



## ENCAPSULAMENTO DE AROMAS EM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NATURAIS

Maíra Taynara Santos da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro

Julho de 2018

ENCAPSULAMENTO DE AROMAS EM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS  
NATURAIS

Maíra Taynara Santos da Silva

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Rosana Lopes Lima Fialho, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Cesar Costapinto Santana, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2018

Silva, Maíra Taynara Santos da

Encapsulamento de aromas em micropartículas poliméricas naturais / Maíra Taynara Santos da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XXIV, 218 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 184-213

1. Encapsulamento. 2. Polímeros naturais. 3. Aromas. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Em seu coração o homem planeja o seu  
caminho, mas o Senhor determina os seus  
passos.”*

*(Provérbios 16)*

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão dessa etapa não quer dizer o final de tudo, mas o início de uma nova jornada de desafios ao desconhecido e conquista de novos horizontes. Os méritos desse documento não são totalmente dedicados a mim, assim, gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que participaram junto comigo no desenvolvimento deste trabalho.

Quero agradecer a Deus por em todo tempo ter me sustentado, como eu sempre falo: EBENEZER, até aqui o Senhor nos sustentou.

A minha família “buscapé” não poderia faltar, quero agradecer a minha mãe, Rosângela e ao meu padrasto, Everaldo por toda forma que dada todo esse tempo. As minhas tias, Sandra e Rosângela por sempre acreditarem em mim e me apoiaram na minha decisão de sair pra estudar. Aos meus primos que sempre estiveram perto torcendo por mim. A Simone, Marcelo, que sempre incentivaram que eu desbravasse o mundo a fora, acreditando no meu potencial. A minha dinda, Sônia por toda ajuda sempre.

Sou imensamente grata ao meu orientador José Carlos, por toda paciência, dedicação e ensinamentos, sempre nos encorajando a seguir. Quero dizer que foi um referencial acadêmico pra mim e que levarei muitas qualidades encontradas e você.

A Claudio Bastos, que me deu oportunidade de me desenvolver e por todas as conversas e conselhos.

Quero agradecer as melhores companhias que você pode imaginar dentro desses anos, as “Neds e Divas” (Luciana, Thamires, Izabella, Debs, Ray, Mari) porque foi isso que sempre fomos. A todas por toda paciência em minhas TPM’s (queria um emoji). Quero agradecer a Lu por toda força e encorajamento que sempre meu e discussões filosóficas registradas na frase: “tem que ter inteligência emocional, minha filha”. A Thamis, por toda disponibilidade em ajudar, seja lá como for (mesmo apagando tudo e dizendo que tá ruim (rs)). A Debs, por sempre está ali por perto ajeitando e analisando um jeito de melhorar as coisas e dispostas a encarar situações pra nos ajudar. A Ray, que apesar de longe hoje, fez muitas faltas nas nossas discussões acadêmicas e boas risadas da minha mão. A Iza, mãezona, passando sempre uma paz e uma calma fora do comum.

E a Mari que nos abandonou, mas está de volta para tricotarmos, acima de tudo sobre cores nudes (rs). Meninas eu amo vocês de verdade e as coisas seriam muito mais difíceis sem vocês. Obrigada.

A Larissa, Natalie, por todo apoio e tudo que vocês fizeram pra me ajudar como puderam, sou muito grata. Sem vocês, o nosso laboratório não funcionaria. E à TODOS os amigos do I-140 e EngePol, pelos bons momentos no laboratório, inúmeras discussões e aprendizagem. Ao Ricardo e a Natasha, por estarem a frente das burocracias. Obrigada a vocês todos por tornarem o nosso local de trabalho mais divertido! Tenho que agradecer a Rafael, por toda ajuda e braço que nos dá. Ainda tenho que agradecer ao Gabriel (vugo mozão, rs), nos últimos 45 min, pra emprestar o carro pra entregar a tese, kkk

Quero agradecer a todos meus amigos os de longe e os de perto que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em minhas decisões, como Dani, Aryanne, Acenini e Vanessa.

Aos amigos que fiz no Rio de Janeiro, através da Bola de Neve, que estiveram sempre me dando os melhores conselhos e foram as melhores companhias e estiveram sempre torcendo para que tudo isso se concretizasse. Não vou citar todos por que são muitos, mas ai vão alguns: Deisy, Luanda, Gabi, Gabi Rocha, Renan, Carol, Leandrinho, Livia, Silvia entre outros e muitos outros. Em especial, a Jessica que durante esse tempo não foi somente uma amiga, mas uma irmã que Deus me presenteou para estar do meu lado pra me “suportar” em amor mesmo com todas minhas mudanças de humor. Obrigada por ser companhia nos momentos felizes, nos de tensão, de raiva, de dor, as vezes sem dizer nada, mas com um abraço e uma palavra sempre disponível. Obrigada por todas suas orações e cuidado (fazendo comida, fazendo unhas, limpando coisas, entre outros, rs). Amo você, zé!

Ao PEQ/COPPE/UFRJ, por me proporcionar a oportunidade de qualificação e desenvolvimento em minha profissão.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## ENCAPSULAMENTO DE AROMAS EM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS NATURAIS

Maíra Taynara Santos da Silva

Julho/2018

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

Biopolímeros são usualmente biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos, apresentando potencial para a produção de partículas para uso em humanos. Em particular, a gelatina é uma proteína de origem natural, de baixo custo e alta disponibilidade, sendo por isso um material promissor para a formação de micropartículas em aplicações médicas, farmacêuticas e da indústria de alimentos, com grau de purificação adequado. Os polissacarídeos também se destacam por apresentarem propriedades semelhantes. No entanto, alguns materiais obtidos a partir dessas matrizes apresentam como inconveniente a alta solubilidade em água em distintas condições, o que limita as aplicações das partículas em meios aquosos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar o uso de agentes reticulantes não tóxicos e o efeito do tempo de reação sobre a redução da solubilidade das matrizes e encapsulamento de aromas. Os resultados mostraram que ao longo do tempo de reticulação ocorrem variações na viscosidade do meio, tamanho e resistência térmica das partículas obtidas da reação em suspensão inversa. Observou-se que os agentes reticulantes podem exercer influência sobre as propriedades finais das matrizes estudadas e dependem fortemente do tempo de reação. Dados experimentais obtidos mostraram que o emprego de óleos essenciais (laranja, manjeriço, canela e citronela) no processo de encapsulamento *in situ* pode influenciar bastante a formação e morfologia das partículas. Os resultados de eficiência de encapsulamento indicaram a presença dos compostos de interesse dentro da partícula, revelando um produto com características promissoras para o encapsulamento ativos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

ENCAPSULATION OF AROMAS IN NATURAL POLYMERIC  
MICROPARTICLES

Maíra Taynara Santos da Silva

July/2018

Advisor: José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

Biopolymers are usually biocompatible, biodegradable and non-toxic, presenting potential for the production of particles for use in humans. In particular, gelatine is a naturally occurring, low-cost and highly available protein and is therefore a promising material for the formation of microparticles in medical, pharmaceutical and food industry applications with a suitable degree of purification. Polysaccharides also stand out because they have similar properties. However, some materials obtained from such matrices have the disadvantage of high solubility in water, which limits the applications of the particles in aqueous media. Thus, the present work aims to study the use of non-toxic crosslinking agents and the effect of reaction time on the reduction of matrix solubility and encapsulation of aromas. The results showed that during the crosslinking time variations occur in dispersed phase viscosity, size and thermal resistance of the particles obtained from the reverse suspension reaction. It has been observed that the crosslinking agents may exert little or great influence on the final properties of the matrices studied and strongly depend on the reaction time. On the other hand, experimental data showed that the use of essential oils in the *in situ* encapsulation process can greatly influence the formation and morphology of the particles. The results of encapsulation efficiency indicated the presence of the compounds of interest, with increased encapsulation efficiency throughout the reaction.



## Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xxii
<i>Capítulo I</i> .....	<i>1</i>
Introdução .....	1
1.1 - Motivação .....	1
1.2 - Objetivos .....	4
1.2.1 Objetivos específicos .....	4
1.3 – Originalidade e relevância .....	5
1.4 - Estrutura da tese .....	5
<i>Capítulo II</i> .....	<i>7</i>
Revisão Bibliográfica.....	7
2.1 - Aromas .....	7
2.2.1. Óleos essenciais .....	10
2.2 - Polímeros Naturais.....	11
2.2.1 Proteínas.....	14
2.2.1.1 Gelatinas .....	16
2.2.2 Polissacarídeos.....	29
2.2.2.1 Amido .....	30
2.3- Encapsulação .....	40
2.3.1 Encapsulamento de Aromas.....	47
2.3.2. Uso de Polímeros Naturais para Encapsulamento .....	50
2.4- Suspensão Inversa e Gelificação .....	54
2.5- Comentários Finais.....	55
<i>Capítulo III</i> .....	<i>57</i>
Materiais e Métodos.....	57
3.1 Material.....	57
3.2 Métodos .....	59
3.2.1 Reações .....	59
3.3 Caracterização .....	61

3.3.1	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	61
3.3.2	Distribuição de Tamanhos de Partículas (Malvern) .....	62
3.3.3	Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT).....	62
3.3.4	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	62
3.3.5	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).....	62
3.3.6	Caracterização Reológica .....	63
3.3.7	Microscopia Óptica.....	63
3.3.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	64
3.3.9	Tensão superficial (TS).....	64
3.3.10	Eficiência de Encapsulamento .....	64
3.3.11	Teste de liberação .....	65
<i>Capítulo IV</i>	.....	<i>66</i>
Resultados e Discussões .....		66
4.1 – Primeiro Bloco de Reações – Efeito da variação de íons .....		66
4.1.1 Reações Conduzidas com Controle de pH.....		67
4.1.1.1 Reação com formaldeído.....		68
4.1.1.2 Reações em meio ácido .....		73
4.1.1.3 Reações em meios alcalino .....		77
4.2 – Segundo Bloco de Reações – Efeito do Tempo.....		83
4.2.1 Reações Conduzidas por Tempos Maiores .....		83
4.2.2 Reação Conduzida na Ausência de Glicose.....		104
4.2.3 Avaliação da concentração de íons no meio de reação.....		112
4.3 - Terceiro Bloco de Reações - Efeito da adição de extratos aromáticos .....		112
4.3.1 Reação com Extratos Aromáticos.....		113
4.4 - Reações com Óleos Essenciais Aromáticos .....		128
4.4.1 Caracterização dos Óleos Essenciais .....		129
4.4.2 Reações de Encapsulação de Óleos Essenciais Comerciais		138
4.4.2.1 Reações com Óleo Essencial de Laranja.....		139

4.4.2.2	Reação com Óleo Essencial de Manjeriçãõ .....	146
4.4.2.3	Reação com Óleo Essencial de Canela .....	152
4.4.2.4	Reação com Óleo Essencial de Citronela .....	157
4.5	Eficiência de Encapsulamento dos Óleos Essenciais .....	164
4.6	Ensaio de Liberação dos Óleos Essenciais .....	166
4.6	Desenvolvimento de Partículas de Amido.....	167
<i>Capítulo V.....</i>		<i>181</i>
	Conclusões e sugestões .....	181
	5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	183
<i>Capítulo VI.....</i>		<i>184</i>
	Referências Bibliográficas .....	184
<i>Apêndice A.....</i>		<i>214</i>
<i>Caracterização da gelatina PhEur .....</i>		<i>214</i>
<i>Apêndice B.....</i>		<i>216</i>
	Avaliação da quantidade de íons na água .....	216

## Lista de Figuras

Figura 2. 1. Evolução do número de publicações relacionada ao tema “Polímero Natural” no período de 1970 a 2017 (dados obtidos da base de dados online Scopus em janeiro de 2018). .....	12
Figura 2. 2. Número de publicações refinada para tipos de polímeros naturais.....	13
Figura 2. 3. Número de trabalhos publicados no período de 1970 à 2017 (obtidos da base de dados online Scopus, Janeiro de 2018; palavras – chave: gelatina, partículas, micropartículas, microcápsulas e esferas). .....	14
Figura 2. 4. Representação esquemática da formação de polipeptídios. ....	15
Figura 2. 5. Estrutura genérica básica da gelatina. ....	18
Figura 2. 6. Composição característica dos aminoácidos que constituem gelatinas comerciais (Gelatin PhEur) (WAY, 2013).....	19
Figura 2. 7. Representação esquemática da estrutura de um hidrogel.....	21
Figura 2. 8. Representação esquemática de hidrogéis químicos e físicos. ....	22
Figura 2. 9. Representação esquemática da reação de formação de base de <i>Schiff</i> .....	24
Figura 2. 10. Esquema da formação de géis iônicos. ....	27
Figura 2. 11. Esquema da reação de reticulação utilizando açúcar como agente de ligação. Adaptado de DIGENIS <i>et al.</i> (1994). ....	28
Figura 2. 12. Estrutura química e conformação esquemática dos principais componentes do amido e sua representação do esquema da conformação: amilose (a) e amilopectina (b). Adaptado de BELGACEM e GANDINI (2008). ....	30
Figura 2. 13. Representação esquemática do grânulo do amido e a visualização da estrutura interna e das regiões cristalinas e amorfas. Adaptado de PARKER & RING (2001).....	32

Figura 2. 14. Esquema proposto para reações de reticulação a) intermoleculares e b) intramoleculares (ROSENTHAL e ESPINDOLA, 1982).....	36
Figura 2. 15. Mecanismo esquemático da reação de reticulação do amido: a) quebra do grupo OH; b) formação das redes reticuladas (KUNIAK e MARCHESSAULT, 1972). .....	38
Figura 2. 16. Modelo esquemático de cápsula (A) e matriz (B).....	43
Figura 2. 17. Evolução do número de publicações referentes ao tema encapsulamento.....	49
Figura 3. 1. Esquema ilustrativo das etapas reacionais. ....	61
Figura 4. 1. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas da reação R5 conduzida na presença de formaldeído. ....	69
Figura 4. 2 Termograma de TGA de partículas de gelatina obtidas da reação R5, conduzidas na presença de formaldeído.....	70
Figura 4. 3. Micrografias das partículas de gelatina obtidas da reação R5 conduzida na presença de formaldeído: a) 30 min e b) 3 horas.....	72
Figura 4. 4. Teste de solubilidade qualitativo das partículas de gelatina obtidas da reação R5 (5 horas) na presença de formaldeído. ....	73
Figura 4. 5. Material obtido da reação realizada em pH 3 com ácido fosfórico (Reação R2 na Tabela 4. 1).....	73
Figura 4. 6. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas em reação conduzida em meio ácido (pH 3,0) com HCl (Reação R1 na Tabela 4. 1).....	75
Figura 4. 7. Micrografias das partículas de gelatina obtidas a partir da reação conduzida em meio ácido (pH 3,0) com HCl: a) 30 min e b) 3 horas. ....	76

Figura 4. 8. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas nas reação realizada em meio alcalino (pH 9,0) com NaOH (Reação R3 na Tabela 4. 1).	78
Figura 4. 9. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas da reação em meio alcalino utilizando $\text{Ca(OH)}_2$ como solução de ajuste (Reação R4 na Tabela 4. 1).	79
Figura 4. 10. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação em meio alcalino (NaOH): a) 30 mim e b) 3 horas.	80
Figura 4. 11. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação em meio alcalino ( $\text{Ca(OH)}_2$ ): a) 0 min, b) 30 min, c) 2 horas e d) 3 horas.	81
Figura 4. 12. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão em meio alcalino utilizando $\text{Ca(OH)}_2$ por 5 horas.	84
Figura 4. 13. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas.	85
Figura 4. 14. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação conduzida em meio alcalino ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) por 5 horas: a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas e) 5 horas.	87
Figura 4. 15. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas, sendo a) 0 min, b) 30 min, c) 3 horas, d) 5 horas.	88
Figura 4. 16. Micrografias de MEV das partículas de gelatinas obtidas na reação conduzida em meio básico com $\text{Ca(OH)}_2$ : a) 5 min, b) 3 horas, c) 5 horas.	91
Figura 4. 17. Micrografias de MEV das partículas de gelatina obtidas na reação padrão: a) 30 min, b) 3 horas e c) 5 horas.	92
Figura 4. 18. Distribuições de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 10 horas com velocidade de agitação de 1000 rpm.	93
Figura 4. 19. Micrografias das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 10 horas da reação padrão com velocidade de agitação de 1000 rpm: a) 5h, b) 6h, c) 7 h, d) 8h, e) 9h, f) 10h.	94

Figura 4. 20. Termogramas de TGA de partículas de gelatina reticuladas obtidas na reação com controle de pH ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ): a) decomposição térmica (TGA); b) derivada da curva de TGA (DTG). .....	96
Figura 4. 21. Termogramas de TGA de partículas de gelatina obtidas na reação padrão: a) decomposição térmica; b) derivada da curva de TGA (DTG). .....	96
Figura 4. 22. Modelo esquemático de distribuição de domínios morfológicos de matriz de gelatina: à esquerda, amostras obtidas no início da reação; à direita, amostras obtidas no final da reação. ....	97
Figura 4. 23. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina em diferentes condições de reação. ....	99
Figura 4. 24. Perfis de tensão superficial da reação padrão comparado com a gelatina. ....	100
Figura 4. 25. Espectros de FTIR de amostras de partícula de gelatina obtidas da reação padrão tratadas com agente de reticulação; a) espectros originais e b) espectros de correlação 0 e 5h. ....	102
Figura 4. 26. Mudança de cor resultante da reação do tratamento térmico; (A) 1 hora e (B) 5 horas .....	103
Figura 4. 27. Avaliação qualitativa da solubilidade em água .....	104
Figura 4. 28. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina obtidas na reação na ausência de glicose. ....	105
Figura 4. 29. Micrografias das partículas de gelatina obtidas na reação conduzidas na ausência de glicose: <b>a)</b> 0 min, <b>b)</b> 30 min, <b>c)</b> 3 horas e <b>d)</b> 5 horas. ....	107
Figura 4. 30. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas na reação conduzida na ausência de glicose: <b>a)</b> 3 horas e <b>b)</b> 5 horas. ....	108

Figura 4. 31. Termogramas de TGA de partículas de gelatina obtidas em reação realizada na ausência de glicose <b>a)</b> decomposição térmica (TG); <b>b)</b> derivada da decomposição térmica (DTG) .....	109
Figura 4. 32. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas com e sem glicose. .	110
Figura 4. 33. Espectros de FTIR de amostras de partículas de gelatina obtidas da reação na ausência de glicose; a) espectro original das partículas no tempo inicial e final e b) correlação dos espectros de FTIR de amostras tratadas po 0 hr e 5hrs. ....	111
Figura 4. 34. Estrutura molecular do citral .....	114
Figura 4. 35. Distribuições dos tamanhos das partículas de gelatina de reações conduzidas com extrato natural de erva cidreira. A) sem controle de pH; b) com controle de pH (Ca(OH) <sub>2</sub> ). .	115
Figura 4. 36. Micrografias de partículas de gelatina preparadas com extrato natural de erva cidreira na reação conduzida sem controle de pH: <b>a)</b> 30 min; <b>c)</b> 3 horas.....	116
Figura 4. 37. Micrografias de partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato natural de erva cidreira em pH 9,0 (Ca(OH) <sub>2</sub> ): a) 30 min e b) 3 horas. ....	116
Figura 4. 38. Micrografias de MEV de partículas de gelatina produzidas com extrato natural de erva cidreira no final da reação (3 horas) em pH 9. ....	117
Figura 4. 39. Estrutura molecular do limoneno. ....	118
Figura 4. 40. Distribuições dos tamanhos de partícula de gelatina em reações conduzidas com extrato de laranja ao longo do tempo; a) até 3hrs, b) 5hrs.....	118
Figura 4. 41. Micrografias das partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de casca de laranja: <b>a)</b> 30 min, <b>b)</b> 2 horas, <b>c)</b> 3 horas e <b>d)</b> 5 horas. ....	119
Figura 4. 42. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas em reações conduzidas com extrato de casca de laranja: <b>a)</b> 3 horas e <b>b)</b> 5 horas. ....	120
Figura 4. 43. Estrutura molecular do cinamaldeído.....	121



Figura 4. 44. Distribuições de tamanhos de partícula de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato natural de canela. ....	122
Figura 4. 45. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato natural de canela: <b>a)</b> 30 min <b>b)</b> 1 hora <b>c)</b> 3 horas <b>d)</b> 5 horas.....	123
Figura 4. 46. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas no final em reação conduzida em presença de extrato de canela: <b>a)</b> 3 horas e <b>b)</b> 5 horas. ....	124
Figura 4. 47. Estrutura do mentol. ....	125
Figura 4. 48. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com extratos natural de hortelã.....	126
Figura 4. 49. Micrografia de gelatina obtidas na reação conduzida com extrato natural de hortelã em pH 9: <b>a)</b> 0 min; <b>b)</b> 30 min; <b>c)</b> 3 horas e <b>d)</b> 5 horas. ....	127
Figura 4. 50. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de hortelã ao longo do tempo: a) 3 horas e b) 5 horas.....	127
Figura 4. 51. Cromatograma dos principais constituintes do óleo essencial de laranja. ....	130
Figura 4. 52. Cromatograma dos principais constituintes do óleo essencial de manjeriço. .	132
Figura 4. 53. Cromatograma dos principais constituintes do óleo de citronela.....	135
Figura 4. 54. Espectros de FTIR dos óleos essenciais: óleo de laranja, manjeriço, canela e citronela .....	136
Figura 4. 55. Termograma de TGA e DTG dos óleos essencial aromáticos .....	138
Figura 4. 56. Distribuições de tamanho de partícula de gelatina obtidas em reação com óleo de laranja comercial ao longo do tempo.....	140
Figura 4. 57. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação com óleo de laranja comercial: a) 3 h de reação e b) 5h de reação.....	141

Figura 4. 58. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja comercial no final da reação (5 horas).....	141
Figura 4. 59. TGA das partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja comercial em diferentes tempos de reação.....	142
Figura 4. 60. Perfis de viscosidade da reação conduzida com óleo de laranja comercial e da reação padrão.....	144
Figura 4. 61. Perfis de viscosidade dinâmica de soluções de gelatina tratadas na presença de óleo essencial de laranja e usando o dobro da quantidade de glicose. ....	145
Figura 4. 62. Perfis de tensão superficial das soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja.....	146
Figura 4. 63. Distribuições de tamanhos de partículas de gelatina produzida em reação conduzida com óleo de manjeriço comercial.....	147
Figura 4. 64. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas na presença de óleo de manjeriço comercial e na condição padrão.....	148
Figura 4. 65. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com óleo de manjeriço comercial: a) 3 horas e b) 5 horas. ....	149
Figura 4. 66. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas em reação conduzida com óleo essencial de manjeriço comercial (5 horas). ....	149
Figura 4. 67. Termograma de TGA das partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com adição de óleo de manjeriço comercial.....	150
Figura 4. 68. Perfis de tensão superficial de misturas de gelatina preparadas com óleo essencial de manjeriço comercial e na condição padrão. ....	151
Figura 4. 69. Formação de filme em soluções de gelatina preparadas com óleo de manjeriço comercial durante ensaios de tensão superficial.....	151

Figura 4. 70. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial. ....	152
Figura 4. 71. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas com óleo de canela comercial na condição padrão. ....	153
Figura 4. 72. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com óleo essencial de canela comercial. A) 3 hrs e B) 5 hrs. ....	154
Figura 4. 73. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial. ....	155
Figura 4. 74. Termograma de TGA das partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial e na condição padrão. ....	156
Figura 4. 75. Perfis de tensão superficial de soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial e na condição padrão.....	157
Figura 4. 76. Perfis de Distribuições de tamanhos das partículas de gelatina obtidas em reação com óleo de citronela comercial.....	158
Figura 4. 77. Perfis de viscosidade das soluções de gelatina preparadas com óleo de citronela comercial e na condição padrão.....	159
Figura 4. 78. Micrografias de partículas de gelatina preparadas em reação com óleo de citronela comercial em diferentes tempos. a) 3h e a) 5h .....	160
Figura 4. 79. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas na presença de óleo de citronela comercial. ....	160
Figura 4. 80. Termograma de TGA de partículas de gelatina preparadas com óleo de citronela comercial e na condição padrão.....	161
Figura 4. 81. Perfis de tensão superficial de soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de citronela comercial e na condição padrão.....	162

Figura 4. 82. Porcentagem em área cromatográfica dos compostos majoritários dos óleos essenciais nas partículas de gelatina para diferentes tempos de reação. ....	166
Figura 4. 83. Ensaio de liberação em partículas de gelatina dopadas com óleo de citronela em 1 hora de reação. ....	167
Figura 4. 84. Ensaio de liberação de partículas de gelatina dopadas com óleo de manjeriço em 5 horas de reação. ....	167
Figura 4. 85. Distribuições de tamanhos de partícula de amido produzidas ao longo do tempo da reação A1. ....	169
Figura 4. 86. Micrografias de partículas de amido obtidas nas condições da reação A1: a) 0 min, b) 30 min, c) 3 horas e d) 5 horas. ....	171
Figura 4. 87. Micrografias de MEV de partículas de amido obtidas após 5 horas da reação A1. ....	171
Figura 4. 88. Distribuições de tamanhos de partícula de amido obtidas da reação A2. ....	173
Figura 4. 89. Micrografias das partículas de amido obtidas ao longo do tempo da reação A2: <b>a)</b> 0 min, <b>b)</b> 30 min, <b>c)</b> 3 horas e <b>d)</b> 5 horas. ....	174
Figura 4. 90. Micrografias de MEV das partículas de amido obtidas da reação A2: <b>a)</b> 30 min e <b>b)</b> 5 horas. ....	175
Figura 4. 91. Termogramas de TGA de partículas de amido obtidas na reação A2. ....	176
Figura 4. 92. Distribuições de tamanhos de partícula de amido obtidas da reação A3. ....	177
Figura 4. 93. Micrografias das partículas de amido obtidas a partir da reação A3. ....	178
Figura 4. 94 Termogramas de TGA de partículas de amido obtidas na reação A3. ....	179
Figura 4. 95. Micrografias de partículas de amido em água para avaliação de solubilidade. ....	179

Figura 4. 96. Perfil de distribuição de tamanho de partículas de gelatina obtidos de reações com água deionizada ao longo do tempo. ....	216
Figura 4. 97. Imagens de microscopia optica de particulas de gelatina obtidas de reações com água deionizada ao longo do tempo. ....	216
Figura 4. 98. Perfil de distribuição de tamanho de partícula de gelatina de reações com a água destilada ao longo. ....	217
Figura 4. 99. Imagens de microscopia optica de particulas de gelatina obtidas de reações com água destilada ao longo do tempo.....	217
Figura 4. 100. Perfil de distribuição de tamanho de partícula de gelatina de reações com água da torneira ao longo do tempo. ....	218
Figura 4. 101. Imagens de microscopia optica de particulas de gelatina obtidas de reações com água da torneira ao longo do tempo.....	218

## Lista de Tabelas

Tabela 2. 1. Principais aplicações industriais de amido (ELLIS <i>et al.</i> , 1998).....	34
Tabela 2. 2. Propriedade e composição de grânulos de amido (SWINKELS, 1985).....	39
Tabela 2. 3. Métodos clássicos de preparação de micro e nanopartículas.....	46
Tabela 3. 1. Composição base do meio reacional usada para o preparo de partículas de gelatina (Reação padrão).....	60
Tabela 4. 1. Condições dos ensaios realizados.....	67
Tabela 4. 2. Tamanho médio e índice de polidispersão de partículas obtidas na reação conduzida na presença e formaldeído. ....	69
Tabela 4. 3 Perda de peso em estágios distintos de degradação de amostras de partículas de gelatina obtidas de reações conduzidas com formaldeído.....	71
Tabela 4. 4. Tamanho médio das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida em meio alcalino com NaOH. ....	78
Tabela 4. 5. Tamanho médio das partículas de gelatina obtidas da reação em meio alcalino com Ca(OH) <sub>2</sub> . ....	79
Tabela 4. 6. Condição das reações realizadas por tempos maiores. ....	83
Tabela 4. 7. Tamanho médio das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida por 5 horas em meio alcalino com Ca(OH) <sub>2</sub> .....	84
Tabela 4. 8. Tamanho médio das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas. ....	85
Tabela 4. 9. Resultados referentes às análises de RMN-DT de amostras de partículas de gelatina obtidas no início e no final da reação padrão (R6). ....	98
Tabela 4. 10. Descrição das principais bandas de FTIR encontradas em proteínas. ....	101

Tabela 4. 11. Tamanho médio das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida na ausência de glicose .....	106
Tabela 4. 12. Condições operacionais usadas para o preparo das partículas de gelatina dopadas com extratos aromáticos. ....	113
Tabela 4. 13. Diâmetros médios das partículas de gelatina ao longo do tempo em reação conduzidas com extrato de erva cidreira e controle de pH. ....	115
Tabela 4. 14. Tamanhos médios de partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de canela. ....	122
Tabela 4. 15. Tamanhos médios de partícula de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato de hortelã. ....	126
Tabela 4. 16. Tabela das reações realizadas com óleo essenciais caracterizados .....	129
Tabela 4. 17. Compostos químicos identificados no óleo essencial de laranja por CG-MS. .	131
Tabela 4. 18. Compostos identificados no óleo essencial de manjerição por CG-MS. ....	132
Tabela 4. 19. Compostos identificados no óleo essencial de canela por GC-MS .....	133
Tabela 4. 20. Compostos identificados no óleo essencial de citronela por CG-MS. ....	134
Tabela 4. 21. Perda de massa de cada estágio de degradação dos óleos essenciais .....	138
Tabela 4. 22. Porcentagem em área cromatográfica dos principais componentes dos óleos essenciais extraídos das partículas de gelatina em função do tempo. ....	165
Tabela 4. 23. Condição das reações conduzidas com amido. ....	168
Tabela 4. 24. Diâmetro médio das partículas de amido obtidas na reação A1. ....	169
Tabela 4. 25. Diâmetro médio das partículas de amido ao longo do tempo da reação A2. ....	173
Tabela 4. 26. Diâmetro médio e índice de polidispersão de partículas de amido ao longo do tempo da reação A3. ....	177

Tabela 4. 27. Massa molar da gelatina comerciais (PhEur) obtidas através de análise de GPC  
.....214

Tabela 4. 28. Resultados da análise de composição de aminoácidos da gelatina comerciais 215



# *Capítulo I*

## *Introdução*

### **1.1 - Motivação**

Biopolímeros<sup>1</sup> usualmente, são materiais biodegradáveis<sup>2</sup>, biocompatíveis<sup>3</sup> e não tóxicos, apresentam alto potencial para uso em aplicações de produção de embalagens plásticas, géis, adesivos, filmes, suporte para adesão celular e de partículas, que podem ser usadas como veículos em que substâncias podem ser encapsuladas (NIAOUNAKIS, 2015). Particularmente, polímeros naturais constituíram padrões em que se basearam muitos pesquisadores para formular materiais similares sintéticos (MANO e MENDES, 1999).

Dentre os diversos tipos de biopolímero, as classes dos polissacarídeos e das proteínas merecem destaque por causa da alta disponibilidade, baixo custo e ampla aplicação industrial (ARAVAMUDHAN *et al.*, 2014). Estes materiais podem ser considerados como candidatos promissores para uso como matrizes para produção de microcápsulas, por conta da boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta versatilidade química (GU e BURGESS, 2014).

É importante ressaltar que macromoléculas biológicas constituem sistemas de extrema complexidade, sendo necessários estudos mais aprofundados em relação particularmente ao fato de apresentarem alta solubilidade em água, que impede algumas aplicações práticas

---

<sup>1</sup> Polímeros produzidos na natureza a partir dos ciclos de crescimento de organismos vivos; assim, também são chamados de polímeros naturais. Síntese desses materiais envolve geralmente reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (IUPAC 2014).

<sup>2</sup> Biodegradabilidade pode ser definida como quebra de uma substância catalisada por enzimas *in vitro* ou *in vivo*. Além disso, pode ser considerada a quebra completa de um composto para moléculas mais simples totalmente oxidadas ou reduzidas (dióxido de carbono, metano, nitrato, amônio e água) quando expostos no ambiente (IUPAC, 2014).

<sup>3</sup> Biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material em ser compatível com tecidos vivos, em especial, o corpo humano.

(CORREIA *et al.*, 2013). Alguns exemplos relacionados a aplicações que despertam muito interesse são os sistemas de liberação de fármacos e as embalagens inteligentes, em que a rápida solubilização em meio aquoso limita o escopo da utilização desses materiais (ESPOSITO *et al.*, 1996). Por conta desse problema, é de grande interesse desenvolver estudos a respeito da reticulação de biopolímeros e, conseqüentemente, sobre a redução da solubilidade desses materiais em água (YOUNG *et al.*, 2005).

Reações de *crosslinking*, chamadas também de reações de reticulação ou de ligações cruzadas, podem ser promovidas por meios químicos ou físicos e causam formação de modificações moleculares que impactam tanto a resistência mecânica quanto a resistência à água (WILLIAMS, 2007). Diversos trabalhos têm reportado técnicas para a reticulação de polímeros naturais, embora a maior parte da literatura empregue compostos tóxicos para promover a reticulação destes materiais, como formaldeído e glutaraldeído (AMADORI *et al.*, 2015; GARAVANDI *et al.*, 2017). Assim, preocupações relacionadas à toxicidade dos materiais impulsionam a busca por novas substâncias reticulantes e novos processos de reticulação.

Os poucos estudos publicados e disponíveis mostram que o processo de reticulação das gelatinas naturais ainda é pouco compreendido e que o desenvolvimento de novos processos é ainda necessário. Isso é particularmente verdadeiro quando se almeja a reticulação para o desenvolvimento de aplicações relacionadas à preparação de partículas e películas plásticas biodegradáveis e resistentes à água, como requerido pela indústria farmacêutica e de alimentos (MATALANIS *et al.*, 2011).

Dentre os usos pretendidos para os materiais naturais, ressalta-se o encapsulamento de aromas. Os aromas e as fragrâncias, também chamados de *flavor*, são substâncias simples e voláteis, muito importantes em diversos campos industriais (SURBURG e PANTEN, 2006). O sabor desempenha um papel importante na satisfação do consumidor e influencia o consumo de alimentos. Entre os produtos em que o “cheiro” exerce um grande diferencial, podem ser citados os cosméticos, perfumes e os produtos de limpeza. O problema do controle da estabilidade de aromas tem por isso sido alvo de diversas pesquisas. Os processos de fabricação e de armazenamento dos aromas também podem causar modificações das propriedades desses

compostos, reduzindo a intensidade do aroma ou originando componentes que apresentam aroma desagradável (FENG *et al.*, 2009).

A importância do *flavor* para a satisfação e qualidade de vários produtos suscitou atenção considerável para ao processo de encapsulamento de aromas, devido à instabilidade dos sabores e odores voláteis (MADENE *et al.*, 2006). Esse processo tem o objetivo de proteger os compostos da degradação e da volatilização, limitando a perda e induzindo a melhoria da retenção, prolongando o efeito desejado. Além disso, pode permitir a liberação controlada desses compostos (LAKKIS, 2007).

Nos últimos anos, foi observado que nanopartículas e micropartículas poliméricas apresentam potencial para a proteção e liberação controlada de vários compostos encapsulados, desde que os materiais tenham características adequadas (BENITA, 2006; MENDES *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2016). Dentre os materiais utilizados para o encapsulamento, os hidrogéis vêm sendo bastante utilizados para encapsulamento de compostos, como maior parte dos extratos aromáticos (PEPPAS *et al.*, 2000). Destacam-se dentre estes compostos a gelatina, o amido, a quitosana entre outros, por apresentarem inúmeras vantagens comparativas como o baixo potencial alergênico, o baixo custo, alta disponibilidade e a boa biodegradabilidade (LAKKIS, 2007; MOHANTY e BOHIDAR, 2003).

Alguns estudos disponíveis na literatura têm reportado a possível interação entre a gelatina e glicose, sugerindo a atuação deste como possível agente de reticulação (CORTESE *et al.*, 1998; DIGENIS *et al.*, 1994). No entanto, trabalhos realizados no Engapol indicaram que, em reações conduzidas em tempos curtos (até 30 min), não foi observada qualquer mudança significativa que indique de forma inequívoca a reticulação das partículas de gelatina por glicose (WAY, 2013).

Diante de todos esses aspectos, parece clara a necessidade de conduzir estudos mais aprofundados sobre a reticulação de macromoléculas naturais com ajustes em variáveis que podem exercer grande influência nessas ligações, como é o caso do tempo. Com isso, torna-se possível potencializar o uso de nanopartículas e micropartículas poliméricas. Particularmente, é importante produzir características e propriedades que sejam desejáveis para o possível emprego no encapsulamento de extratos aromáticos.

Assim, o presente estudo tem o objetivo de desenvolver partículas poliméricas a partir de polímeros naturais, visando ao encapsulamento de extratos aromáticos naturais. Inicialmente foi estudado o processo de reticulação das matrizes poliméricas naturais com o emprego de reticulante não tóxico, a fim de obter as partículas desejadas. Essa etapa foi realizada por meio da condução de reações em suspensão inversa, variando algumas das condições reacionais. Além da etapa de produção, buscou-se compreender se as condições de operação afetavam a estrutura molecular das cadeias poliméricas e a morfologia das partículas produzidas. Avaliou-se também a influência morfológica exercida sobre as partículas pelos extratos aromáticos encapsulados *in-situ* em algumas das matrizes utilizadas.

### **1.2 - Objetivos**

O objetivo principal desse estudo foi o desenvolvimento de partículas poliméricas reticuladas a partir de polímeros naturais, por meio de reações em suspensão inversa, com a posterior avaliação do uso dessas partículas para o encapsulamento de extratos naturais aromáticos.

#### **1.2.1 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos perseguidos nesse estudo foram:

- Obter partículas poliméricas reticuladas a partir de polímeros natural, a gelatina e amido, por meio de reações em suspensão inversa.
- Estudar o processo de reticulação com agente reticulante não tóxico, a glicose;
- Caracterizar as propriedades morfológicas, físico-químicas, reológicas e térmicas das partículas reticuladas e dos materiais produzidos.
- Avaliar o potencial de aplicação das partículas de gelatina para o encapsulamento de extratos aromáticos naturais.
- Caracterizar as partículas dopadas com aromas encapsulados por diferentes técnicas, para definir a eficiência de retenção e liberação em meio aquoso.

### **1.3 – Originalidade e relevância**

O estudo aqui apresentado é original em vários aspectos. Em primeiro lugar, caracteriza de forma mais clara o papel da glicose como agente reticulante de matrizes constituídas por polímeros naturais. Em segundo lugar, descreve pela primeira vez a produção de partículas poliméricas naturais a partir de reações em suspensão inversa. Em terceiro lugar, propõe pela primeira vez o encapsulamento de aromas em micropartículas à base de polímeros naturais, usando processos de suspensão inversa e com encapsulamento *in situ*. Finalmente, é feita pela primeira vez a análise de desempenho dos produtos obtidos, na forma de micropartículas dopadas com aromas, em termos de eficiência de encapsulamento e de liberação de ativos.

### **1.4 - Estrutura da tese**

O presente texto está estruturado em seis capítulos descritos brevemente a seguir. O Capítulo I apresenta uma pequena introdução sobre o tema, e os principais objetivos perseguidos neste estudo. O Capítulo II apresenta uma revisão bibliográfica mais detalhada, destacando os principais trabalhos relacionados à utilização dos polímeros naturais e dando ênfase a processos de reticulação e ao uso destes materiais como matrizes para a produção de micropartículas poliméricas. Além disso, o capítulo ainda descreve sobre o processo de encapsulamento e as principais técnicas empregadas nos últimos anos. Descrevem-se os principais estudos desenvolvidos na área de encapsulamento de aromas. Ao final do capítulo, discute-se sobre o uso de polímeros naturais para encapsulamento de aromas e sobre a técnica de suspensão inversa. No Capítulo III é apresentada a metodologia experimental adotada para produção de micropartículas reticuladas a partir dos polímeros naturais abordados. São descritas também as técnicas de caracterização como medidas de distribuição de tamanhos de partículas (DTP) (por espalhamento de luz), avaliação morfológica por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para avaliar as mudanças ocorridas, análises termogravimétricas (TGA), ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT), avaliação indireta das massas molares por análise reológica, cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) para avaliação do constituintes presentes, além da eficiência de encapsulamento. Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho são apresentados nos capítulos seguintes. No Capítulo IV são apresentados os resultados obtidos

para cada um dos ensaios conduzidos, assim como as caracterizações realizadas. Os resultados foram divididos em 3 blocos principais e ao longo da discussão foram realizadas análises comparativas entre as diferentes condições e técnicas de reticulação investigadas. No primeiro bloco são apresentados os resultados dos ensaios de uma avaliação preliminar do comportamento da reação em diferentes condições. No segundo bloco apresentam-se os principais resultados referentes à obtenção das micropartículas reticuladas. No terceiro bloco são apresentados os primeiros ensaios com aromas extraídos e os ensaios com óleos essenciais. No Capítulo V são apresentadas as conclusões finais encontradas ao longo do trabalho e são formuladas algumas questões que ainda não foram respondidas, mas que incentivam a realização de novos trabalhos nessa linha de pesquisa. Finalmente, no Capítulo VI são apresentadas as referências bibliográficas consultadas no decorrer da investigação. No Apêndice A são apresentados os resultados referentes as caracterizações da gelatina utilizada neste trabalho. No Apêndice B são apresentados um conjunto de testes realizado com águas de diferentes origens (deionizada, destilada, torneira) com a finalidade de avaliar a influência da presença de íons na água sobre o processo de obtenção de partículas de gelatina.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Aberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises de distribuição de tamanho de partícula (DTP), termogravimétricas (TGA) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol). As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Programa de Engenharia Metalúrgica. A análise de ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT) foi realizada no Instituto de Macromoléculas. As análises reológicas e de tensão superficial foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Coloides (EngeCol). Por fim, as análises cromatográficas foram realizadas no Núcleo de Catálise (NUCAT).

## *Capítulo II*

### *Revisão Bibliográfica*

#### **2.1- Aromas**

Aromas são compostos ou mistura de compostos que apresentam propriedades organolépticas, como cheiro e sabor. Os aromas sempre encontraram muitos usos ao longo da história da humanidade. Por exemplo, nos primórdios da civilização os aromas eram usados para diferenciar alimentos estragados e para distinguir as plantas comestíveis das nocivas (AROMAS NATURAIS, 2008). É importante enfatizar que a maioria dos aromas é formada por substâncias químicas orgânicas funcionalizadas, como ésteres, ácidos, cetonas, aldeídos, álcoois, terpenos e moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de microrganismos (REINECCIUS, 2006). Os compostos que constituem aromas geralmente são moléculas orgânicas de baixa massa molar (inferior a 400 Daltons) que, à pressão atmosférica e à temperatura ambiente, apresentam pressão de vapor alta o suficiente para que se encontrem em grande parte no estado vapor, desencadeando estímulos olfativos. Contudo, a intensidade e a qualidade de um aroma não são necessariamente determinadas pelos componentes presentes nas maiores concentrações (MONTEIRO, 1984). Estão catalogadas mais de 3.000 substâncias simples voláteis que podem ser utilizadas para compor os mais variados aromas que existem na natureza e caracterizam diferentes conjuntos de produtos (DOSSIÊ AROMAS, 2009).

Segundo a Resolução nº 104, de 14/05/1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos, podendo ser classificados como aromas naturais ou sintéticos, sendo os primeiros obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos (BRASIL, 1999). Alguns autores apresentam outras definições alternativas em seus trabalhos. Berger (1995) define aroma como a combinação das sensações de sabor e odor produzidas por uma substância ingerida. Christen (1995) define aroma como uma fração volátil percebida por receptores localizados nas fossas nasais e completa que o aroma sempre provoca uma percepção olfato-

gustativa. Em geral, a sensação de odor é estimulada por misturas complexas de moléculas de várias classes químicas que são detectadas por células receptoras do epitélio olfativo, mesmo quando a concentração é muito baixa.

Os aromas e fragrâncias são muito importantes para a indústria química e já foram propostas diferenças para estas denominações. Muitas definições sugerem que o termo fragrância seja reservado para compostos voláteis que encontram aplicações nas indústrias de perfumes e cosméticos, enquanto que o termo aromas seja aplicado exclusivamente na indústria de alimentos (JANSSENS *et al.*, 1988). De maneira similar, o sabor também desempenha um papel importante para satisfação do consumidor de vários produtos. Por exemplo, o aroma influencia muito o consumo de alimentos, afetando o cheiro e o sabor, enquanto em outros produtos o “cheiro” exerce o fator diferencial, como em cosméticos, perfumes e produtos de limpeza. No caso de alimentos, aromatizantes podem ter o mesmo nível de importância que os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas e minerais), devendo ser considerados como componentes essenciais do alimento (AROMAS NATURAIS, 2008). De fato, é amplamente reconhecido que o aroma constitui atributo que influencia de forma decisiva a qualidade e a opção de compra do cliente nas mais variadas áreas (OS AROMAS E OS ALIMENTOS, 2008).

O mercado global de aromas e fragrâncias vem crescendo nos últimos anos. Segundo um relatório feito pela *Grand View Research*, o mercado de aromas e fragrância foi avaliado em 2015 em US\$ 18 bilhões, sendo estimado um alcance de US \$28,65 bilhões até 2025. A indústria deve reconhecer um crescimento notável durante o período previsto devido ao aumento da demanda em indústrias de aplicação, como alimentos, bebidas, cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal. Vale ressaltar que, a indústria de alimentos e bebidas está projetada a crescer nesse período devido a demanda por refeições prontas, alimentos saudáveis, bem como avanços tecnológicos que devem impulsionar o crescimento do mercado. Além disso, podemos considerar o aumento do uso de sabores nos mercados farmacêuticos, de suplementos e nutracêuticos, que também contribui com aumento, prevalecendo a preferência aos ingredientes com sabor natural. A crescente demanda dos consumidores por produtos frescos e naturais contribuiu para o crescimento exponencial do segmento, além de que esses



produtos aumentam o apelo geral e o valor estético dos bens de consumo. Os produtos são principalmente classificados em naturais e sintéticos.

Os aromas sintéticos são compostos por substâncias obtidas por processos químicos, incluindo aromas idênticos aos aromas naturais e outros aromas artificiais. Desta forma, os aromas sintéticos podem ser também naturais, a depender de como o aroma particular é produzido. Deve-se ressaltar que a maioria dos aromas disponíveis comercialmente é “idêntico aos naturais” (AROMAS NATURAIS, 2008). Os aromas sintéticos idênticos aos naturais são substâncias obtidas usualmente por síntese química ou isoladas por processos químicos, a partir de matérias-primas de origem animal ou vegetal (BRASIL, 1999). Esses aromas apresentam estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas matérias-primas naturais (processadas ou não), sendo úteis por razões econômicas e de produção. Quando a síntese dá origem a moléculas que não são encontradas espontaneamente na natureza, os aromas são considerados artificiais (DOSSIÊ AROMAS, 2009)

Os aromas naturais são constituídos por moléculas obtidas exclusivamente a partir de produtos de origem animal ou vegetal, mediante aplicações de métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos. Estes compostos são usualmente mais valorizados no mercado do que os aromas artificiais em virtude da origem natural. Nesse conjunto podem ser incluídos óleos essenciais, extratos, bálsamos, óleo-resinas e óleo-goma-resinas, além de substâncias aromatizantes e aromas naturais isolados (BRASIL, 1999)

Os compostos aromatizantes são quase sempre quimicamente instáveis e muito deles são altamente voláteis. Estes fatores causam perdas significativas e efeitos indesejáveis quando estes compostos são expostos a condições inadequadas de armazenamento na presença de oxigênio, luz, água ou calor (ROWE, 2005). Por isso, o problema do controle da estabilidade de aromas tem sido alvo de diversas pesquisas, devido à relação existente entre estabilidade, qualidade e aceitabilidade dos produtos em que estes compostos estão presentes. Muitos fatores relacionados às propriedades físico-químicas, concentração e interações das moléculas voláteis resultantes da degradação de aromas com componentes de alimentos podem causar efeitos deletérios sobre a qualidade dos produtos (BARANAUSKIENE *et al.*, 2005; FUCHS *et al.*, 2006; KWAN e DAVIDOV-PARDO, 2017).

Em particular, o processo de fabricação e armazenamento de aromas pode causar uma série de modificações nas moléculas, reduzindo a intensidade dos compostos que constituem o aroma e originando componentes denominados de *off-flavor* (CHANG *et al.*, 1988). Diante destes aspectos, o desenvolvimento de estratégias que ajudem a superar essas limitações, relacionadas principalmente à degradação e estabilidade dos compostos que compõem os óleos, é necessário. FENG *et al.* (2009) reportaram que o uso de microcápsulas para encapsulamento de aromas é de especial interesse, uma vez que microcápsulas podem reter componentes aromáticos em uma matriz, protegendo-os contra a oxidação e a degradação, prolongando a estabilidade e, conseqüentemente, aumentando o tempo de prateleira do produto, permitindo que a qualidade não seja significativamente prejudicada nas etapas de elaboração e utilização.

### **2.2.1. Óleos essenciais**

O mercado de sabores naturais e fragrâncias deve emergir como o segmento de produtos que mais cresce. Espera-se que os óleos essenciais surjam como o maior e mais rápido segmento de produtos naturais. O uso de óleos essenciais naturais está em ascensão devido à crescente demanda por óleo essencial exótico para uso em cosméticos naturais, aromaterapia, produtos farmacêuticos, etc. países desenvolvidos estão exigindo fragrâncias funcionais onde o valor do odor de uma fragrância é reforçado com óleos naturais. O segmento de aromas detinha a maior fatia do mercado devido à crescente demanda por pratos exóticos e culinária local como aromatizantes e corantes. No entanto, o segmento de fragrância e de aplicação de aromaterapia tem ganhado espaço na demanda de produtos, devido ao aumento do uso de óleos essenciais em perfumarias e a crescente popularidade na aromaterapia (ICROWDNEWSWIRE, 2017).

O tamanho do mercado global de óleos essenciais foi avaliado em US\$ 6,6 bilhões em 2016, com aumento anual estimado de 9,7% ao ano até 2024. O aumento das aplicações em aromaterapia, juntamente com a crescente demanda por fragrâncias, aromas em alimentos, bebidas e cuidados pessoais, deverá impulsionar o crescimento do mercado de óleos essenciais durante o período até 2024. Cerca de 200 tipos diferentes de óleos essenciais são consumidos em todo o mundo anualmente e os EUA exercem um papel importante na demanda global, representando em torno de 50% do consumo (GRAND VIEW RESEARCH, 2018).

O aumento da produção de óleos essenciais, juntamente com a crescente demanda de várias indústrias, provavelmente aumentará a demanda por diferentes tipos de produtos de óleo essencial em todo o mundo. Técnicas inovadoras de extração, juntamente com o avanço tecnológico no processo de produção, provavelmente aumentarão a preferência por produtos naturais (GRAND VIEW RESEARCH, 2018).

Diante da importância dos óleos essenciais para a satisfação do cliente e qualidade dos produtos, atenção considerável tem sido dada ao processo de encapsulamento desses compostos naturais, protegendo-os das condições de degradação já citadas. O processo de encapsulamento pode proteger os compostos dessas alterações indesejáveis, limitando as perdas e induzindo a melhora da retenção das propriedades.

## **2.2- Polímeros Naturais**

Polímeros são materiais constituídos por macromoléculas formadas por reações entre moléculas menores. Dentre as diferentes classes de polímeros existentes, estes podem ser distribuídos em dois grandes grupos segundo a sua origem: os polímeros naturais e os polímeros sintéticos. Os polímeros naturais são aqueles obtidos diretamente da natureza. Polímeros naturais são geralmente produzidos por reações catalisadas por enzimas a partir de espécies ativadas, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Os polímeros naturais constituíram os padrões em que se basearam os pesquisadores para a produção de similares sintéticos durante o período de extraordinário desenvolvimento da Química de Polímeros, após a II Guerra Mundial, no início da década de 50 (MANO E MENDES, 1999).

Polímeros naturais, quando submetidos a modificações químicas apropriadas, podem permitir a produção de materiais com propriedades particularmente interessantes, devido à baixa toxicidade e os baixos custos de produção (CHIOU *et al.*, 2005). A maioria dos polímeros naturais resulta de reações de condensação, a partir da reação entre monômeros polifuncionais, produzindo água como subproduto. A principal vantagem do uso de polímeros naturais reside no fato de serem abundantes e econômicos, além de poderem ser modificados quimicamente

com certa facilidade por conta da natureza multifuncional das moléculas (FANGUEIRO *et al.*, 2010).

Em geral, os biopolímeros podem ser definidos como os polímeros naturais que são biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos (YU *et al.*, 2006). Por este motivo, biopolímeros apresentam alto potencial para aplicações como embalagens plásticas, géis, adesivos, filmes para liberação de fármacos, suporte para adesão celular e produção de cápsulas para encapsulamento de compostos (US, 1993). Dentre os principais biopolímeros, destacam-se as classes dos polissacarídeos e das proteínas.

Dentro do cenário de polímeros naturais, o número de publicações tem aumentado no decorrer dos anos, como pode ser visto na Figura 2. 1, sendo possível perceber que o número de publicações, quando se busca por “Natural Polymer” é igual a 15968. O tema é de crescente interesse, contudo com média anual menor que 2000 publicações.

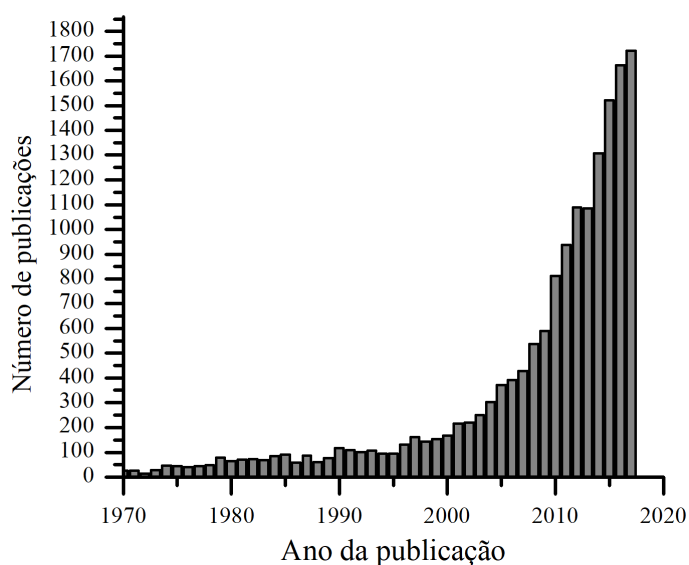


Figura 2. 1. Evolução do número de publicações relacionada ao tema “Polímero Natural” no período de 1970 a 2017 (dados obtidos da base de dados online Scopus em janeiro de 2018).

Ao buscar, mais especificamente um tipo específico de polímero natural, o número de publicações decai significativamente, como pode ser visto na Figura 2. 2. Ao restringir esse universo para as micropartículas com busca por *Particles*, *Microparticles*, *Beads* e *Microspheres*. foi possível observar que, quando é realizada a buscas em todos os campos, o

maior número de publicações é para quitosana e partículas, que não constitui o foco deste trabalho, embora tenha sido reportado para exibir um panorama atual sobre os polímeros naturais mais reportados. Contudo, quando se realiza essa busca mais geral, incluídos os três tipos de polímeros, muitos trabalhos não estão diretamente ligados ao escopo desta tese. Restringindo para busca apenas em título, resumos e palavras chaves, o número de publicações decaiu significativamente. Dentro deste cenário, é possível observar que ainda é escassa a literatura para produção de partículas com polímeros naturais. Esses dados revelam mais uma vez a importância deste trabalho e a originalidade quanto à produção de micropartículas de gelatinas pela técnica de suspensão inversa.

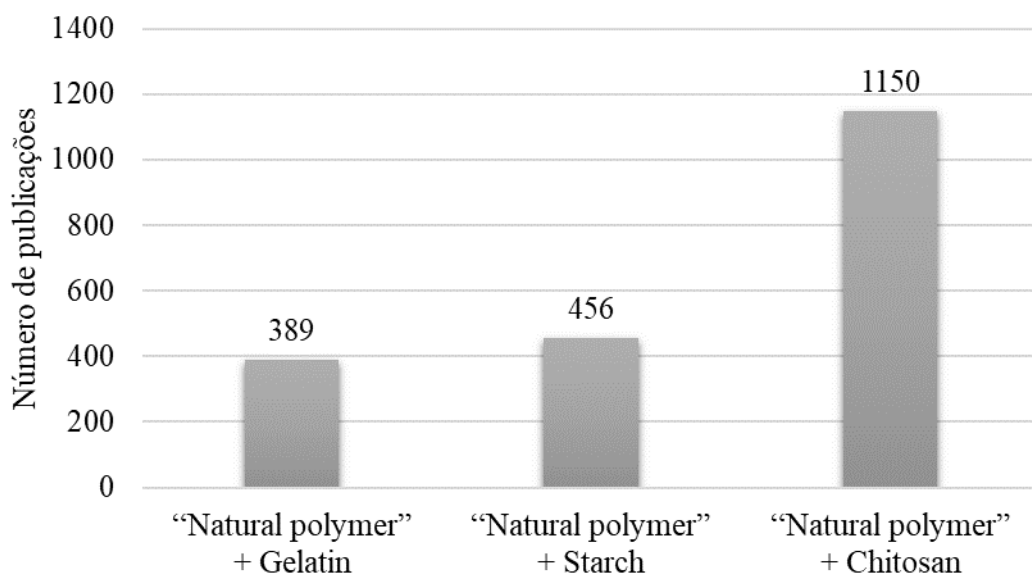


Figura 2. 2. Número de publicações refinada para tipos de polímeros naturais.

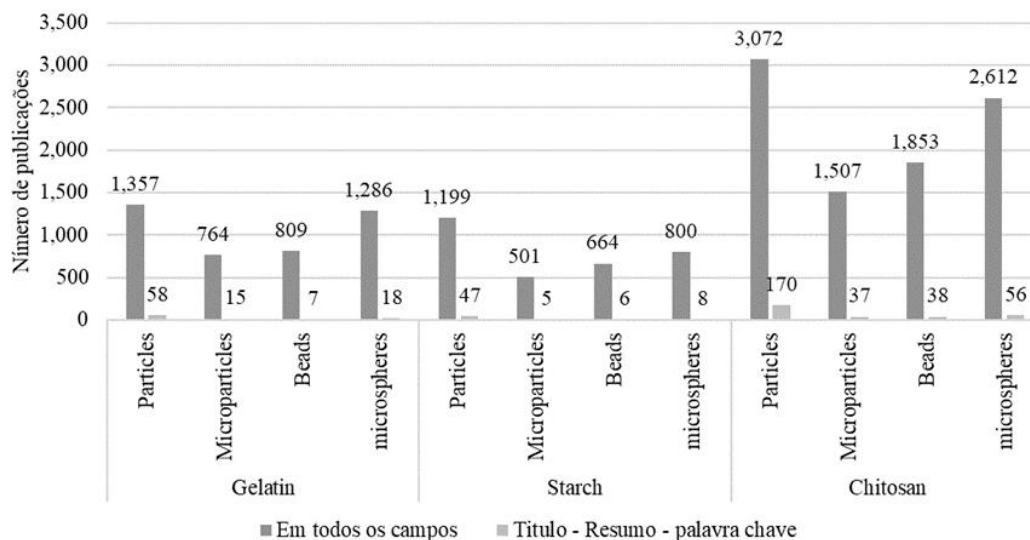


Figura 2. 3. Número de trabalhos publicados no período de 1970 à 2017 (obtidos da base de dados online Scopus, Janeiro de 2018; palavras – chave: gelatina, partículas, micropartículas, microcápsulas e esferas).

## 2.2.1 Proteínas

As proteínas são polímeros naturais biodegradáveis constituídos por cadeias lineares de unidades méricas resultantes de reações entre aminoácidos. Os aminoácidos mais comuns ( $\alpha$ -aminoácidos) e que constituem a ampla maioria das proteínas de organismos vivos são de 20 tipos diferentes e contêm o mesmo grupo de íon dipolar. Todos têm em comum um átomo de carbono central ( $\alpha$ ), ao qual estão ligados um átomo de hidrogênio, um grupo amino primário ( $\text{NH}_2$ ) e um grupo carboxílico ( $\text{COOH}$ ). A única exceção é a prolina, que apresenta um grupo amino secundário. A ligação  $-\text{CO}-\text{NH}-$  (amida) formada entre os aminoácidos é conhecida como ligação peptídica e é ilustrada na Figura 2. 4 (PHILLIPS e WILLIAMS, 2011).

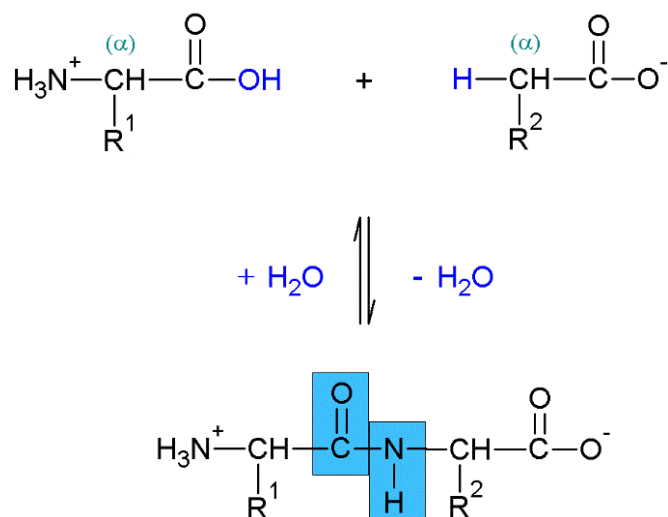


Figura 2. 4. Representação esquemática da formação de polipeptídios.

A principal diferença existente entre os diferentes aminoácidos diz respeito à estrutura das cadeias laterais. As cadeias laterais conferem importantes mudanças nas propriedades da proteína, tal como a capacidade para interagir com outros compostos e catalisar reações. O grupo lateral pode ser não-polar (hidrofóbico), polar sem carga (hidrofílico), positivamente ou negativamente carregado. As características dos aminoácidos determinam ainda a forma como as cadeias de proteína assumem a configuração tridimensional essencial para atividade biológica (ZHANG e ZENG, 2008).

Há uma enorme variedade de proteínas na natureza e muitas delas apresentam grande potencial para aplicação industrial, em particular nas áreas farmacêutica e biomédica, como emprego para elaboração de revestimentos, para microencapsulamento de drogas e para o preparo de hidrogéis (ZHANG e ZENG, 2008). Não se pode deixar de dizer que as proteínas são ingredientes alimentares nutritivos, sendo usadas amplamente na indústria de alimentos, como no caso da gelatina, da proteína de soja, da zeína, da proteína de ervilha, dentre outros. Em função de suas propriedades físico-químicas inerentes, esses materiais têm sido amplamente utilizados como materiais de revestimento para microencapsulamento na indústria

alimentar. As propriedades emulsificantes e a natureza anfifílica<sup>4</sup> são as características importantes que tornam esses materiais apropriados para processos de microencapsulação (MENG e CLOUTIER, 2014). Dentre as principais proteínas de uso comercial, às gelatinas merecem destaque.

### 2.2.1.1 Gelatinas

A gelatina é um nome genérico para designar biopolímeros versáteis que encontram numerosas aplicações nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos e médicos, de cosméticos, entre outros. Isso justifica as mais de  $3 \times 10^5$  toneladas de gelatina produzidas anualmente no mundo todo. Essas proteínas têm sido investigadas e estudadas pelos cientistas desde o século XIX, mas têm sido aplicadas para elaboração de alimentos desde muito antes (PHILLIPS e WILLIAMS, 2011).

A gelatina é uma proteína que tem quase sempre origem animal, sendo a principal proteína fibrosa derivada de cartilagens, ossos e peles de animais, obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno. O colágeno compreende 20 aminoácidos e é constituído por três cadeias estabilizadas e entrelaçadas por ligações de hidrogênio na forma de uma tripla hélice (JONES e WHITMORE, 1972). Já a rede tridimensional dos géis de gelatina é composta de micro cristais interconectados por regiões amorfas de segmentos dispostos aleatoriamente. Embora os principais usos da gelatina sejam direcionados para indústria de alimentos, a gelatina tem sido usada para outras aplicações desde o século XIX, quando um farmacêutico chamado Mothes iniciou pesquisas relacionadas ao uso de gelatina para fabricação de cápsulas de medicamentos (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). De lá para cá, essa proteína tem sido largamente empregada para os mais diversos fins.

O colágeno bruto é insolúvel em água e um pré-tratamento é necessário para a extração e obtenção da gelatina. A conversão hidrolítica de colágeno a gelatina produz moléculas de massa molar variável, dependendo das características do colágeno a partir da qual a gelatina foi gerada (Figura 2. 5). Portanto, a gelatina não pode ser descrita como uma entidade química

---

<sup>4</sup> Diz-se que um composto é anfifílico quando ele apresenta em sua estrutura química uma parte polar hidrofílica e uma parte apolar hidrofóbica.



única, mas como uma mistura de frações compostas por aminoácidos ligados por ligações peptídicas para formar cadeias de polímeros com massa molar variando de 1,5 a  $4 \times 10^5$  Da. O processo que converte colágeno em gelatina é conhecido como condicionamento e dois tipos de gelatinas podem ser obtidas, dependendo do procedimento de pré-tratamento envolvido. A conversão do colágeno em gelatina pode ser conduzida por meio do aquecimento do colágeno, em meio ácido ou alcalino (ARVANITOYANNIS *et al.*, 1998). O processo produtivo de obtenção da gelatina consiste de três etapas: tratamento da matéria-prima, extração da gelatina e purificação e secagem (KARIM e BHAT, 2008). Geralmente a matéria prima é submetida a uma solução alcalina ou ácida por um período de 24h a 20 dias. Após esse período, o material tratado é centrifugado, o precipitado é suspenso em uma solução ácida aquecida e novamente centrifugado, obtendo-se a gelatina no sobrenadante (PHILLIPS e WILLIAMS, 2011).

Os pré-tratamentos ácidos e alcalinos são usados para clivar um número suficiente de ligações covalentes no colágeno, originando respectivamente a gelatina do tipo A e gelatina do tipo B (CHIELLINI *et al.*, 2001; YAKIMETS *et al.*, 2005). A gelatina conhecida comercialmente como gelatina do tipo A é obtida sob condições de tratamento ácido, apresentando ponto isoelétrico (PI) na faixa de pH's entre 8 e 9. Gelatina do tipo B é resultante de condições de tratamento alcalino e possui PI entre pH's de 4 a 5 (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). No processo alcalino, os grupos amino são hidrolisados em grupos carboxílicos, diminuindo assim o ponto isoelétrico, (ou seja, o pH em que as moléculas apresentam cargas totais neutras) como resultado do aumento do número de grupos carboxílicos da gelatina. Em contraste, o pré-tratamento ácido pouco afeta os grupos amino presentes (YOUNG *et al.*, 2005).

Diante do fato de que no ponto isoelétrico as proteínas apresentam carga efetiva nula, o tipo de gelatina define o pH de trabalho mais adequado para um determinado fim. Usualmente não convém trabalhar na faixa de pH's próximos ao PI, uma vez que a solubilização da gelatina é normalmente comprometida pela ausência de carga das moléculas (WAY *et al.*, 2017).

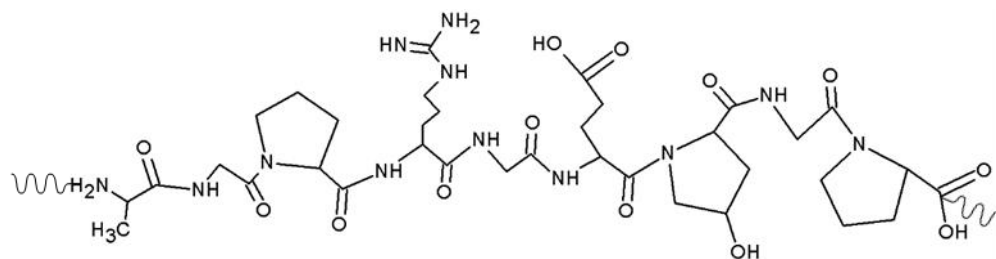


Figura 2. 5. Estrutura genérica básica da gelatina.

A estrutura da gelatina obtida por pré-tratamento ácido é geralmente menos ramificada e com massa molar entre 2 Da e  $20 \times 10^4$  Da, sendo que uma pequena proporção da gelatina pode apresentar massa molar mais elevada de até  $1 \times 10^6$  Da. As gelatinas obtidas no início do processo de extração são normalmente menos ramificadas do que as obtidas em extratos posteriores, formando soluções menos viscosas. A viscosidade aumenta com o andamento da extração até o ponto em que a viscosidade decresce (etapa final), devido à degradação térmica. Nos pré-tratamentos alcalinos, a quebra de ligações covalentes do colágeno não é completa, sendo formadas gelatinas obtidas com massas molares mais altas e superiores a  $1 \times 10^6$  Da (WOLF, 2003).

Alguns autores reportam que a qualidade da gelatina para uma aplicação particular depende em grande parte das propriedades reológicas da solução (STAINSBY, 1987). A ampla aplicação é baseada principalmente na capacidade de formação de gel, embora propriedades físico-químicas básicas, tais como os parâmetros de composição, a solubilidade em água, a transparência, a cor, o odor e o sabor, também afetem várias aplicações. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial global da gelatina são a resistência do gel formado e a estabilidade térmica (temperatura de fusão e gelatinização) do produto final (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

A capacidade de formação do gel é determinante para a utilização comercial das gelatinas. Assim, para fins de padronização, a capacidade de formação do gel é determinada com o chamado teste de Bloom, que consiste em avaliar o gel produzido em condições bem definidas de concentração (6,67 % em peso), temperatura (10 °C) e tempo de maturação (17 h), permitindo que a resistência do gel formado seja expressa em termos de um "valor bloom" normalizado (WAINWRIGHT, 1977).

Ambos, a resistência do gel e a termoestabilidade, são largamente dependentes das propriedades moleculares da gelatina, especialmente no que diz respeito a três fatores principais: (a) a composição de aminoácidos, (b) a distribuição de massas molares que resultante das condições de processamento do colágeno e (c) a matéria-prima de origem (GÓMEZ-GUILLÉN, TURNAY *et al.*, 2002). A Figura 2. 6 apresenta a composição típica dos aminoácidos que constituem as gelatinas de origem comercial.

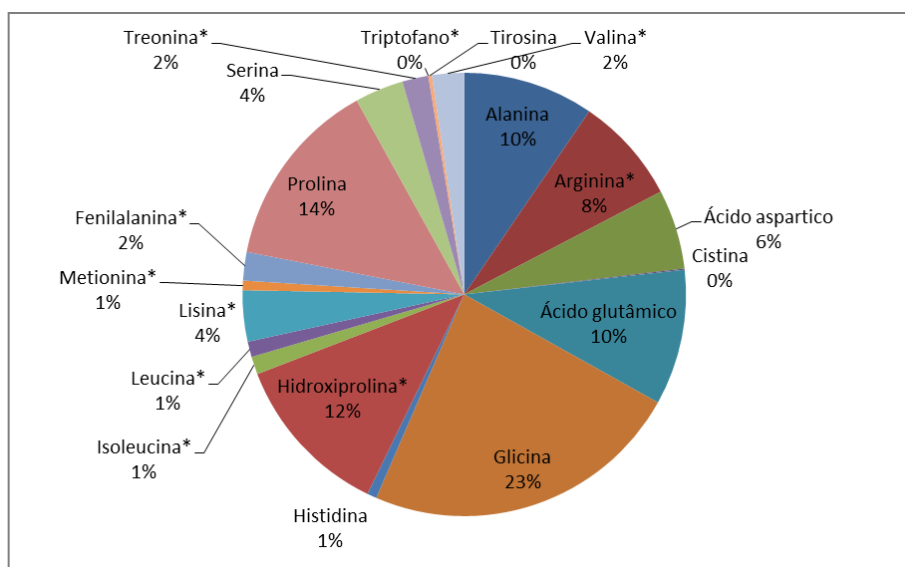


Figura 2. 6. Composição característica dos aminoácidos que constituem gelatinas comerciais (Gelatin PhEur) (WAY, 2013).

Todos os aminoácidos essenciais estão presentes na gelatina, com exceção do triptofano. Já os aminoácidos metionina, cistina e tirosina estão presentes em teores baixos, devido à degradação durante a hidrólise. Os três componentes presentes em maiores quantidades na gelatina são a glicina (Gly), a prolina (Pro) e a hidroxiprolina (Hyp), sendo a glicina o aminoácido usualmente mais abundante. Os conteúdos de prolina e hidroxiprolina são especialmente importantes para a capacidade de gelificação (RAJA MOHD HAFIDZ *et al.*, 2011). No entanto, embora a prolina seja importante, acredita-se que a hidroxiprolina desempenhe um papel singular na estabilização da hélice de cadeia tripla de colágeno, devido às pontes de hidrogênio resultantes do grupo – OH da hidroxiprolina. Além disso, foi também observado que o conteúdo total da sequência Gly - Pro - Hyp constitui um dos principais fatores

que afetam a estabilidade térmica, além de propriedades relacionadas à bioatividade do material (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

As gelatinas também apresentam algumas peculiaridades úteis quando apresentadas como fontes de biopolímero, tais como a presença de grupos funcionais ácidos e básicos, a capacidade de formar estruturas do tipo tripla-hélice não observada em polímeros sintéticos (esta estrutura é formada em soluções a baixas temperaturas), a capacidade de apresentar estado vítreo a altas temperaturas 205 - 210 °C e a boa resistência ao calor (KOZLOV e BURDYGINA, 1987). Diante de todos esses aspectos, as gelatinas vêm sendo consideradas candidatos promissores para uso como matrizes para formação de materiais de revestimento e de microcápsulas. Tanto a biodegradabilidade quanto a não toxicidade constituem também pontos-chaves para uso desses polímeros naturais, já que as formulações em que gelatinas são utilizadas requerem com frequência a ingestão desses compostos, não sendo observados problemas com o acúmulo dessas substâncias no organismo. Além disso, a gelatina é o único hidrocolóide de formação termorreversível com ponto de fusão próximo da temperatura do corpo, o que é particularmente importante em aplicações alimentares e farmacêuticas (ACHET & HE, 1995).

No entanto, é importante ressaltar que macromoléculas biológicas são sistemas químicos de extrema complexidade, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre vários aspectos, como a alta solubilidade em água, que impede algumas aplicações. Esse ponto inibe o emprego das matrizes de gelatina em aplicações de longo prazo, como nos sistemas de liberação de ativos (ESPOSITO *et al.*, 1996) e na fabricação de embalagens inteligentes (ZHU *et al.*, 2004; FARRIS *et al.*, 2011), já que a proteína se solubiliza muito rapidamente em meio aquoso. Uma forma de contornar este problema é inserir ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Estas ligações podem ser formadas por meio de um processo de reticulação, permitindo que propriedades inerentes ao material sejam modificadas (ZHANG e ZENG, 2008).

A gelatina é um material hidrofílico multifuncional que apresenta inúmeros grupamentos que podem ser reticulados (principalmente OH, COOH e NH<sub>2</sub>), permitindo formar um hidrogel. Os hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas capazes de reter quantidades significativas de água dentro de suas estruturas e intumescendo, sem que ocorra a

dissolução na água. Essas redes poliméricas são formadas por meio de ligações cruzadas entre as cadeias dos polímeros durante o processo de reticulação (CANEVAROLO, 2003; WANG *et al.*, 2004). A Figura 2. 7 ilustra a representação estrutural de um hidrogel.

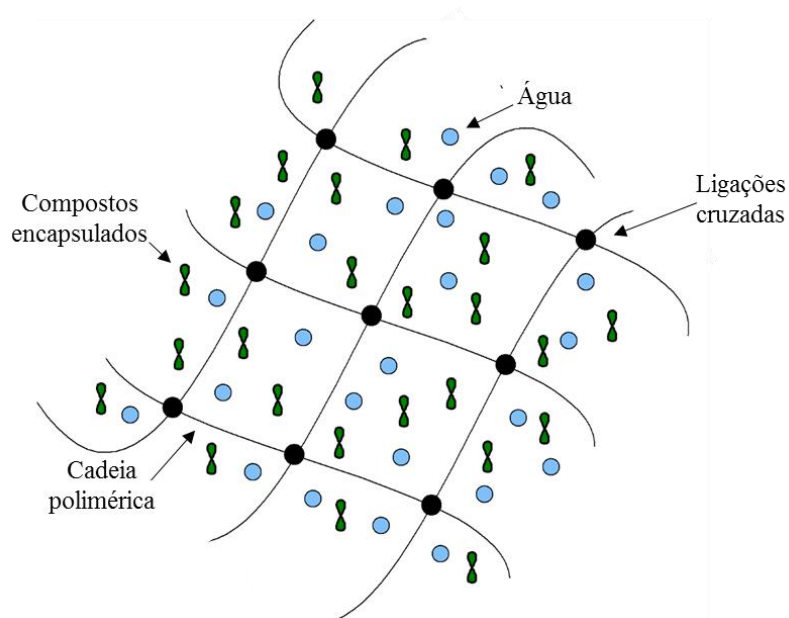


Figura 2. 7. Representação esquemática da estrutura de um hidrogel.

A reticulação pode ocorrer por meio da formação de redes de moléculas de gelatina estabilizadas, denominados géis físicos (Figura 2. 8), formados por forças de atração eletrostática e ligações de hidrogênio. No entanto, a aplicabilidade de gelatina como uma matriz de hidrogel físico é limitada, devido à baixa rigidez da rede. No caso dos géis químicos (Figura 2. 8), também chamados de permanentes, a reticulação ocorre por meio da formação de ligações covalentes, muito mais fortes que as ligações presentes nos géis físicos. Portanto, o grau e o tipo da reticulação devem ser bem delineados, observando que quanto maior o grau de reticulação apresentado por um hidrogel, mais rígida deve ser a estrutura formada e menor intumescimento deve ser observado após o contato com a água (HENNINK *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004).

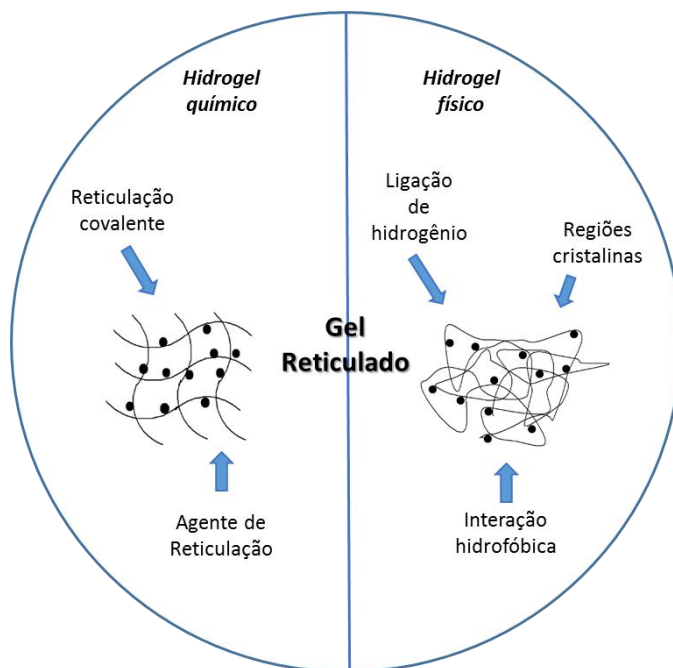


Figura 2. 8. Representação esquemática de hidrogéis químicos e físicos.

O uso da gelatina como biomaterial apresenta diversas vantagens, como o fato desse material ser um polímero natural que não apresenta antigenicidade<sup>5</sup>. Além disso, devido ao grande número de grupos laterais funcionais, a gelatina pode reticular rapidamente, o que é muito importante para a utilização e produção de sistemas de liberação de ativos. A formação de ligações cruzadas é muito importante para evitar a dissolução rápida das cadeias desses polímeros hidrofílicos em ambientes aquosos. O retardamento da dissolução em água permite a produção de materiais mais resistentes. Dependendo do tipo de aplicação desejada, o hidrogel pode ser produzido na forma de cápsulas, filmes, membranas ou ainda como micro e nanopartículas (HENNINK *et al.*, 2002). Do ponto de vista estrutural, a gelatina se diferencia de outras proteínas por conta da ausência de ordem configuracional interna e configuração geométrica aleatória das cadeias polipeptídicas em solução aquosa (ARVANITOYANNIS, 2002). Essa propriedade justifica a necessidade de empregar técnicas para configurar ou “endurecer” a estrutura da gelatina em água.

---

<sup>5</sup> Antigenicidade é a capacidade que um agente tem de induzir a formação de anticorpos e antígenos, muitos vezes associada a reações alérgicas.

Uma variedade de procedimentos distintos usados para endurecimento da gelatina já foi descrita na literatura. As técnicas mais comuns propõem o uso de um reagente bifuncional para promover a reticulação. Vários agentes reticulantes, tais como formaldeído, glutaraldeído, carbodiimida, genipina, glioxal, dentre outros, têm sido usados para modificar quimicamente a gelatina e promover a formação de géis mais rígidos para aplicações diversas (TROPINI *et al.*, 2004; YOUNG *et al.*, 2005).

No entanto, o glutaraldeído é conhecido por ser neurotóxico e o glioxal por ser mutagênico e o destino no corpo humano não é totalmente compreendido. Por exemplo, Zhang *et al.* (2006) reportaram o uso de vapor de glutaraldeído para reticular nanofibras de gelatina com intuito de melhorar a resistência a água para uso potencial em aplicações biomédicas, contudo, a gelatina reticulada sugeriu algum efeito citotóxico de resíduos de glutaraldeído em células testadas. Portanto, mesmo que os hidrogéis passem por processos de purificação antes da administração, a possibilidade da presença de dialdeídos livres não reagidos não pode ser completamente descartada, podendo induzir efeitos tóxicos (BEAUCHAMP *et al.*, 1992; MATTIODA e BLANC, 2011).

Hennink *et al.* (2002) mostraram que polímeros solúveis em água e que apresentam grupos hidroxila podem ser reticulados com glutaraldeído; no entanto, temperaturas elevadas devem ser aplicadas. Em contraste, polímeros que contêm grupos amino podem ser reticulados quimicamente com glutaraldeído sob condições brandas, sendo formadas as chamadas bases de Schiff. As bases de Schiff são iminas provenientes da condensação de substâncias carbonílicas com aminas, sendo importantes intermediários para diversas transformações (ver Figura 2. 9). Bases de Schiff podem ser sintetizadas a partir de uma amina aromática e um composto carbonila por adição nucleofílica, formando um grupo hemiaminal, seguida da desidratação para gerar o grupo imina.

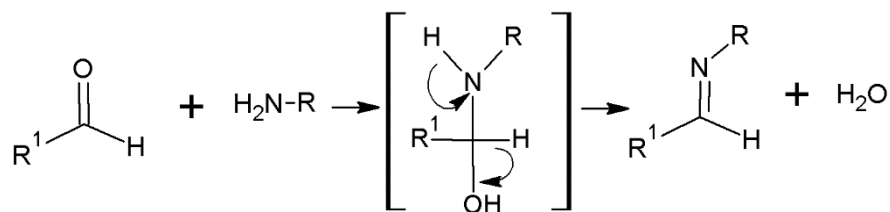


Figura 2. 9. Representação esquemática da reação de formação de base de *Schiff*.

Os grupos amino conferem ao polímero uma densidade de carga elétrica elevada, tornando-o disponível para reações químicas e formação de sais. Essa funcionalidade observada com a presença do grupo amino, torna o polímero de grande interesse, pois pode ser adequadamente modificado para conferir as propriedades desejadas e funções biológicas distintas, incluindo solubilidade em diferentes solventes (COSTA e MANSUR, 2008).

A reatividade de moléculas de gelatina parece estar fortemente relacionada à presença de aminoácidos trifuncionais, especialmente a lisina. Os grupos carboxílicos presentes na gelatina são mais abundantes que os grupos amino, mas parecem ser menos reativos em reações de reticulação (DIGENIS *et al.*, 1994). Cada aminoácido que compõe a estrutura da gelatina exerce um papel único, que pode favorecer ou não a ocorrência das reações de entrecruzamento das cadeias.

Digenis *et al.* (1994) reportaram que a reticulação de moléculas de gelatina pode ser feita por meio de diversas reações químicas. Uma dessas reações é a oxidação, para obtenção de um grupo aldeído livre, que pode dar origem a um material reticulado. Uma outra opção é a reação de reticulação na presença de um aldeído, como o formaldeído ou glutaraldeído. No entanto, esses compostos são altamente tóxicos, mesmo em baixas concentrações (JAYAKRISHNAN e JAMEELA, 1996). Assim, outras alternativas vêm sendo pesquisadas e a utilização desses aldeídos deve ser evitada, uma vez que a toxicidade pode comprometer a aplicação do produto final.

Diante destes aspectos, outros agentes de reticulação, como esquarato de dietilo, ácido oxálico e genipina, foram investigados por alguns autores (MI *et al.*, 2000; DE ANGELIS *et al.*, 1998). No entanto, não há dados relacionados aos dois primeiros compostos em relação à sua real toxicidade. Por isso, a busca por compostos não tóxicos para a modificação dessas matrizes é cada vez maior. O uso da genipina como reticulante químico foi estudado em



diversos trabalhos reportados na literatura, devido à menor toxicidade, quando comparada à toxicidade do glutaraldeído (NICKERSON *et al.*, 2006; MUZZARELLI, 2009; THAKUR *et al.*, 2010). No entanto, em certas concentrações esse composto pode evidenciar algum tipo de toxicidade (SANTOS e DANTAS, 2008).

Chang e colaboradores (2003) utilizaram a genipina como agente reticulante natural. A genipina ainda apresenta alguma citotoxicidade, embora menor que as do formaldeído e glutaraldeído. No estudo foram avaliadas as mudanças ocorridas nas propriedades mecânicas, na taxa de transmissão do vapor d'água e no inchamento de membranas de gelatina tratadas com genipina. Os autores também utilizaram o glutaraldeído para efeito de comparação das estruturas obtidas e concluíram que a genipina pode ser usada com sucesso para a reticulação da gelatina.

Alguns trabalhos sugerem o uso de meios físicos para reticular a gelatina e evitar o uso de reticulantes tóxicos. Yannas e Tobolsky (1967) sugeriram a desidratação prolongada da gelatina a uma temperatura elevada e pressão reduzida, para produzir a formação espontânea de ligações amida entre cadeias. Do ponto de vista prático, essas condições são inadequadas para uso comercial.

Welz e Ofner (1992) reportaram o uso da desidratação para obter matriz de gelatina reticulada, para uso em aplicações de liberação controlada de fármacos, por meio de tratamentos do material a temperaturas elevadas. O mecanismo de formação das ligações cruzadas foi explicado em termos da reação de condensação entre um grupo carboxilo livre numa cadeia de gelatina e um grupo amino de uma cadeia de proteína adjacente, sem o uso de agentes reticulantes. Além disso, os autores reafirmaram a necessidade da reticulação para prevenir a solubilização da gelatina e a imediata liberação da droga na temperatura do corpo. No entanto, o tempo de reticulação térmica é muito elevado, o que faz com que esse processo seja pouco atrativo comercialmente.

Vandelli *et al.* (2004) utilizaram a energia de micro-ondas para provocar a reticulação de macromoléculas, como forma de superar o inconveniente da toxicidade dos agentes reticulantes e o emprego dos tempos elevados do tratamento térmico convencional. No entanto, o processo parece ter um custo elevado, sendo esse o maior inconveniente para o processo.

Ratanavaraporn *et al.* (2010) sugeriram a reticulação desidrotérmica fibras de gelatina para controlar a degradação da estrutura das fibras, no entanto, os resultados não alcançaram o nível de extensão necessário, devido a ocorrência de reticulação somente na superfície das fibras. Assim, os autores sugerem o uso da técnica em conjunto com um reticulante químico.

Alguns trabalhos relatam a possibilidade de obtenção de géis formados por complexos iônicos, que não utilizam reticulantes químicos, o que pode ser considerado como uma vantagem adicional frente aos hidrogéis covalentes. Estes géis podem ser considerados como uma subcategoria dos hidrogéis físicos, pois a natureza reversível das interações iônicas caracteriza a estrutura do hidrogel. Os complexos iônicos podem ser divididos entre hidrogéis ionicamente reticulados e os complexos polieletrólíticos. Vários compostos iônicos podem ser utilizados, uma vez que o mesmo deve ser apenas misturado à solução do polímero e deve ionizar-se no pH ao qual é submetido. Por meio desse efeito, forças intermoleculares do tipo íon-íon acabam por gerar um processo de reticulação, prendendo as cadeias poliméricas por forças eletrostáticas (GONSALVES *et al.*, 2011).

Os hidrogéis ionicamente reticulados ou géis ionotrópicos são formados por um polímero de característica iônica, com um contra íon de valência múltipla, enquanto que os complexos polieletrólíticos (PEC) são formados por um par de polímeros iônicos de cargas contrárias. O esquema da Figura 2. 10 ilustra a formação dos dois tipos de géis. Porém, existe a possibilidade de que estes hidrogéis não sejam estáveis, já que a ligação iônica é lábil e pode ser desfeita no meio solvente apropriado (HOFFMAN, 2002).

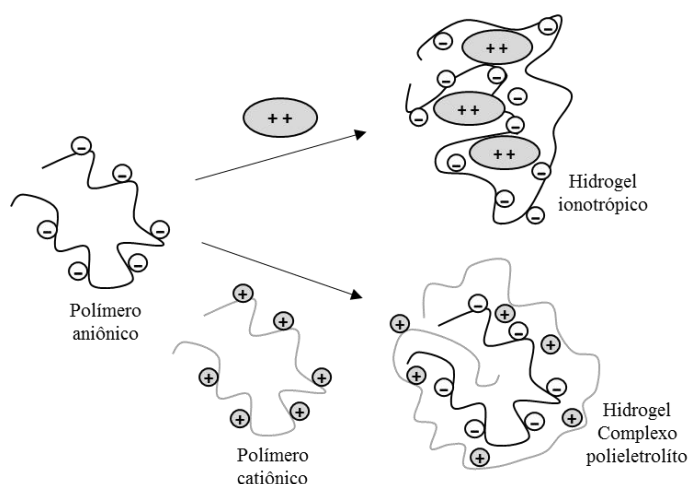


Figura 2. 10. Esquema da formação de géis iônicos.

Diante dos inconvenientes associados ao uso de compostos tóxicos e as condições de operação dos outros processos de tratamento térmico, o uso da glicose e de outros açúcares vem sendo sugerido em várias formulações, como forma de proporcionar a reticulação de gelatina. Aparentemente, Digenis *et al.* (1994) foram os primeiros a revelar a possibilidade de ocorrerem ligações covalentes entre moléculas de gelatina por meio da adição de glicose e de outros açúcares, devido a reações com os grupos funcionais hidroxila e aldeído presente nessas substâncias.

O grupo funcional aldeído de sacarídeos pode reagir com o grupo  $\epsilon$ - amino livre presente na cadeia da gelatina, resultando na formação de um grupo imina intermediário, que, por meio do rearranjo de Amadori, produz açúcar de cetose. O açúcar de cetose formado (aminoglicosídeo) pode reagir com outro grupo amino, por meio da funcionalidade carbonila, para formar gelatina reticulada. A Figura 2. 11 mostra um esquema descrito para reação de reticulação de gelatina (DIGENIS *et al.*, 1994).

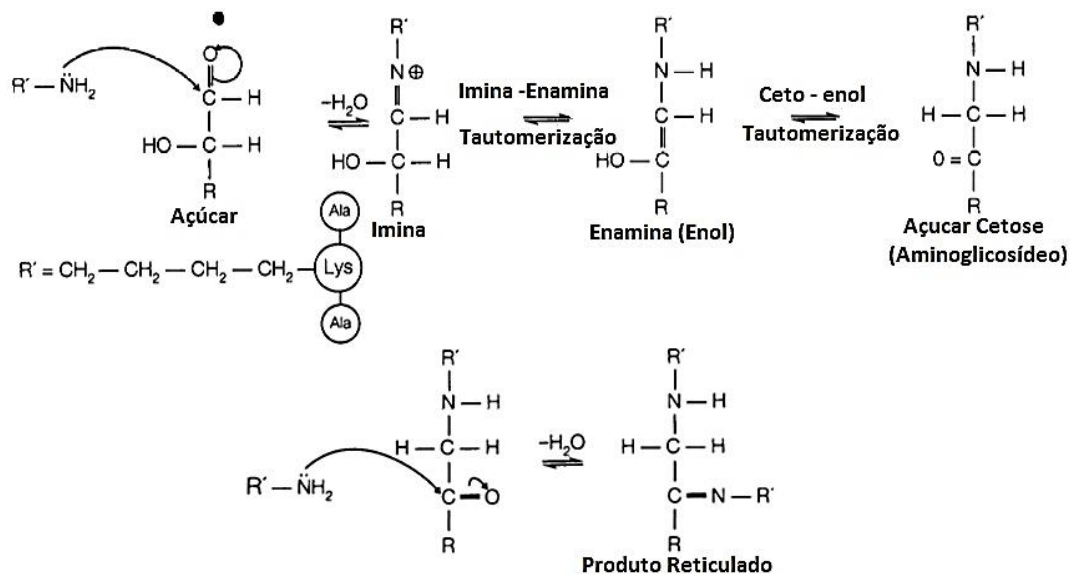


Figura 2. 11. Esquema da reação de reticulação utilizando açúcar como agente de ligação. Adaptado de DIGENIS *et al.* (1994).

DIGENIS *et al.* (1994) reportaram também que as reações de reticulação entre as cadeias de gelatina podem ocorrer de duas formas. Quando a ligação ocorre dentro da mesma cadeia do polipeptídeo, as reações são denominadas de reticulação intramolecular ou intracadeia. Por outro lado, a reticulação intermolecular ou intercadeia é caracterizada pelas reações entre resíduos de aminoácidos de duas cadeias de peptídeos vizinhas, formando uma ponte (DIGENIS *et al.*, 1994).

A formação das ligações cruzadas leva a mudanças nas propriedades da gelatina e a principal diferença está relacionada à solubilidade final das matrizes. Alguns autores sugerem que a eficiência do processo de reticulação é avaliado, de forma prática, por meio da determinação da mudança da solubilidade em água da gelatina. Embora esta mudança não quantifique o grau de reticulação a nível molecular, sob condições apropriadas a redução na solubilidade já constitui uma indicação da reticulação (WELZ e OFNER, 1992). A insolubilidade da gelatina, sob estas condições, é uma consequência da formação de redes tridimensionais a partir de reticulação covalente (YANNAS, 1972). Além disso, o aumento na viscosidade é um efeito muito comum em produtos de reticulação, principalmente devido ao aumento da massa molar (KIM e YOO, 2010).

O número de estudos relacionados a reações de reticulação de polímeros naturais vem crescendo continuamente com o passar dos anos. Contudo, os trabalhos disponíveis na literatura fazem uso desenfreado de agentes de ligação cruzada de natureza tóxica, limitando o uso desses materiais. Apesar dos inúmeros trabalhos disponíveis a respeito da reticulação da gelatina, das aplicações do hidrogel, dos efeitos causados por agentes reticulantes e das técnicas de reticulação, ainda há necessidade de obter informações mais concretas e precisas para o emprego mais direcionado dessas matrizes. Por exemplo, pouco se sabe sobre a evolução das massas molares médias durante o processo de reticulação de gelatina (WAY, 2013).

### 2.2.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos formam uma outra classe de polímeros naturais, constituídos por unidades básicas de glicose unidas por ligações glicosídicas na forma  $\alpha$  ou  $\beta$ . A ligação glicosídica é formada entre o grupo hidroxila do átomo de carbono anomérico de uma molécula do monossacarídeo e um grupo hidroxila qualquer de outra molécula de monossacarídeo. Essas unidades são ligadas na forma de anéis de grupos acetais (aldeído e álcool) na presença de grande quantidade de grupos hidroxilas, de maneira que a molécula resultante apresente alta hidrofiliabilidade (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Assim como as proteínas, os polissacarídeos também podem organizar suas estruturas na forma de  $\alpha$ -hélice ou dupla hélice. O tipo de ligação ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) e as forças existentes entre as moléculas influenciam significativamente as propriedades físico-químicas do polímero final. A presença de ligações do tipo  $\alpha$  induz uma organização molecular que promove ligações entre grupos hidroxila e moléculas de água, aumentando como consequência a solubilidade do material em água. Em polissacarídeos que apresentam ligações do tipo  $\beta$ , ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre os monômeros, responsáveis pela insolubilidade das moléculas em água, como no caso da celulose (LOVEGROVE *et al.*, 2017).

Os principais polissacarídeos de interesse comercial são a celulose e o amido, sendo hoje dada atenção especial a carboidratos mais complexos, como quitina e quitosana. No entanto, o polímero natural destacado será o amido por conta da sua ampla disponibilidade e baixo custo.

### 2.2.2.1 Amido

O amido é um polímero de condensação formado pela reação de centenas de moléculas de glicose, que se combinam quimicamente por meio do desprendimento de uma molécula de água. As principais fontes de amido são os cereais (com milho, trigo e arroz), tubérculos (batatas) e raízes (como mandioca e batata doce). O amido é certamente um dos materiais mais versáteis para uso dentre os polímeros naturais, pois é encontrado em abundância, apresenta baixo custo de produção e tem comportamento termoplástico (SHIRAI *et al.*, 2013).

O amido é o polissacarídeo de reserva dos vegetais e está armazenado na forma de grânulos no interior das células, apresentando certo grau de organização molecular, que confere ao material um caráter cristalino ou semicristalino, com grau de cristalinidade variado (entre 20 a 45%) (YOUNG, 1984). O grão de amido é essencialmente composto por dois polissacarídeos principais, a amilose e a amilopectina, que apresentam estruturas e funcionalidades diferentes (Figura 2. 12).

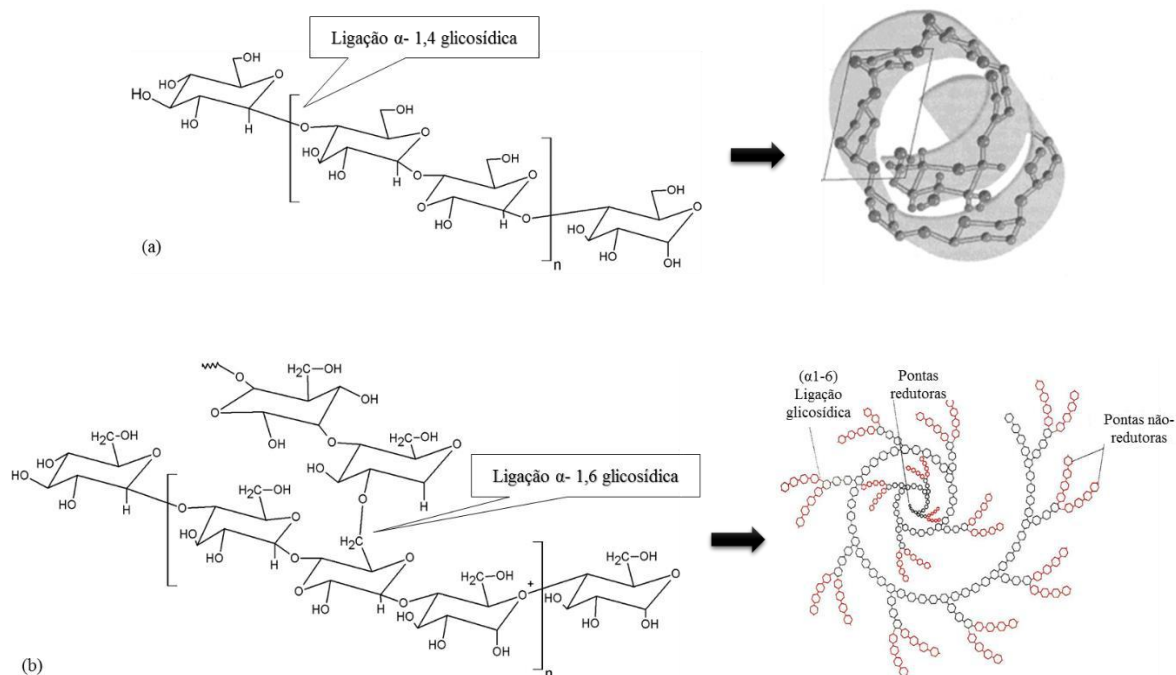


Figura 2. 12. Estrutura química e conformação esquemática dos principais componentes do amido e sua representação do esquema da conformação: amilose (a) e amilopectina (b). Adaptado de BELGACEM e GANDINI (2008).

A amilose é um polímero linear relativamente longo, com massa molar média aproximada entre  $10^5 - 10^6$  g/mol. A amilose é composta por unidades de D-glicose com aproximadamente 99% de ligações do tipo  $\alpha$  e grau de polimerização (DP) que depende da fonte do amido (VEENDAM, 1985). Devido à configuração  $\alpha$ -D- (1,4), a amilose apresenta tendência de assumir conformação em hélice, com aproximadamente seis moléculas de glicose por giro (Figura 2. 12a). Muitas propriedades da amilose podem ser explicadas pela habilidade para formar diferentes estruturas moleculares. A estrutura linear faz com que o comportamento da amilose se assemelhe mais estreitamente ao dos polímeros sintéticos convencionais, além de permitir algumas propriedades únicas, como a capacidade de formar filmes (WURZBURG, 1986; DENARDIN e SILVA, 2009).

As cadeias lineares de amido têm tendência para alinhamento em feixes, resultando no fenômeno de retrogradação. A retrogradação é basicamente um processo de cristalização das moléculas de amido, que ocorre por causa da forte tendência de formação de pontes de hidrogênio entre moléculas adjacentes. A associação das moléculas do amido propicia o desenvolvimento de uma rede tridimensional, que é mantida coesa pelas áreas cristalinas. A velocidade de formação dessa rede está relacionada ao tamanho das moléculas de amilose no grão. Moléculas longas de amilose apresentam maior dificuldade para difundir em estreita associação com outra, havendo então mais baixa taxa de retrogradação. As moléculas menores de amilose são mais propensas à associação rápida, com consequente alta velocidade de retrogradação (YONEMOTO *et al.*, 2007).

A amilopectina é um polímero extremamente longo e ramificado, com unidades de D-glicose constituídas por 95% de ligações do tipo  $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 4) e 5% de ramificações do tipo  $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 6). Apesar da massa molar mais elevada ( $10^7$  a  $10^9$  g/mol), a viscosidade em solução é baixa devido ao grande número de ramificações (Figura 2. 12b) (ELLIS *et al.*, 1998; CHIOU *et al.*, 2005). A massa molar da amilopectina é cerca de 1000 vezes mais elevada que a massa molar de amilose, de forma que a velocidade de retrogradação é muito baixa, ainda mais por conta da estrutura altamente ramificada. Este fator ajuda a reduzir a mobilidade das cadeias de polímero e afeta qualquer tendência à aproximação orientada que possa permitir níveis significativos de ligação de hidrogênio (SINGH *et al.*, 2003; DENARDIN e SILVA, 2009).

Segundo Vandeputte e Delcour (2004), a amilopectina apresenta um grau de polimerização médio que varia entre 4700 a 12800 unidades de resíduos de glicose. A variação tanto da distribuição das massas molares quanto do grau de polimerização depende da quantidade de moléculas ramificadas existentes (VEENDAM, 1985). Isso influencia também a propriedade essencial para o processamento, que é a viscosidade, além do comportamento de cristalização e o consequente desempenho do produto (CHIOU *et al.*, 2005; MALI *et al.*, 2010).

O amido é um material que apresenta natureza semicristalina e pode apresentar diferentes níveis de cristalinidade. A cristalinidade está essencialmente associada com a amilopectina, enquanto que as regiões amorfas estão associadas principalmente com a amilose (SINGH *et al.*, 2003). O grânulo de amido é caracterizado pela coexistência de moléculas lineares e ramificadas dispostas em paralelo, por conta de associações entre cadeias, que são mantidas unidas por meio de pontes de hidrogênio, formando regiões cristalinas e amorfas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). A parte linear da molécula de amilopectina forma estruturas helicoidais duplas e são elas que dão origem às regiões cristalinas dos grânulos. A região amorfa é composta pelas cadeias de amilose e pelas ramificações da amilopectina (JENKINS *et al.*, 1993; SOUZA e ANDRADE, 2000). A Figura 2. 13 mostra um esquema de representação do grânulo do amido e suas regiões.

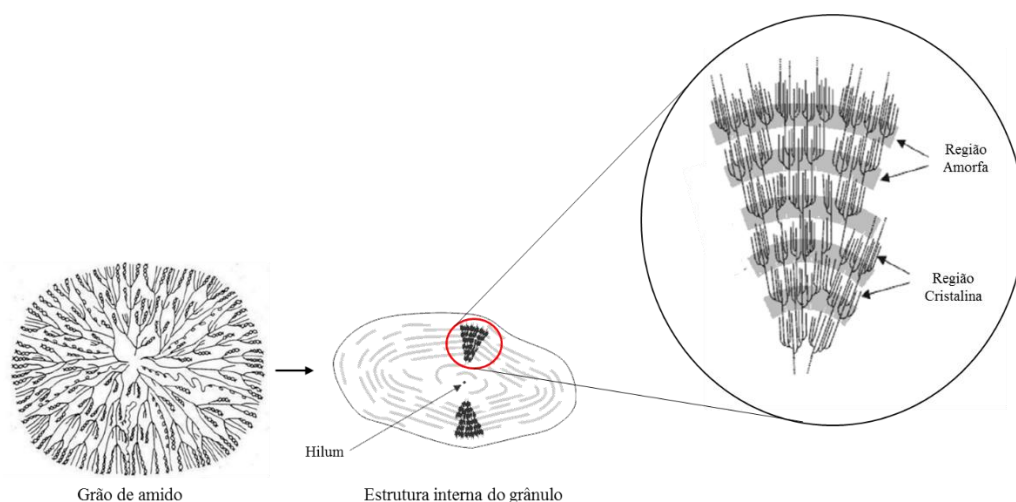


Figura 2. 13. Representação esquemática do grânulo do amido e a visualização da estrutura interna e das regiões cristalinas e amorfas. Adaptado de PARKER & RING (2001)



Devido aos enlaces entre as cadeias provocados pelas pontes de hidrogênio entre moléculas de amilopectina e amilose, o amido torna-se praticamente insolúvel em água. A cristalinidade associada à amilopectina é decorrente do arranjo radial no grânulo, que é construído como uma série de grupos de amilopectina empilhadas (Figura 2. 13) (DAVIS, 1994). Essas regiões cristalinas estão presentes na forma de hélices duplas com comprimento médio ao redor de ~ 5 nm (LIU *et al.*, 2009). Segundo Biliaderis (1992), são as regiões cristalinas do amido que mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na presença de água e os tornam mais ou menos resistentes aos ataques químicos e enzimáticos.

A região amorfa dos grânulos de amido é menos densa e, portanto, mais susceptível a ataques químicos. Além disso, regiões amorfas absorvem mais água em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização. No entanto, não há uma demarcação clara entre as regiões cristalinas e amorfas, existindo evidências de uma estrutura supramolecular em que as fases amorfas e cristalinas são interdependentes (HOSENEY, 1986).

As variações nas proporções entre os componentes do amido e de suas estruturas e propriedades podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais bem diferentes, que podem afetar as aplicações industriais reais (MALI *et al.*, 2010). A Tabela 2. 1 mostra algumas das aplicações industriais reportadas para o amido na sua forma modificada.

Tabela 2. 1. Principais aplicações industriais de amido (ELLIS *et al.*, 1998).

Indústria	Uso do amido /amido modificado
Adesivo	Produção de adesivo
Agroquímica	Coberturas, liberação de pesticidas e revestimento de sementes
Cosméticos	Pós faciais e talcos
Detergente	Surfactantes, construtores, coadjuvantes, agentes branqueadores e ativadores de branqueamento
Alimentos	Modificador de viscosidade e agente de revestimento
Médica	Expansor/substituto de plasma, preservação de órgãos transplantados e produtos sanitários absorventes
Perfuração de petróleo	Modificador de viscosidade
Papel e cartão	Encadernação e revestimento,
Farmacêutica	Diluyente, ligante e liberação de drogas
Purificação	Floculante
Têxtil	Dimensionamento, acabamento e impressão, resistência ao fogo;

De acordo com as aplicações mais comuns, o amido pode ser classificado em três tipos: tipo “A” (cereais), tipo “B” (tubérculos, frutas, milho com alto teor de amilose) e tipo “C” (leguminosas). Cada tipo e misturas entre eles apresenta um padrão característico de cristalinidade (LIU *et al.*, 2009).

Além das diversas utilidades já citadas, o amido ainda é empregado para produzir biopolímeros por meio de processos fermentativos, sendo também hidrolisado e empregado para produzir monômeros ou oligômeros. Nesse contexto, o amido tem sido aplicado para confecção de espumas (expandidas), filmes, sacolas, itens moldados, produtos termoformados e itens de higiene pessoal (VANIÉR *et al.*, 2017). Além dessas aplicações, acredita-se que há muito potencial para emprego em formulações que visam a produção de partículas ou cápsulas com o intuito de encapsular compostos ativos.

Alguns autores relatam que o amido pode sofrer reações distintas na presença de água. Essas reações ocorrem quando o amido é aquecido continuamente e em excesso, podendo ocorrer a penetração da água na região amorfa do grânulo, sem perturbar as zonas cristalinas, rompendo as ligações de hidrogênio presentes nessas regiões. Isso favorece o intumescimento do grânulo, que permanece intacto até o ponto em que ocorre o rompimento, caracterizado pelo desaparecimento da ordem estrutural do grânulo (RIBEIRO e SERAVALLI, 2009;

DERNARDIN e SILVA, 2009). Essa perda de organização estrutural resulta no fenômeno denominado como gelatinização. O conceito bem aceito da "gelatinização" diz respeito à destruição da estrutura cristalina dos grânulos de amido (FENG *et al.*, 2009), que é um processo irreversível que inclui, em um sentido amplo e na sequência de tempo, inchamento granular, fusão cristalina nativa (perda de birrefringência) e solubilização molecular (LIU *et al.*, 2009). Os processos de gelatinização e fusão não ocorrem espontaneamente sem a presença de um plastificante, já que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) do amido puro e seco são maiores que a temperatura de decomposição (CHIOU *et al.*, 2005; MALI *et al.*, 2010).

A modificação do amido é buscada com o intuito de incrementar ou inibir algumas características originais, adequando o material a aplicações direcionadas. Na forma nativa, como já reportado, o amido apresenta alguns inconvenientes e sua utilização pode ser limitada, pois os grânulos não modificados se hidratam facilmente, intumescem rapidamente, rompem-se e perdem viscosidade, produzindo uma pasta pouco espessa, bastante elástica e coesiva (TAGGART *et al.*, 2009). Contudo, a natureza muito hidrofílica do amido constitui a principal limitação ao desenvolvimento de materiais baseados no amido. Filmes de amido apresentam boa resistência mecânica, mas apresentam alta permeabilidade ao vapor d'água. Esses filmes também são muito sensíveis às condições ambientais, devido ao caráter higroscópico destes materiais (MALI *et al.*, 2006).

A modificação química do amido por meio do estabelecimento de ligações cruzadas constitui um foco crescente de pesquisas (AKCELRUD, 2007; VROMAN e TIGHZERT 2009; SAPSFORD *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2016). Em particular, Sintov *et al.* (1995) afirmaram que tanto a reticulação química quanto a reticulação física podem ser usadas para reduzir a solubilidade em água dos polissacarídeos naturais, para formar hidrogéis intumescíveis. No entanto, as reticulações químicas são mais reportadas (REDDY e YANG, 2010; CANISAG, 2015)

Os amidos reticulados são utilizados para fabricar produtos em que é necessária grande estabilidade, como nos biofilmes poliméricos naturais (CANISAG, 2015). O aumento no grau de reticulação torna o material mais rígido, com o incremento do número de ligações covalentes na estrutura do polímero e redução da mobilidade, melhorando a resistência do filme (DELVAL

*et al.*, 2004). Além disso, a ligação cruzada e pontes de hidrogênio mudam a estrutura da cadeia, aumentando a viscosidade e a resistência ao cisalhamento, reduzindo a retenção de água (HIRSCH e KOKINI, 2015).

Canisag (2015) reporta em seu estudo que reticulação promovida em amido modifica fortemente propriedades como viscosidade e grau de inchamento do grão. Chiou *et al.* (2005) mostraram que as modificações ocorridas no amido pela substituição dos grupamentos hidroxila podem diminuir as temperaturas de gelatinização, reduzir a recristalização e melhorar a flexibilidade do produto final. Além disso, é sugerido o uso de reticulantes, preferencialmente não tóxicos, como glicóis e açúcares, que podem ser adicionados ao produto para baixar a *Tg* e aumentar a ductilidade.

Como já reportado, a ligação cruzada pode ocorrer entre hidroxilas da mesma molécula de amido, entre hidroxilas de duas ou mais moléculas de amido ou pode ocorrer concomitantemente entre hidroxilas de moléculas de polissacarídeos diferentes promovida por um agente polifuncional (ROSENTHAL e ESPINDOLA, 1982). O resultado mais imediato é o aumento acentuado da massa molar média. O esquema para uma reação de reticulação intermolecular e intramolecular, é mostrado na Figura 2. 14, onde X é o agente polifuncional.

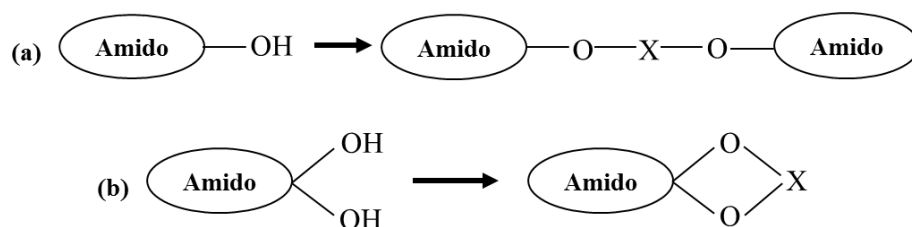


Figura 2. 14. Esquema proposto para reações de reticulação a) intermoleculares e b) intramoleculares (ROSENTHAL e ESPINDOLA, 1982)

É válido ressaltar que não há literatura atual que reportem sobre a reticulação do amido e os trabalhos encontrados reportam o uso repetitivo dos agentes de reticulação que são apresentados a seguir. Diversos são os agentes de ligação cruzada que insolubilizam o amido, como ésteres, éteres, produtos catiônicos, aniônicos e anfóteros. Os agentes mais reportados são o trimetafosfato, a epicloridrina, o formaldeído, o oxicloreto de fósforo, os di-epóxidos e os xantenos (dissulfetos) (HIRSCH e KOKINI, 2002; GUI-JIE *et al.*, 2006; KOO *et al.*, 2010

WONGSAGONSUP *et al.*, 2014). Segundo Wongsagonsup *et al.* (2014), o tipo do agente reticulante determina as mudanças observadas nas propriedades funcionais de amidos tratados.

Kabir (2000) reticulou com sucesso a goma guar com quantidades variadas de trimetafosfato de sódio para reduzir as propriedades de intumescimento, para uso como veículo em formulações orais de liberação, especialmente em sistemas que liberam o fármaco nas porções distais do intestino delgado

Wattanachant *et al.* (2003) utilizaram agentes reticulantes reportados no trabalho de Yook *et al.* (1993) e Yeh & Yeh (1993) para determinar as diferenças das propriedades obtidas quando cada um dos agentes era utilizado. O oxiclureto de fósforo, epicloridrina e uma mistura de trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio foram empregados. A reticulação com todos os reagentes estudados resultaram em produtos mais resistentes que o amido nativo. Os autores observaram que a determinação da reticulação de amido e a eficiência dos reagentes de reticulação poderia ser confirmada pela redução da clareza da pasta, pelo aumento da viscosidade e pela temperatura de gelatinização.

Wongsagonsup *et al.* (2014) reportaram o uso da mistura de trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio em diferentes concentrações (0,25% a 6,0%) para reticular amido de tapioca, com a finalidade de avaliar as mudanças nas propriedades físico-químicas para aplicação na indústria de alimentos. Foram obtidos amidos que resultam em maiores valores de viscosidade em solução aquosa e maior resistência ao cisalhamento das misturas obtidas.

Em qualquer trabalho reportado sobre processo de reticulação do amido não foram sugeridos prováveis mecanismos. No entanto, o estudo de Kuniak e Marchessault (1972) foi sugerido um mecanismo de reticulação em que a reação se inicia com a quebra da ligação O-H para formar o amido aniônico (Amido-O<sup>-</sup>). O resumo do mecanismo de reação é apresentado na Figura 2. 15, em que R representa o agente reticulante. Os autores também reportaram que o mecanismo da reação de reticulação do amido é facilitado pela presença de reagentes alcalinos, como NaOH e KOH.

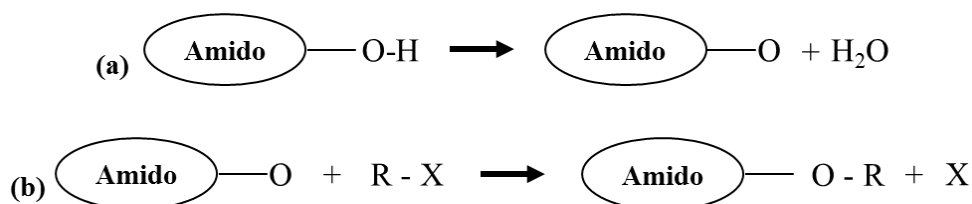


Figura 2. 15. Mecanismo esquemático da reação de reticulação do amido: a) quebra do grupo OH; b) formação das redes reticuladas (KUNIAK e MARCHESSAULT, 1972).

Em média, estão disponíveis para substituição três hidroxilas em cada unidade de açúcar anidro. Porém, a reatividade relativa dos grupos hidroxila varia consideravelmente, devido à acessibilidade das regiões cristalino-amorfas e aos efeitos posicionais. No amido, o grupo hidroxila mais reativo está posicionado na posição C-6. As várias formas usadas para conseguir modificar os amidos nativos procuram alterar uma ou mais de suas propriedades, como a temperatura de geleificação da pasta, a relação existente entre o teor de sólidos e viscosidade, a resistência das pastas de amido à redução de viscosidade por ácidos, calor e/ou agitação mecânica (cisalhamento), a tendência de retrogradação e o caráter iônico e hidrofílico da pasta (SWINKELS, 1996). As propriedades dos amidos preparados a partir de diferentes fontes variam consideravelmente.

Como já citado, os amidos disponíveis comercialmente provêm de diversas fontes. Dentre as fontes de amido, a mais reportada é o milho, seguidas de outras fontes vulgarmente utilizadas, como mandioca, trigo, batata e arroz (RUDNIK, 2008). Cada um destes tipos de amido apresenta propriedades e composições distintas, como mostrado na Tabela 2. 2.

Tabela 2. 2. Propriedade e composição de grânulos de amido (SWINKELS, 1985)

Propriedade dos grânulos	Batata	Milho	Milho Ceroso	Trigo	Tapioca
Diâmetro (µm)	5-100	3- 26	3- 26	1- 40	4- 35
Lípido (% p/p)	0,05	0,60	0,15	0,80	0,10
Proteína (% p/p)	0,06	0,35	0,25	0,40	0,10
Fósforo (% p/p)	0,08	0,02	0,01	0,06	0,01
Amilose (%)	21	28	0	28	17
Amilopectina (%)	79	72	100	72	83
Amilose (DP)	3000	800	-	800	3000
Amilopectina x10 <sup>6</sup> (DP)	2	2	2	2	2
Temp. da Pasta (°C)	60-65	75-80	65-70	80-85	65-70
Pico de Viscosidade (B.U) (5% de amido)	3000	600	800	300	1000
Poder de Inchaço (g) (95°C)	1153	24	64	21	71
Viscosidade da Pasta	Muito alta	Média	Médio-alto	Médio baixa	Alto
Claridade do filme e da pasta	Muito claro	Opaca	Razoavelmente claro	Turva	Completamente claro
Taxa de Retrodegradação	Média baixa	Alta	Muito baixa	Alta	Baixa

Foi possível observar que há uma grande distinção entre as características dependendo da fonte do amido. Dessa forma, fica claro que as modificações podem variar em função das diferenças nas propriedades do amido. Ellis *et al.* (1998) reportaram que a temperatura é uma característica muito importante para o processamento do amido e que a viscosidade varia entres os tipos de amido processados nas mesmas condições, pois a capacidade de interação com a água depende da fonte.

De acordo com conhecimento adquirido foi possível perceber que houve uma redução nos estudos sobre a modificação de amido por tratamento químico, por meio de ligações cruzadas. Além disso, pode-se notar que os estudos estão concentrados apenas na modificação do amido para aplicações em sua forma natural ou para a produção de filmes plásticos com características específicas. Assim, é plausível e necessário considerar estudos sobre o potencial da produção de micropartículas reticulada de amido por agente reticulantes não tóxicos e método reacional nunca testado, de forma que estudos posteriores sobre seu potencial para

encapsulamento de ativos seja testado. É válido deixar claro que, neste trabalho, não serão expostos resultados sobre o uso das partículas de amido para encapsulamento, pois os dados obtidos geraram uma patente e foi mantida a sigilosidade dos resultados.

### **2.3- Encapsulação**

Dentre os vários usos propostos para polímeros naturais, o encapsulamento de compostos químicos se destaca. Inicialmente, o encapsulamento foi aplicado para corantes, sendo dirigido em particular para o desenvolvimento de papel vegetal. Este papel consistia em uma fina película de microcápsulas, aderidas ao papel, de modo que a pressão da caneta provocava o rompimento das microcápsulas e conseqüentemente a liberação da tinta sobre o papel (SANTOS, 2012).

A encapsulação pode ser definida como um processo de empacotamento de substâncias variadas (aromas, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes) em cápsulas de dimensão suficientemente pequenas. Os primeiros relatos de trabalhos que utilizam materiais naturais para encapsulamento datam da década de 1930. Desde então, pesquisas relacionadas ao encapsulamento vêm sendo cada vez mais acentuadas, sendo que o emprego desses materiais tem sido direcionado a diversos fins (SUAVE *et al.*, 2006). Nas áreas agrícola, alimentar, de produtos domésticos, médica, gráfica, cosmética e farmacêutica, as aplicações de produtos encapsulados são das mais variadas, como reportado adiante.

O processo de encapsulação de substâncias foi desenvolvido inicialmente com diversos fins, como reduzir as interações do material encapsulado com fatores ambientais, separar componentes reativos ou incompatíveis, reduzir a migração do material encapsulado para o ambiente externo, evitar reações prematuras de um substrato, mascarar compostos de sabor indesejável, promover melhor solubilidade e melhorar a incorporação do material encapsulado em sistemas secos. Além disso, no decorrer dos anos aumentou o interesse por pesquisas relacionadas a processos que permitem a liberação do material encapsulado lentamente ou a partir da ocorrência de um certo evento estimulante (como mudança de pH e da temperatura) (AZEREDO, 2005).



Cada um dos fins reportados está relacionado com o uso final. Na agricultura o encapsulamento é empregado para a liberação lenta de fungicidas e fertilizantes (BOH *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2012; MARIMUTHU *et al.*, 2017; OLAD *et al.*, 2018). A indústria de cosméticos faz vasta utilização de micro e nanocápsulas em cremes hidratantes e emolientes, depilatórios, fotoprotetores, produtos para cabelo e maquiagem (AMMALA, 2013; CASANOVA e SANTOS, 2015; KESENTE *et al.*, 2017). Na indústria de alimentos, o encapsulamento confere um meio de proteção a componentes sensíveis, reduzindo a reatividade do encapsulado provocada por fatores ambientais, evitando perdas nutricionais, transformando ingredientes líquidos em sólidos fáceis de manusear e constituindo uma forma de compensar a sazonalidade. Além disso, o encapsulamento pode ser empregado para a preservação de aromas e cheiros, que pode ter enorme importância para a estabilidade destes compostos (CARVALHO, 2009; MARTINS *et al.*, 2014; GANGURDE *et al.*, 2017; CANIZALES *et al.*, 2018).

Na área farmacêutica, o encapsulamento encontra um amplo espectro de aplicações para o mascaramento de sabores ou odores, proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e/ou oxidação), redução ou eliminação da toxicidade, redução da volatilidade, administração de fármacos incompatíveis, auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos e produção de formas farmacêuticas de liberação controlada, sustentada e vetorizada (KAS e ONER, 2000; SILVA *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2018). No caso da liberação controlada, a eficiência de proteção depende principalmente da composição e da estrutura da parede formulada, além das condições do processo (temperatura, pH, pressão, umidade) durante a produção e a utilização de tais partículas. A barreira é geralmente formada por componentes que criam, uma rede por conta das propriedades hidrófilas ou hidrófobas do sistema (FUCHS *et al.*, 2006).

Diversos são os trabalhos que reportam o emprego de encapsulamento com objetivos distintos. Por exemplo, Nastruzzi *et al.* (1994) propuseram a microencapsulação de fármacos anti-neoplásico para tratamento direcionado de tumores com a finalidade de levar maior concentração de droga no local. Wilson e Shah (2007) reportaram o uso do microencapsulamento para compostos sensíveis como as vitaminas, com a finalidade de evitar oxidação e perdas do conteúdo, melhorando o tempo de retenção nos alimentos e permitindo

controle de liberação em tempos específicos durante o consumo. Jelvehgari *et al.* (2010) reportaram que administração de drogas anti-inflamatórias frequentemente provocam efeitos adversos no tecido gastrointestinal e microencapsulamento foi empregado com fármaco tolmetina com a finalidade de direcionar a administração e evitar esses efeitos. Jyothi Sri *et al.* (2012) reportaram o uso do microencapsulamento para pesticidas com intuito de serem liberados progressivamente, evitando o uso quantidades excessivas e perdas por lixiviação, evaporação e degradação. Zhang *et al.* (2016) reportaram o encapsulamento de proteínas dentro de partículas de polímero para protegê-las, devido sensibilidade à degradação química ou bioquímica e suscetibilidade à agregação, além de liberar em diferentes ambientes. Šipailienė e Petraitytė (2018) reportaram o microencapsulamento de bactérias probióticas para promover a proteção adequada, resultando em grande número de células viáveis com longa durabilidade para emprego prolongado.

Em tais aplicações industriais, o objetivo não é somente isolar os compostos encapsulados completamente, mas controlar a taxa com que os compostos saem das microcápsulas, evitando perdas imediatas e permitindo a preparação de muitas formulações com cargas químicas menores, reduzindo significativamente o custo dos processos (JYOTHI SRI *et al.*, 2012; SARLAK *et al.*, 2017)

As partículas usadas para o encapsulamento são pequenas, sólidas e esféricas, podendo ser classificadas a depender do tamanho em 3 categorias básicas: macro- (>5000µm), micro- (1-5000 µm) e nanopartículas (<1,0 µm). Independentemente do tamanho obtido, estas partículas podem receber nomenclatura distinta, em função da morfologia e estrutura interna. Um grupo pode ser descrito como cápsulas, em que o núcleo é nitidamente distinto e circundado por um filme (camada de polímero) de espessura variável. Um segundo grupo é classificado como sistema matricial, em que o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz. O material encapsulado é usualmente denominado de recheio ou núcleo, enquanto o material que forma a partícula é denominado de cápsula, encapsulante, cobertura ou parede. No esquema representativo da Figura 2. 16 são apresentados os dois principais modelos de partículas no problema de encapsulamento (SUAVE *et al.*, 2006; AZEREDO, 2005).

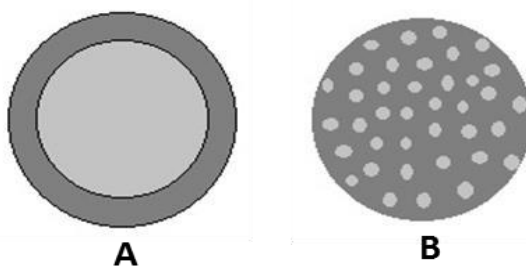


Figura 2. 16. Modelo esquemático de cápsula (A) e matriz (B).

No caso das estruturas matriciais, o material a ser encapsulado pode permanecer na superfície, o que é geralmente evitado no caso das cápsulas. Essa é uma das principais diferenças entre estas duas famílias de estruturas (AZEREDO, 2005). Outros dois sistemas que por vezes são incluídos na classificação das partículas usadas para o encapsulamento são os lipossomas e as emulsões lipídicas, também conhecidos por microesferas lipídicas. Contudo, estes sistemas não satisfazem a definição aqui proposta pelo fato de não serem sólidos e não apresentarem estrutura polimérica (BURGESS e HICKEY, 1994).

Os diferentes tipos de cápsulas e matrizes são produzidos por meio de uma gama muito variada de materiais e por um grande número de diferentes métodos de encapsulamento (CARVALHO, 2009). O material polimérico deve ser selecionado de acordo com as propriedades físico-químicas dos compostos a serem encapsulados, o processo de produção e a via de administração. O encapsulante ideal deve ter propriedades emulsificantes, ser capaz de formar filmes, permitir a preparação de suspensões com baixa viscosidade e altos níveis de sólido, exibindo baixa higroscopicidade e baixo custo (CASANOVA *et al.*, 2015). Autores relataram que a complexidade do material a ser encapsulado deve ser considerada e que a escolha do método deve ser particularmente condicionada pela garantia da estabilidade desse material (MCCLEMENTS, 2017).

Os principais compostos poliméricos naturais reportados na literatura para produção de partículas são os polissacarídeos (agarose, carragena, alginato, quitosana e amido) e as proteínas (colágeno, gelatina, fibrina e elastina) (GASPERINI *et al.*, 2015). A utilização dos biopolímeros como matrizes é de especial interesse para diversas áreas de pesquisa, pelo fato de que estes

sistemas são geralmente biocompatíveis, biodegradáveis e oriundos de matérias primas naturais (PAULA *et al.*, 2010).

As principais técnicas de encapsulamento utilizadas exploram as propriedades requeridas e já citadas, sendo que a escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a ação do produto. A diferença básica entre os métodos existentes diz respeito ao tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (SUAVE *et al.*, 2006).

De acordo com Swioklo *et al.* (2016), o método de encapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor para a escala industrial. A seleção do processo de microencapsulação é fundamentada nas propriedades físicas e químicas da substância ativa e da matriz (principalmente a solubilidade) e na aplicação ou na finalidade das micropartículas, no tamanho, na textura, na forma da micropartícula e no mecanismo de liberação do material a ser encapsulado (BANSODE *et al.*, 2010).

As cápsulas são concebidas e preparadas para atender às exigências impostas pelas propriedades do material encapsulado, destinadas à utilização do produto, bem como pelo ambiente de armazenamento. O tamanho e a forma, assim como as propriedades químicas das paredes da microcápsula, incluindo degradabilidade, biocompatibilidade e permeabilidade, têm que ser considerados na etapa de seleção de matérias-primas e dos processos de microencapsulação. O objetivo da microencapsulação é normalmente definido em termos da permeabilidade do ativo na matriz que constitui a partícula e na solubilidade no meio de liberação (CÁNOVAS *et al.*, 2005).

As microcápsulas com paredes impermeáveis são utilizadas em produtos em que é necessário o isolamento de substâncias ativas, seguida por uma liberação rápida sob condições definidas. Os efeitos obtidos com microcápsulas impermeáveis incluem a separação de componentes reativos, a proteção de substâncias sensíveis contra os efeitos ambientais, a redução da volatilidade das substâncias altamente voláteis, a conversão de ingredientes líquidos

em um estado sólido, mascaramento de sabor e odor e redução de toxicidade (BOH *et al.*, 1996; JYOTHI SRI *et al.*, 2012).

Por outro lado, as microcápsulas com paredes permeáveis permitem a libertação prolongada de componentes ativos para o ambiente, tal como no caso de medicamentos de libertação prolongada, perfumes, desodorizantes, repelentes ou imobilização com atividade localmente limitada de substâncias encapsuladas. Exemplos incluem a produção de fertilizantes encapsulados, de pesticidas com lançamento limitado local para diminuir a lixiviação para a água subterrânea e de catalisadores e enzimas encapsulados para processos químicos e biotecnológicos (BOH *et al.*, 1996).

São diversas as técnicas disponíveis para a produção de partículas poliméricas e encapsulamento de ativos, que podem ser divididas em métodos mecânicos, físico-químicos e químicos. As técnicas físicas e físico-químicas normalmente requerem a formação de uma solução polimérica inicial que contém a espécie ativa, com posterior remoção do solvente para a formação da partícula. A remoção do solvente pode ser feita por inversão de fase e precipitação das partículas dopadas com o agente ativo ou por dispersão de solução em meio heterogêneo e evaporação a quente do solvente. As técnicas químicas normalmente promovem a produção de partículas por meio de reação em meio disperso, com eliminação eventual do solvente e resíduos de reação por meio de evaporação. Os procedimentos mais utilizados são a emulsificação e a evaporação do solvente, a emulsificação seguida de reticulação, o *spray drying*, a coecervação, a extrusão, a liofilização e a gelificação (MILIÁN *et al.*, 2017).

O método *in situ* mais empregado para produção de partículas é a emulsificação, seguida por evaporação do solvente. Em contrapartida, essa é uma técnica muito restritiva, devido à utilização de solventes muitas vezes tóxicos, que limita o uso em aplicações médicas, farmacêuticas e alimentares (SOUTO *et al.*, 2012). A técnica de *spray drying* o método de microencapsulação mais comum, tem sido usado há décadas para encapsular principalmente aromas, lipídios e pigmentos, mas seu uso em produtos termossensíveis, como microorganismos e óleos essenciais, pode ser limitado porque a alta temperatura necessária causa volatilização e / ou destruição do produto (SILVA *et al.*, 2014). As partículas são produzidas por aspersão, sendo que o polímero é solubilizado inicialmente em um solvente volátil e então borrifado em ar quente, que leva à secagem e conseqüente a formação de

partículas (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015). Na coacervação, chamada também de técnica de separação de fases, um material imiscível com água é dispersado na forma de gotas diminutas na solução aquosa do material encapsulante; então, um eletrólito simples e carregado com carga oposta à da espécie coloidal é adicionado para induzir a coacervação. A técnica apresenta como principal vantagem a possibilidade de obtenção de altas eficiências de encapsulamento de substâncias hidrossolúveis. É tipicamente usado para encapsular óleos aromáticos (SILVA *et al.*, 2014). Em contrapartida, parece uma técnica cara quando diz respeito ao aumento de escala, além de ocorrer apenas dentro de limites limitados de pH, concentrações de colóides e / ou concentrações de eletrólitos (COMUNIAN *et al.*, 2013). A liofilização é um método que envolve a desidratação de material congelado sob um processo de sublimação a vácuo, ou seja, a remoção de água composta ocorre sem submeter a amostra a altas temperaturas (CHEN e WANG, 2007). Este método fornece produtos de excelente qualidade, pois minimiza as alterações associadas à alta temperatura, é amplamente utilizado em essências ou aromas. No entanto, seu alto custo e longo tempo de processamento prejudicam sua aplicabilidade, além de ser um método caro e quando necessidade etapas antecedentes (EZHILARASI *et al.*, 2013). A Tabela 2. 3 mostra algumas técnicas de preparação de micropartículas reportadas na literatura.

Tabela 2. 3. Métodos clássicos de preparação de micro e nanopartículas

<b>Técnica</b>	<b>Partículas obtidas</b>	<b>Referências</b>
Nebulização, <i>spray-drying</i> e <i>spray-freeze</i>	Microcápsulas, microesferas	(GHARSALLAOU <i>et al.</i> , 2007; EZHILARASI <i>et al.</i> , 2013; DROSOU <i>et al.</i> , 2017)
Coacervação	Microcápsulas, nanocápsulas,	(ONER, 2000; GOMEZ-ESTACA <i>et al.</i> , 2016; WANG <i>et al.</i> , 2018)
Extrusão/solidificação	Microcápsulas	(TACKENBERG <i>et al.</i> , 2015; LAZOU <i>et al.</i> , 2017,)
Emulsificação/ solidificação	Microesferas, microcápsulas, nanoesferas, nanocápsulas	(CARINO <i>et al.</i> , 2000; HIROSUE <i>et al.</i> , 2001; KIM <i>et al.</i> , 2002; RAO <i>et al.</i> , 2015 KIM <i>et al.</i> , 2017; KONG <i>et al.</i> , 2018)
emulsão	Nanoesferas	(ZHOU <i>et al.</i> , 2015; PERREIRA <i>et al.</i> , 2017)
suspensão	Microesferas, nanopartículas	(DUGUET <i>et al.</i> , 2000; XIE <i>et al.</i> , 2017)
Polimerização	Microcápsulas, nanocápsulas	(HINCAL e KAS, 2000; SHARMA <i>et al.</i> , 2012)
interfacial		

No caso dos polímeros naturais empregados, duas técnicas podem ser combinadas: a reação em suspensão inversa e a gelificação. Essas técnicas possibilitam não só a formação de partículas, mas também o encapsulamento *in situ* do material, dispensando uma etapa posterior para carregamento das partículas. Nesse caso, uma dispersão da solução aquosa do polímero e do material ativo, na presença de uma agente reticulante, é inicialmente preparada em meio orgânico (suspensão inversa). Em seguida, promove-se a reação nas gotas dispersas, formando as partículas sólidas e fazendo o encapsulamento *in situ* (WAY, 2013).

### 2.3.1 Encapsulamento de Aromas

A principal finalidade do encapsulamento de aromas antes do uso é limitar a perda em tempos reduzidos e proteger os compostos da degradação (MA *et al.*, 2013). Como abordado anteriormente, o processo de microencapsulação surgiu há muitas décadas e pode oferecer vários benefícios para os aromas, tais como proteção e estabilidade de voláteis, melhores condições de armazenamento e maior eficiência para aplicação em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (REINECCIUS, 2017). Este processo, além de evitar a perda de compostos voláteis, produz um novo aditivo para a indústria de alimentos: um flavorizante em pó de maior valor agregado e grande aplicabilidade. A principal vantagem da microencapsulação de aromas é a formação de uma barreira entre o composto ativo e o ambiente externo (GUPTA *et al.*, 2016). Geralmente, a matriz usada para encapsulação de aromas deve ter uma boa solubilidade em água, propriedades emulsificantes, boas propriedades de secagem e capacidade de gerar suspensões com baixa viscosidade a alto teor de sólidos (MARTINS *et al.*, 2014).

A maioria dos aromas é volátil; portanto, encapsulamentos destes componentes alargam o período de vida útil desses produtos (WANG *et al.*, 2015). As técnicas mais comumente usadas para encapsulamento de aroma são *spray drying*, liofilização, extrusão, *spray cooling*, coacervação, revestimento em leito fluidizado e inclusão molecular. A escolha de metodologias de encapsulamento apropriadas dependerá do uso final de produtos, das características dos materiais principais e transportadores e das condições de processamento relacionadas à fabricação do produto (WANG *et al.*, 2015, PENBUNDITKUL *et al.*, 2012).

Por exemplo, Botrel *et al.* (2012) utilizaram a técnica de *spray drying* para o microencapsulamento de óleo essencial de orégano, usando como matrizes de revestimento a maltodextrina, a goma arábica e o amido modificado. Santiago-Adame *et al.* (2015) também utilizaram a técnica de *spray drying* para o microencapsulamento de canela, utilizando maltodextrina e como matrizes para concentrar maior teor de fenólicos. Yang *et al.* (2014) desenvolveram uma microcápsula com óleo de baunilha empregando técnica de coacervação complexa, com o objetivo de uma liberação controlada de óleo de baunilha com um efeito residual prolongado e visando um aumento em sua termoestabilidade para aplicação de especiaria. De forma similar, a técnica de coacervação oferece poucas oportunidades para a modificação da matriz polimérica e só pode ser aplicada em casos muito específicos de aplicação (LOPES *et al.*, 2016).

Evageliou e Saliari (2017) estudaram a encapsulação de limoneno pela técnica de *freeze-drying*, utilizado várias matrizes de encapsulamento com objetivo de maior tempo de retenção. No entanto, alguns autores revelaram que esta técnica geralmente resulta na perda de componentes altamente voláteis, produtos espumosos e estruturas porosas (ZUIDAM e SHIMONI, 2010). Castro *et al.* (2016) reportaram que maiores limitações desse método para encapsulamento de aromas estão ligadas a evaporação do voláteis e dissolução dos compostos ativos. Assim, as aplicações de encapsulamento tornaram amplamente aceitos na indústria de aromas, principalmente pela utilização de óleos essenciais.

O uso de óleos essenciais na perfumaria, cosméticos e agricultura ou indústrias de alimentos é bastante comum devido às suas propriedades aromáticas. Propriedades de óleos essenciais podem mudar dependendo de sua origem e composição. Alguns óleos têm propriedades medicinais, como atividade antioxidante, atuando no combate aos radicais livres, atividade antiinflamatória e atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais são ligeiramente solúveis em água e são capazes de transmitir à água o odor e o sabor, sendo muito útil para o encapsulamento. Esses aromas contêm terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres e outros compostos secundários (SANTIAGO-ADAME *et al.*, 2015; KWAN e DAVIDOV-PARDO, 2017).

A proteção de óleos essenciais, perfumes, aromas e outros agentes ativos em transportadores poliméricos com a finalidade de liberação controlada durante um certo período



de tempo tem sido uma questão de pesquisa considerável nos últimos anos (EL ASBAHANI *et al.*, 2015; WEN *et al.*, 2016; GRANATA *et al.*, 2018). O desenvolvimento de novos métodos de encapsulamento consome tempo e esforço, exigindo uma abordagem multidisciplinar, particularmente com materiais alimentícios. No entanto, para o encapsulamento de fragrâncias, nenhuma legislação extensiva é necessária para aprovação, tornando assim o uso de novos materiais de matriz mais fáceis de aplicar para usos comerciais. No entanto, as considerações de custo na indústria de alimentos são muito mais rigorosas do que nas indústrias farmacêutica ou cosmética, assim um cuidado a mais são necessárias as novas formulações (FUCHS *et al.*, 2006).

Dentro desse cenário, foi realizado uma análise da evolução do número de publicações com o tema relacionado a esse estudo. Ao buscar por “encapsulation”, “essential oil” e “gelatina” em todos os campos da busca na plataforma Scopus, foi possível observar que o número de publicações cresce exponencialmente quando algumas das palavras pertinentes ao tema foram encontradas no corpo das publicações; contudo, o número de publicações anual ainda é menor que 250, assim como quando se adiciona a palavra “particle” na busca. Além do fato das primeiras publicações serem de 2004, isso mostra o quão recente é este tema e que existe a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o assunto.

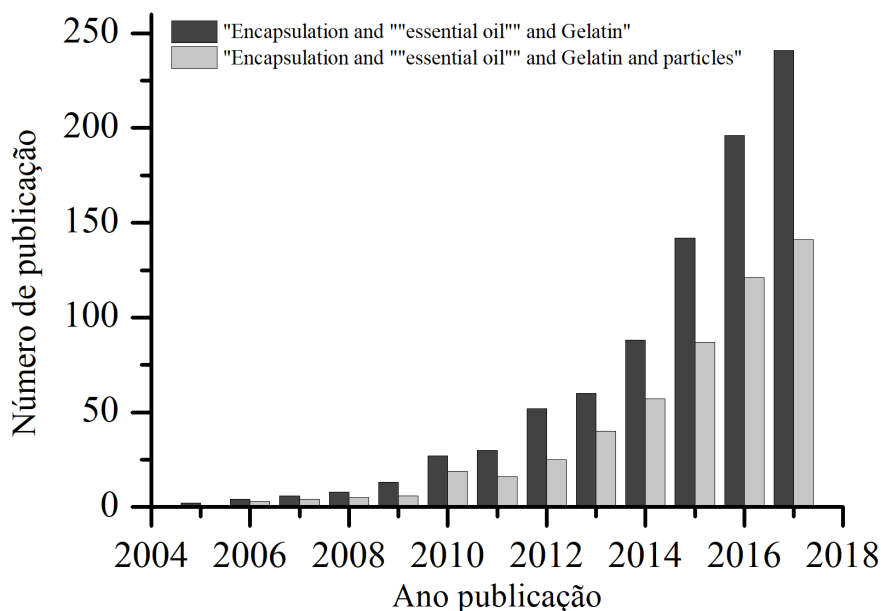


Figura 2. 17. Evolução do número de publicações referentes ao tema encapsulamento.

Diante de todos os aspectos abordados, uma área de investigação que desperta cada vez mais interesse é o desenvolvimento de um polímero de baixo custo, biocompatível e com propriedades capazes de encapsular aromas (óleo essenciais) *in situ*, por técnica simples e prática, promovendo a redução de perdas e um tempo de liberação prolongada. Considerando esses aspectos, o uso de polímeros naturais como gelatina da classe das proteínas e do amido da classe dos polissacarídeos pode ser um potencial para desenvolvimento desses produtos.

### **2.3.2. Uso de Polímeros Naturais para Encapsulamento**

Os materiais naturais mais utilizados para o encapsulamento mais utilizados são polissacarídeos e açúcares (gomas, amidos, celuloses, ciclodextrinas), proteínas (gelatina, caseína, proteínas de soja) e lipídeos (ceras, parafina, óleos). Apesar dos vários sistemas propostos, polímeros biodegradáveis surgiram como potenciais candidatos para o desenvolvimento de veículos encapsulantes com compatibilidade de ingestão. A seguir será revisado principalmente o uso de gelatina e amido para o encapsulamento de ativos.

Apesar de serem mais conhecidas como nutrientes dos alimentos, as proteínas, tais como gelatina, proteína de soja, zeína, dentre outras, apresentam muitas propriedades que as tornam boas e viáveis para uso como materiais para microencapsulação. A propriedade de emulsificação é muito importante para estes materiais. Devido à natureza anfifílica, proteínas podem interagir tanto com grupos hidrofílicos como com grupos hidrofóbicos, auxiliando a estabilidade de sistemas dispersos por reduzirem a tensão interfacial do meio (MENG e CLOUTIER, 2014).

Como já reportado, o intuito principal da microencapsulação é a proteção do material a ser encapsulado da influência do meio externo, além de possibilitar uma liberação direcionada e controlada. Dessa forma, as propriedades de barreiras do material para encapsulação devem ser melhoradas. Por essa razão, a reticulação é frequentemente sugerida como meio para melhorar essas propriedades (MENG e CLOUTIER, 2014). A gelatina é uma proteína que vem sendo usada para encapsulação por conta da excelente propriedade de formação de filme, de secagem, além da propriedade única de gelificação. Com base nessas propriedades físicas e químicas, gelatinas vêm sendo usadas como materiais de revestimento em diferentes processos;

contudo, as suas propriedades devem ser melhoradas por meio de reações de reticulação (SHAHIDI e HAN, 1993).

Segundo Chaundy *et al.* (1996), gelatinas reticuladas podem ser utilizadas com sucesso em combinação com materiais termicamente sensíveis, como é o caso dos aromas. Os autores estudaram a possibilidade de reticular a gelatina na presença de vitamina A, sem exigir a utilização de um agente de reticulação tóxico. Esposito *et al.* (1995) estudaram a reticulação da gelatina para redução da solubilidade com a finalidade de encapsular clorpromazina, fármaco antipsicótico utilizado no tratamento de esquizofrenia.

Bruschi *et al.* (2003) utilizaram matriz de gelatina para encapsulamento de própolis para facilitar a incorporação em outros produtos, como produtos farmacêuticos. Alguns trabalhos reportam que o uso de um único material encapsulante podem não resultar em todas as características requeridas para melhorar as propriedades de encapsulamento de uma ativo. Roussenova *et al.* (2012) reportaram o uso da gelatina para encapsular compostos ativos lábeis, como nutrientes essenciais e fármacos, com a finalidade de protegê-los de influências externas indesejáveis, facilitar a retenção e atingir o alvo quando desejado. Nakagawa *et al.* (2012) reportaram o uso de gelatina e goma acácia para a produção de micropartículas por processos de coacervação para o encapsulamento de  $\beta$ -caroteno.

Jeyakumari<sup>1</sup> *et al.* (2017) reportaram em seu trabalho o microencapsulamento de óleo de orégano em blendas preparadas com gelatina, ciclodextrina e goma arábica pela técnica de *spray drying*. Tavassoli-Kafran *et al.* (2018) estudaram a preparação de fibras de gelatina e de gelatina reticulada com ácido tânico para o encapsulamento de óleo de laranja para preservar a estabilidade do óleo de laranja.

Alguns trabalhos reportam que a gelatina é um material promissor para o encapsulamento; no entanto, muitas dessas referências não fazem o escopo e nem estão diretamente ligadas ao realizado no presente trabalho. É válido ressaltar mais uma vez que nunca antes foi descrita a preparação partículas de gelatina para encapsulamento de óleo essenciais *in situ* por técnica de suspensão inversa.

Dos polissacarídeos, os amidos, maltodextrinas e pectina, têm sido normalmente utilizados como agentes de encapsulação, tendo destaque para estudos com maltodextrinas usado por técnica de inclusão complexa, sendo um tema altamente investigado. Por outro lado, pesquisas referentes ao uso do amido como agente de encapsulação ainda é limitado; no entanto, vem crescendo com passar dos anos, como foi anteriormente reportado.

O amido é um polissacarídeo muito abundante e considerado um bom agente encapsulante, pois apresentam baixas viscosidades a teores elevados de sólidos, além de boa solubilidade, embora alguns deles não possuam as propriedades interfaciais necessárias para um elevado rendimento de microencapsulação (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Contudo, amidos que possuem propriedades de gelificação podem estabilizar emulsões em relação à floculação e à coalescência (DALGLEISH, 2006). No entanto, é possível superar os inconvenientes dos materiais de encapsulação e melhorar as propriedades, promovendo modificações químicas dos materiais.

A produção de amidos modificados constitui uma alternativa que vem sendo desenvolvida com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos, aumentando a utilidade deste polímero em muitas aplicações (LEONEL *et al.*, 1998). Com estruturas mais bem projetadas e produtos mais consistentes, o uso mais recente do amido é na área de microencapsulamento, em que pode oferecer alta retenção do material encapsulado, maior tempo de vida e alta eficiência de fabricação (BOUTBOUL *et al.*, 2000; SOSA *et al.*, 2014). O amido modificado é um agente encapsulante recomendado também pela excelente retenção de voláteis (acima de 93%), pela boa estabilização da emulsão e a baixa viscosidade do meio (ARANCIBIA *et al.*, 2011). Chen e Wagner (2004) reportaram o uso do amido modificado para o nanoencapsulamento de vitamina E, com a finalidade de fornecer estabilidade e maior tempo de atuação desse nutriente.

Li (2014) reportou o uso do amido para a microencapsulação de diversos compostos, como vitaminas, óleos e aromas. O autor revelou que o amido tem vantagem em relação à eficiência de encapsulação, em comparação com outros polissacarídeos. Gangurde *et al.* (2016) estudaram sobre o encapsulamento de vitamina E em matrizes de amido modificado pela técnica de emulsão/*spray-drying* com o intuito aumentar a estabilidade da vitamina e facilitar a solubilização em água.

Diversos trabalhos têm reportado o uso do amido como matriz eficiente para o encapsulamento de aromas, seja o amido usado como matriz única ou mistura a outros polímeros naturais (REINECCIUS, 1989; ROWE, 2005; LAKKIS, 2007;). Por exemplo, amido de milho tem sido empregado para encapsular antioxidantes (DELADINO *et al.*, 2015), pigmentos (SPADA *et al.*, 2012), aromas (ORDOÑEZ *et al.*, 2014), microrganismos, proteínas e drogas. (JANASWAMY *et al.*, 2014).

Madene *et al.* (2006) reportaram que o amido e ingredientes à base de amido são materiais que podem ser usados como veículos para encapsulamento de aromas, além de serem substitutos de gordura e estabilizadores de emulsões. Geralmente, a interação de compostos voláteis com o amido pode ocorrer de duas maneiras. Por um lado, as moléculas do composto aromatizante podem interagir com a  $\alpha$ -hélice da amilose, por meio de ligação hidrofóbica, formando um complexo de inclusão. Por outro lado, podem ocorrer interações polares que envolvem o surgimento de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxila da molécula de amido e do componente aromático (ARVISENET *et al.*, 2002; BOUTBOUL *et al.*, 2002).

Escher *et al.* (2000) também reportaram que a amilose é capaz de formar complexos de inclusão com um amplo espectro de moléculas, incluindo compostos de aroma. Tietz e Conde-Petit (2007) reportaram que o amido interage com aromas fortemente e retém compostos por maior tempo, em comparação com outros ingredientes. Conde-Petit *et al.* (2006) reportaram também que a estrutura helicoidal única da amilose faz com que o amido seja um veículo muito eficiente para o encapsulamento de aromas.

Ao longo dos anos, o amido tem sido usado como ingrediente funcional, principalmente na área de alimentos e bebidas, pois fornece textura e estabilidade para produtos alimentícios. Por outro lado, há alguns anos o amido ganhou outras aplicações industriais de grande importância, especialmente para a produção de papel, cosméticos, produtos farmacêuticos e embalagens renováveis (LI, 2014).

Na verdade, uma enorme variedade de materiais de parede baseados em modificações de amido está comercialmente disponível. No entanto, o desenvolvimento de materiais de baixo custo é uma área de pesquisa constante com o amido como um material de parede importante e relativamente barato. Misturas de material disponível comercialmente têm sido exploradas para

melhorar as características de encapsulação dos produtos finais e para atingir uma ampla gama de aplicações, além do uso de novas técnicas e formulações.

## 2.4- Suspensão Inversa e Gelificação

Um típico sistema de polimerização em suspensão apresenta um ou mais monômeros insolúveis na água, contendo um iniciador solúvel na fase orgânica. Essas espécies são dispersas numa fase aquosa contínua por uma combinação de forte agitação e uso de pequenas quantidades de agentes de suspensão (estabilizantes). Os estabilizantes impedem a coalescência das gotas orgânicas suspensas na fase aquosa, estabilizando a gota de polímero. Dessa forma, cada gota funciona como se fosse um mini-reator em massa, onde apenas o iniciador e os monômeros estão presentes (ODIAN, 2004).

Quando o contrário é observado (a fase contínua é orgânica e a fase dispersa é aquosa), a técnica recebe o nome de suspensão inversa. O uso de polimerização em suspensão inversa é um desenvolvimento relativamente novo. A diferença é que dessa vez o agente estabilizante deve ser solúvel na fase orgânica e o iniciador deve ser solúvel na fase aquosa. A suspensão inversa é, portanto, responsável pela produção de partículas de polímeros hidrofílicos (MACHADO *et al.*, 2007).

A dispersão de água em óleo é termodinamicamente instável. Para o desenvolvimento tecnológico, procura-se utilizar meios que possam retardar pelo maior tempo possível a separação de fases. Por isso, é requerida a adição de agentes estabilizantes, que atuam na interface entre as fases e previnem a aglomeração (AHMED, 2015).

Nas reações conduzidas por intermédio da técnica de suspensão inversa, os polímeros formados são obtidos na forma de pérolas esféricas e a distribuição final de tamanhos de partícula é resultado dos fenômenos de quebra e coalescência das gotas. Por isso, o tamanho das partículas de polímero pode ser controlado com auxílio da variação da velocidade de agitação, da concentração de agente estabilizante, da temperatura da reação e até mesmo por meio da alteração do tipo de fase contínua empregada. Tipicamente, as partículas formadas possuem tamanhos na faixa de 10-1000  $\mu\text{m}$  (JAHANZAD *et al.*, 2004; DOWDING e VINCENT, 2000). O tipo de óleo, a velocidade de agitação, a temperatura de reação, a

concentração de polímero e o tipo e concentração do agente estabilizante exercem influência muito grande no tamanho e na distribuição de tamanhos de partícula dos polímeros finais obtidos (ODIAN, 2004; ESPOSITO *et al.*, 1996).

Para que sejam obtidas micropartículas após a realização da reação em suspensão inversa no caso da gelatina ou amido, é necessário gelificar as gotículas formadas na suspensão por meio da redução da temperatura (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009). Uma vez gelificadas, as partículas têm maior dificuldade de aglomerar. No entanto, caso a agitação cesse, as partículas não se mantêm estáveis por muito tempo, pois a presença de água no sistema faz com que elas fiquem bastante pegajosas. Para contornar esse problema e permitir a formação definitiva das esferas, costuma ser adicionada acetona à mistura final para desidratar as partículas. Quando isso é feito, toda a água é retirada das partículas de polímero, que se tornam sólidas e não mais suscetíveis à aglomeração.

A técnica de suspensão apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas de polimerização, que incluem a facilidade de dissipação de calor na reação, e permite assim melhor controle da temperatura, e a mais baixa viscosidade do sistema ao longo da reação. Além disso, resulta em baixos níveis de impureza no produto e, conseqüentemente, menor custo de separação, quando comparada com técnicas em emulsão. É importante ressaltar que técnica de suspensão inversa nunca foi reportada para preparação de partículas a partir de polímeros naturais nem para o encapsulamento de aromas.

## **2.5- Comentários Finais**

Os aromas são compostos voláteis muito importante em diversos campos industriais. É indiscutível a necessidade do controle da estabilidade destes compostos para a satisfação e qualidade dos produtos em que são empregados. O processo de encapsulação de aromas suscitou atenção considerável, devido à capacidade de proteger esses compostos da degradação e alta volatilidade, limitando perdas e induzindo retenção. Por isso, diversos trabalhos reportados sugerem o uso de polímeros naturais para o encapsulamento desses compostos.

Os polímeros naturais são materiais usualmente biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo e baixa toxicidade que apresentam alto potencial para diversas aplicações e entre elas o encapsulamento de compostos ativos. Os polímeros naturais apresentam inúmeros grupos funcionais (hidroxilas livres, carbonilas, grupamentos amino) que podem ser reticulados, dando origem a redes altamente interconectadas, capazes de encapsular aromas e permitir com isso a estabilização desses compostos, além de viabilizar a incorporação desses aromas na forma de pó em diversos produtos. É inquestionável a necessidade de reticular os polímeros naturais devido à sua solubilidade em água. O emprego de reticulantes tóxicos é largamente definido na literatura e a toxicidade destes reticulantes deve ser considerada quando se consideram aplicações alimentares e farmacêuticas. Preocupados com esse aspecto, trabalho anterior realizado pelo grupo buscou desenvolver técnicas baseadas no uso de glicose para reticulação da gelatina. No entanto, resultados satisfatórios não foram alcançados nas condições testadas para obtenção das partículas.

Dessa forma, o presente trabalho visa melhor compreender o processo de reticulação de polímeros naturais na presença da glicose, produzir micropartículas reticuladas à base de polímeros naturais e estudar o emprego das partículas produzidas para o encapsulamento de aromas, averiguando aspectos relacionados à estabilidade dos produtos e eficiência dos processos. Assim, o estudo aqui apresentado é original em vários aspectos. Em primeiro lugar, caracteriza de forma mais clara o papel da glicose como agente reticulante de matrizes constituídas por polímeros naturais. Em segundo lugar, descreve pela primeira vez a produção de partículas poliméricas naturais a partir de reações em suspensão inversa. Em terceiro lugar, propõe pela primeira vez o encapsulamento de aromas em micropartículas à base de polímeros naturais, usando processos de suspensão inversa e com encapsulamento *in situ*. Finalmente, é feita pela primeira vez a análise de desempenho dos produtos obtidos, na forma de micropartículas dopadas com aromas, em termos de eficiência de encapsulamento e de liberação de ativos.



## *Capítulo III*

### *Materiais e Métodos*

#### **3.1 Material**

Os principais reagentes e solventes utilizados ao longo do presente trabalho e as respectivas pureza e procedência são listados a seguir:

- Gelatina Grau Farmacêutico – PhEur Gelatin (Sigma-Aldrich, Alemanha) – é, segundo o fabricante, uma mistura de gelatinas dos tipos A e B, em proporção conforme segue as especificações da farmacopéia europeia, (Lote: BCBC8523). A gelatina utilizada foi caracterizada por Way (2013) como mostrada no Apêndice A.
- D-(+) - glicose anidra (Sigma-Aldrich, França) – Reagente ACS.
- Óleos essenciais aromáticos de laranja, manjeriço, canela e citronela. Foram obtidos da FERQUIMA (São Paulo, Brasil).

Outros reagentes:

- Acetona (VETEC, Brasil) – Reagente PA, com pureza mínima de 99,5%. Usada para desidratar as partículas após a reação.
- Monooleato de sorbitano, SPAN 80 (C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>) (Sigma Aldrich, EUA). Usado como agente surfactante das reações.
- Óleo de milho comercial (SALADA- Tipo I, Brasil). Utilizado como fase contínua das reações.
- Hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) (VETEC, Brasil). Utilizado para o ajuste de pH, com pureza mínima de 95%.
- Água destilada obtido de uma destilador GEHAKA modelo Master System MS 2000.

Os principais equipamentos utilizados são listados a seguir.

- Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7, Alemanha) com controle de temperatura por meio de termopar (IKA, modelo ETS-D5). Utilizada para agitação e controle de temperatura das reações.
- Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A). Utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais.
- Bomba de vácuo (QUIMIS, modelo Q355D2, Brasil) e todo aparato necessário para seu funcionamento (kitassato, funil de büchner). Utilizada para lavagem e filtração das amostras.
- Papel de filtro qualitativo (Qualy, Brasil) com 12,5 cm de diâmetro, 205 µm de espessura e maioria dos poros com 14 µm de diâmetro. Usado na filtração das amostras com a bomba de vácuo.
- Bécheres com capacidades variando entre 50-500 mL, utilizados para preparo de soluções e pesagem de reagentes.
- Microscópio óptico (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 MAT,). Utilizado para uma melhor observação da morfologia das partículas.
- Analisador Térmico (Perkin Elmer, modelo STA-6000, EUA). Utilizado para condução das análises termogravimétricas (TGA) dos materiais.
- Analisador de tamanho de partículas (Malvern, Mastersizer 2000, Reino Unido). O equipamento possui um sistema de detectores para espalhamento frontal, lateral e posterior de luz. A fonte é um laser néon de hélio, cujo comprimento de onda característico é de 632,8 nm. A faixa de detecção varia entre 0,1 e 1000 µm. Foi empregado para determinação dos tamanhos médios e distribuição de tamanhos de partícula.
- Reômetro (TA instruments, Modelo AR-G2, EUA). Utilizado para observar a viscosidade das soluções poliméricas.
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL Milestones, modelo 6460LV, EUA). Usado para as análises da morfologia das partículas. As partículas foram

metalizadas antes das análises em metalizador (Emitech, modelo K550, Inglaterra).

- Cromatógrafo a gás (DANI Instruments, modelo Master GC, Itália) acoplado Espectrômetro de massa (DANI Instruments, modelo Master TOF, Itália) equipado com detector de ionização de chama e uma coluna capilar HP-5MS (5%-Phenylmethylpolysiloxane), com comprimento de 30 m, diâmetro interno 0.25 mm e espessura de 0.25  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, EUA). Utilizado para identificar presença dos compostos encapsulados.
- Infravermelho com transformada de Fourier (Thermo, modelo Nicolet 6700, EUA). Utilizado para conduzir análises de FTIR das amostras. O equipamento é equipado com um acessório Smart Orbit, que possui um diamante na área de leitura e permite a análise de amostras sólidas sem a necessidade de preparar pastilhas.
- Ressonância magnética nuclear no domínio de tempo (RMN-DT) (Oxford Instruments, modelo MARAN Ultra 0,54 T – 23,4 MHz para  $^1\text{H}$ , EUA). Foi utilizada a sequência de pulsos MSE-FID.
- Tensiometro (Kruss, modelo K100, Alemanha). Utilizado para análises de tensão superficial das misturas físicas da fase aquosa pura e na presença dos aromas.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Reações

As reações foram realizadas com o intuito de preparar partículas a partir de soluções de polímeros naturais com propriedades desejáveis, para uso posterior em aplicações relacionadas ao encapsulamento de extratos naturais aromáticos. O objetivo inicial era estudar a obtenção de partículas de gelatina reticulada por meio da adição de glicose, a fim de alterar características tais como solubilidade água e resistência mecânica. Posteriormente, as reações foram conduzidas com os demais materiais.

As reações foram conduzidas em suspensão inversa, sendo preparadas inicialmente duas misturas. A fase oleosa era composta por uma mistura de óleo de milho comercial e SPAN 80, enquanto a fase aquosa era formada por uma mistura de gelatina, água destilada e glicose. A composição experimental básica para a dispersão de gelatina está descrita na Tabela 3. 1, em conformidade com os estudos conduzidos previamente. As modificações realizadas foram feitas a partir da receita apresentada.

Tabela 3. 1. Composição base do meio reacional usada para o preparo de partículas de gelatina (Reação padrão).

	Componentes	Massa (g)
Fase dispersa	Gelatina	4,5
	Glicose	1,2
	Água	30,0
Fase continua	Óleo de milho	120,0
	Span 80	6,0
	Total	162,0

Após a glicose ser solubilizada a 50 °C em água, a gelatina era adicionada sem a condução de uma etapa prévia de inchamento. Após a solubilização da gelatina, essa solução era vertida sobre a fase oleosa, iniciando à reação. O sistema foi mantido sob agitação magnética constante em cerca de 700 rpm ou 1000 rpm, em uma das reações para avaliar a dinâmica da reação. A temperatura foi mantida constante e igual a  $60 \pm 2$  °C durante todo o tempo de reação.

Terminada a reação, a mistura era resfriada até  $10 \pm 1$  °C com auxílio de um banho de gelo. Em seguida, 50 mL de acetona eram adicionados para desidratar as partículas. Após permanecer sob agitação por ao menos 5 minutos em presença de acetona, o produto era então filtrado a vácuo e lavado com mais 100 mL de acetona, para remoção do óleo e água residuais. O produto final era mantido no dessecador por 24 horas. A Figura 3. 1 ilustra o esquema reacional descrito. Após a definição da reação padrão, um novo bloco de reações foi executado.

O novo bloco de reações foi realizado na presença dos extratos aromáticos para avaliar a influência dos extratos no processo de produção de partículas e os seus efeitos sobre a

morfologia das partículas obtidas. Após concluir a avaliação preliminar, outro grupo de reações foi elaborado com óleos essenciais comerciais para promover a encapsulação. Os óleos aromáticos selecionados para encapsulação foram o óleo essencial de laranja, o óleo essencial de citronela, o óleo essencial de canela e o óleo essencial de manjeriço. A escolha dos óleos essenciais foi baseada na disponibilidade comercial e por serem os mais consumidos. O procedimento foi realizado com adição de 15% em massa do extrato na fase aquosa da reação após a solubilização da gelatina. E em seguida, a solução era vertida sobre a fase oleosa, dando início à reação, como no caso padrão. As etapas posteriores foram conduzidas na forma reportada.

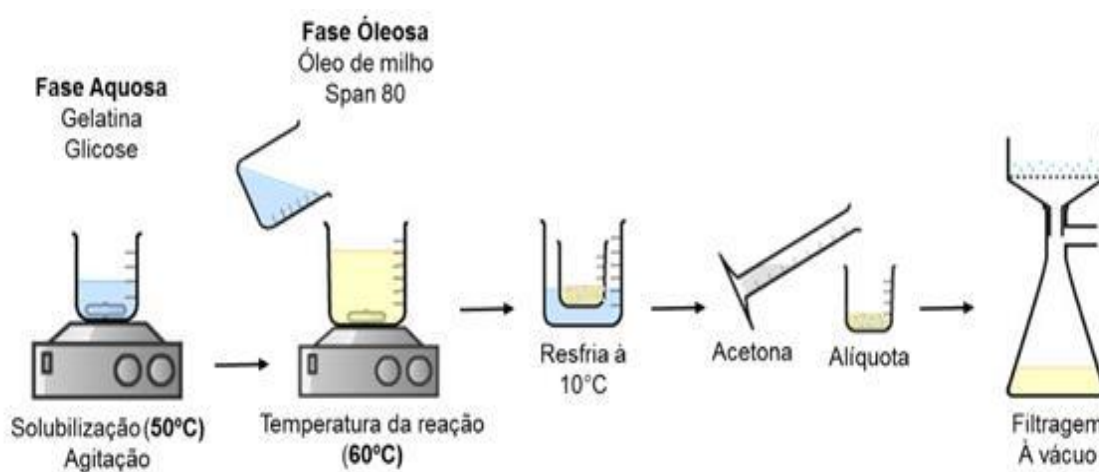


Figura 3. 1. Esquema ilustrativo das etapas reacionais.

### 3.3 Caracterização

#### 3.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

A fim de caracterizar as partículas de gelatina obtidas em diferentes instantes de tempo e a ação da glicose como agente reticulante, amostras coletadas a tempos regulares foram submetidas a ensaios térmicos por meio da técnica termogravimétrica (TGA) com auxílio do analisador térmico Perkin Elmer Modelo STA-6000 (Shelton, EUA). As análises foram realizadas na faixa de 25 a 650 °C, a uma taxa de aquecimento 10 °C/min. As amostras foram preparadas colocando cerca de 10 – 20 mg de material em um cadinho de alumínio adequado

para o uso no equipamento. As análises foram conduzidas sob atmosfera inerte de nitrogênio e vazão de 20 mL/min.

### **3.3.2 Distribuição de Tamanhos de Partículas (Malvern)**

As distribuições de tamanhos de partículas foram caracterizadas por intermédio da técnica de difração a laser provocado pela presença das partículas poliméricas em meio aquoso. O equipamento utilizado foi o analisador de tamanho de partículas Master Sizer Hydro 2000S (Malvern, Reino Unido). As amostras foram preparadas dispersando cerca de 200 mg de amostra em 5 mL de etanol. O meio de dispersão utilizado não dissolve as partículas. As análises foram feitas na temperatura ambiente.

### **3.3.3 Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (RMN-DT)**

As amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (RMN-DT) para evidenciar as diferentes conformações do polímero. O equipamento utilizado foi fabricado por Oxford Instruments, modelo MARAN Ultra 0,54 T (23,4 MHz para o  $^1\text{H}$ , EUA). Foi utilizada a sequência de pulsos MSE-FID para conhecimento das frações percentuais das regiões rígida, intermediária e móvel, além do tempo de relaxação transversal ( $T_2^H$ ) de cada uma das amostras.

### **3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As análises de infravermelho foram realizadas na região do infravermelho médio (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). Espectros foram obtidos no modo de refletância total atenuada (ATR) com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e foram armazenados como médias de 128 varreduras. O equipamento utilizado foi um Nicolet 6700 fabricado pela Thermo Electron Corporation (Madison, EUA). As análises foram feitas diretamente com o pó, uma vez que o equipamento é equipado com o acessório Smart Orbit, que permite a utilização direta da amostra em pó, sem a necessidade de preparo de pastilhas.

### **3.3.5 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)**

Análises cromatográficas foram realizadas para caracterizar os extratos aromáticos e os óleos, por meio da determinação dos constituintes presentes, e para determinar os constituintes

do aroma presente nas partículas resultantes das reações conduzidas com os extratos. Os constituintes dos extratos foram separados com uma coluna capilar HP5-MS, fabricada pela Agilent, modelo 19091S-433, EUA, com 30 m de comprimento, 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme, cuja fase estacionária é composta por 5% fenilmetilpolisiloxano. Subsequentemente, os compostos foram identificados de acordo com a biblioteca do NIST (National Institute of Standards and Technology), a partir dos fragmentos gerados no espectrômetro de massas.

As amostras analisadas foram diluídas em etanol na razão de 1:5 e uma alíquota de 0,1  $\mu\text{L}$  desta mistura foi usada na injeção no cromatógrafo. A análise foi realizada utilizando-se um cromatógrafo a gás fabricado pela DANI Instruments (modelo Master GC, Itália), equipado com um detector de ionização de chama e acoplado ao espectrômetro de massas (DANI Instruments, modelo MS Master TOF MS Plus, Itália), usando como gás de arraste o hélio. A razão de "split" foi igual a 1:100. O forno foi programado para iniciar a análise a 40 °C, permanecendo 5 minutos em estado isotérmico e, em seguida, elevando a temperatura do forno até 270 °C a uma taxa de 5 °C/min.

### **3.3.6 Caracterização Reológica**

As viscosidades das soluções aquosas de gelatina foram caracterizadas por meio do reômetro AR-G2 fornecido pela TA instruments (New Castle, EUA), com o intuito de observar indiretamente a possível mudança das massas molares médias do soluto. Para a realização das análises, amostras de 20 mL da fase aquosa eram colocadas em um recipiente de geometria de cilindro coaxial com taxa de cisalhamento 300  $\text{s}^{-1}$  por 5 h, a 60 °C. Ao longo da análise, leituras foram realizadas a cada 10 segundos, gerando ao final um gráfico da viscosidade como função do tempo.

### **3.3.7 Microscopia Óptica**

As características morfológicas das partículas de gelatina produzidas foram caracterizadas por meio da microscopia óptica, usando microscópio óptico Axiovert 40 MAT (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). As microfotografias foram capturadas por meio do programa Axiovision, possibilitando ampliação e ajustes de imagens.

### **3.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualização mais apurada da morfologia das partículas. As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura modelo 6460LV (JEOL, Milestones, USA), equipado com filamento de tungstênio e com resolução de 10 nm, operando com tensão máxima de 30 kV. Para a realização das análises, as amostras foram metalizadas com ouro. O metalizador utilizado foi o Emitech (modelo K550, Inglaterra) com taxa de deposição de 50 nm/min e tamanho de partícula de 5 nm.

### **3.3.9 Tensão superficial (TS)**

As análises de tensão superficial das soluções líquidas foram realizadas com Tensiometro KRUSS (modelo K100, Alemanha). A finalidade foi observar prováveis mudanças na tensão superficial ao longo da reação, para explicar o fenômeno de formação das partículas de gelatina em algumas reações. Além disso, as análises tiveram o objetivo de avaliar a influência da adição dos extratos aromáticos na de evolução da reação. Inicialmente, a mistura física usada nas reações foi elaborada e 20 mL da amostra foram colocados em um recipiente. As medidas foram feitas com o método da placa por aproximadamente 40 min (tempo que medida estabilizava) a temperatura de 60 °C. Após isto, a solução foi mantida sob agitação por 5 horas (tempo total da reação) e, então, novas medidas foram realizadas. Esse mesmo procedimento foi realizado na presença de diferentes óleos essenciais. Não foi utilizados surfactantes para as medidas realizadas.

### **3.3.10 Eficiência de Encapsulamento**

A eficiência de encapsulamento dos óleos essenciais foi avaliada pela técnica CG-MS, realizada em duas etapas. Primeiramente, as partículas dopadas com óleos passaram pelo processo de extração/filtração. Para realização da extração, 0,36 g de partículas de gelatina dopadas com óleos essenciais foram suspensas em 5mL etanol. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 20 min e filtrada em membrana de 0,22 µm para completa separação dos sólidos. Em seguida, o material filtrado foi então analisado usando a técnica de GC-MS, nas condições reportada na Seção 3.3.5.



### **3.3.11 Teste de liberação**

Sabendo que os aromas são voláteis, a liberação é mais perceptível no ambiente. Dessa forma, o teste de liberação dos aromas foi realizado com por meio da técnica de FTIR, já descrita na seção 3.3.4. Os ensaios foram conduzidos pela exposição das partículas em um ambiente com temperatura controlada em torno de 23 °C e medidas no espectrômetro foram tomadas a cada 24h para avaliar as mudanças nos espectros ao longo dos dias.

## ***Capítulo IV***

### ***Resultados e Discussões***

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos experimentais. O primeiro e o segundo bloco de reações são referentes à obtenção das partículas de gelatina e suas caracterizações. O terceiro bloco diz respeito aos testes conduzidos com adição de extratos aromáticos, com a finalidade de verificar a influência dos óleos no processo e na formação e morfologia das partículas. O quarto bloco de experimentos é referente aos testes feitos com a adição de óleo essenciais comerciais. O último bloco de experimentos é referente às reações conduzidas com amido para desenvolvimento de um processo para produção de partículas de amido.

Para fins de avaliação, considera-se que o comportamento ideal resulta na produção de partículas micrométricas, com diâmetros na faixa de 100 a 500  $\mu\text{m}$ , capazes de encapsular grandes quantidade de aromas e de liberar os aromas lentamente no ar. Tais partículas encontram uso na indústria alimentícia.

#### **4.1 – Primeiro Bloco de Reações – Efeito da variação de íons**

Em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo (WAY, 2013), foi revelado experimentalmente por meio de ensaios em que foram variadas a concentração do reticulante, tipo de reticulante e temperatura, que não havia evidência inequívoca da reticulação da gelatina nas condições testadas. Embora a gelatina tenha se tornado de fato pouco solúvel em água após o tratamento térmico, ensaios de GPC mostraram que as massas molares da gelatina se mantiveram essencialmente constantes ao longo do tempo (WAY *et al.*, 2017). Foi então admitido que a mudança de solubilidade podia ser devida a mudanças do arranjo estereoquímico e configuracional da gelatina, confirmadas por análises de FTIR.

Motivados por estes resultados e mediante o conhecimento sobre o comportamento das proteínas em diferentes pH's, uma nova série de reações foi proposta no presente trabalho.

Reações foram realizadas com controle de pH em meio ácido e alcalino. É amplamente sugerido na literatura que a ligação cruzada da gelatina com grupos aldeídos é mediada por grupos amino não protonados da  $\epsilon$ -lisina e hidroxilisina e o pelo grupo amino do aminoácido N-terminal. Portanto, a variação do pH do meio pode constituir um fator de influência em reações de reticulação (SCHMITT *et al.*, 2009).

Alguns autores também reportaram que a variação do pH do meio reacional é um fator muito importante para reações de reticulação, principalmente quando um aldeído, em especial o glutaraldeído, foi empregado (FARRIS *et al.*, 2010). Pressupondo que a modificação pH do meio pudesse afetar a reticulação da gelatina mediada por glicose, mudanças das condições das reações foram sugeridas. Dessa forma, a denominação dada às reações baseadas na formulação de referência, reportada na Tabela 3. 1, foi reação padrão G. A partir dessa condição, foram propostas outras modificações necessárias.

#### 4.1.1 Reações Conduzidas com Controle de pH

A primeira série de reações foi definida como indica a Tabela 4. 1. As reações foram conduzidas em pH 3,0 e 9,0, utilizando ácido clorídrico ou ácido fosfórico 10% e hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio 5%, respectivamente. Cada composto foi adicionado ao meio de reação de forma independente e na ausência dos demais. As etapas seguintes mantiveram-se como descrito anteriormente.

Tabela 4. 1. Condições dos ensaios realizados.

Condições das reações			
Controle de pH	R1	Ácido Clorídrico (HCl)	pH 3,0
	R2	Ácido Fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	
	R3	Hidróxido de sódio (NaCl)	pH 9,0
	R4	Hidróxido de cálcio (Ca(OH) <sub>2</sub> )	
Reticulante (tóxico)	R5	Formol	1%

O controle do pH foi realizado na fase dispersa (que continha água, glicose e gelatina) após a solubilização da gelatina. O objetivo era estudar primeiramente a natureza das transformações ocorridas durante a formação da partícula no processo de reticulação gelatina. Inicialmente, as reações foram conduzidas no tempo de 30 min recomendado por WAY (2013), para avaliar somente a influência da mudança do pH sobre os resultados obtidos. Posteriormente, foi dada continuidade às reações por tempos de reação de até 3 horas.

O processo de reticulação de gelatina por meio de agentes tóxicos, como anteriormente reportado, vem sendo utilizado com certa frequência (BIGI *et al.*, 2001; FARRIS *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2015). Assim, uma das reações foi conduzida na presença de formaldeído, com o intuito de obter um resultado de referência para o processo de reticulação de gelatina. Nesse caso, o formaldeído foi adicionado à fase aquosa no teor inicial de 1% em relação a água, como sugerido por Farris e colaboradores (2010).

#### 4.1.1.1 Reação com formaldeído

As caracterizações das partículas obtidas da reação conduzida na presença de formaldeído foram realizadas como referência e são apresentadas a seguir.

A análise de distribuição de tamanhos das partículas foi realizada para avaliar a estabilidade o tamanho ao longo do tempo. Como pode ser visto na

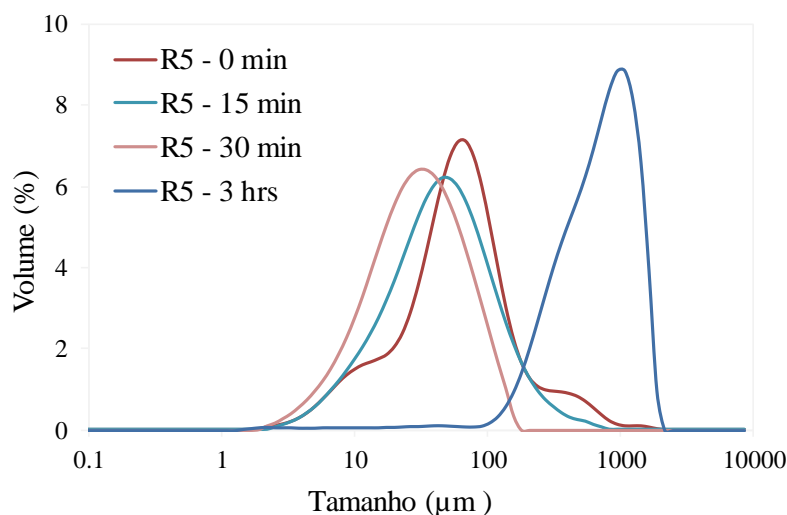


Figura 4. 1, para tempos reduzidos as distribuições de tamanho das partículas foram semelhantes, à medida que o tempo passa, as distribuições são deslocadas para tamanhos maiores. Resultados apresentados por Way (2013) revelaram que nenhuma mudança parece ocorrer até 2 horas de reação, assim não foram coletadas alíquotas entre 30 minutos e 3 horas de reação.

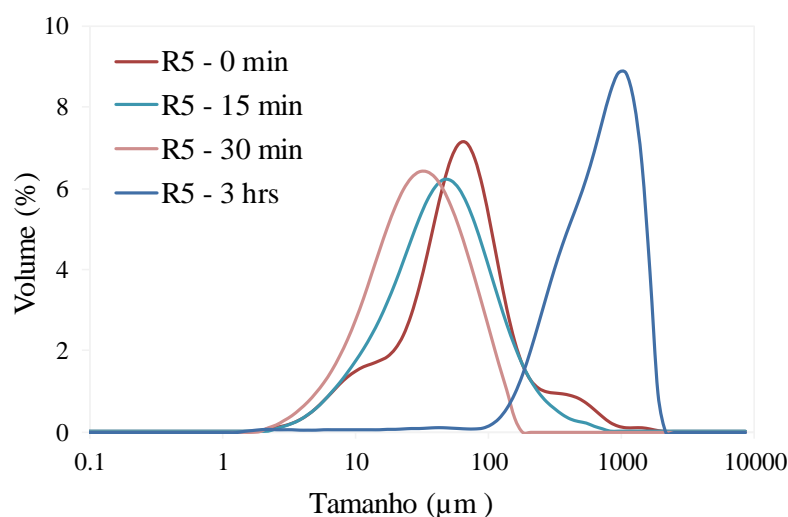


Figura 4. 1. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas da reação R5 conduzida na presença de formaldeído.

Tabela 4. 2. Tamanho médio e índice de polidispersão de partículas obtidas na reação conduzida na presença e formaldeído.

<b>Tempo</b>	<b>Diâmetro médio (μm)</b>	<b>PDI*</b>
0 min	94,9	2,8
15 min	65,8	3,4
30 min	38,3	5,0
3 h	770,1	8,1

Com o intuito de caracterizar a estabilidade térmica das partículas obtidas da reação R5, amostras coletadas em tempos regulares foram submetidas a ensaios por meio da análise termogravimétrica (TGA) e os resultados são apresentados na

Figura 4. 2. A

Figura 4. 2 indica que algumas mudanças ocorreram no material ao longo do tempo de reação. Os resultados parecem indicar um leve aumento na resistência térmica das partículas tratadas com formaldeído em função do tempo. Os percentuais de perda em cada estágio confirmam esse leve aumento na resistência e podem ser vistos na Tabela 4. 3. Zhao e Sun (2017) reportaram que não ocorreram grandes mudanças na resistência térmica em gelatinas tratadas com genipina e polifenóis. O tema reticulação com reticulantes químicos é bem documentado; no entanto, poucos trabalhos reportam avaliações em função da resistência térmica do material. Esse leve aumento é um possível indicador de reticulação; no entanto, outras análises são necessárias para garantir o quanto as cadeias de gelatina estão reticuladas.

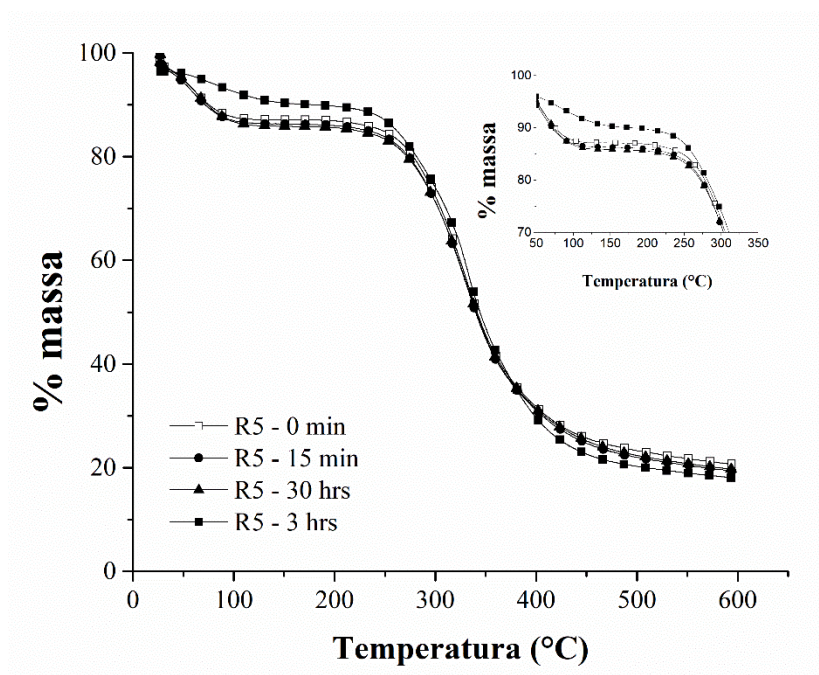


Figura 4. 2 Termograma de TGA de partículas de gelatina obtidas da reação R5, conduzidas na presença de formaldeído.

Tabela 4. 3 Perda de peso em estágios distintos de degradação de amostras de partículas de gelatina obtidas de reações conduzidas com formaldeído

Tempo de reação (min)	Perda de massa (%)		
	Estágio 1 (até 170 °C)	Estágio 2 (200 -600 °C)	Estágio 3 (Residual)
Gelatina	11,9	65,9	22,2
0	12,6	66,5	20,6
15	13,3	66,9	19,3
30	13,9	66,1	19,7
180	6,4	56,4	18,1

As partículas obtidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para caracterização morfológica. A Figura 4. 3 mostra imagens obtidas das partículas produzidas com formaldeído. Pode ser verificado que no início as partículas se apresentavam aglomeradas e com superfície irregular. Na Figura 4. 3b é perceptível a mudança na morfologia das partículas após 3 horas de reação, com variações nos tamanhos das partículas que confirmam os resultados de distribuição de tamanho. É válido deixar claro que as micrografias das partículas em até 30 min mostraram o mesmo comportamento, sendo assim, tempos mais curtos que 30 min não foram exibidos na figura. É perceptível que o aumento do tempo, de fato, induz o aumento dos tamanhos das partículas e com superfícies mais regulares. Essas mudanças são evidências de reticulações que ocorrem entre as cadeias de gelatina. O aumento da reticulação pode induzir o aumento da viscosidade e, conseqüentemente, de coalescência e de tamanho.

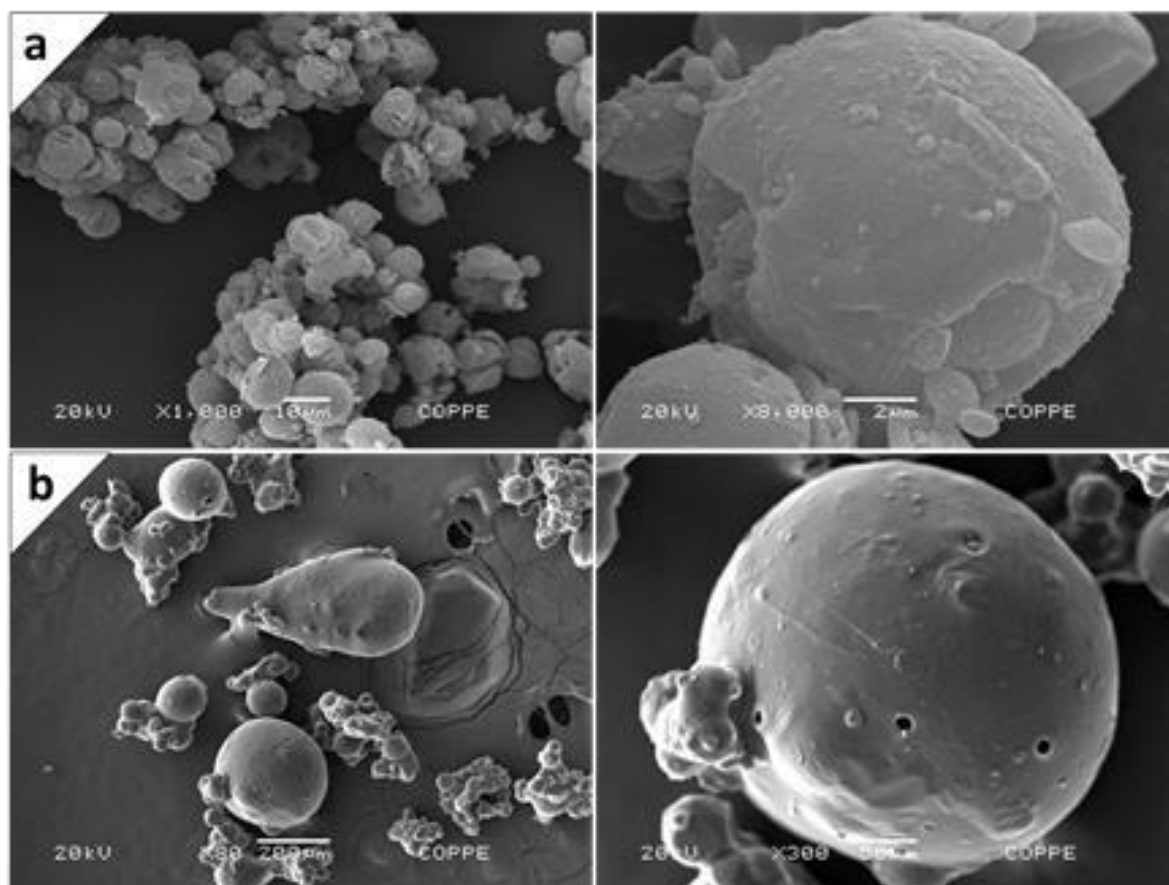


Figura 4. 3. Micrografias das partículas de gelatina obtidas da reação R5 conduzida na presença de formaldeído: a) 30 min e b) 3 horas

Como já reportado, a solubilidade em água é um forte indicador de reticulações de gelatina. Assim, para avaliar a ocorrência de reticulação em partículas preparadas com formaldeído, um teste qualitativo de solubilidade em água foi realizado. As partículas de gelatina (5 horas) foram suspensas em água e deixadas por 24h e então foi observado o comportamento das partículas no meio aquoso. A Figura 4. 4 mostra os resultados obtidos da hidratação das partículas. Nota-se que não ocorreu a solubilização das partículas de gelatina em água, elas aglomeraram-se, incharam, formando um gel transparente e insolúvel. Portanto, parece correto afirmar que ocorreu reticulação das partículas de gelatina tratadas com formaldeído como reportado por diversos autores (CARVALLHO e GROSSO, 2004; WAY *et al.*, 2018).





Figura 4. 4. Teste de solubilidade qualitativo das partículas de gelatina obtidas da reação R5 (5 horas) na presença de formaldeído.

#### 4.1.1.2 Reações em meio ácido

Na reação em que ácido fosfórico foi utilizado para ajuste do pH do meio, ocorreu aglomeração das partículas logo após a adição da acetona em todos os casos. O material obtido tinha um aspecto de “cola”, tornando impossível executar a etapa seguinte de filtração. Na Figura 4. 5 pode ser observado o comportamento do material obtido.



Figura 4. 5. Material obtido da reação realizada em pH 3 com ácido fosfórico (Reação R2 na Tabela 4. 1).

A gelatina utilizada, como descrito anteriormente, é uma mistura de gelatinas do tipo A e do tipo B, em conformidade com a Farmacopéia Européia. No entanto, a caracterização do produto foi realizada pelo grupo (ver Apêndice A) e o pH da solução da gelatina encontrado foi

de 5,76, inferindo-se que tenha sido obtida por meio de condicionamento ácido, característica de gelatinas do tipo A (WAY, 2013). Gelatinas do tipo A possuem ponto isoelétrico próximo do pH 8,5 (HAUG e DRAGET, 2009), em torno do qual a solubilidade é dificultada, pois as cargas são nulas neste ponto, levando à aglomeração. Portanto, o comportamento observado na reação parece não estar atrelado exatamente ao pH do meio. Por outro lado, o ácido utilizado pode exercer alguma influência na obtenção dessas partículas, por conta da carga multivalente do íon fosfato.

Quando o ajuste do pH foi feito por meio da adição de ácido clorídrico, foi possível conduzir a contento todas as etapas do processo e obter partículas de gelatina. Isso mostra que a natureza iônica do meio é relevante para o processo de produção de partículas de não somente o pH. Mediante a coleta de alíquotas obtidas ao longo do tempo, algumas caracterizações foram realizadas a fim de compreender possíveis mudanças ocorridas que pudessem estar relacionadas com a formação de ligação cruzada. No entanto, parece óbvio que o resultado anterior não estava relacionado ao pH, mas à natureza do ânion  $\text{PO}_4^{-3}$ . Por exemplo, a natureza polivalente do ânion fosfato pode ter causado a retenção excessiva de água no meio, impedindo a formação das partículas nas condições do ensaio. Deve-se ressaltar também que o ácido fosfórico é mais fraco que o ácido clorídrico, o que pode ter afetado a eficiência da etapa de desidratação da mistura polimérica. A literatura não discute esses temas e não mostrou o efeito da natureza iônica do meio sobre o processo de formação de partículas de gelatina.

- **Análise Morfológica**

As análises de distribuição de tamanho de partícula (DTP) foram conduzidas por meio da técnica de difração a laser. As análises foram realizadas para avaliar a estabilidade dos tamanhos e caracterizar a distribuição do tamanho das partículas ao longo do tempo. Como pode ser visto na Figura 4. 6, a distribuição do tamanho das partículas é deslocada para tamanhos maiores, à medida que o tempo passa. As mudanças de tamanho podem estar relacionadas com o tempo de reação, tendo em vista que o aumento da viscosidade da fase dispersa pode resultar em aumento das taxas de aglomeração, como bem discutido na literatura (ODIAN, 2004). De qualquer forma, os resultados indicam que parecem ocorrer mudanças das propriedades de suspensão com o tempo, o que pode estar relacionado a mudanças das propriedades físicas do meio disperso induzidas por mudanças do soluto. Em particular, a

Figura 4. 6 mostra que as mudanças podem ser lentas, requerendo tempos de reação mais longos.

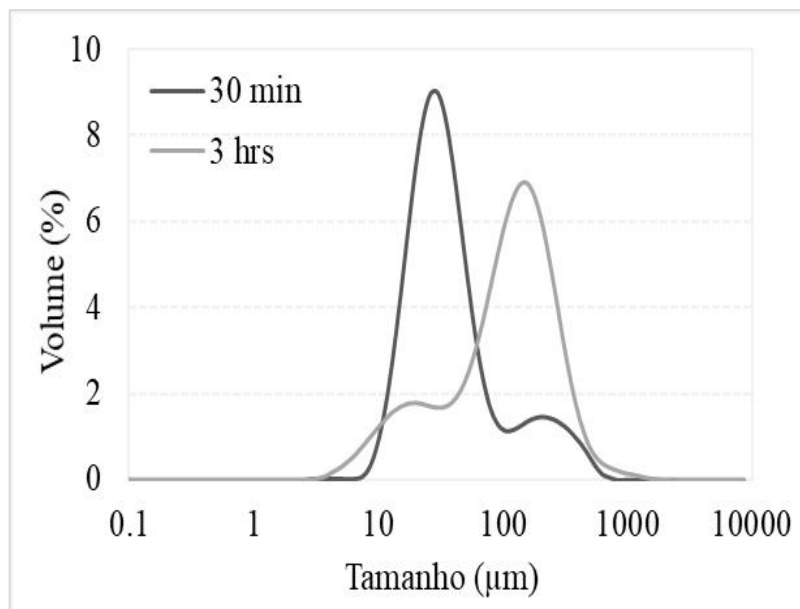


Figura 4. 6. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas em reação conduzida em meio ácido (pH 3,0) com HCl (Reação R1 na Tabela 4. 1).

Análises de microscopia óptica foram realizadas e permitiram fazer uma avaliação visual da estrutura e morfologia das partículas. Além disso, foi possível avaliar por meio de imagens como ocorre a formação e aglomeração das partículas. Algumas imagens obtidas podem ser vistas na Figura 4. 7.

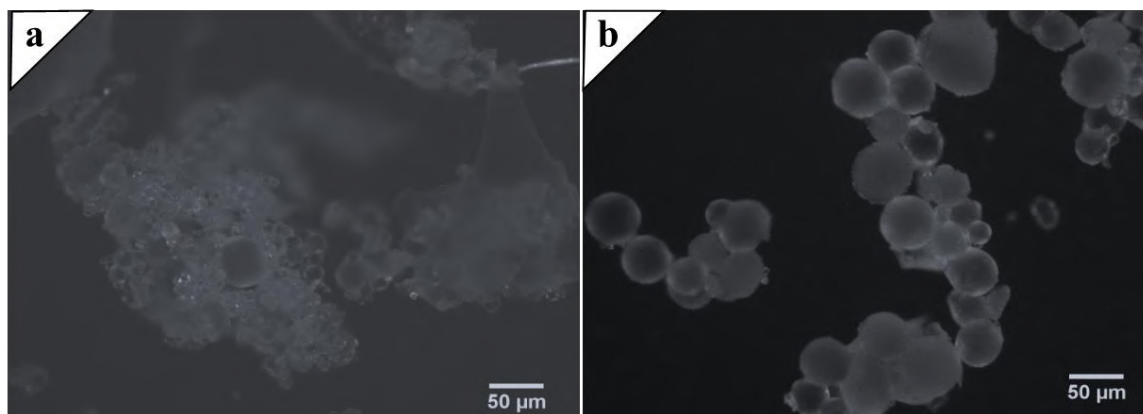


Figura 4. 7. Micrografias das partículas de gelatina obtidas a partir da reação conduzida em meio ácido (pH 3,0) com HCl: a) 30 min e b) 3 horas.

Por meio da Figura 4. 7a é possível observar que a formação das partículas é muito irregular nos primeiros 30 min de reação. Após 30 min de reação as partículas estão claramente aglomeradas, como reportado por Way (2013). Esse comportamento foi observado em até 2 horas de reação. Além disso, os tamanhos das partículas são evidentemente menores, como já mostrado nos resultados da Figura 4. 6. Way (2013) encontrou resultados semelhantes em reações conduzidas sem controle de pH para tempos de reação de até 30 min. Comparando estes resultados com os apresentados por Way (2013), é possível notar que o pH ácido não causou qualquer mudança significativa das propriedades das partículas, pois para o mesmo intervalo de tempo, resultados semelhantes foram encontrados. Por outro lado, partículas obtidas após 3 h de reação, como pode ser visto na Figura 4. 7b, apresentaram tamanho de partículas mais elevados e tamanhos mais variados, confirmando os dados da distribuição de tamanho da Figura 4. 6. Além disso, parece que as partículas obtidas possuíam estruturas esféricas mais densas e bem definidas, indicando que o tempo parece exercer influência importante sobre essas reações.

Como pôde ser observado, alguma mudança estrutural relevante ocorreu ao longo do tempo de reação, que pode ser resultado da reticulação. No entanto, esses dados não são suficientes para permitir essa afirmação. Assim, algumas análises qualitativas de solubilidade em água foram realizadas. Os resultados obtidos revelaram que as partículas obtidas solubilizaram-se totalmente em temperaturas baixas (30 °C), indicando que talvez o processo de reticulação das partículas de gelatina não tenha sido eficiente, como reportado por Way (2013).

A redução do pH pode aumentar a quantidade de grupos amino protonados; assim, a possibilidade de ocorrência de reações de reticulação pode ser significativamente reduzida, já que há aumento dos grupos carregados positivamente, que não estão disponíveis para as reações de reticulação. Contudo, a obtenção de partículas esféricas densas e bem definidas parece ser positiva, pois é característica de reações realizadas em suspensão. Esse tipo de morfologia não foi observado no trabalho de Way (2013) nas condições testadas e indica que o tempo exerce influência relevante sobre o sistema, indicando a existência de algum tipo de transformação relevante e lenta no sistema reacional. O efeito do tempo sobre o processo de reticulação de gelatina e formação de micropartículas não foi ainda estudado na literatura.

#### **4.1.1.3 Reações em meios alcalino**

Para as reações realizadas em meio alcalino (pH 9,0), foram obtidos distintos resultados para cada uma das bases utilizadas, assim como observado nas reações conduzidas em meio ácido. As bases utilizadas foram hidróxido de sódio (monobase) e hidróxido de cálcio (dibase). Algumas caracterizações das partículas obtidas foram realizadas para detectar se ocorreram mudanças que representassem o processo de reticulação da gelatina.

- **Análises Morfológicas**

Os resultados das análises de distribuição de tamanhos das partículas de gelatina estão apresentados nas Figura 4. 8 e Figura 4. 9. Na reação em que a alteração do pH do meio foi realizado com hidróxido de sódio (NaOH), obsevou-se que as mudanças nos perfis de distribuição de tamanho não foram tão significativas ao longo da reação, com pode ser visto na Figura 4. 8. No entanto, os perfis de distribuição de tamanho das partículas no tempo inicial e final da reação foram muito diferentes, indicando uma vez mais a ocorrência de lentas transformações no meio reacional.

No momento inicial da reação, a distribuição de tamanhos apresentou forma larga e um caráter bimodal. Esse comportamento pode ser explicado pelo fenômeno de quebra e coalescência, que geralmente ocorre a altas taxas no início da reação até que se atinja a estabilidade, gerando partículas de tamanhos muito distintos e concentração de finos. Por outro lado, é interessante observar que, após a estabilização e ao longo da reação, os perfis de distribuição de tamanho das partículas se mantiveram quase constantes, havendo um pequeno

deslocamento para tamanho maiores no final da reação (3 horas). A estabilidade no tamanho das partículas ao longo do tempo pode estar atrelado a um equilíbrio entre as taxas de quebra e coalescência, que confere uma certa estabilidade à suspensão. Por meio do cálculo do tamanho médio, isto pode ser confirmado, como pode ser visto na Tabela 4. 4. Os maiores tamanhos obtidos após 3 h de reação parecem indicar a ocorrência de mudanças lentas no meio reacional, como observado na reação conduzida em meio ácido.

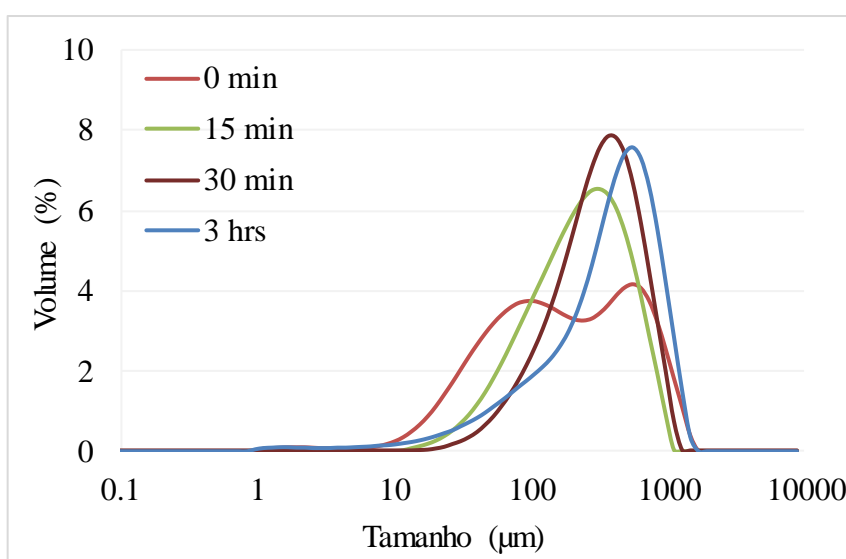


Figura 4. 8. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas nas reação realizada em meio alcalino (pH 9,0) com NaOH (Reação R3 na Tabela 4. 1).

Tabela 4. 4. Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida em meio alcalino com NaOH.

Tempo	Diâmetro médio (μm)	PDI
0 min	293	5,0
15 min	315	5,7
30 min	358	6,4
3 hrs	433	6,7

Na reação conduzida em o meio alcalino na presença de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), as distribuições de tamanhos das partículas não ficaram sobrepostas (Figura 4. 9). Além disso, os perfis das curvas nas primeiras duas horas foram mais largos, sendo observado no final da reação mais uma vez um deslocamento para tamanhos maiores de partículas e uma distribuição

mais estreita de tamanhos. A Tabela 4. 5 ilustra os dados referentes aos tamanhos médios calculados a partir das curvas da Figura 4. 9. Esses dados confirmam o aumento do tamanho médio das partículas ao longo do tempo. Parece claro uma vez mais que o tempo exerce um efeito significativo sobre o sistema reacional e que a natureza do íon usado para o controle do pH afeta o andamento do processo.

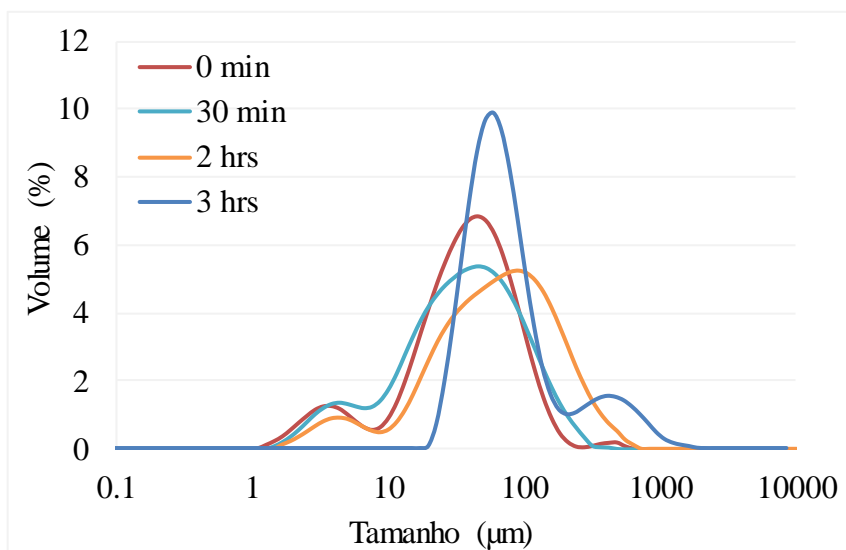


Figura 4. 9. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas da reação em meio alcalino utilizando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  como solução de ajuste (Reação R4 na Tabela 4. 1).

Tabela 4. 5. Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas da reação em meio alcalino com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Tempo	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	PDI
0 min	64	4,57
30 min	51	4,18
2 horas	92	4,09
3 horas	130	3,09

Os dados desta seção mostram que a evolução dos tamanhos das partículas é marcada basicamente por um lento deslocamento das distribuições ao longo do tempo. A partir desses resultados, não é possível concluir sobre a influência do pH do meio para obtenção de partículas reticuladas de gelatina; contudo, é possível observar que o tempo e a natureza iônica do meio

afetam a evolução do sistema de forma significativa. Desse modo, outras análises se fazem necessárias para certificar a veracidade da ocorrência da reticulação da gelatina.

Além de dados de distribuição de tamanhos, análises de microscopia óptica foram realizadas com intuito de avaliar melhor a morfologia das partículas, como apresentado para reações conduzidas em meio ácido. As análises de microscopia das partículas obtidas nas reações conduzidas em meio alcalino com NaOH e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  podem ser vistas nas Figura 4. 10 e Figura 4. 11, respectivamente.

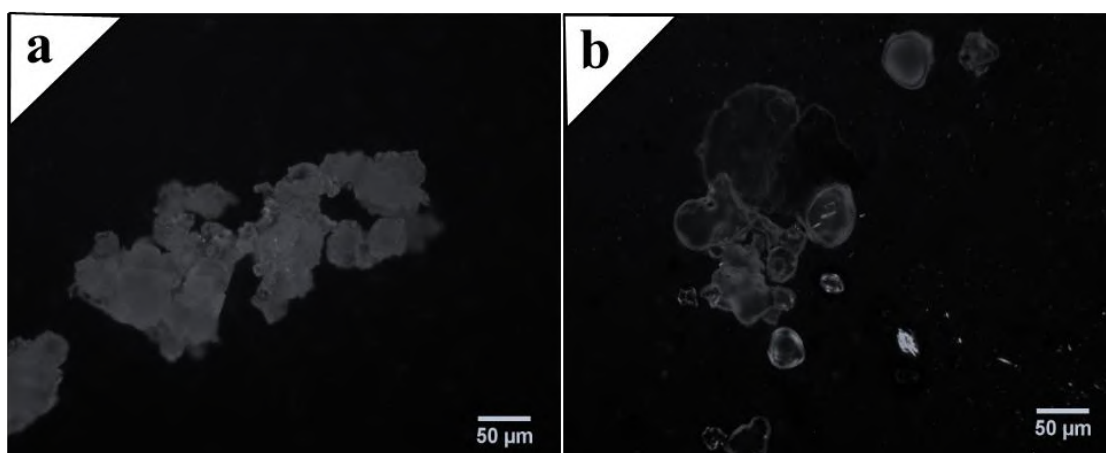


Figura 4. 10. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação em meio alcalino (NaOH): a) 30 mim e b) 3 horas.

Na Figura 4. 10 pode ser observado que a morfologia das partículas de gelatinas não foi bem definida. Por meio das imagens obtidas, é facilmente notado que reações conduzidas em o pH alcalino com NaOH (9,0) exerceu influência negativa no processo de formação da partícula esférica, desestabilizando a suspensão, mesmo quando tempos mais longos foram empregados. Esses resultados também podem estar atrelados ao fato de que uma proporção maior da mistura de gelatinas utilizada é do tipo A (ou seja, ácida, a qual tem ponto isoelétrico entre 6,0 e 9,0, próximo a faixa de trabalho dessa condição). Dessa forma, o processo reacional pode ter sido comprometido, pois no PI as cargas das proteínas são nulas e tendem a precipitar, não sendo a faixa mais adequada para conduzir a reação.



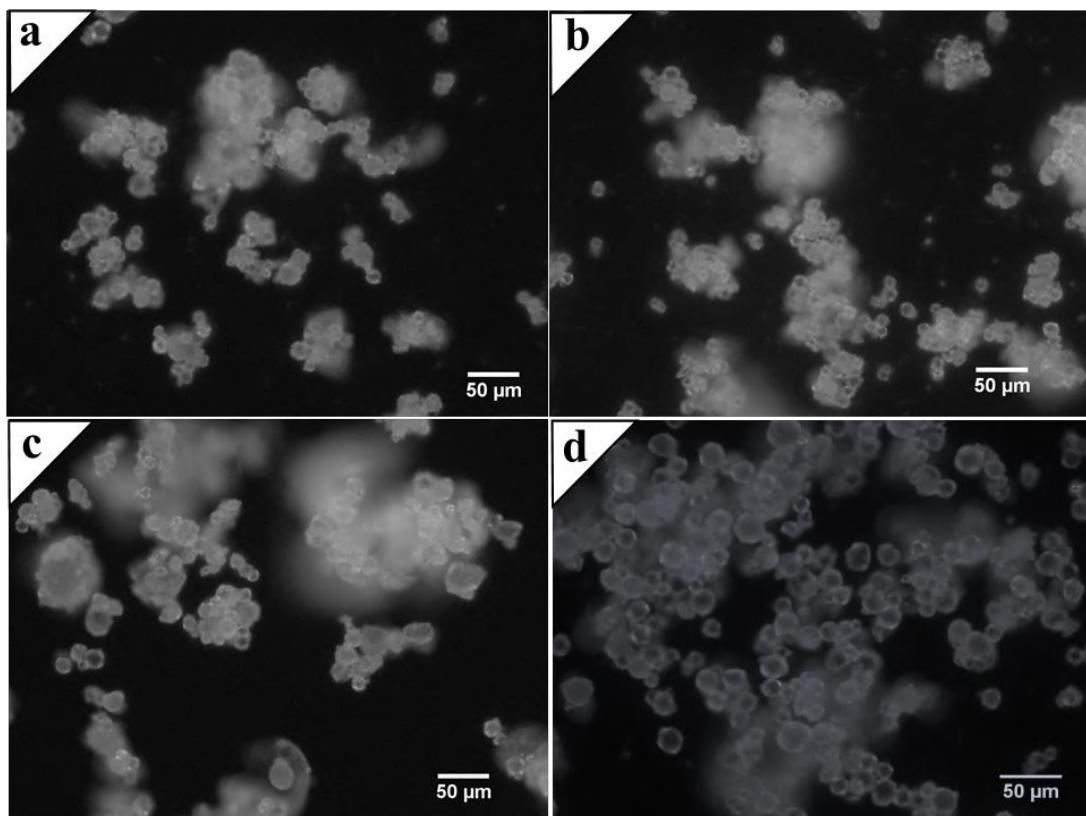


Figura 4. 11. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação em meio alcalino ( $\text{Ca(OH)}_2$ ): a) 0 min, b) 30 min, c) 2 horas e d) 3 horas.

Por outro lado, observando as imagens mostradas na Figura 4. 11, foi possível visualizar a formação de partículas de gelatina resultantes da reação com  $\text{Ca(OH)}_2$  desde os primeiros minutos da reação. Vale ressaltar a coerência desses resultados com os obtidos nas análises de distribuição de tamanho, que mostram a presença de distribuições mais heterogêneas nos tempos iniciais, resultantes da aglomeração das partículas. Apesar do tamanho reduzido e do estado aglomerado, partículas com estruturas esféricas já podem ser observadas desde o início da reação, evento não observado nas outras reações. Além disso, é muito importante enfatizar que há uma variação na formação estrutural dessas partículas ao longo do tempo, confirmada pelo aumento de tamanho.

Parece claro que houve um efeito relevante na reação e, conseqüentemente, nas partículas obtidas quando o  $\text{Ca(OH)}_2$  foi empregado. Uma explicação plausível está baseada na dissociação completa do hidróxido de cálcio, devido à sua forte basicidade, liberando íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$ . Estes íons de cálcio dispersos podem exercer um papel de reticulante iônico, como

já reportado por outros autores (HABRAKEN *et al.*, 2008). Isso pode justificar a formação das partículas desde o início, proporcionando talvez uma maior estabilidade na gota, resultando em um acelerado aumento de tamanho, à medida que o tempo passa.

- **Considerações parciais**

Diante dos resultados apresentados nos experimentos conduzidos com controle de pH, foi detectado que em até 30 minutos de reação a variação do pH do meio também não exerceu qualquer influência significativa sobre a reticulação da gelatina; ou seja, parecem não ocorrer mudanças no meio reacional em intervalos curto de tempo nestes sistemas, independentemente do pH empregado. A formação das partículas foi observada somente em dois dos ensaios realizados no primeiro bloco de reações e após 2 horas de reação. Alguns relatos da literatura revelam que, para obtenção de grau de reticulação desejado, reações devem ser conduzidas por períodos longos e da ordem de 12 a 24 horas (CHAUNDY *et al.*, 1996). Além disso, o uso do hidróxido de cálcio parece indicar alguma modificação na estrutura do sistema desde os primeiros instantes da reação, podendo estar associada à presença de íons multivalentes que tende acelerar o processo de reticulação física desse material (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). Em todos os casos, no entanto, o efeito primário mais relevante parece estar associado ao tempo e à ocorrência de mudanças lentas no meio reacional, que talvez por isso não tenham sido capturadas por Way (2013).

É válido ressaltar que há uma grande dificuldade em determinar o grau de reticulação de polímeros naturais como a gelatina. As técnicas mais simples e usuais citadas na literatura para determinação de reticulação fazem o uso solventes orgânicos fortes, pois polímeros reticulados não são solúveis em água. Sendo assim, torna-se inviável o uso de solventes orgânicos devido sua sensibilidade das proteínas. Por esse motivo que há um grande número de trabalhos que reportam reticulação de gelatinas, contudo não há comprovação inequívoca que essas reações ocorram em determinadas condições. Diante disso, o maior intuito deste trabalho é evidenciar detalhadamente, por meio de técnicas menos agressivas, que a reticulação da gelatina ocorre.

## 4.2 – Segundo Bloco de Reações – Efeito do Tempo

Motivados pelos resultados apresentados na seção anterior, algumas reações foram conduzidas por períodos maiores. Admite-se assim que reações de reticulação de gelatina apresentem uma cinética muito lenta e que o grau de reticulação aumente lentamente com o tempo de reação. As condições das reações estudadas podem ser vistas na Tabela 4. 6.

Tabela 4. 6. Condição das reações realizadas por tempos maiores.

Segundo Bloco de Reações				
Condições		Tempo de reação (h)	pH da reação	Agitação (rpm)
Reação Padrão	R6	5	-	700
Reação Padrão + Hidróxido de cálcio	R7	5	9,0	700
Reação sem glicose	R8	5		700
*Reação Padrão	R9	10	-	1000

### 4.2.1 Reações Conduzidas por Tempos Maiores

Diante dos resultados reportados anteriormente, que evidenciaram a importância do tempo pode constituir um fator muito importante para as lentas mudanças (viscosidade, tamanhos de partículas, morfologia) ocorridas nas partículas de gelatina, optou-se por conduzir as reações por até 5 horas. Assim, pretendeu-se averiguar a influência relevante do tempo de reação sobre a reticulação da gelatina e se esta variável poderia afetar significativamente a frequência de reticulação, como sugerido por alguns autores (CHAUNDY *et al.*, 1996).

Dessa forma, duas reações foram conduzidas em condições similares às anteriores (R6 e R7 na Tabela 4. 6); no entanto, por tempos maiores. Os resultados das caracterizações referentes aos dados obtidos são mostrados a seguir. Estas reações foram caracterizadas por meio de análises de distribuição de tamanho (DTP), análises térmicas (TGA), microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ressonância magnética no domínio de tempo (RMN-DT), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), viscosidade e análises de tensão superficial (TS), de forma a caracterizar e entender melhor o processo de reticulação de gelatina.

• **Distribuição de Tamanhos de Partículas (DTP)**

As análises de distribuição de tamanho de partículas feitas com adição de cálcio foram realizadas por meio da técnica de difração a laser e os resultados estão apresentados na Figura 4. 12. Como pode ser visto, houve variação continuada dos perfis de distribuição de tamanho de partículas com o aumento do tempo. Observa-se claramente que a distribuição de tamanhos das partículas é deslocada para tamanhos maiores com o tempo, obtendo-se ao final uma distribuição mais larga e, conseqüentemente, mais heterogênea. A Tabela 4. 7 ilustra os dados de tamanho médio das partículas, confirmando as mudanças nos perfis de distribuição em cada tempo, representadas pelo aumento do tamanho médio ao final da reação. Comparando esses resultados com o anterior, observa-se que os perfis de distribuição dos tempos iniciais foram similares, o que reforça a interpretação sobre o efeito do tempo na evolução dos tamanhos.

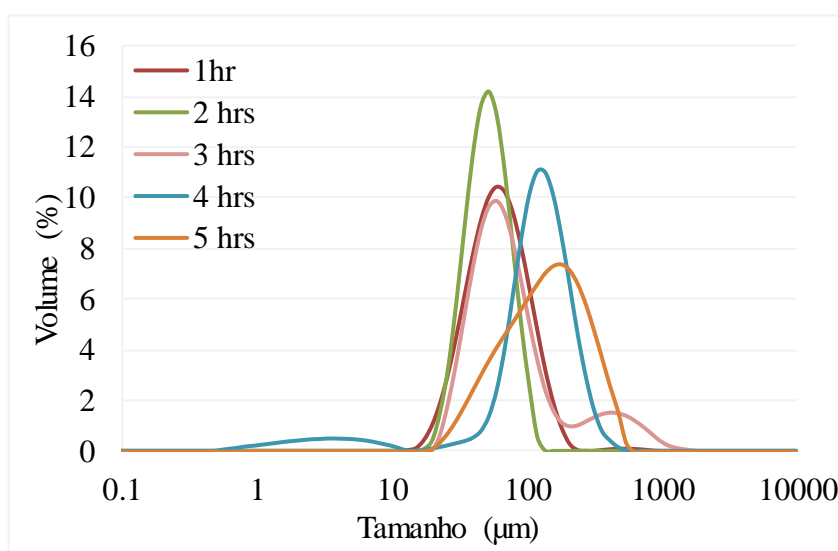


Figura 4. 12. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão em meio alcalino utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$  por 5 horas.

Tabela 4. 7. Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida por 5 horas em meio alcalino com  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Tempo	Diâmetro médio (µm)	PDI
1 hora	69	1,39
2 horas	54	0,66
3 horas	130	0,39
4 horas	132	3,46

5 horas

165

0,84

A decisão de conduzir uma reação com a formulação base por um tempo maior teve como pilar o trabalho anterior do grupo, juntamente com os ensaios preliminares obtidos nesse trabalho. Dessa forma, um ensaio foi realizado para confirmar se a variável tempo exerce de fato influência sobre a formação das partículas nas condições de referência. Os resultados da avaliação das distribuições de tamanhos são mostrados na Figura 4. 13.

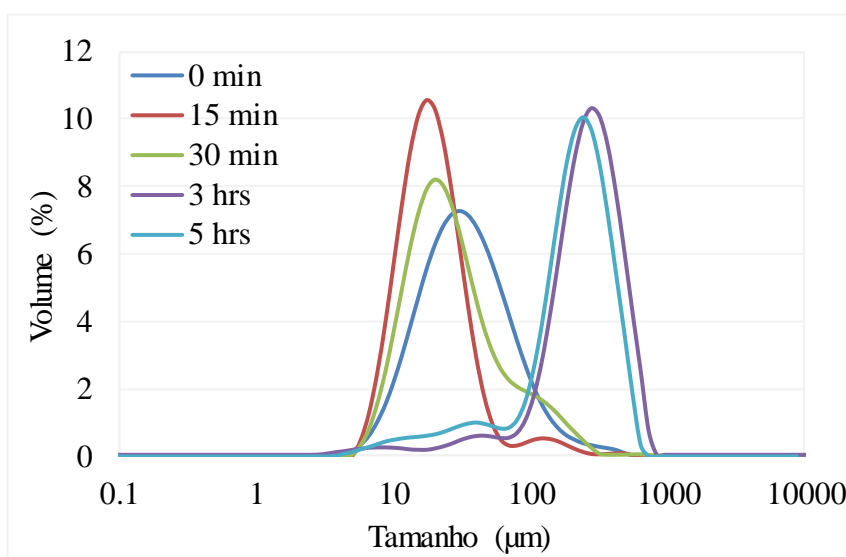


Figura 4. 13. Distribuição de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas.

Tabela 4. 8. Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas.

Tempo	Diâmetro médio (µm)	PDI
0 min	45	0,63
15 min	25	0,75
30 min	39	0,54
3 h	279	2.69
5 h	225	2.44

A Figura 4. 13 mostra a ocorrência uma mudança brusca das distribuições de tamanhos ao longo da reação. A avaliação das distribuições de tamanho de partícula mostrou que as partículas aumentam de tamanho de forma significativa com o decorrer do tempo. O deslocamento lento das distribuições para tamanhos de partícula maiores indica que alguma mudança importante ocorre no meio de reação que afeta o mecanismo de formação das partículas na mistura reacional. Além disso, é claramente mostrado que os perfis para as últimas duas horas de reação são quase que sobrepostos, mostrando que talvez não ocorram mudanças expressiva após cerca de 3 horas de reação. As mudanças podem estar relacionadas à ocorrência de ligações cruzadas, que promovem aumento lento da massa molar, resultando no aumento da viscosidade da fase dispersa, facilitando conseqüentemente a coalescência entre as partículas. No entanto, essas suposições devem ser confirmadas por meio de análises adicionais.

Diante desses resultados, fica claro que a variável tempo exerce forte influência sobre os dados de distribuição de tamanhos das partículas, sendo talvez o fator preponderante para a obtenção de partículas de gelatina reticuladas com glicose, independentemente das condições de reação analisada.

- **Microscopia Óptica**

Como nos ensaios anteriores, também foram realizadas análises de microscopia óptica com a finalidade de visualizar melhor a formação das partículas ao longo do tempo de reação. As Figura 4. 14 e Figura 4. 15 mostram a evolução da morfologia das partículas de gelatina obtidas.

Na Figura 4. 14 são ilustradas as partículas de gelatina obtidas da reação conduzida em meio alcalino com  $\text{Ca(OH)}_2$ . As imagens mostram que as partículas apresentam geometria claramente esférica e superfície regular, o que é normalmente esperado para reações em suspensão (MACHADO *et al.*, 2007). Além disso, um aumento do tamanho médio ao longo do tempo e formação de partículas densas e bem definidas foram verificados, reforçando os dados obtidos com as distribuições de tamanho. Esses resultados já foram reportados na seção anterior em reações conduzidas por até 3 horas. Assim, percebe-se que a formação de partículas e o comportamento foram reprodutíveis.

A partir das análises de microscopia é possível constatar que ocorre uma mudança clara na morfologia das partículas, embora de forma lenta. É importante destacar que os resultados indicaram um efeito consistente na morfologia com a mudança nas condições de operação, sendo necessárias análises mais aprofundadas para compreender as modificações que ocorrem ao longo do tempo. Dados mais detalhados referentes à morfologia serão apresentados adiante com base em análises de microscopia eletrônica de varredura.

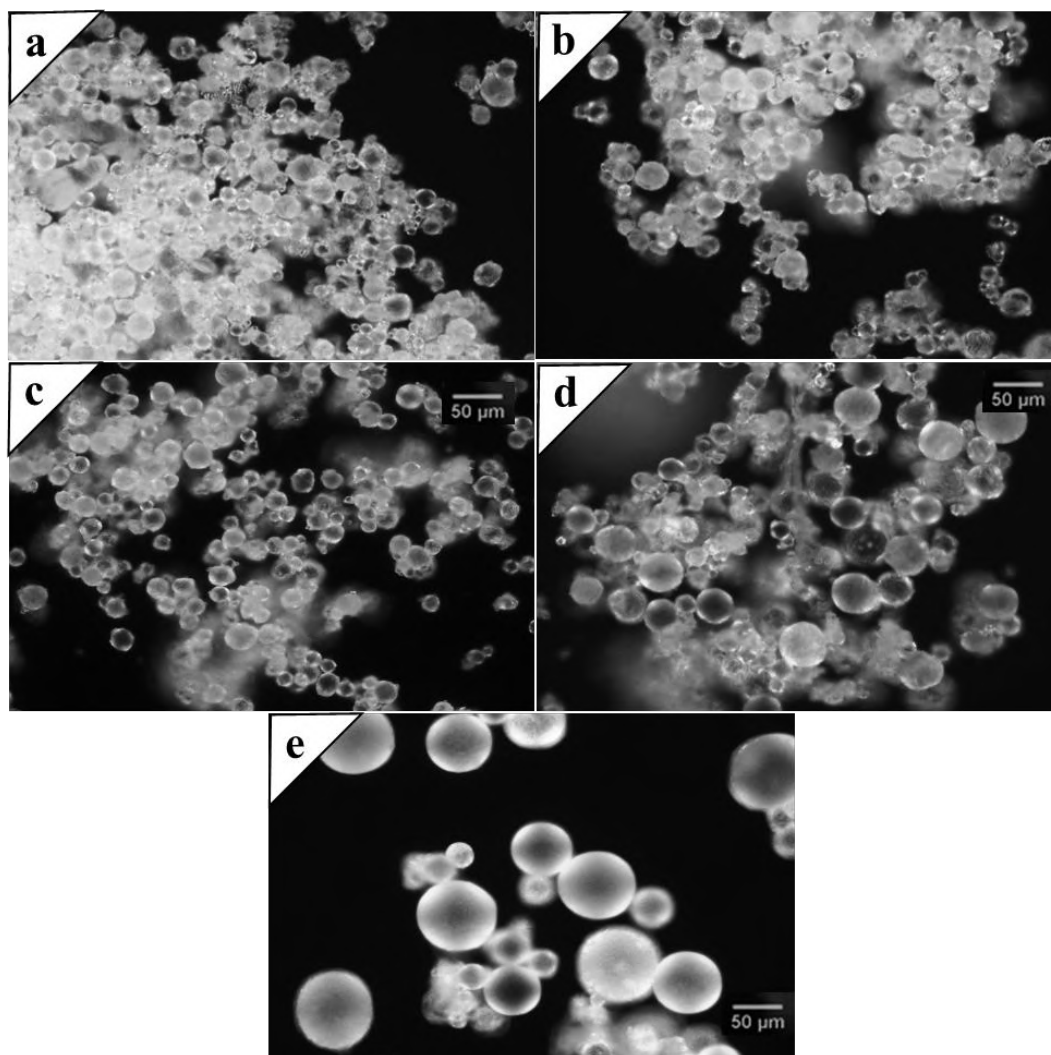


Figura 4. 14. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação conduzida em meio alcalino ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) por 5 horas: a) 1 hora, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas e) 5 horas.

As imagens exibidas na Figura 4. 15 são referentes à reação conduzida na condição da reação padrão. Por meio dessas imagens é possível observar que nos primeiros 30 minutos o comportamento obtido foi similar ao obtido por Way (2013), confirmando a inobservância de

efeitos significativos quando testes de reticulação com gelatina foram conduzidos por tempos curtos. As imagens ilustram que as partículas de gelatina obtidas nestas condições também apresentam geometria esférica. No entanto, após um determinado tempo, a morfologia das partículas sofre modificação, já que os tamanhos das partículas são bem maiores ao final da reação. Vale ressaltar que essa reação, em particular, indica que as diferenças observadas nas amostras estão principalmente vinculadas ao aumento do tempo de reação. Com esses resultados, pode-se inferir como o tempo exerce uma influência singular sobre o processo estudado.

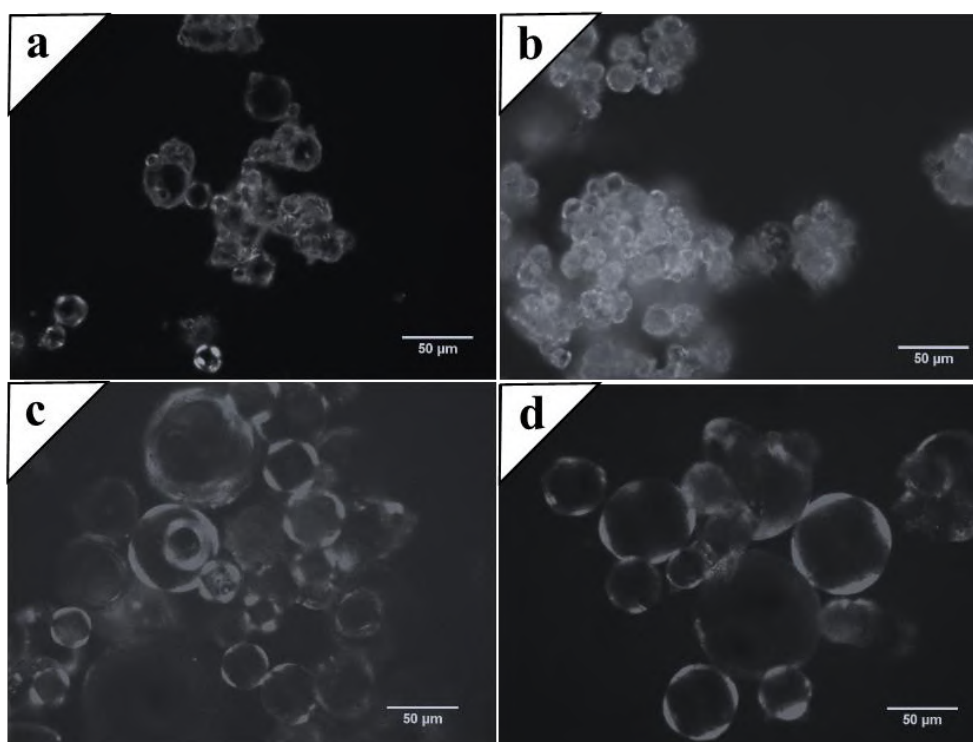


Figura 4. 15. Micrografias de partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 5 horas, sendo a) 0 min, b) 30 min, c) 3 horas, d) 5 horas.

Observando os dados de microscopia mais cuidadosamente, é possível notar que nos ensaios em que o hidróxido de cálcio foi empregado, a aglomeração das partículas não foi tão persistente nos tempos iniciais da reação, como nos ensaios em que a base não foi empregada. Esse parece ser um efeito benéfico adicional resultante da adição do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ao meio.

- **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**



As partículas obtidas ao longo do tempo foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para caracterização morfológica. Assim, uma avaliação visual mais detalhada das partículas pode ser apresentada. A Figura 4. 16 mostra imagens obtidas pela técnica de MEV para as partículas produzidas na reação conduzida com hidróxido de cálcio. A Figura 4. 16a exibe as partículas de gelatina obtidas no início da reação, após 5 minutos. Verifica-se que as partículas apresentavam-se aglomeradas e a com a superfície rugosa, informação não capturada nas micrografias ópticas. Pode ser notado que nos instantes iniciais existem partículas que são mal formadas. Na Figura 4. 16b é possível notar a mudança da morfologia das partículas após 3 horas de reação, com as partículas apresentando superfícies mais regulares, embora ainda um pouco aglomeradas. Esse comportamento é semelhante ao descrito para a reação padrão. É observada de forma mais clara a heterogeneidade dos tamanhos das partículas, corroborando mais uma vez os dados das distribuições de tamanhos obtidos por espalhamento de luz. No que diz respeito à Figura 4. 16c, é perceptível que o aumento do tempo de reação leva ao aumento continuado do tamanho das partículas, que apresentam geometria cada vez mais esférica e regular, com mudanças na superfície e na forma. Essas mudanças podem ser evidência indireta da ocorrência de ligações cruzadas, que podem estar ocorrendo entre as cadeias de gelatina. De qualquer forma, parece que as partículas pequenas e aglomeradas fundem-se contínua e lentamente para formar as partículas esféricas e regulares ao final do processo.

Para efeito de comparação entre as partículas obtidas nas reações, foram também realizadas análises de MEV das partículas obtidas da reação padrão (R6) (Figura 4. 17). Os resultados evidenciaram que ao longo da reação há evolução continuada nos tamanhos e morfologia das partículas presentes no sistema. Durante os instantes iniciais (até 30 minutos), o material obtido parece não sofrer qualquer mudança significativa, como já reportado. Neste intervalo parece haver predominância das taxas de quebraamento, que podem afetar os tamanhos das partículas e produzir partículas pequenas. À medida que a reação avança, os tamanhos das partículas aumentam, resultado principalmente do aumento da taxa de aglomeração, devido ao aumento da viscosidade das gotas. Neste momento, pode ser conjecturado que está ocorrendo a reticulação da gelatina, resultando na presença de “partículas grudentas” até que ao fim de 3 horas atinge-se a estabilidade de tamanhos observada nas imagens.

A comparação detalhada das Figura 4. 16 e Figura 4. 17 mostra que a evolução morfológica das partículas nos dois casos é muito parecida. De acordo com essas figuras, a morfologia irregular formada por aglomeração de partículas finas se transforma aos poucos em uma estrutura morfológica bem definida, formada por partículas esféricas, densas, com superfícies lisas e com diâmetros maiores após algumas horas de tratamento térmico. Portanto, não parece haver dúvidas de que o tempo controla as lentas transformações que ocorrem no meio.

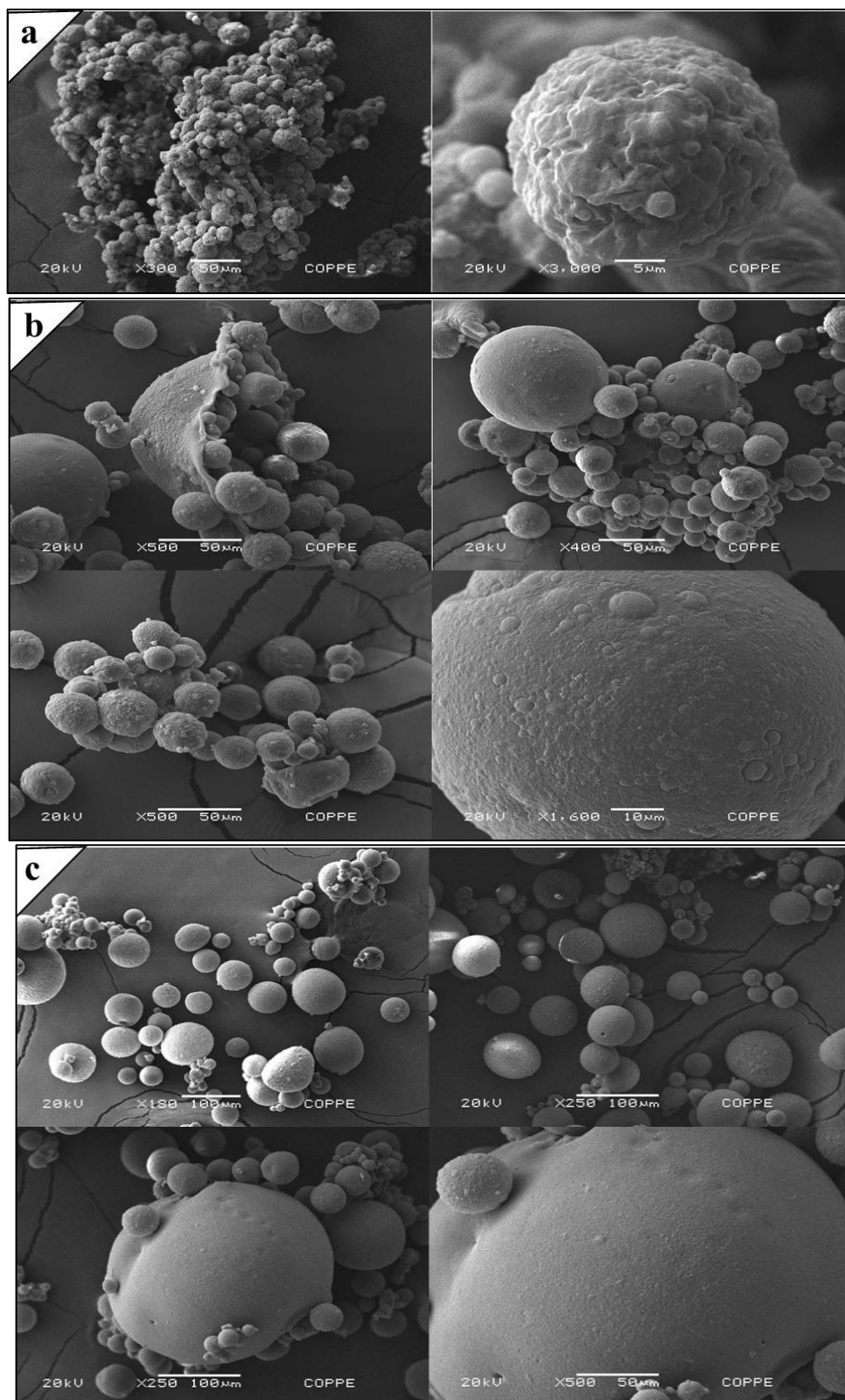


Figura 4. 16. Micrografias de MEV das partículas de gelatinas obtidas na reação conduzida em meio básico com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ : a) 5 min, b) 3 horas, c) 5 horas.

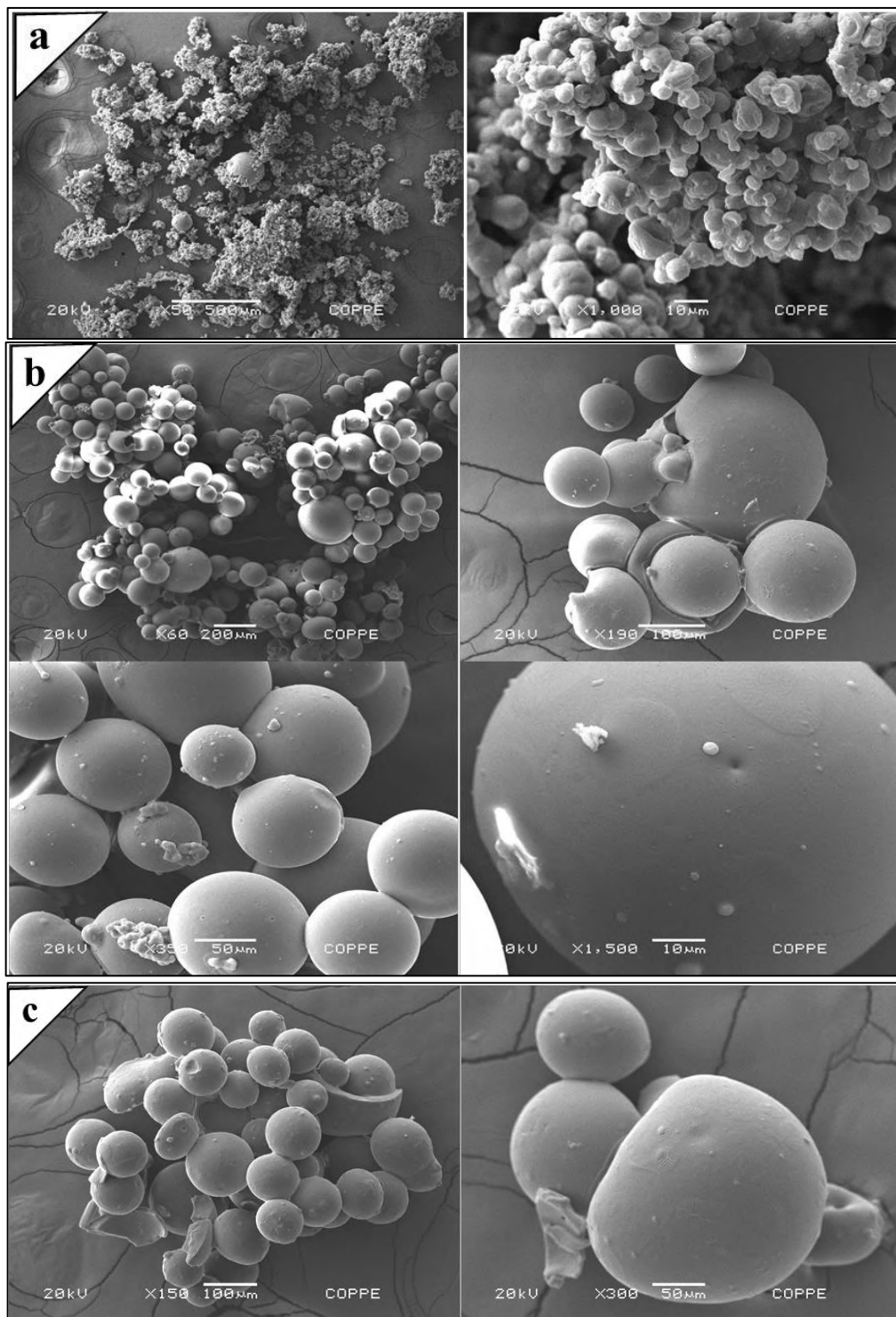


Figura 4. 17. Micrografias de MEV das partículas de gelatina obtidas na reação padrão: a) 30 min, b) 3 horas e c) 5 horas.

Com o intuito de ilustrar a significância dos resultados discutidos, outro teste foi realizado em tempo ainda maior (Reação R8 na Tabela 4. 6). Neste teste, a velocidade de agitação foi modificada com o objetivo de verificar se a maior velocidade poderia impedir o crescimento das partículas. Os resultados mostram que as trajetórias de DTP obtidas seguiram tendência dinâmica qualitativa semelhante, com tamanhos médios de partícula deslocados em direção a diâmetros menores quando considerados tempos de reação semelhantes, como esperado quando a velocidade de agitação aumenta. Esses resultados são mostrados na Figura 4. 18 e Figura 4. 19. Observam-se nas Figura 4. 18 e Figura 4. 19 as mesmas transformações morfológicas já discutidas, o que confirma a consistência das observações apresentadas. Os menores tamanhos iniciais das partículas confirmam o controle do mecanismo de quebra e coalescência sobre a evolução de DTP. Por outro lado, as mudanças observadas após 8 horas de reação mostram que as lentas transformações do meio se estendem por períodos de tempo que extrapolam o período de 5 horas analisadas anteriormente.

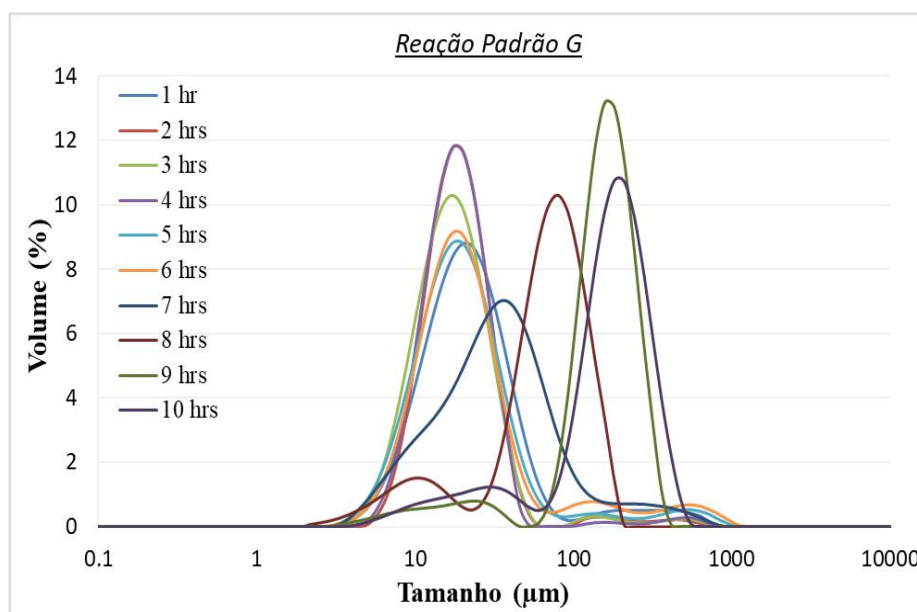


Figura 4. 18. Distribuições de tamanhos das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 10 horas com velocidade de agitação de 1000 rpm.

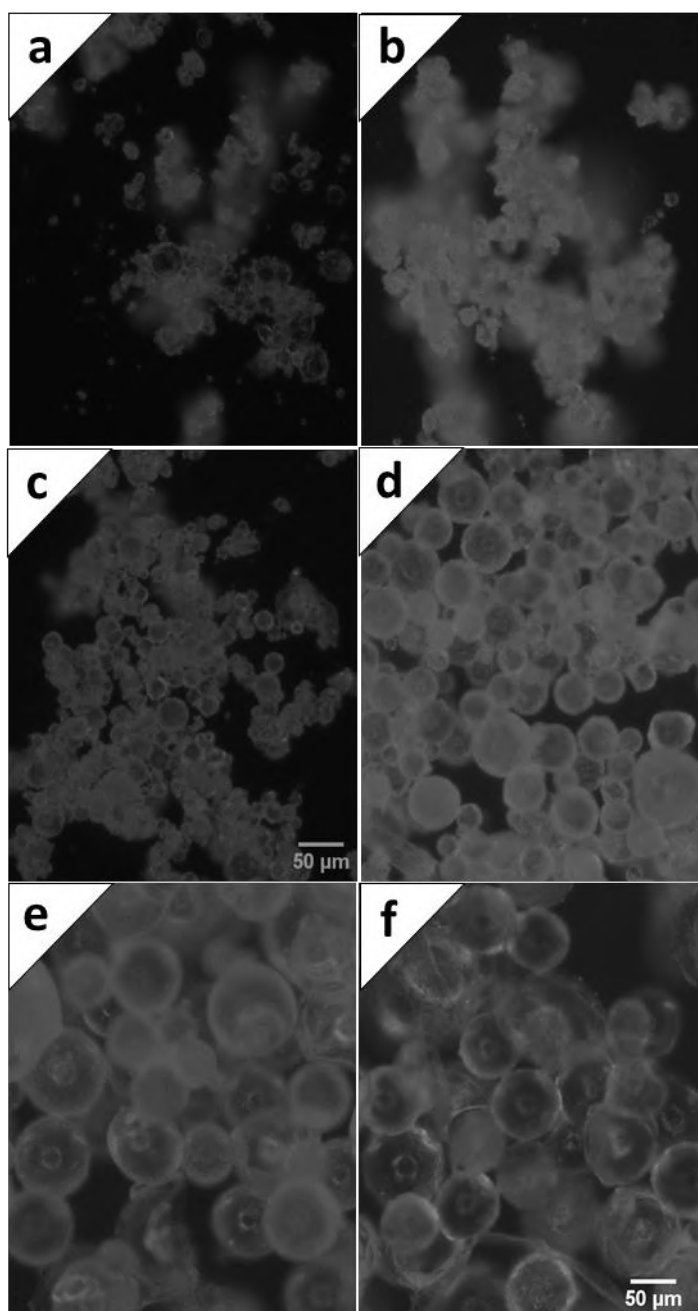


Figura 4. 19. Micrografias das partículas de gelatina obtidas na reação padrão conduzida por 10 horas da reação padrão com velocidade de agitação de 1000 rpm: a) 5h, b) 6h, c) 7 h, d) 8h, e) 9h, f) 10h.

- **Análise Termogravimétrica (TGA)**

A fim de caracterizar de forma mais detalhada a estabilidade de partículas de gelatina obtidas ao longo do tempo e verificar a possível ocorrência da reticulação, amostras coletadas a tempos regulares foram submetidas a ensaios térmicos por meio da análise termogravimétrica (TGA). Essas análises foram realizadas nas duas condições reportadas nesta seção.

A Figura 4. 20 mostra os termogramas (TGA) de amostras tomadas ao longo do tempo da reação conduzida com controle de pH e sua respectiva derivada de decomposição térmica (DTG). De forma similar, ensaios termogravimétricos da reação padrão em função do tempo também foram realizados para amostras tomadas ao longo do tempo. O termograma mostrado na Figura 4. 21 indica as mudanças ocorridas no material e permite a comparação entre eles. Os resultados obtidos mostraram que houve pequena e constante variação das taxas de perda de massa em amostras coletadas ao longo do tempo de reação. Nota-se em particular na Figura 4. 20 que quanto maior é o tempo de reação menos acentuadas são as taxas máximas de perda de massa e menos acentuadas são as perdas de massa ao final do processo (indicando leve aumento da resistência à perda de massa, como esperado em materiais reticulados). Tendências similares, embora menos expressivas, são observadas na Figura 4. 21. Esses resultados parecem reforçar a ideia de que transformações lentas ocorrem com o passar do tempo durante o tratamento térmico e que podem estar associadas à lenta reticulação das cadeias de gelatina. Uma vez mais, tendências similares foram observadas nas condições avaliadas, que parecem ser controladas pelo tempo de reação. Parece correto ressaltar que as variações ocorridas nas taxas de perda de massa em amostras coletadas da reação conduzidas na presença de formaldeído (R5 na Tabela 4. 1) também não foram tão expressivas (

Figura 4. 2), revelando talvez que apenas pequenas variações possam ser detectadas em análises de TGA de gelatina.

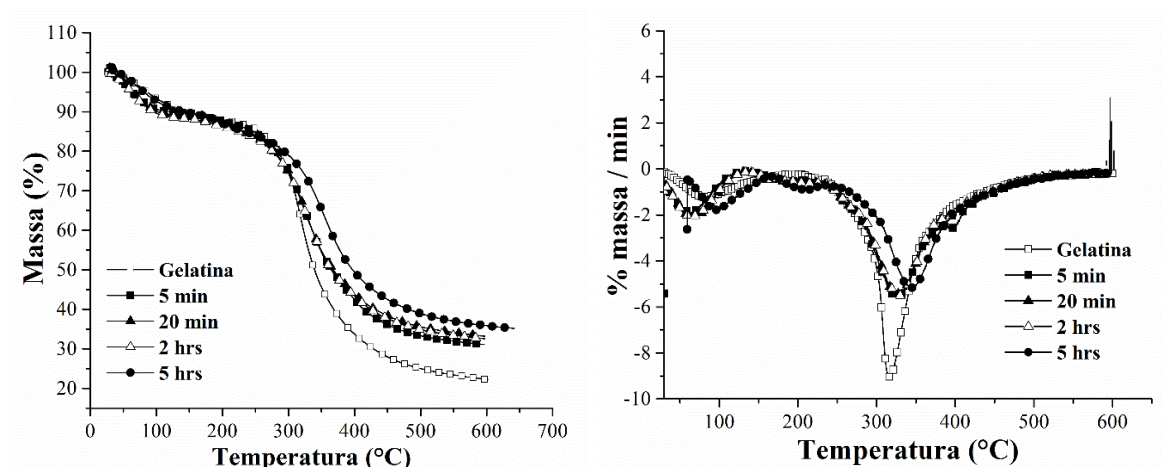


Figura 4. 20. Termogramas de TGA de partículas de gelatina reticuladas obtidas na reação com controle de pH ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ): a) decomposição térmica (TGA); b) derivada da curva de TGA (DTG).

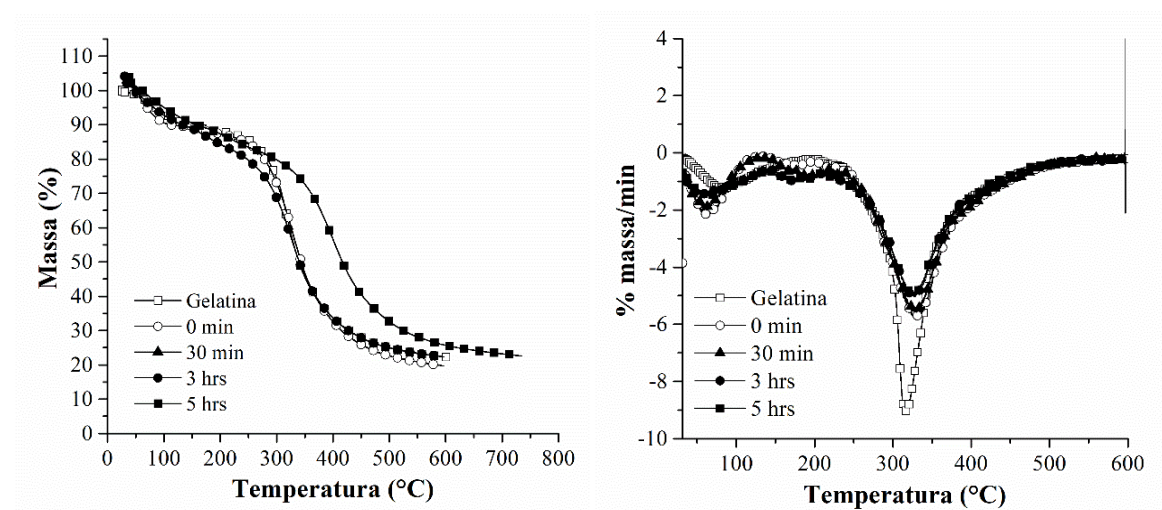


Figura 4. 21. Termogramas de TGA de partículas de gelatina obtidas na reação padrão: a) decomposição térmica; b) derivada da curva de TGA (DTG).

- **Ressonância Magnética Nuclear no Domínio de Tempo (RMN-DT)**

Amostras de gelatina comercial e duas alíquotas referentes ao tempo inicial e final de reação foram submetidas a análises de ressonância magnética nuclear no domínio de tempo, com o objetivo de avaliar a possível mudança de estrutura molecular ocorrida ao longo do tempo de reação. Segundo os resultados das análises, amostras tomadas nos primeiros minutos



de reação apresentaram domínios morfológicos caracterizados por diâmetros menores e com tendência a formar aglomerados (*clusters*), enquanto amostras referentes ao final da reação (3 horas) apresentavam domínios morfológicos caracterizados por diâmetros maiores e com maior dispersão. A Figura 4. 22 exibe um modelo de disposição das partículas proposto para melhor compreensão dos resultados, enquanto a Tabela 4. 9 mostra os dados quantitativos das análises. À medida que o tempo passa, a fração rígida das amostras aumenta, possivelmente em função da reticulação.

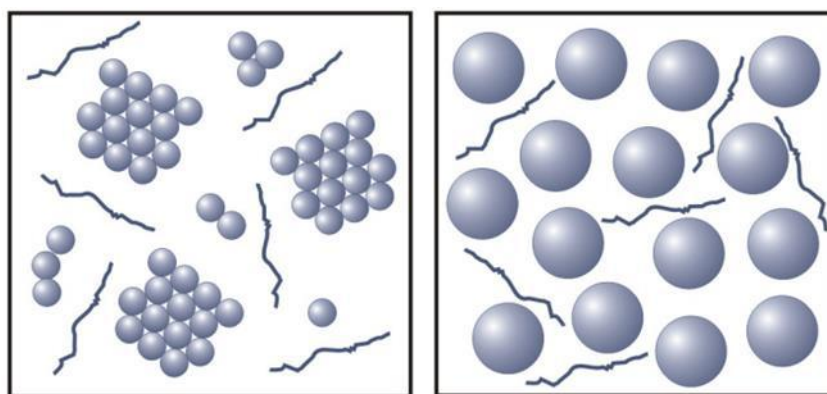


Figura 4. 22. Modelo esquemático de distribuição de domínios morfológicos de matriz de gelatina: à esquerda, amostras obtidas no início da reação; à direita, amostras obtidas no final da reação.

É importante enfatizar inicialmente que as transformações observadas após o processo de dissolução da gelatina foram muito mais expressivas que as observadas durante a reação. Esse fato corrobora os dados obtidos por Way (2013), que concluem que o processo de dissolução por si só induzia modificações de estruturas das cadeias de gelatina, que eram mais importantes que as observadas ao longo de 30 min de tratamento térmico.

Com relação à fração rígida, observa-se um ligeiro aumento percentual do tempo inicial para o tempo final, que pode ser devido ao maior diâmetro dos domínios rígidos, induzido pela reticulação. O valor de  $T_2$  decaiu de 22 para 18 microssegundos, o que indica que as esferas maiores e mais densas apresentam maior rigidez em relação aos domínios da amostra no tempo inicial.

Tabela 4. 9. Resultados referentes às análises de RMN-DT de amostras de partículas de gelatina obtidas no início e no final da reação padrão (R6).

AMOSTRA	MSE-FID		
	Rígida (%/μs)	Intermediária (%/μs)	Móvel (%/μs)
Gelatina	66 / 20	7 / 120	27 / 220
Tempo Inicial (t <sub>0</sub> )	50 / 22	34 / 460	16 / 523
Tempo Final (t <sub>3</sub> )	55 / 18	28 / 352	17 / 465

Na fração intermediária, a redução percentual de 34% para 28% sugere que, após 3 horas, os domínios rígidos aumentaram de tamanho por conta da redução da fração de cadeias livres ou não empacotadas. O tempo de relaxação foi reduzido de 460 para 352 μs, uma vez que a amostra obtida ao final da reação apresentava menos espaço livre para movimentações das cadeias residuais e das moléculas de água, diminuindo a mobilidade. Esses efeitos sugerem o enrijecimento das frações mais móveis, possivelmente por conta da reticulação.

Já a fração representada pela fase mais móvel não apresentou mudança percentual significativa, uma vez que é majoritariamente composta pelas moléculas da água adsorvida. Contudo, assim como na fração intermediária, observou-se uma diminuição dos tempos de relaxação pelos mesmos motivos colocados anteriormente. Portanto, as análises de RMN-DT sugerem a lenta ocorrência de reação de reticulação e enrijecimento da matriz de gelatina. Estudos similares não foram encontrados na literatura.

- **Análise de Viscosidade**

Na Figura 4. 23 são exibidos os perfis dinâmicos de viscosidade das reações conduzidas com e sem adição de Ca(OH)<sub>2</sub>. As análises de viscosidade mostram que a viscosidade da solução de gelatina aumenta lentamente ao longo do tempo da reação, o que pode indicar o aumento gradativo da massa molar, sugerindo a ocorrência da reticulação lenta da gelatina. Esse resultado pode também explicar o aumento dos tamanhos médios de partícula ao longo do tempo, por conta da redução da frequência de quebra e aumento das taxas de coalescência (ODIAN, 2004). A Figura 4. 23 ilustra de forma muito relevante o aumento de viscosidade e

indica a existência de um tempo de “lag” (com viscosidade aproximadamente constante) de cerca de 1 hora, o que justifica os resultados apresentados por Way (2013). Além disso, os perfis de viscosidades apresentados no gráfico foram semelhantes para ambas as reações, mostrando o mesmo comportamento para condições da reação padrão e a reação com hidróxido de cálcio. O ponto de máximo para reação padrão parece estar ligada a instabilidade do sistema de medição. Contudo, a presença dos íons de  $\text{Ca}^{+2}$  aparentemente causaram uma redução na velocidade de transformação do meio, possivelmente por causa da modificação da densidade de cargas nas moléculas de proteína. (O ponto de máximo na curva de viscosidade da reação padrão está relacionado a problemas de medição e não deve ser interpretado em bases físicas). Por isso, a trajetória decrescente da curva será removida das próximas figuras.

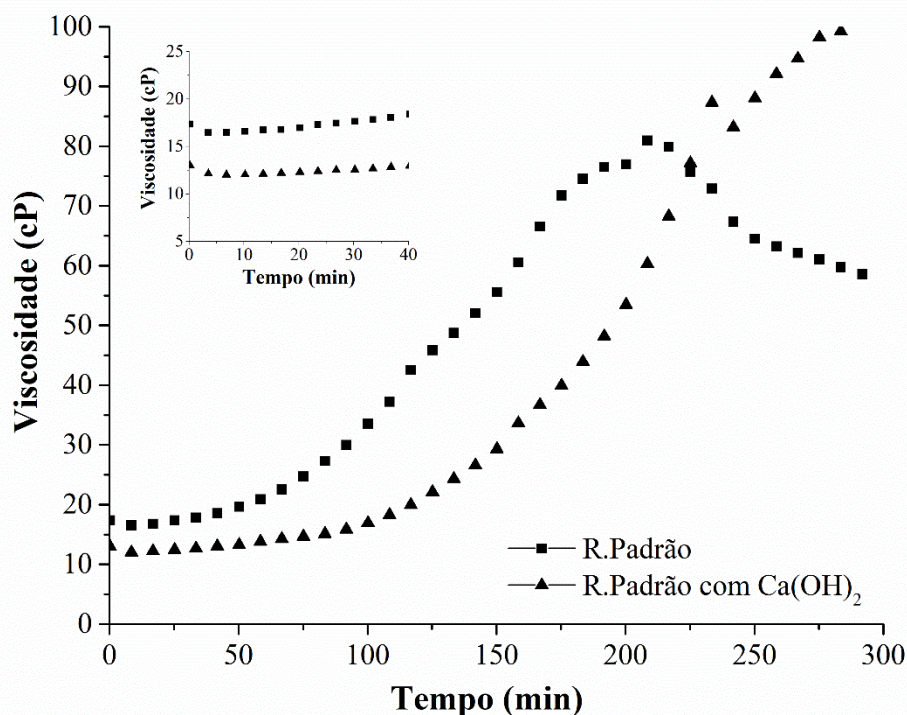


Figura 4. 23. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina em diferentes condições de reação.

- **Análise de Tensão Superficial**

As análises de tensão superficial foram realizadas na fase dispersa da reação (fase aquosa), onde ocorrem as mudanças causadas pela reticulação do polímero. A Figura 4. 24 mostra os perfis de tensão superficial obtidos com soluções de gelatina obtidas no tempo inicial

e no tempo final (referente ao tempo final da reação). Por meio do gráfico é possível observar que não há diferença significativa entre os valores de tensão superficial para a reação padrão e gelatina pura. No entanto, um leve aumento pode ser observado no perfil de tensão superficial de solução de gelatina tratada termicamente por 5 horas.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que a evolução das distribuições de tamanho de partícula é controlada pelo aumento da viscosidade com o tempo (sensível aumento da massa molar) e não pelo aumento de tensão interfacial (sensível a mudanças de composição). Esses dados reforçam a hipótese de ocorrência de lenta reação de reticulação durante tratamento térmico de partículas de gelatina

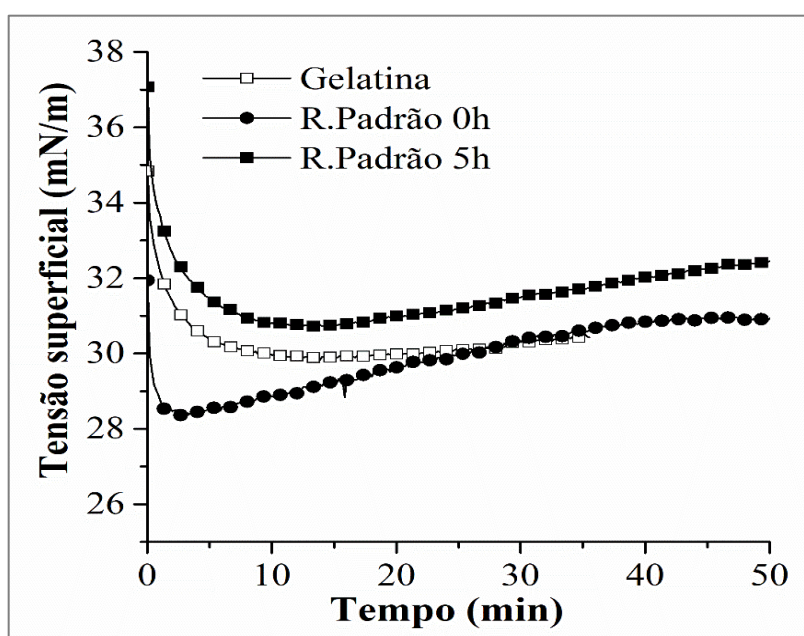


Figura 4. 24. Perfis de tensão superficial da reação padrão comparado com a gelatina.

- **Análises de FTIR**

Com intuito de avaliar as mudanças de composição química e confirmar as evidências que sugerem a ocorrência da reticulação das cadeias de gelatina, análises de FTIR foram realizadas. Espectros de FTIR das amostras de partículas de gelatina podem ser observados na Figura 4. 25. Pode ser verificado que a intensidade da banda posicionada em  $3279\text{ cm}^{-1}$  (estiramento NH), aumenta consideravelmente após determinado tempo de reação quando a

glicose foi usada. A região entre 3100-3300  $\text{cm}^{-1}$  é geralmente caracterizada pela existência de ligações de amida A e amida B, que são característicos de cadeias peptídicas, como a gelatina. Além disso, essa região também pode caracterizar a presença de água na amostra; ou seja, grupos OH, resultantes de associação com as cadeias poliméricas. Da mesma forma, existe um aumento relativo das bandas que caracterizam as ligações amida I, II e III. A banda da Amida I compreende a região espectral de 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde ao estiramento de C=O de ligações peptídicas. A banda da Amida II surge principalmente da flexão no plano NH e da vibração de estiramento do CN (FASASI *et al.*, 2015). As principais características das bandas IR das proteínas e peptídeos estão listadas na Tabela 4. 10.

Tabela 4. 10. Descrição das principais bandas de FTIR encontradas em proteínas.

Designação	Frequência aproximada ( $\text{cm}^{-1}$ )	Descrição
Amide A	3300	NH estiramento
Amide B	3100	NH estiramento
Amide I	1600–1690	C=O estiramento
Amide II	1480–1575	CN estiramento, NH dobramento
Amide III	1229–1301	CN estiramento, NH dobramento
Amide IV	625–767	OCN dobramento

Por meio da Figura 4. 25a, foi possível observar que ao longo do tempo de reação ocorreram diferenças nas intensidades relativas dos espectros gerados, o que poderia resultar de diferenças do sinal de fundo de cada espectro. No entanto, o aumento da intensidade pode estar também relacionado a mudanças da estrutura aleatória das cadeias, resultante da perda da estrutura secundária e terciária da proteína (AL-SAIDI *et al.*, 2012). Essa mudança de estrutura iniciada pelo processo de aquecimento leva a uma variação na conformação que, provavelmente, expõe grupos funcionais reativos da proteína, facilitando que ligações aconteçam. Esta mudança na intensidade nos espectros também pode ser devida a uma modificação conformacional da estrutura secundária da proteína promovida principalmente pela presença de água na cadeia (KONG e YU, 2007; YAKIMETS *et al.*, 2005).

Alguns autores têm discutido que a gelatina tem um padrão de absorção de múltiplos picos. Assim, a reticulação pode ocorrer e não ser possível observar o efeito no espectro, devido à ampla sobreposição das largas bandas de componentes subjacentes, que estão próximas umas das outras e são instrumentalmente não identificáveis (CORTESI *et al.*, 1998; KONG e YU, 2007).

Embora não seja inequivocamente identificável, outros resultados evidenciam a ocorrência da reticulação da gelatina. Construindo um gráfico de correlação entre os espectros de FTIR (Figura 4. 25b), como forma de observar quão diferente são as amostras ao longo do tempo, observam-se diferenças significativas entre os espectros no início e no final da reação. Esses dados mostram de forma inequívoca que a gelatina tratada termicamente é distinta da gelatina original, em particular na região de  $1078\text{ cm}^{-1}$ , característica da formação de ligações CN à custa de ligações de CO durante a formação do composto reticulado (CUI *et al.*, 2014). Esse resultado sugere uma vez mais a ocorrência de reações de reticulação induzidas pela adição de glicose. Os dados de FTIR obtidos na ausência do reticulante (glicose) serão exibidos na seção seguinte e uma avaliação mais cuidadosa será realizada.

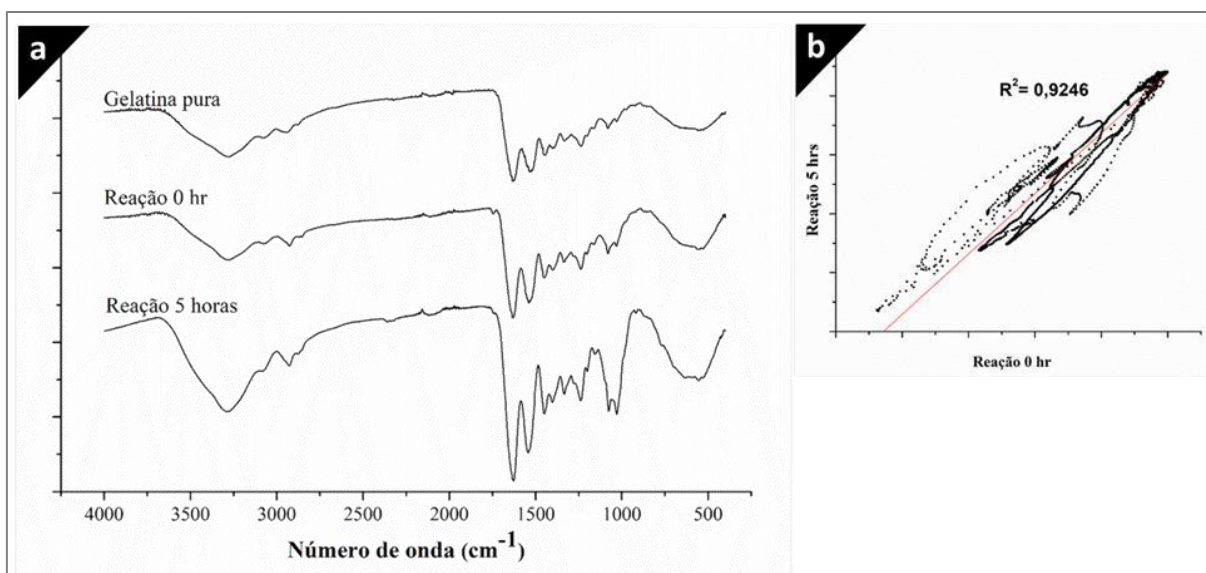


Figura 4. 25. Espectros de FTIR de amostras de partícula de gelatina obtidas da reação padrão tratadas com agente de reticulação; a) espectros originais e b) espectros de correlação 0 e 5h.

Além disso, observou-se uma clara mudança de cor, do branco para o amarelo, das partículas tratadas com glicose após algum tempo de reação (Figura 4. 26), o que pode ser atribuído à ocorrência da ligação aldimina ( $\text{CH} = \text{N}$ ), gerada quando um grupo aldeído ( $-\text{CHO}$ ) reage com um grupo amino durante o processo de reticulação (TIAN *et al.*, 2016).

Afirma-se que a cor pode ser fortemente influenciada por vários fatores, tais como o valor de pH, o grau de reticulação, o teor de plastificante, o processo térmico e o processo de fabricação (GARAVAND *et al.*, 2017). A intensificação no padrão de amarelecimento também foi observada na presença de glutamina (HERNÁNDEZ-MUÑOZ *et al.*, 2004), isolada de proteína de soja (PARK *et al.*, 2000) e proteína de mamona (MAKISHI *et al.*, 2013), e gelatinas reticuladas por diferentes aldeídos.

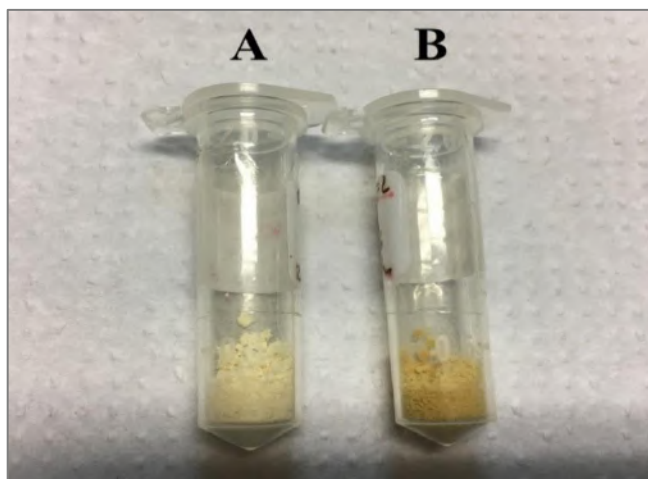


Figura 4. 26. Mudança de cor resultante da reação do tratamento térmico; (A) 1 hora e (B) 5 horas

- **Avaliação qualitativa da solubilidade**

Após todos os testes realizados e resultados apresentados mostrarem de forma cada vez mais clara que mudanças ocorrem ao longo do tempo em gelatinas tratadas com glicose, as partículas de gelatina foram avaliadas quanto à solubilidade em água. As partículas foram suspensas em água e os resultados são mostrados na Figura 4. 27. As imagens da Figura 4. 27 mostram que as partículas de gelatina não solubilizaram em água; no entanto, quando são mantidas em água por um período de 24h, a solução ficou turva, embora as partículas tenham

ainda permanecido suspensas. Esse resultado sugere, de fato, uma vez mais a ocorrência de reações de reticulação induzidas pela adição de glicose. A turbidez se deve ao inchamento de pequenas partículas de gelatina, que se comporta como um hidrogel quando reticulado.



Figura 4. 27. Avaliação qualitativa da solubilidade em água

#### 4.2.2 Reação Conduzida na Ausência de Glicose

A proposição do uso da glicose como agente de reticulação foi baseada em trabalhos prévios, que sugerem a ação desse composto como agente de ligação cruzada de gelatina (CORTESI *et al.*, 1998; CHAUNDY *et al.* 1996; DIGENIS *et al.*, 1994). No entanto, há falta de informação inequívoca de que de fato ocorram ligações cruzadas das cadeias de gelatina quando a glicose é empregada. Os estudos são baseados principalmente na redução de solubilidade em água. Além disso, trabalho anterior do grupo indicou que possivelmente não ocorreu reticulação da gelatina quando a glicose foi empregada como agente de reticulação para as condições testadas, embora algumas mudanças tenham ocorrido na estrutura da gelatina (WAY, 2013).

CHAUNDY e colaboradores (1996) reportaram o uso da glicose para a reticulação da gelatina, sendo que, na ausência da mesma, o processo de reticulação foi comprometido. Diante dos resultados já reportados no presente trabalho, em que o tempo parece exercer importante influência no processo de reticulação, uma nova reação conduzida na ausência de glicose foi proposta (Reação R9 na Tabela 4. 6). Essa decisão foi tomada para confirmar se a glicose realmente promovia ligações cruzadas na gelatina e se, de fato, sua ausência comprometeria alguma etapa da reação. As caracterizações realizadas nesta etapa são apresentadas a seguir.



- **Distribuição de Tamanhos de Partículas**

A análise das distribuições de tamanhos das partículas obtidas na ausência de glicose foi realizada após a secagem e os resultados são apresentados na Figura 4. 28. Com base nos dados apresentados, foi possível observar que nenhuma diferença qualitativa foi detectada na ausência da glicose nos perfis de distribuição de tamanhos. Notou-se que no início da reação a distribuição era relativamente larga e que, ao longo da reação, ocorreu um deslocamento para tamanhos maiores, como nos demais casos. É importante observar que em reações conduzidas com glicose foram encontrados resultados muito semelhantes; no entanto, não é possível inferir as mudanças nas propriedades e morfologia das partículas causadas pela ausência da ligação cruzada com base apenas nas DTP's. Dessa forma, foi necessário realizar outras análises para melhor compreender os resultados.

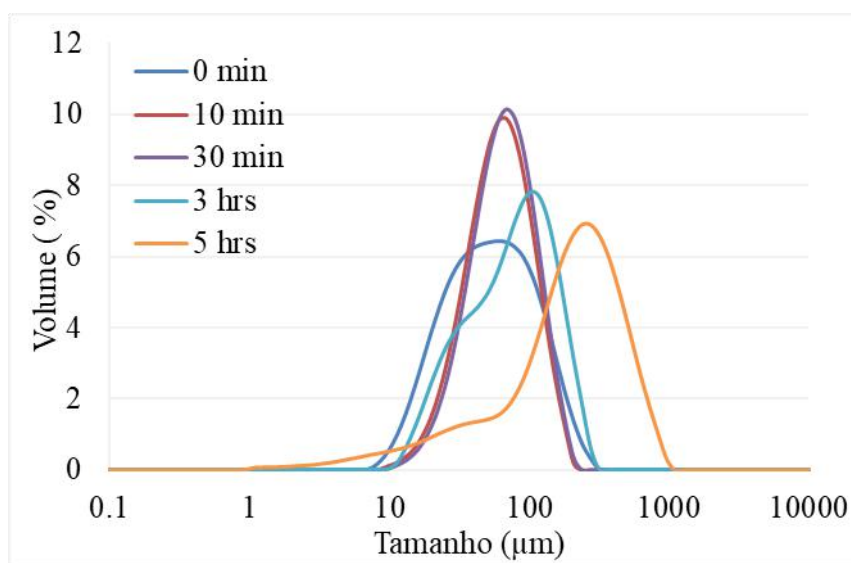


Figura 4. 28. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina obtidas na reação na ausência de glicose.

Tabela 4. 11. Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas na reação conduzida na ausência de glicose

<b>Tempo</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>PDI</b>
0 min	67	0,7
10 min	68	0,9
30 min	72	1,0
3 h	72	0,9
5 h	89	2,4

- **Microscopia Óptica:**

As partículas obtidas foram analisadas por microscopia óptica, permitindo melhor observação da morfologia das partículas. A Figura 4. 29 mostra a morfologia das partículas ao longo do tempo de reação, podendo perceber algumas diferenças de tamanho e de morfologia. Confirma-se a princípio um comportamento semelhante aos das demais reações; ou seja, até 3 horas de reação, as partículas pareciam aglomeradas e disformes. No entanto, no final da reação, ocorreu uma mudança marcante no aumento de tamanho e na forma das partículas. Portanto, as mudanças morfológicas observadas independem da adição de glicose, havendo outras transformações subjacentes que ocorrem no meio durante o tratamento térmico.

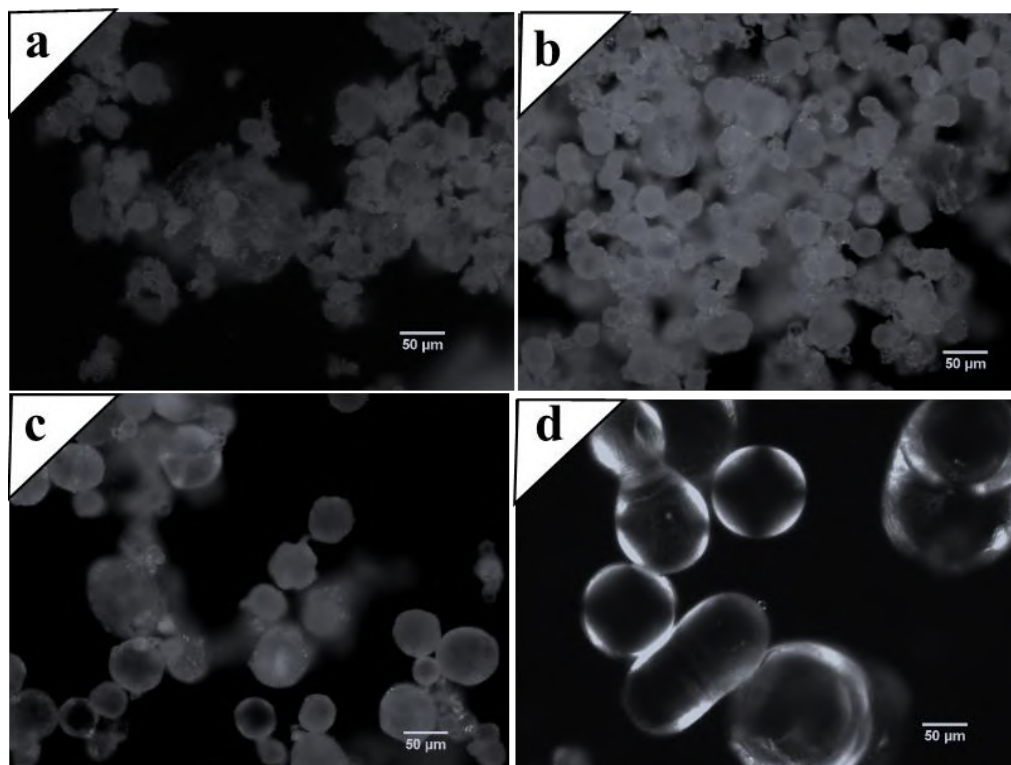


Figura 4. 29. Micrografias das partículas de gelatina obtidas na reação conduzidas na ausência de glicose: **a)** 0 min, **b)** 30 min, **c)** 3 horas e **d)** 5 horas.

- **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Na Figura 4. 30 é possível visualizar as micrografias de MEV das partículas obtidas na ausência de glicose. Observando as imagens e comparando-as com micrografias na Seção 4.2.1, ressalta-se que as partículas obtidas para o mesmo tempo de reação, de até 3 horas, apresentaram morfologias distintas, indicando que a presença da glicose pode afetar o desempenho da reação. A Figura 4. 30a exibe partículas com má formação e superfície altamente irregular. Por outro lado, partículas obtidas no final da reação apresentaram bom aspecto morfológico, com a presença de partículas de geometria esférica e superfície regular. No entanto, esse material, ainda apresentava um aspecto bem diferente do anteriormente obtido para o mesmo intervalo de tempo, como mostrado na Figura 4. 30b. As partículas apresentavam-se aparentemente mais frágeis, com formação de algumas esferas ocas. Diante desse aspecto, esses resultados parecem indicar que a glicose afeta de alguma forma o andamento das reações nas condições testadas, como sugerido por alguns autores já citados neste documento. A partir das análises de microscopia não é possível obter informações

conclusivas sobre mudanças nas propriedades, mas é possível afirmar que as partículas obtidas no mesmo tempo de reação apresentam morfologias distintas. Portanto, parece correto afirmar que a adição de glicose afeta a completa rede de transformação que ocorreu durante o tratamento térmico, aparentemente acelerando o processo de transformação.

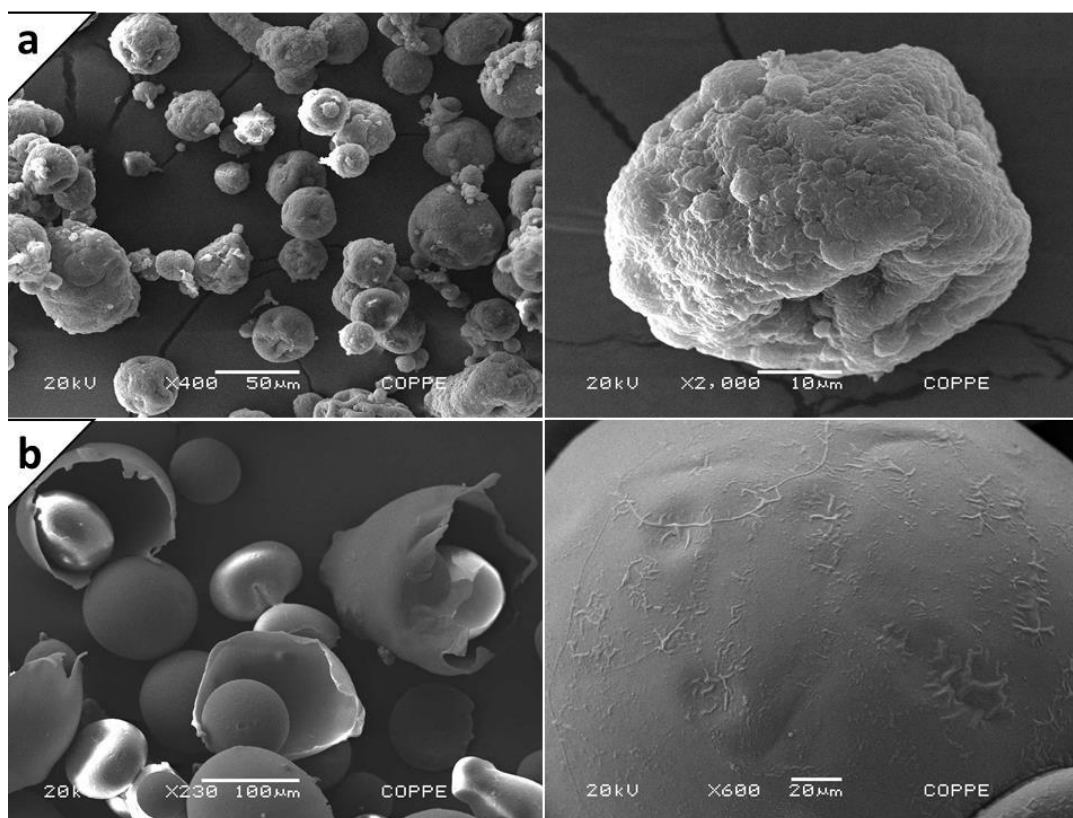


Figura 4. 30. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas na reação conduzida na ausência de glicose: **a)** 3 horas e **b)** 5 horas.

- **Análise Termogravimétrica (TGA)**

Como algumas mudanças foram observadas mesmo na reação conduzida na ausência de glicose, testes termogravimétricos foram realizados com objetivo de avaliar os efeitos dessa mudança na resistência térmica do material obtido e observar o efeito da glicose sobre o andamento da reação e as propriedades finais das partículas. As variações da resistência térmica do material podem estar atreladas à presença de ligações cruzadas. A Figura 4. 31 ilustra os resultados obtidos para partículas coletadas ao longo do tempo. Os resultados mostram, no

entanto, que ao longo do tempo ocorre essencialmente sobreposição das curvas; ou seja, nenhuma mudança significativa na resistência térmica foi observada. Outra observação importante é que o perfil da gelatina pura foi similar aos das amostras retiradas ao longo do tempo, o que parece indicar que o material não foi modificado, o que pode ser explicado pela ausência da glicose. Dessa forma, observa-se que as mudanças morfológicas observadas não foram acompanhadas por mudanças de resistência térmica.

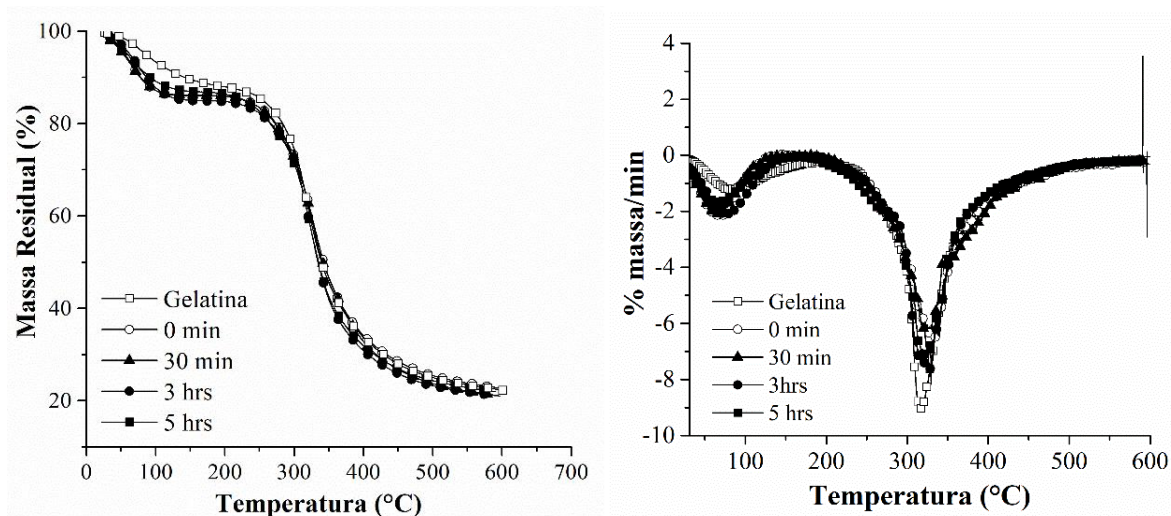


Figura 4. 31. Termogramas de TGA de partículas de gelatina obtidas em reação realizada na ausência de glicose **a)** decomposição térmica (TG); **b)** derivada da decomposição térmica (DTG)

- **Análise de viscosidade**

O ensaio de viscosidade da mistura física, na ausência da glicose, foi feito com a finalidade de comparar o perfil obtido com o perfil da reação padrão. Dessa forma, pode ser possível confirmar se a glicose promove a reticulação das cadeias de gelatina, como sugerido por alguns autores já citados. A Figura 4. 32 mostra o perfil de viscosidades da reação conduzida sem adição de glicose, comparando-o com o perfil obtido para a reação padrão. Analisando esse gráfico, é notória a ação da glicose no perfil de viscosidades em reações térmicas da gelatina. A ausência da glicose manteve os valores de viscosidade no tempo quase que constantes, sendo possível inferir que não houve aumento da massa molar, o que pode estar atribuído à não ocorrência de ligações cruzadas entre as cadeias da gelatina. Com estes resultados, fica claro

que a glicose, provavelmente exerce ação reticulante com a gelatina, como sugerido por alguns autores; no entanto, em tempos prolongados de reação. Como pode ser visto no gráfico, em tempos curtos (30 min) de reação não ocorre qualquer mudança significativa na viscosidade, confirmando os resultados exibidos por Way (2013). A ocorrência desse tempo de indução nunca foi descrita na literatura. O leitor atento vai perceber um leve decréscimo de viscosidade nos instantes iniciais de reação, como previsto por Way (2013), por conta de redução da massa molar no processo de solubilização.

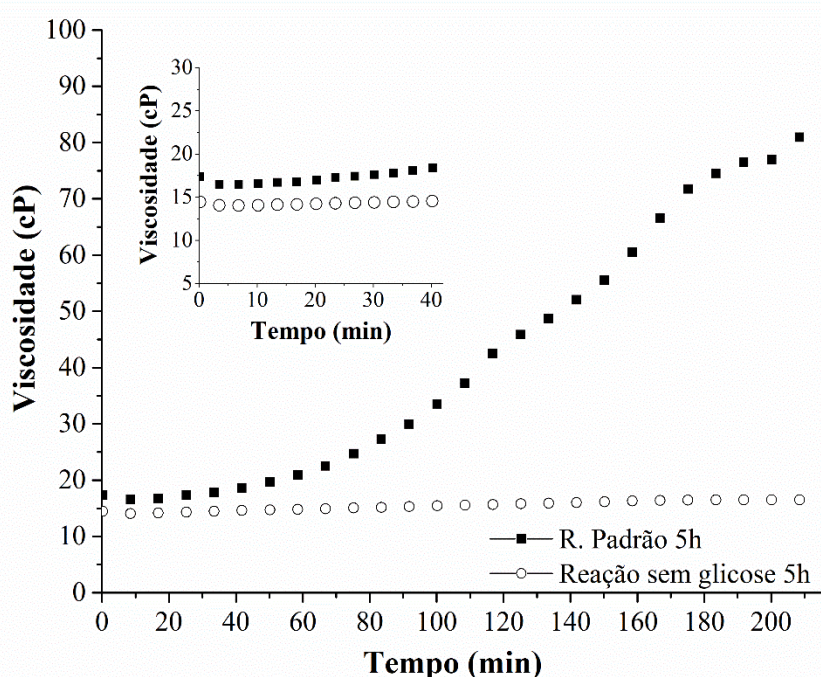


Figura 4. 32. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas com e sem glicose.

- **Análises de FTIR**

A Figura 4. 33 mostra os espectros de partículas de gelatina obtidas da reação na ausência da glicose. Com base na Figura 4. 33 é possível afirmar que não existem diferenças importantes nos espectros de amostras obtidas em diferentes tempos da reação (0 hr e 5 h). Percebe-se que não houve mudança inclusive nas intensidades, o que permite conjecturar que não houve a reticulação do material. A Figura 4. 33b mostra que os espectros de FTIR são muito semelhantes. Comparando esse resultado com os obtidos na Seção 4.2.1, é possível confirmar

que há grande diferença entre os espectros das partículas obtidas da reação padrão e da reação conduzida na ausência de glicose. Dessa forma, isso mostra quão diferentes são os produtos de reação obtidos nas duas condições, sendo mais um indicador da ocorrência de ligações cruzadas na presença da glicose.

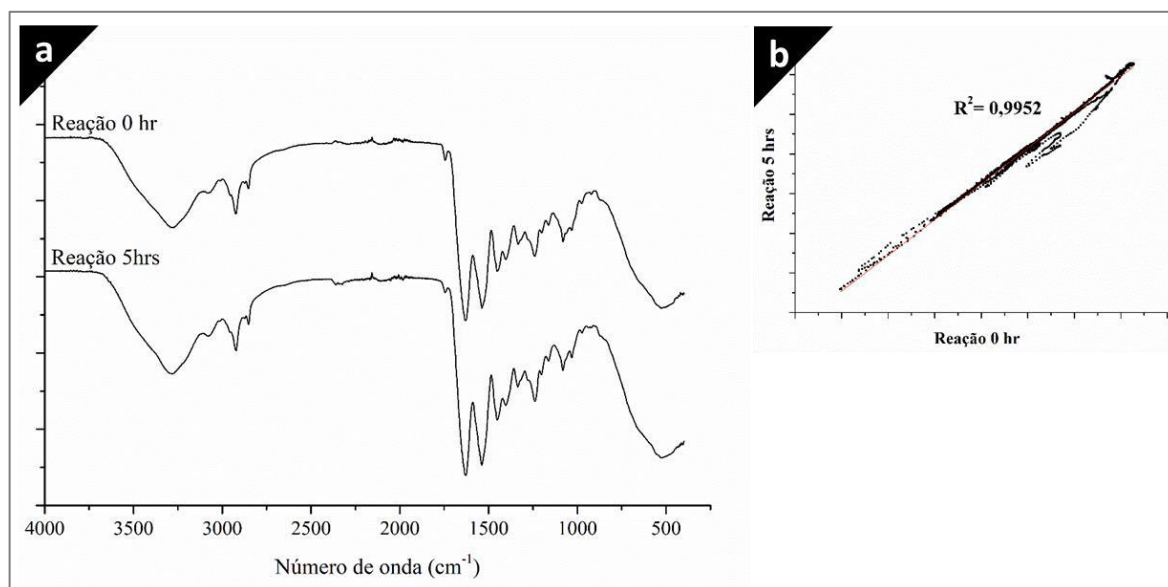


Figura 4. 33. Espectros de FTIR de amostras de partículas de gelatina obtidas da reação na ausência de glicose; a) espectro original das partículas no tempo inicial e final e b) correlação dos espectros de FTIR de amostras tratadas po 0 hr e 5hrs.

- **Considerações parciais**

Diante dos resultados apresentados e discutidos nesta seção, é possível afirmar que as adições de cálcio e de glicose exercem papéis relevantes nas reações de tratamento térmico de gelatina. No entanto, o tempo parece ser a variável que mais afeta a preparação das partículas de gelatina, segundo a técnica proposta. Um fator importante revelado é que mesmo na ausência da glicose ocorrem modificações na estrutura da partícula ao longo do tempo. Parece também ter ficado claro a ação da glicose como agente de reticulação nas reações conduzidas por tempos prolongados com a gelatina. Dessa forma, pode-se afirmar que é possível produzir partículas de gelatina reticulada nas condições avaliadas, para uso em diversas áreas que requeiram a ingestão desses materiais, superando o impasse da toxicidade relacionada com uso de outros agentes reticulantes, como o formaldeído e o glutaraldeído.

### **4.2.3 Avaliação da concentração de íons no meio de reação**

Diante dos resultados obtidos até aqui, um conjunto de testes foi realizado com águas de diferentes origens (deionizada, destilada, torneira) com a finalidade de avaliar a influência da presença de íons na água sobre o processo de obtenção de partículas de gelatina. Os testes foram motivados por observações feitas durante os ensaios e os conhecimentos prévios obtidos neste trabalho, relacionado à presença de íons no meio de reação. Como já esperado, a presença de íons (medida de forma qualitativa por ensaios de condutividade) induziu uma melhor formação das partículas e os resultados são apresentados no Apêndice B. Esse resultado pode ser considerado muito importante, pois, dependendo do uso pretendido para essas partículas, pode não ser necessário impor restrições industriais ou laboratoriais para a produção de água excessivamente pura em larga escala, já que a presença de íons, como  $\text{Ca}^{++}$ , pode ser benéfica ao processo.

### **4.3 - Terceiro Bloco de Reações - Efeito da adição de extratos aromáticos**

Nas seções anteriores, foi confirmada a possibilidade de produzir partículas reticuladas de gelatina com a glicose. Assim, foram feitos testes para o emprego dessas partículas como material encapsulante de extratos aromáticos naturais, de forma a averiguar o uso potencial para encapsulamento deste tipo de composto. Inicialmente foi necessário avaliar a influência do emprego desses compostos sobre a morfologia das partículas obtidas e o desempenho do método de preparo. Deve ser ressaltado que extratos naturais são formados por misturas de alta complexidade, formadas por compostos que apresentam grande número de grupos funcionais nas moléculas, apresentando conseqüentemente potencial de interação com o meio de reação. A Tabela 4. 12 mostra as condições operacionais em que as reações foram conduzidas e os extratos que foram utilizados.



Tabela 4. 12. Condições operacionais usadas para o preparo das partículas de gelatina dopadas com extratos aromáticos.

<b>Terceiro Bloco de Reações</b>			
Condições		Tempo de reação (h)	pH da reação
Reação padrão – Extrato de Erva cidreira	R10	3	-
Reação padrão - Extrato de Laranja (Ca(OH) <sub>2</sub> )	R11	5	9,0
Reação padrão– Extrato de Erva Cidreira (Ca(OH) <sub>2</sub> )	R12	5	9,0
Reação padrão– Extrato de Canela (Ca(OH) <sub>2</sub> )	R13	5	9,0
Reação padrão– Extrato de Hortelã (Ca(OH) <sub>2</sub> )	R14	5	9,0

Nestes testes, os extratos aromáticos foram extraídos por meio de infusão do material e evaporação parcial de solvente. O objetivo desta etapa foi verificar preliminarmente a intensidade da influência do extrato sobre o processo de formação da micropartícula e definir qual o melhor extrato e condição para realizar o encapsulamento do extrato nas matrizes de gelatina. Nessa etapa, os extratos não foram caracterizados; no entanto, algumas informações disponíveis na literatura foram consideradas, como descrito a seguir.

#### **4.3.1 Reação com Extratos Aromáticos**

Extratos de erva cidreira, laranja, canela e hortelã foram usados como a fase aquosa da reação, enquanto as demais etapas de preparo foram mantidas essencialmente as mesmas. Esses ensaios foram conduzidos sem ajuste de pH e em pH 9,0, para efeito de comparação. Posteriormente, as partículas foram caracterizadas por meio de análises de distribuição de tamanhos e de microscopia.

Extrato de erva cidreira foi selecionado como material a ser encapsulado devido principalmente a suas propriedades aromáticas. Em particular, esse extrato é bastante utilizado na área de alimentos e cosméticos (EDMUNDO, 2012). O principal constituinte presente no extrato de erva cidreira é o citral, responsável por 65% a 85% do total de constituintes encontrados (SILVA *et al.*, 2006). A Figura 4. 34 mostra a estrutura molecular do citral.

Geralmente, as ervas aromáticas são utilizadas frescas, pois perdem algumas das suas propriedades após secagem, como sabor e aroma (GERDEN, 2013).

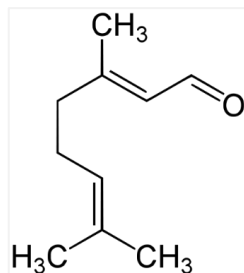


Figura 4. 34. Estrutura molecular do citral

#### 4.3.1.1 Reações Conduzidas com Extrato Natural de Erva Cidreira

As reações conduzidas com extratos naturais de erva cidreira foram realizadas por 3 horas, devido à inobservância de mudanças significativas entre as partículas preparadas por 3 e 5 horas de reação, como mostrado na Seção 4.2.1. É importante salientar que o intuito inicial foi avaliar de forma qualitativa de que maneira o material a ser encapsulado podia exercer influência sobre o produto final obtido.

- **Distribuição de Tamanhos de partícula (DTP)**

Análises de distribuição de tamanho de partícula podem ser visualizadas na Figura 4. 35. Analisando a Figura 4. 35 é possível notar que no final da reação a distribuição de tamanhos é mais estreita e formado por partículas de tamanhos mais regulares. No entanto, como nos demais casos, há tendência de produzir partículas maiores, à medida que o tempo passa. O comportamento observado foi semelhante aos obtidos quando o extrato de aroma não foi empregado, parecendo que o extrato não exerce influência significativa sobre a evolução da distribuição de tamanhos. Na reação conduzida em pH 9,0, ajustado com hidróxido de cálcio, os dados de distribuição de tamanhos ao longo do tempo mantiveram-se semelhantes até 2 horas (Figura 4. 12). Após esse tempo, o perfil foi deslocado para tamanhos de partículas maiores, embora com a presença de partículas de menor tamanho, ganhando a forma de uma curva bimodal. Os diâmetros médios das partículas ao longo do tempo são apresentados na Tabela 4. 13, confirmando o aumento acentuado dos diâmetros no final da reação.

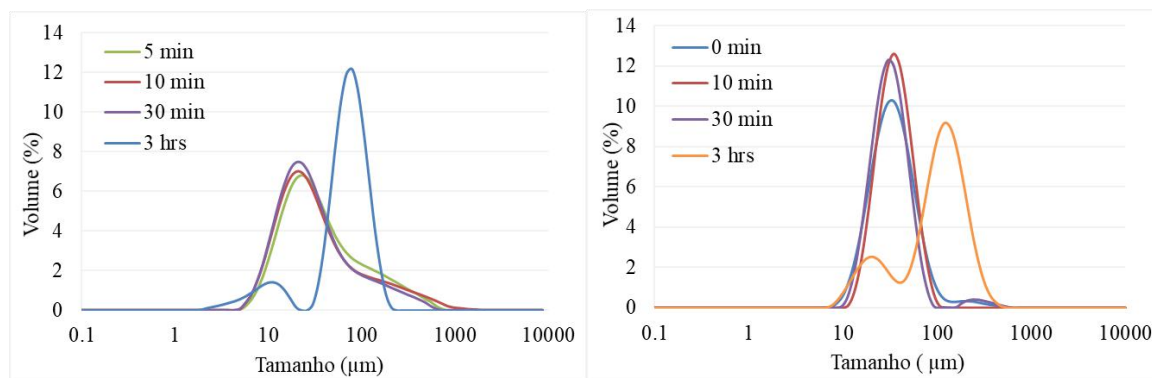


Figura 4. 35. Distribuições dos tamanhos das partículas de gelatina de reações conduzidas com extrato natural de erva cidreira. A) sem controle de pH; b) com controle de pH ( $\text{Ca(OH)}_2$ ).

Tabela 4. 13. Diâmetros médios e índice de polidispersão das partículas de gelatina ao longo do tempo em reação conduzidas com extrato de erva cidreira e controle de pH.

Com controle de pH			Sem controle de pH		
Tempo de reação	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	PDI	Tempo de reação	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	PDI
5min	42	0,95	5 min	66	0,38
10 min	37	0,75	10 min	71	0,37
30 min	39	1,10	30 min	53	1,48
3 horas	113	1,61	3 horas	73	2,59

#### • Morfologia das Partículas

Análises de microscopia óptica de amostras das partículas de gelatina preparadas em reações conduzidas com extrato de erva cidreira podem ser vistas na Figura 4. 36. Os dados corroboram os resultados apresentados nas análises de distribuição de tamanhos de partícula, sendo possível observar partículas muito pequenas, mas aglomeradas, no início da reação. Em intervalos intermediários, apesar de haver ainda aglomerados, a presença de partículas dispersas do mesmo tamanho é maior. No final da reação podem ser visualizadas partículas maiores e de tamanho similares, confirmando as distribuições de tamanhos mais uniformes.

Na Figura 4. 37, referente à reação conduzida em pH 9,0, nota-se que ao longo das duas primeiras horas, as partículas mantiveram o tamanho, confirmando os dados das distribuições de tamanho. No entanto, no final da reação as partículas dobraram de tamanho, o que fica claro

nas imagens. Acredita-se que esse efeito é resultado do aumento das taxas de coalescência, como já reportado em seções anteriores. A diferença das partículas obtidas entre os dois ensaios no término da reação foi muito grande, o que pode ser atribuído à presença de íons de cálcio, que parece afetar a reticulação por conta de efeitos físicos, como já explicado.

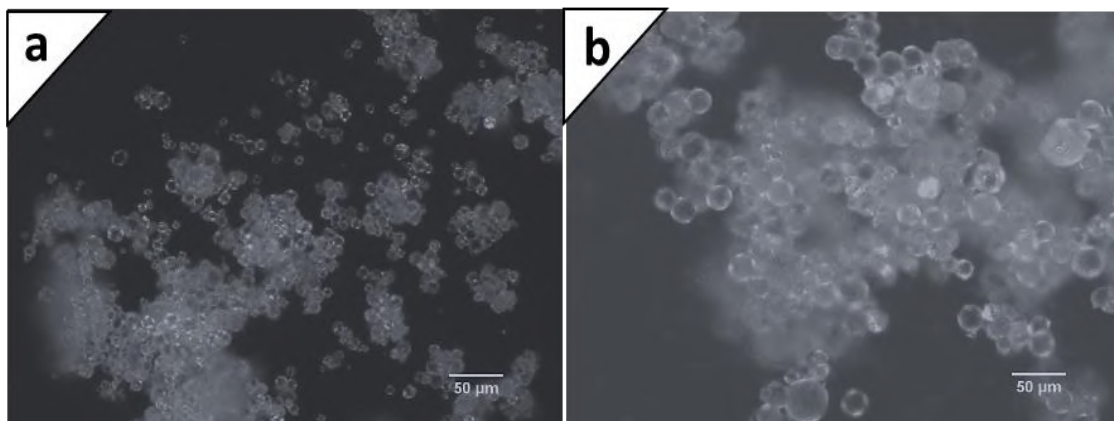


Figura 4. 36. Micrografias de partículas de gelatina preparadas com extrato natural de erva cidreira na reação conduzida sem controle de pH: a) 30 min; c) 3 horas.

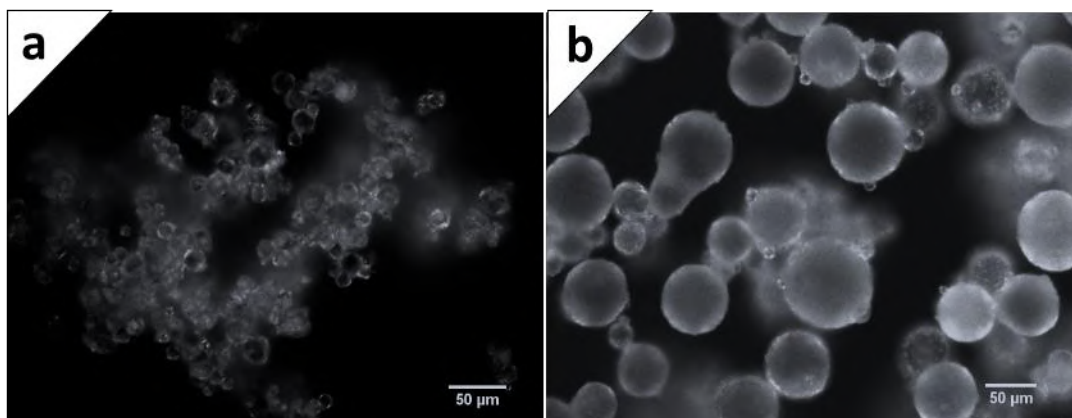


Figura 4. 37. Micrografias de partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato natural de erva cidreira em pH 9,0 ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ): a) 30 min e b) 3 horas.

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para visualizar melhor a morfologia e a superfície das partículas. A Figura 4. 38 apresenta algumas micrografias das partículas preparadas com extrato de erva cidreira. Pode-se perceber que as partículas possuem estrutura porosa, sugerindo que este composto exerce influência significativa sobre o mecanismo de formação desses materiais. A formação de poros usualmente indica ocorrência de uma segunda fase termodinâmica, parecendo revelar um

aspecto importante da interação do extrato com o meio reacional. A estrutura porosa indica mudança relevante do aspecto morfológico das partículas. Não encontramos na literatura qualquer referência à produção de micropartículas de gelatina porosa, induzidas por extratos aromáticos.

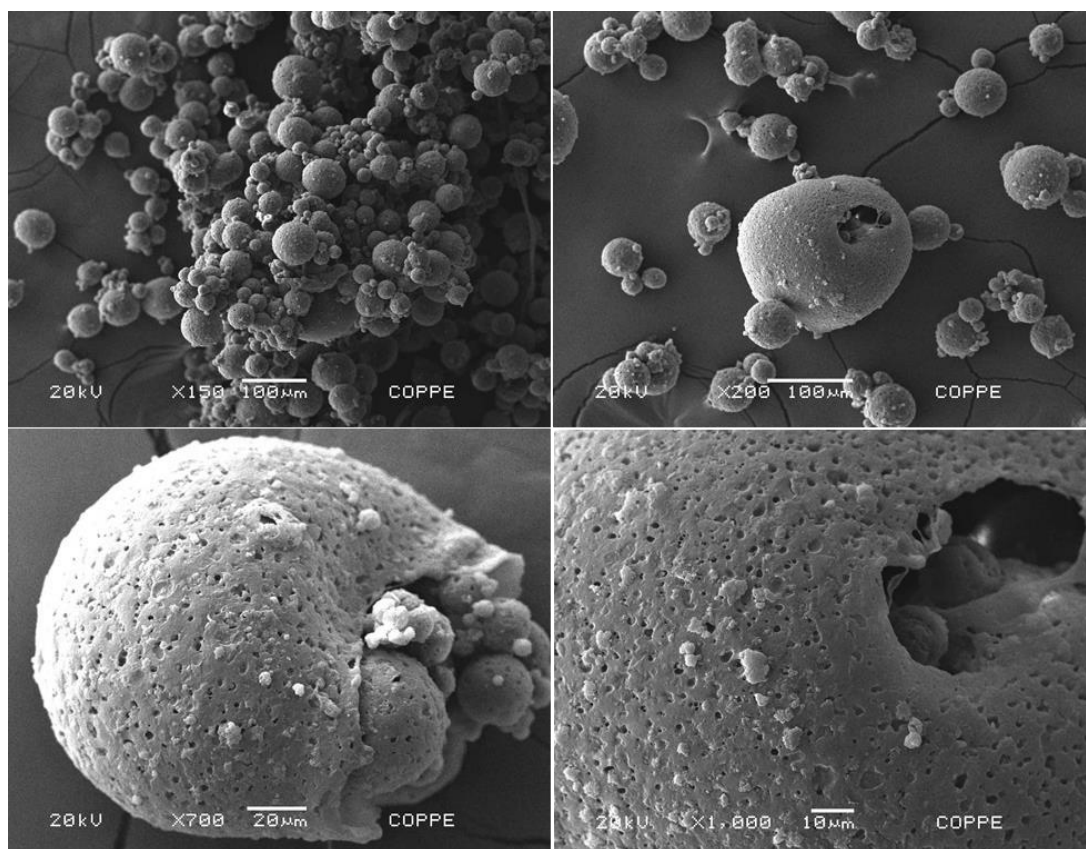


Figura 4. 38. Micrografias de MEV de partículas de gelatina produzidas com extrato natural de erva cidreira no final da reação (3 horas) em pH 9.

#### 4.3.1.2 Reações Conduzidas com Extrato Natural de Laranja

Para reação conduzida com extrato de óleo de laranja, foram utilizados extratos obtidos da extração de cascas de laranja. Segundo vários autores a substância de maior concentração no extrato da casca da laranja é o limoneno (HAYPEK *et al.*, 2000), que compreende 95% do óleo da casca de laranja e é responsável pelo aroma característico da laranja. A estrutura desse composto pode ser vista na Figura 4. 39.

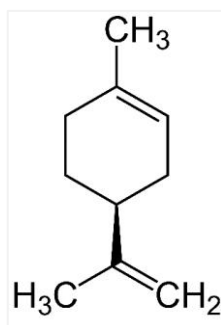


Figura 4. 39. Estrutura molecular do limoneno.

- **Distribuição de Tamanho de Partícula (DTP):**

Os resultados das distribuições dos tamanhos das partículas de gelatina preparadas em com extrato de laranja são mostrados na Figura 4. 40a. Os resultados mostram perfis estáveis dos tamanhos das partículas até 3 horas de reação, como observado na seção anterior. No entanto, um aumento no tamanho das partículas não foi alcançado neste caso até 3h de reação. Por outro lado, continuando a reação até 5h, observou-se um deslocamento da curva para diâmetros maiores de partícula, além da obtenção de uma distribuição estreita (Figura 4. 40b). Dessa forma, constata-se que o extrato de laranja retarda o crescimento das partículas de gelatina, intensificando o efeito das baixas velocidades das mudanças que ocorrem no meio das reações.

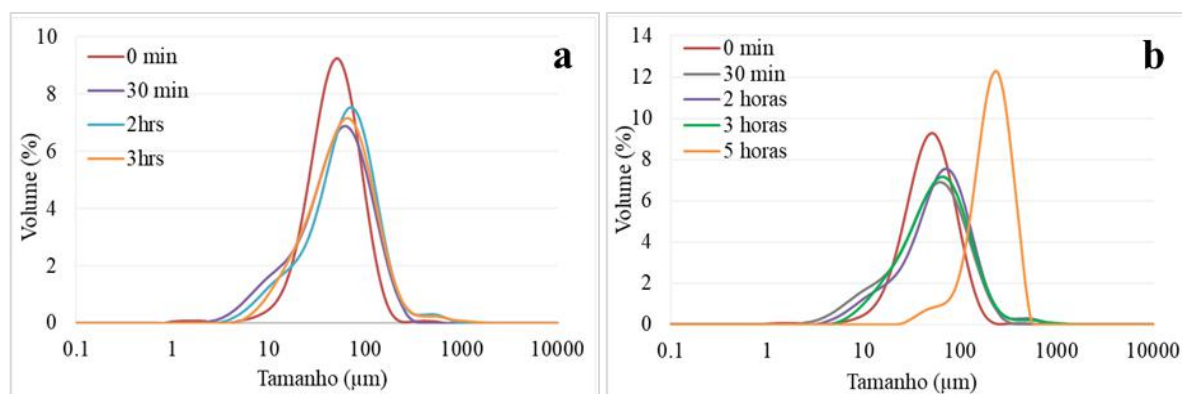


Figura 4. 40. Distribuições dos tamanhos de partícula de gelatina em reações conduzidas com extrato de laranja ao longo do tempo; a) até 3hrs, b) 5hrs.

- **Morfologia das Partículas**

As micrografias ópticas das partículas obtidas com extratos da casca da laranja são ilustradas na Figura 4. 41. As imagens confirmam os dados de distribuição de tamanho, os quais mantiveram diâmetros menores e semelhantes até 3 horas de reação, alcançando no final da reação diâmetros maiores e partículas mais homogêneas.

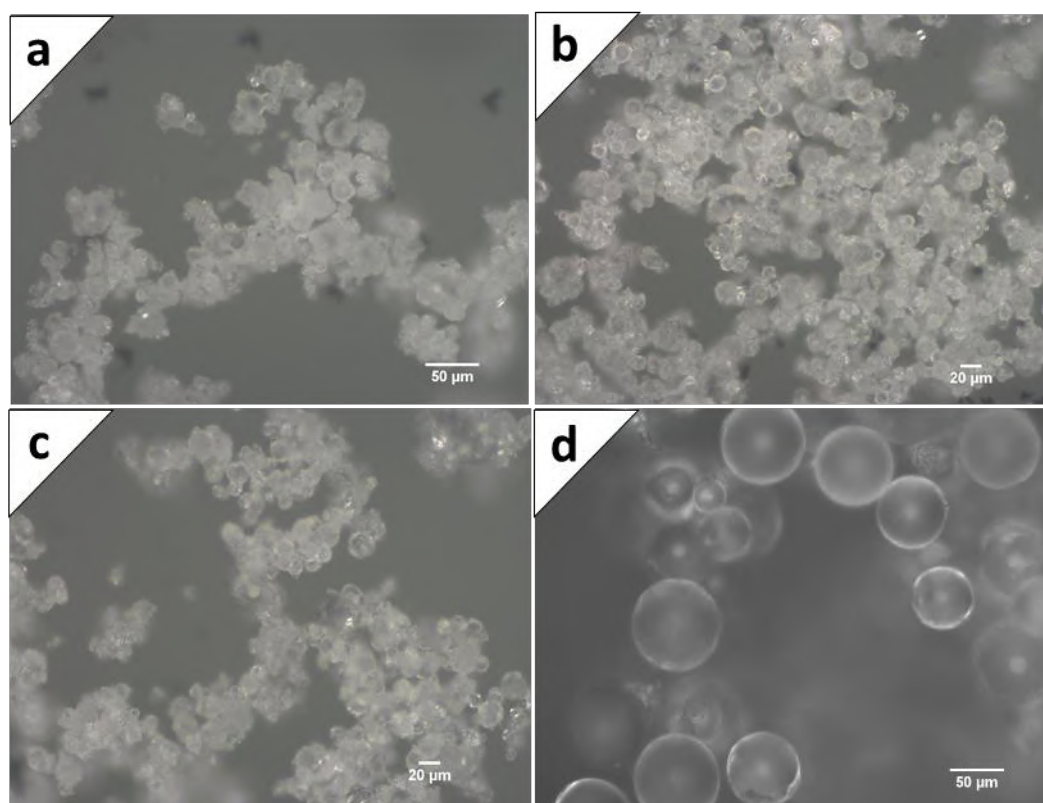


Figura 4. 41. Micrografias das partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de casca de laranja: **a)** 30 min, **b)** 2 horas, **c)** 3 horas e **d)** 5 horas.

Para melhor visualizar a estrutura morfológica das partículas, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de amostras de gelatina obtidas no final da reação foram realizadas. As imagens obtidas são mostradas na Figura 4. 42. À medida que a reação avança, na presença de extrato de laranja, formam-se partículas com geometria esférica e de superfície regular. As partículas obtidas assemelham-se às obtidas em reações conduzidas sem extratos aromáticos naturais, como descrito na Seção 4.2.1. Comparando aos dados obtidos com erva

cidreira, é possível notar de maneira clara que o extrato natural afeta o processo de reticulação, a formação da partícula de gelatina e as características morfológicas do produto final. Portanto, pode-se inferir que o processo de encapsulamento é afetado pelo extrato utilizado, que não atua como um sistema inerte.

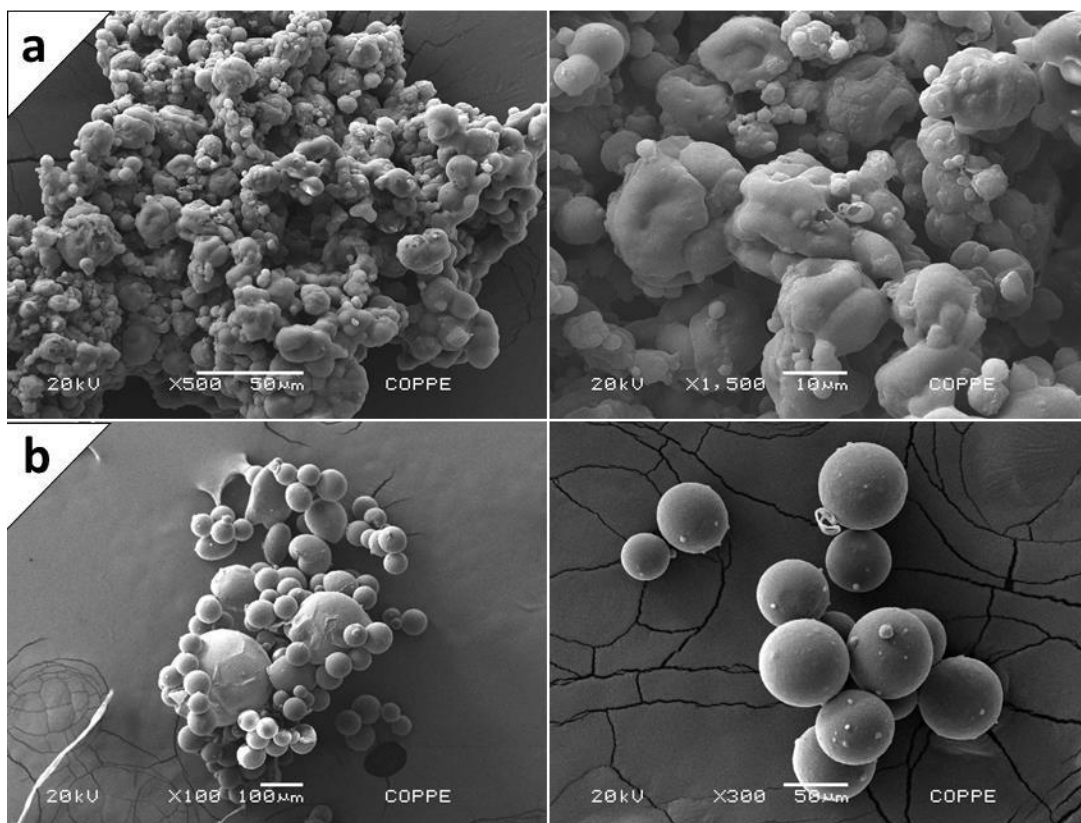


Figura 4. 42. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas em reações conduzidas com extrato de casca de laranja: **a)** 3 horas e **b)** 5 horas.

#### 4.3.1.3 Reação Conduzida com Extrato Natural de Canela

A canela é uma especiaria muito utilizada por conta dos diversos benefícios que pode trazer à saúde, como propriedades anti-inflamatórias, ativação do metabolismo, atividade antioxidante, que combate os radicais livres, e de regulação dos níveis de colesterol ruim no organismo, entre outros. Além disso, exala um odor muito agradável (BOLIN QIN *et al.*, 2010; SANTIAGO-ADAME *et al.*, 2015). A canela é utilizada para muitos fins, principalmente para o preparo de diversos tipos de comidas. A escolha dessa especiaria está vinculada a esses



benefícios do óleo de canela, à ampla disponibilidade, além do agradável aroma (SANTIAGO-ADAME *et al.*, 2015). O maior responsável pelo cheiro característico é o cinamaldeído, cuja estrutura pode ser vista na Figura 4. 43.

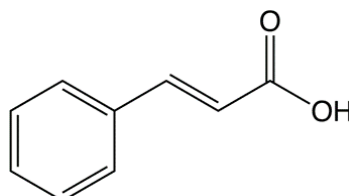


Figura 4. 43. Estrutura molecular do cinamaldeído.

A reação foi conduzida com extrato de canela obtidos por extração de canela comercial. Como nos ensaios anteriores realizados com extratos aromáticos, as partículas de gelatina foram submetidas a ensaios para caracterizar o efeito do extrato sobre o processo de formação da partícula.

- **Distribuição de Tamanhos de Partícula (DTP)**

Os ensaios de distribuição de tamanhos de partículas obtidas na reação com extrato de canela podem ser vistos na Figura 4. 44. De maneira geral, as curvas se mantiveram dentro de uma faixa bem definida de tamanhos. No entanto, o comportamento observado foi bem diferente dos anteriormente reportados nesse trabalho. Por exemplo, não houve um avanço contínuo do tamanho das partículas ao longo do tempo. Os dados relativos aos diâmetros médios das partículas mostram a variação de tamanho, como ilustrado na Tabela 4. 14. Os resultados indicam que o tamanho máximo foi atingido após 1 hora de reação, com posterior redução dos tamanhos e do alargamento da distribuição. Esse resultado indica que o processo é controlado inicialmente pela coalescência e posteriormente pela quebra, indicando mudanças das propriedades do meio. Portanto, a presença de extrato de canela no meio reacional afeta significativamente o processo de produção das micropartículas de gelatina.

Tabela 4. 14. Tamanhos médios e índice de polidispersão das partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de canela.

Tempo de reação	Diâmetro médio (µm)	PDI
0 min	75	1,10
30 min	106	1,57
1 hora	175	0,90
3 horas	137	2,78
5 horas	73	1,29

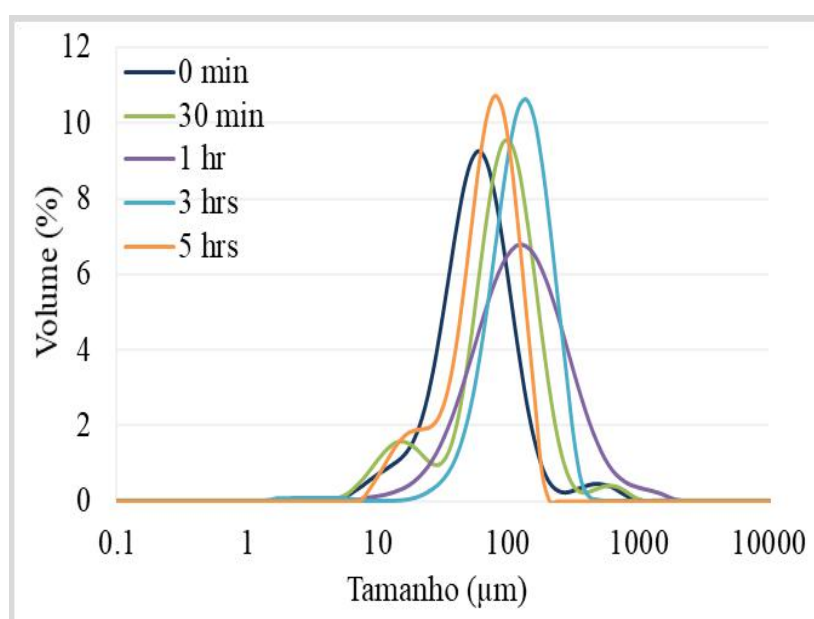


Figura 4. 44. Distribuições de tamanhos de partícula de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato natural de canela.

- **Morfologia das Partículas**

Análise de microscopia óptica foi realizada com a finalidade de avaliar a morfologia das partículas de gelatina preparadas na presença do extrato natural de canela. Como pode ser visto na Figura 4. 45, o extrato de canela parece exercer uma influência significativa no processo de formação dessas partículas, pois ocorre aglomeração pronunciada das pequenas partículas já no início da reação. À medida que a reação avança, o meio pode se tornar mais rígido, resultando em fragmentação sem que tenha ocorrido de fato a coalescência.

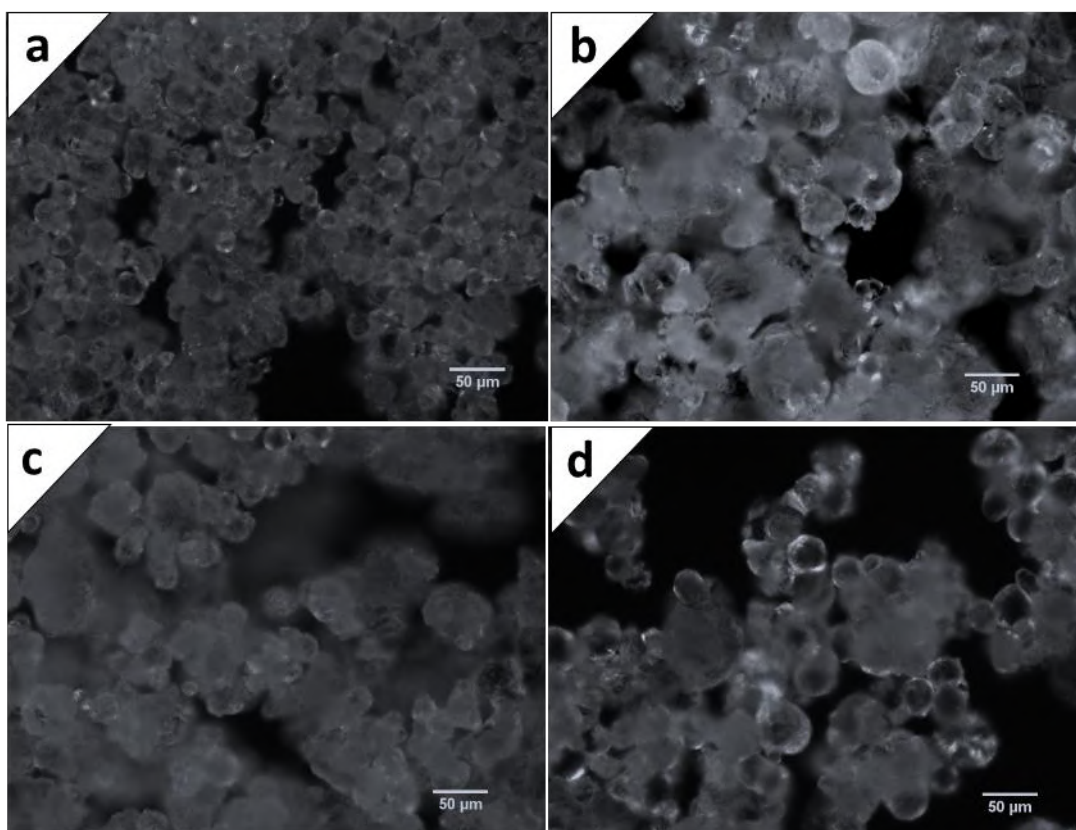


Figura 4. 45. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato natural de canela: **a)** 30 min **b)** 1 hora **c)** 3 horas **d)** 5 horas.

Para visualizar mais precisamente o que ocorre com a estrutura das partículas, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foram realizadas. A Figura 4. 46 exibe as partículas obtidas no final dessa reação. O resultado mostra que as partículas não apresentam estrutura bem definida, como nos casos anteriores, formando grandes aglomerados de partículas menores. Os compostos presentes no extrato de canela parecem inibir a formação das partículas, evitando a coalescência plena. Esse resultado parece indicar a atividade superficial de compostos presentes no extrato de canela e a existência de interação entre os componentes do extrato e o meio de reação.

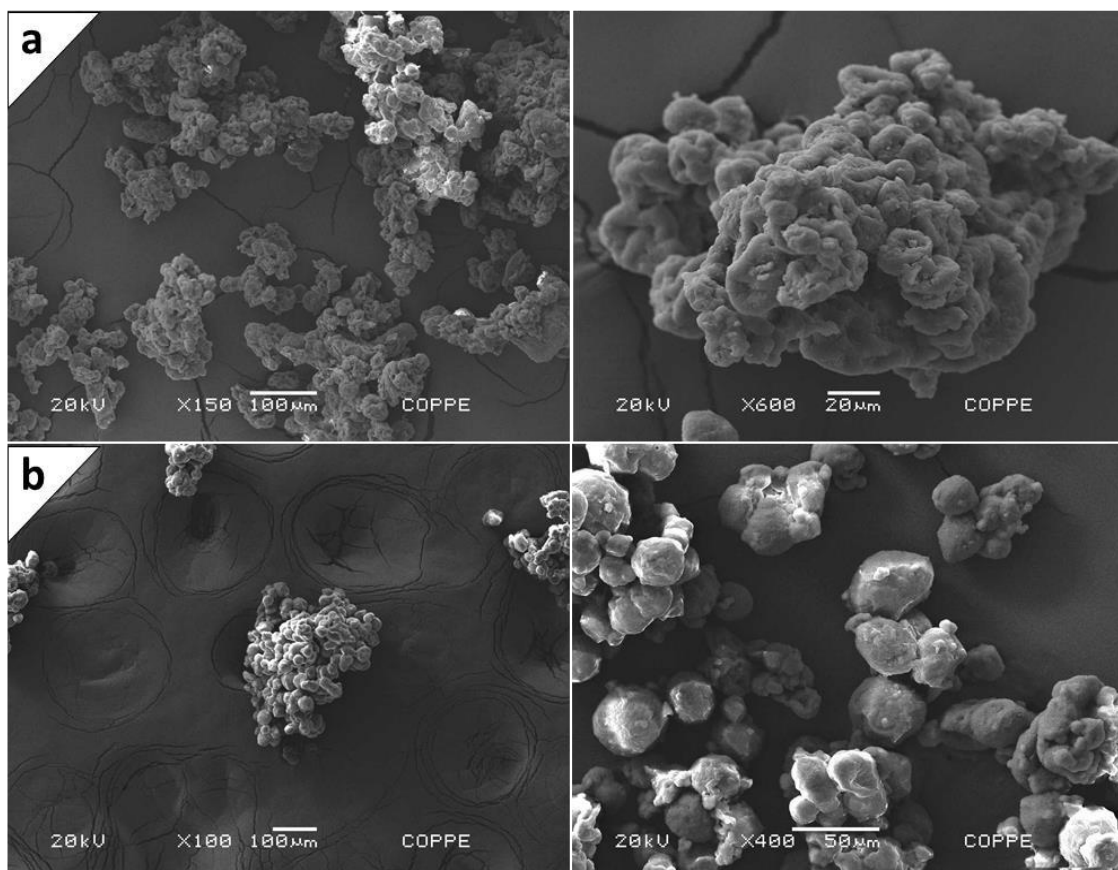


Figura 4. 46. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas no final em reação conduzida em presença de extrato de canela: **a)** 3 horas e **b)** 5 horas.

#### 4.3.1.4 Reações Conduzidas com Extrato Natural de Hortelã

Os ensaios de reação foram realizados na presença de extrato de hortelã e as caracterizações foram feitas de forma semelhantes à já reportada. A reação de preparo das partículas de gelatina foi feita como mostrado na Seção 3, com substituição da água da fase dispersa pelo extrato de hortelã extraído de folhas frescas. Os resultados das caracterizações são apresentados a seguir.

A hortelã é uma planta muito cultivada em todo o mundo devido às essências aromáticas presentes em extratos de toda a planta, principalmente nas folhas. O principal constituinte é o mentol, que é responsável pelo odor e sabor refrescante (USJT, 2001). O mentol compõe em torno de 70% dos constituintes totais do extrato. A hortelã é muito utilizada em diversas indústrias, principalmente alimentícia e de cosméticos. Além disso, a hortelã é de fácil

obtenção, fácil extração, baixo custo, sendo algumas das motivações que justificam o uso do hortelã nesse trabalho. A Figura 4. 47 mostra a estrutura molecular do mentol.

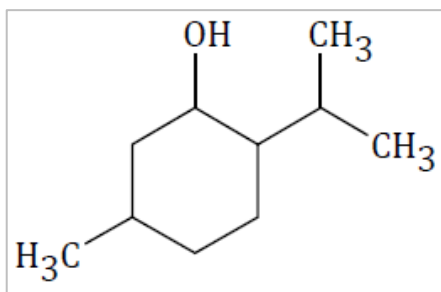


Figura 4. 47. Estrutura do mentol.

- **Distribuição de Tamanhos de Partícula (DTP):**

As distribuições de tamanhos de partícula obtidas ao longo do tempo na reação com extrato de hortelã podem ser vistas na Figura 4. 48. Como observado antes, ocorreu aumento gradual dos tamanhos das partículas ao longo do tempo, em especial após 3 horas de reação. Os tamanhos médios de partículas resultantes dessa reação ao longo do tempo estão dispostos na Tabela 4. 15, onde pode ser observado que houve um suave aumento do tamanho médio das partículas obtidas no final da reação. É importante salientar que os tamanhos se mantiveram sempre pequenos e menores que nos ensaios anteriores, indicando a maior atividade superficial do composto de interesse no sistema.

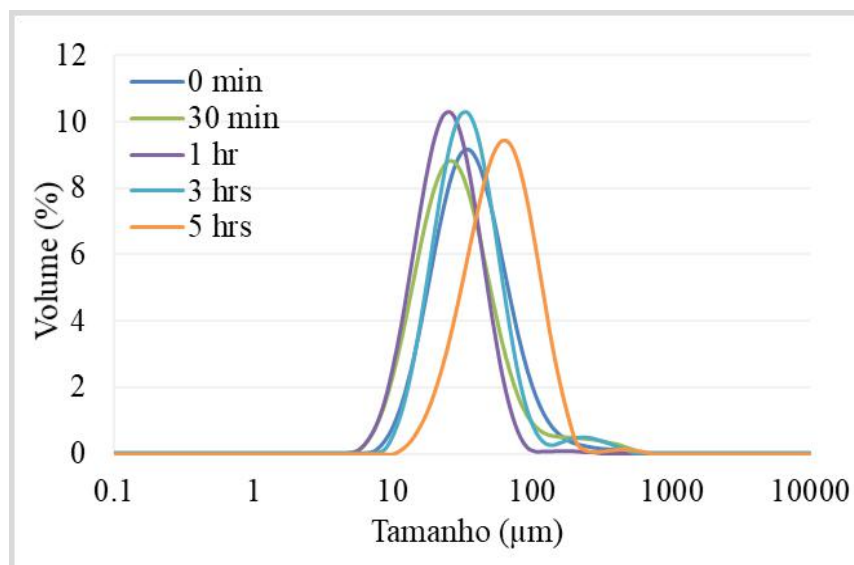


Figura 4. 48. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com extratos natural de hortelã.

Tabela 4. 15. Tamanhos médios de partícula de gelatina obtidas em reação conduzida com extrato de hortelã.

<b>Tempo de reação</b>	<b>Diâmetro médio (μm)</b>	<b>PDI</b>
<b>0 min</b>	45	0,83
<b>30 min</b>	41	0,54
<b>1 hora</b>	28	1,29
<b>3 horas</b>	44	0,78
<b>5 horas</b>	69	1,20

- **Morfologia das Partículas**

As análises de microscopia óptica foram realizadas de forma semelhante às anteriores. A Figura 4. 49 mostra as imagens de partículas obtidas ao longo da reação na presença do extrato de hortelã. Os resultados corroboram as distribuições de tamanho de partícula de maneira mais clara, havendo um considerável deslocamento para tamanhos de partículas maiores ao final da reação (5 horas), embora sempre pequenos. No entanto, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, mostradas na Figura 4. 50, ilustram que houve a formação de aglomerados de partículas pequenas ao final da reação.

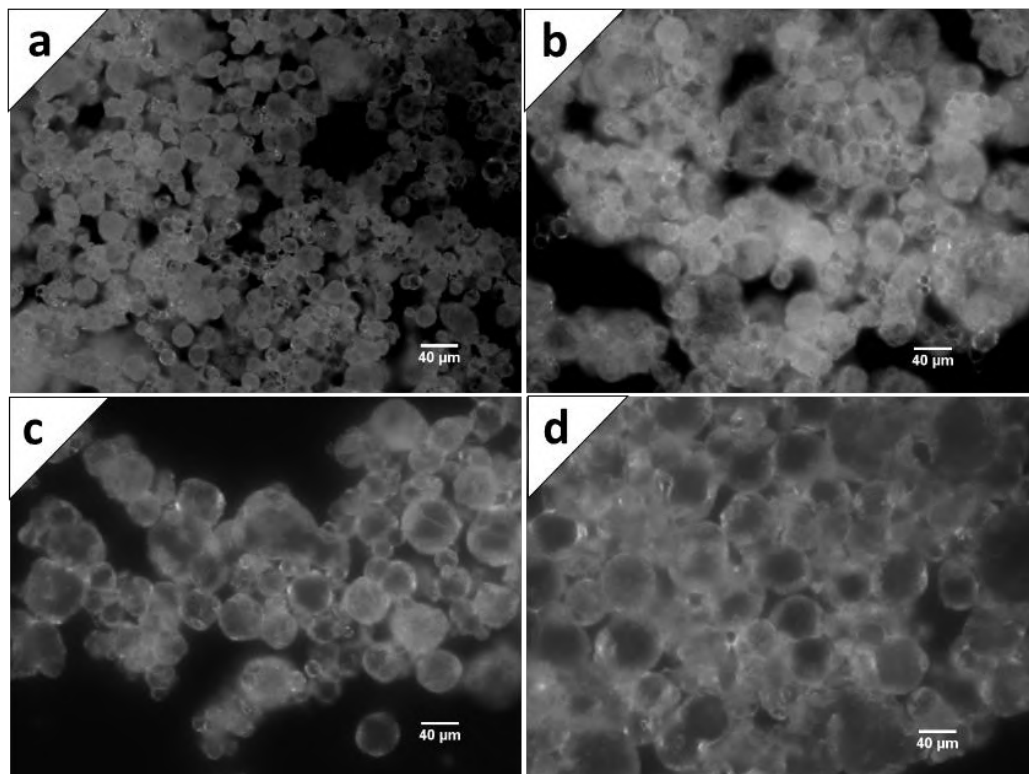


Figura 4. 49. Micrografia de gelatina obtidas na reação conduzida com extrato natural de hortelã em pH 9: **a)** 0 min; **b)** 30 min; **c)** 3 horas e **d)** 5 horas.

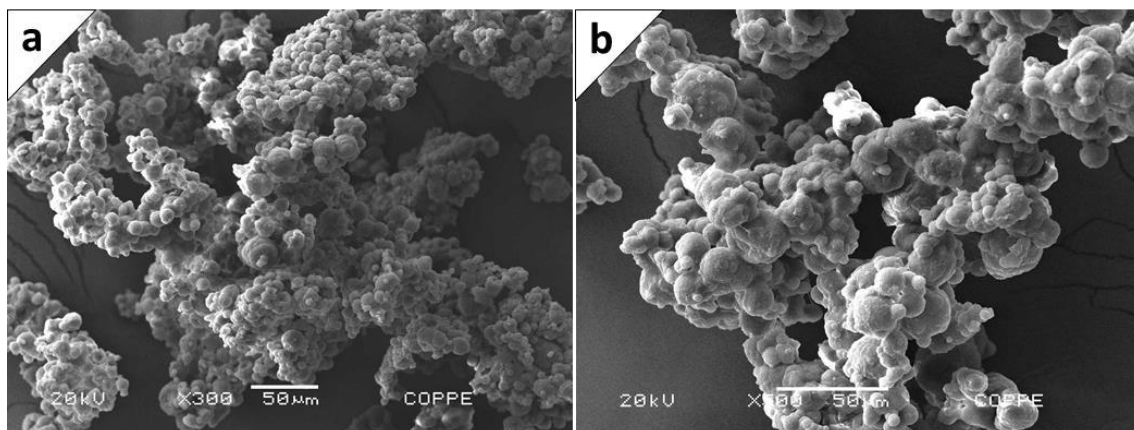


Figura 4. 50. Micrografias de MEV de partículas de gelatina obtidas da reação conduzida com extrato de hortelã ao longo do tempo: **a)** 3 horas e **b)** 5 horas.

- **Considerações parciais**

Após análise dos dados anteriormente apresentados, referentes ao terceiro bloco de reações, foi possível perceber que os extratos aromáticos podem exercer uma influência significativa sobre o processo de formação das partículas, além de levar à formação de partículas com diferentes estruturas. Dois dos extratos utilizados (erva cidreira e extrato de laranja) parecem levar à formação de partículas esféricas e bem formadas. No caso de erva cidreira, forma-se partícula muito porosa, com morfologia muito distinta das demais. Em outros casos, como quando se usa extrato de hortelã e extrato de canela, formam-se aglomerados de pequenas partículas. Portanto, caracterizações mais específicas serão necessárias de maneira a avaliar a intensidade da atuação destes compostos nas partículas reticuladas e da interação com a matriz, comparando-as com partículas puras, principalmente no que diz respeito à solubilidade. De qualquer forma, observa-se que os extratos de óleos essenciais não podem ser considerados inertes no processo de preparo de micropartículas de gelatina, de forma que as condições de processamento devem ser ajustadas ao óleo essencial a ser encapsulado.

#### **4.4 - Reações com Óleos Essenciais Aromáticos**

Após ensaios descritos na seção anterior, fica claro que cada material a ser encapsulado pode exercer uma influência diferente no processo de formação e na morfologia final das partículas de gelatina preparadas por suspensão inversa. Assim, é esperado que os ensaios realizados com óleos essenciais possam gerar também partículas com diferentes morfologias e estrutura. No entanto, para melhor compreensão dos resultados, os óleos essenciais descritos nessa seção foram caracterizados e padronizados.

As reações com óleos essenciais aromáticos foram conduzidas de forma semelhantes às reações descritas nos ensaios preliminares. Para estas reações, os óleos foram obtidos comercialmente e, antes da utilização foram caracterizados quanto à composição. Após esse procedimento, as reações foram realizadas com 4 diferentes óleos disponíveis comercialmente, como descrito na Tabela 4. 16.



Tabela 4. 16. Tabela das reações realizadas com óleo essenciais caracterizados

Bloco de Reações com óleos essências		
Condições		Tempo de reação (h)
Reação padrão – Óleo essencial de laranja	R15	5
Reação padrão - Óleo essencial de manjerição	R16	5
Reação padrão – Óleo essencial de canela	R17	5
Reação padrão – Óleo essencial de citronela	R18	5

#### 4.4.1 Caracterização dos Óleos Essenciais

Antes da utilização, os óleos essenciais comerciais foram cuidadosamente caracterizados por diversos métodos quanto à composição, resistência térmica e grupos funcionais pelas técnicas descritas a seguir. Como esses compostos podem apresentar características distintas e afetar o processo de encapsulação de maneiras distintas, é importante caracterizá-los apropriadamente como observado nas seções anteriores.

- **Análise Cromatográfica (CG-MS)**

Inicialmente, as composições dos óleos essenciais foram caracterizadas por análises de cromatografia (CG-MS). Como os óleos essenciais constituem mistura complexas, centenas de componentes podem estar presentes. Além disso, a maioria dos componentes que confere aroma ou sabor ao óleo essencial pode estar presentes somente em níveis de ppm (VIVEK *et al.*, 2018). As características de retenção e as descrições dos componentes presentes no óleo essencial de laranja são resumidas na Tabela 4. 17. Embora a amostra tenha produzido 20 picos, somente 16 compostos de aroma puderam ser identificados no cromatograma correspondente à Figura 4. 51. Dentre os compostos identificados, 4 encontram-se em maior quantidade no óleo essencial de laranja. Os principais compostos identificados foram limoneno, mirceno, linalol e decanal. O composto mais abundante foi o limoneno, representando 95% da composição. Outros compostos, exceto linalol (1,2%) e mirceno (3,9%), representam menos que 1% da composição total. Percebe-se pela área do pico que o limoneno é o componente extremamente majoritário do óleo essencial de laranja, sendo, neste caso, o maior contribuinte para o aroma de laranja.

Isso não é surpreendente, já que resultados semelhantes foram relatados por Vora *et al.* (1983), Moufida e Marzouk (2003) e Djenane (2015).

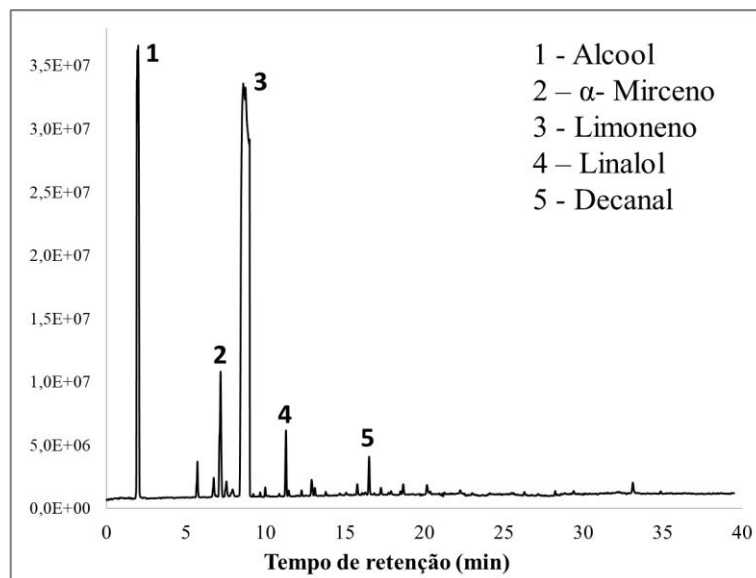


Figura 4. 51. Cromatograma dos principais constituintes do óleo essencial de laranja.

Tabela 4. 17. Compostos químicos identificados no óleo essencial de laranja por CG-MS.

Tempo de Retenção (min)	Componente	Fórmula Estrutural	*Porcentagem do componentes (%)
1.937	Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	-
5.720	1R- $\alpha$ -Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
6.747	Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
7.180	$\alpha$ -Mirceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.9
7.543	Octanal	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	-
7.933	3-Careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
8.603	D-Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	95
9.673	Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
11.297	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1.2
12.903	Limoneno óxido, cis-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-
13.110	Limoneno óxido, trans-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-
15.780	Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-
16.527	Decanal	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	0.5
18.673	Carvona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-
20.167	Citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-
33.123	Valenceno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-

\*A área do pico foi escolhida como sinal para o cálculo do teor relativo.

As descrições e as características de retenção dos componentes presentes no óleo essencial de manjeriço também foram analisados e são mostrados na Tabela 4. 18. Dois componentes foram predominantes, como pode ser visto na Figura 4. 52. Linalol e estragol foram os principais componentes do óleo de manjeriço, com pico estimados de 18% e 68%, respectivamente. Outros componentes foram detectados, como eucaliptol, mentol e citral, no entanto, todos representaram menos de 1% da composição. De acordo com Politeo *et al.* (2007), os dois mais importantes componentes do óleo de manjeriço foram linalol (28,6%) e estragol (21,7%), embora com menor concentração do que a observada no presente trabalho. Esta diferença provavelmente se deve à fonte do óleo essencial, que pode afetar significativamente a composição dos principais componentes, conforme relatado por Simon *et al.* (1990) e Radulović *et al.* (2013).

Tabela 4. 18. Compostos identificados no óleo essencial de manjeriço por CG-MS.

Tempo de retenção (min)	Componentes	Fórmula Estrutural	Porcentagem dos componentes (%)*
2.57	Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	-
2.78	1-Propanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	-
15.01	Eucalipitol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,21
16.39	Óxido de linalol, <i>trans</i>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	-
16.9	Óxido linalol, <i>cis</i>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	-
17.42	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	17,69
19.49	Mentol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	0,53
20.47	Estragol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	67,88
21.42	Citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	0,81
21.78	4-Anisaldeído	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-
22.23	Citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-
23.01	4-Propilanisol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	-
26.59	$\alpha$ -Bergamoteno	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	-
27.80	(E)- $\beta$ -Fameseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-
28.34	$\beta$ -Bisaboleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-
29.14	$\alpha$ -Ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
30.16	3-Amino-4-metilbenzil álcool		-

\*A área do pico foi escolhida como sinal para cálculo do teor relativo.

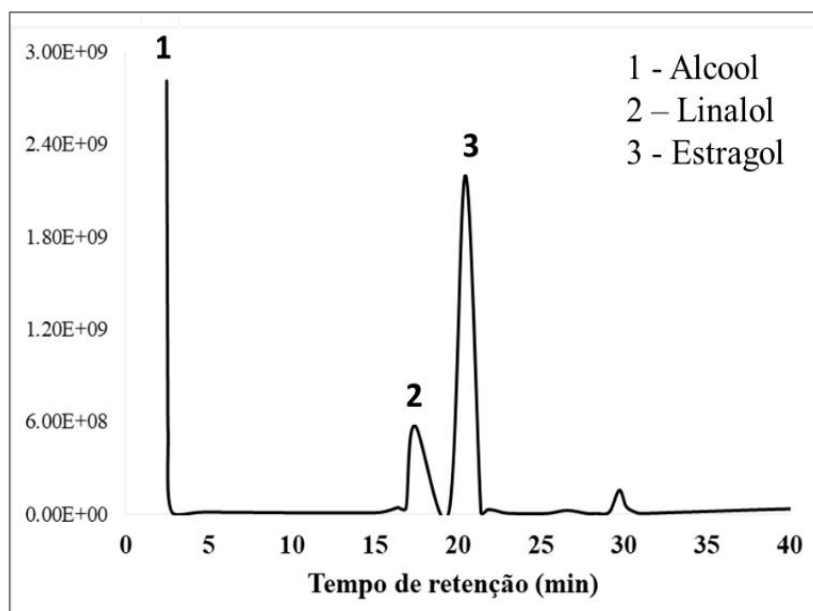


Figura 4. 52. Cromatograma dos principais constituintes do óleo essencial de manjeriço.

Análises do óleo essencial de canela permitiram a identificação de dezesseis compostos diferentes, como resumido na Tabela 4. 19. Sabe-se que o principal componente do óleo de canela é o cinamaldeído (DING *et al.*, 2011). Os resultados obtidos mostraram que três compostos estavam presentes em quantidades maiores no óleo de canela: trans-cinamaldeído (68%), acetato de cinamila (4,3%) e metoxicinamaldeído (12,1%). As porcentagens da área dos outros compostos voláteis observado foram, em geral, menores que 1%. Wang *et al.* (2009) obtiveram resultados semelhantes para óleo de canela extraídos de diferentes fontes. Este resultado também foi similar ao teor de cinamaldeído (66,28 – 81,97%) reportado por Li *et al.* (2010) para óleo de canela de diferentes fontes. Os autores mostraram que vários fatores podem afetar a composição deste óleo essencial (MASOTTI *et al.*, 2003), incluindo a fonte do óleo e as condições do processamento.

Tabela 4. 19. Compostos identificados no óleo essencial de canela por GC-MS

Tempo de retenção (min)	Componente	Fórmula estrutural	*Porcentagem dos componentes (%)
2.87	Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	-
3.36	Isobutanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	-
4.92	Etano	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	-
12.69	Benzaldeído	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	-
15.05	Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-
15.5	Benzaldeído, 2 hidroxí	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-
17.77	Álcool fenético	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	-
19.27	Benzenepropanal	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	-
19.39	Biciclol	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-
19.64	Pirrolol	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N	-
22.85	Cinamaldeído	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	68
23.38	Álcool cinâmico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	-
26.98	Acetato de Cinamila	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4.3
28.33	α-Muroleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-
29.16	Metoxicinaleíde	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	12.1
29.76	Nerolidol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-

\*A área do pico foi escolhida como sinal para o cálculo do teor relativo.

Na Tabela 4. 20 são apresentados os compostos que caracterizam o óleo essencial de citronela. Foram encontrados 9 constituintes no óleo, sendo que 3 foram mais significativas que as demais: o citronelal, o geraniol e o citronelol (Figura 4. 53). Pela área do pico, observa-se que citronelal é a substância majoritária do óleo de citronela, como já reportado por alguns autores (SILVEIRA *et al.*, 2013).

Tabela 4. 20. Compostos identificados no óleo essencial de citronela por CG-MS

Tempo de Retenção (min)	Componente	Fórmula Estrutural	*Porcentagem dos componentes (%)
2.193	Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	-
13.453	D-Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.1
19.093	Isopulegol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1.06
19.553	Citronelal	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	42.4
23.060	Citronelol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	13.7
24.323	Geraniol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	23.7
28.663	2,6-Octadieno, 2,6-dimetil-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	3.4
29.990	Acetato geranila	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3.6
30.390	Elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2.7
35.800	Cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2.4

\*A área do pico foi escolhida como sinal para o cálculo do teor relativo.

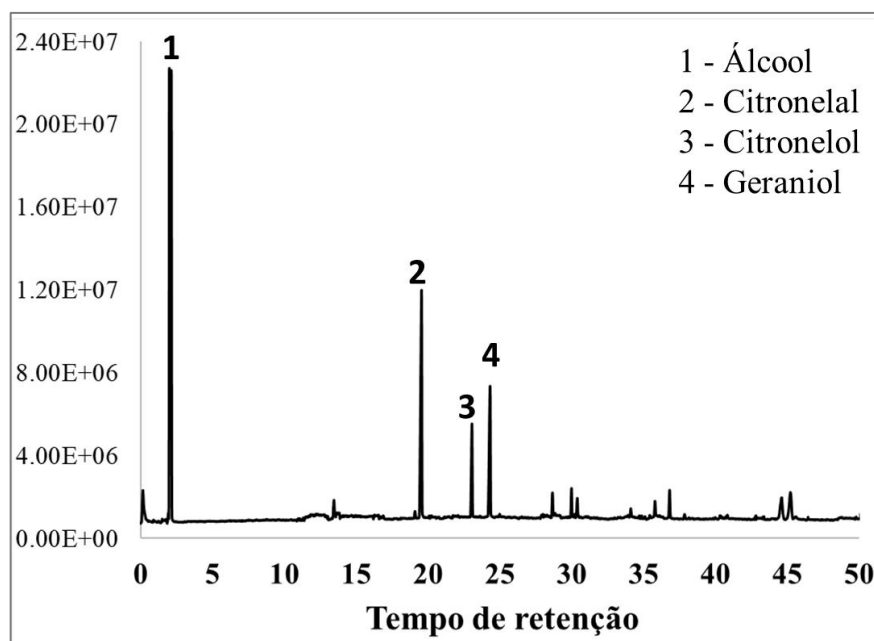


Figura 4. 53. Cromatograma dos principais constituintes do óleo de citronela.

- **Análises de FTIR**

As análises de FTIR foram realizadas com os óleos essenciais e os grupos funcionais foram determinados comparando-se as frequências vibratórias observadas com os dados reportados em textos de referência (SONGKRO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; AZIZ *et al.*, 2016).

A Figura 4. 54 exibe os espectros de FTIR dos 4 óleos comerciais analisados. Como o limoneno é o principal componente do óleo de laranja e ocorre em grandes quantidades (HÖGNADÓTTIR e ROUSEFF, 2003), não surpreende que os espectros do óleo de laranja sejam dominados pelos modos vibratórios deste monoterpene, que estão localizados em 884, 1432 e 1648  $\text{cm}^{-1}$ . (Figura 4. 54a) (GONSALVES *et al.*, 2009). No caso do óleo de manjerição, os picos característicos foram observados no intervalo entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção colocadas em 1516  $\text{cm}^{-1}$  representam o alongamento C = C, que podem ser devidas ao estragol. Picos colocados em 1244 e 800  $\text{cm}^{-1}$  são devidos a modos vibracionais característicos do monoterpene. No espectro do óleo de canela, a principal banda de absorção colocada a 1666  $\text{cm}^{-1}$  revelou a presença de ligações C = O do cinamaldeído (Figura 4. 54c), o principal composto do óleo de canela (ADINEW, 2014). Bandas de absorção fortes colocadas a 1000  $\text{cm}^{-1}$  e 680  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de C = C aromático do cinamaldeído do óleo

essencial de canela. A Figura 4. 54d mostra que o óleo de citronela apresenta bandas intensas em vários números de onda. O óleo de citronela contém principalmente citronelal, citronelol e geraniol, com bandas localizadas em 3413, 2918, 2729, 1727, 1445, 1375, 1236, 1108, 1009 e 738  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo a grupos funcionais químicos de vários terpenos presentes no óleo. Espectros similares foram relatados por Songkro *et al.* (2012) para amostras de óleo de citronela. Observando esses espectros, pode ser notado que não há presença de água em quaisquer um deles, o que o caracteriza um certo grau de pureza.

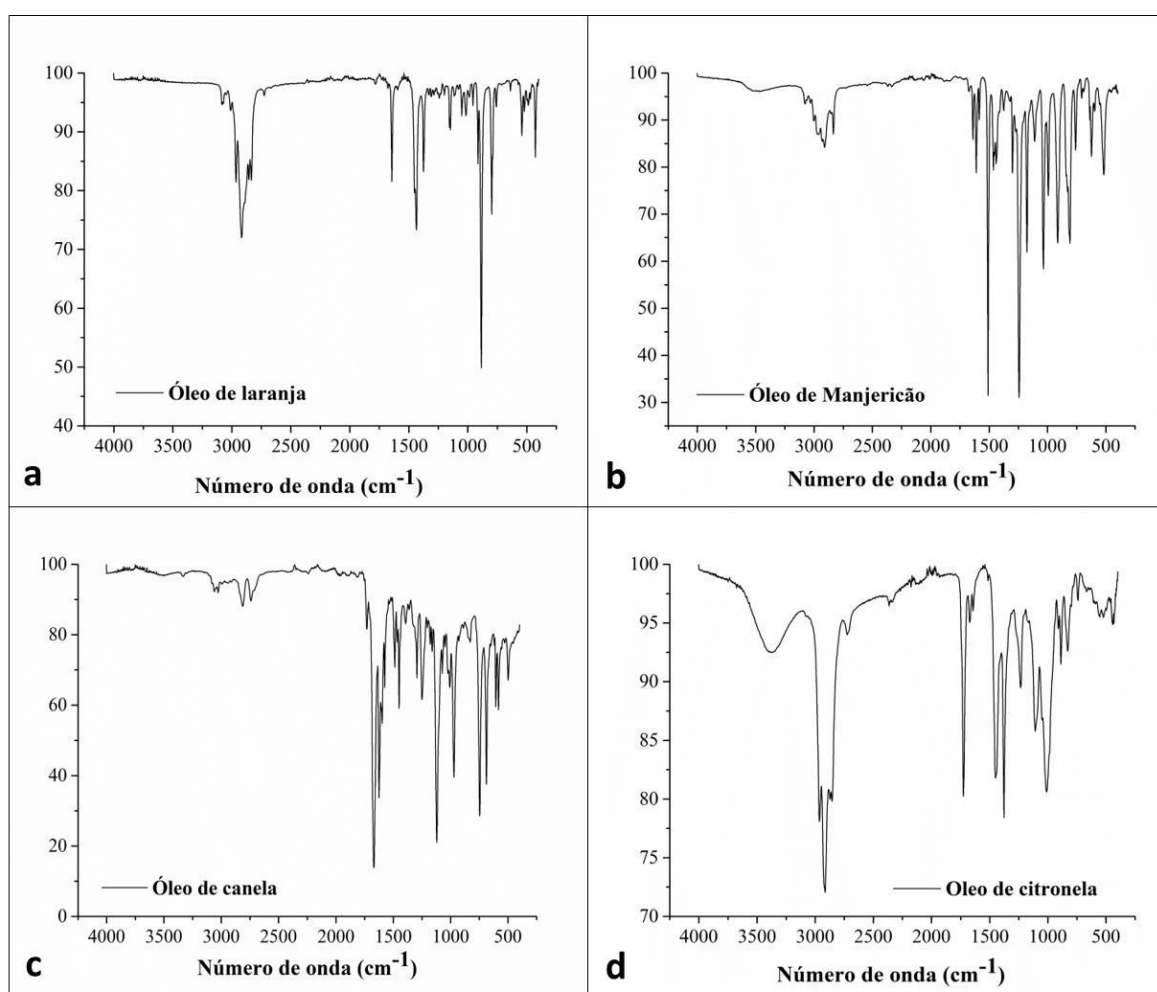


Figura 4. 54. Espectros de FTIR dos óleos essenciais: óleo de laranja, manjerição, canela e citronela



- **Análises de TGA**

Outra técnica utilizada para caracterizar os óleos essenciais foi a análise termogravimétrica. Os aromas, em geral, são substâncias sensíveis ao calor e a condições ambientais. O comportamento térmico é um parâmetro crítico para definir mudanças nos atributos físicos, como fusão, evaporação, sublimação, decomposição, entre outros (VISHWAKARMA *et al.*, 2016). É importante, portanto, conhecer a temperatura em que esse processo se inicia e o momento em que há perda parcial e total desses compostos. Por isso, as propriedades térmicas de diferentes amostras de óleo essencial foram investigadas por TGA e os termogramas estão apresentados na Figura 4. 55. Para óleo de laranja, óleo de manjeriço e óleo de citronela puros a temperatura de evaporação/degradação térmica variou de 25 °C e 220 °C com um único estágio de perda de peso, indicando que os óleos essenciais de laranja, manjeriço e citronela tinham uma natureza volátil que se assemelhava ao comportamento de um composto puro. No caso do óleo de canela, três estágios de perda de peso poderiam ser identificados. Na faixa inicial de perda de peso observou-se uma perda média de 12% em peso até 100 °C, o que pode ser atribuído à perda de uma mistura de água e voláteis. Embora obtido do mesmo fornecedor, o óleo de canela exibiu um perfil de perda de peso diferente, que pode ser devido à composição e pureza do óleo (ZAWADZKI *et al.*, 2016) A Tabela 4. 21 ilustra a perda de massa em cada estágio de degradação dos 4 óleos essenciais.

É importante observar em todos os casos que os picos principais de perda de massa estão posicionados acima de 100 °C, permitindo concluir que a perda de massa esperada dos óleos essenciais por vaporização nas condições de preparo da partícula é baixa. A única exceção diz respeito ao óleo de canela, embora o primeiro pico pareça estar relacionado a umidade.

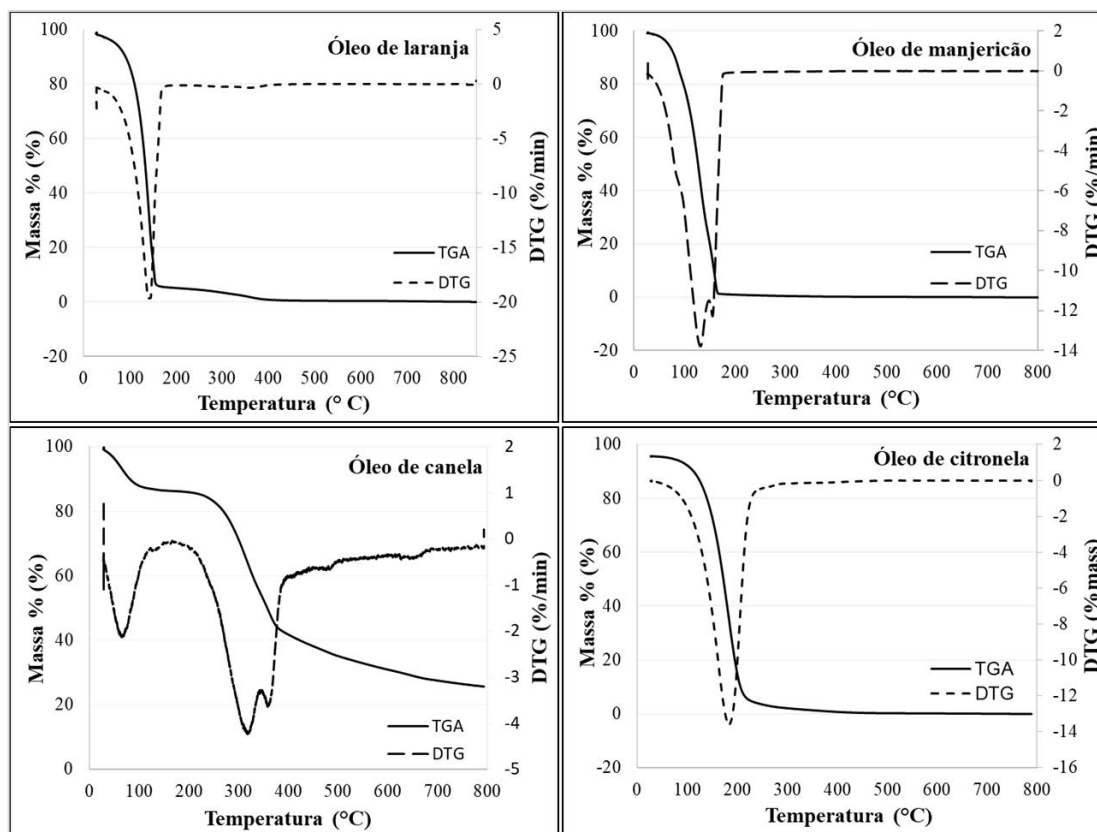


Figura 4. 55. Termograma de TGA e DTG dos óleos essencial aromáticos

Tabela 4. 21. Perda de massa de cada estágio de degradação dos óleos essenciais

Compostos de aroma	Perda de massa (%)			
	1º estágio	2º estágio	3º estágio	4º estágio
Laranja	95,87	2,98	-	-
Manjeriçao	76,62	22,96	-	-
Canela	12,81	0,74	32,37	27,99
Citronela	95,69	4,31	-	-

#### 4.4.2 Reações de Encapsulação de Óleos Essenciais Comerciais

Após a caracterização dos compostos, um novo conjunto de reações foi proposto com uma concentração fixa de 15% de cada óleo essencial em relação à fase aquosa. As reações foram conduzidas na forma já apresentada Seção 4.4. Inicialmente foram observadas as transformações ocorridas durante o processo da formação da partícula com a adição desses

óleos essenciais comerciais, já sendo esperada grande influência devido à complexidade desses compostos como visto nas seções anteriores.

#### 4.4.2.1 Reações com Óleo Essencial de Laranja

As reações foram realizadas com a adição da essência de laranja doce comercial (*Citrus aurantium dulce*) para encapsulação *in situ*. As reações foram conduzidas por 5 h, na condição definida em testes anteriores, devido ao retardo provocado em algumas reações. As caracterizações das partículas obtidas são mostradas nas próximas Seções.

- **Distribuição do Tamanho de Partícula (DTP)**

Inicialmente, as amostras foram caracterizadas por meio de análises de distribuição de tamanho de partículas (DTP) e as evoluções das distribuições de tamanho estão ilustradas na Figura 4. 56. O gráfico mostra que os perfis de distribuição tamanho de partículas na presença do óleo de laranja foram deslocados para tamanho menores, quando comparados com as reações realizadas na ausência dos óleos em condições experimentais similares (reação padrão). Levando em consideração os resultados apresentados anteriormente, também foi possível observar que mesmo em tempos elevados houve um comportamento distinto das reações conduzidas na ausência do óleo. Entre 3 e 4 horas de reação parecem ainda estar acontecendo estágios de quebra e coalescência, gerando curvas com perfis bimodais. Pode ser observado que a distribuição é larga após 3 horas, deslocada para tamanhos maiores e mais estreita após 5 horas de reação. Levando em consideração os resultados apresentados anteriormente em relação à produção de partículas de gelatina, uma possível explicação é que a adição dos óleos pode estar interferindo no desempenho da reação, inibindo de alguma forma o curso da reação e a formação das partículas. A redução do tamanho das partículas na presença do óleo de laranja pode estar relacionada com a redução da viscosidade média na presença dos óleos essenciais, devido à inibição das reações de reticulação da gelatina.

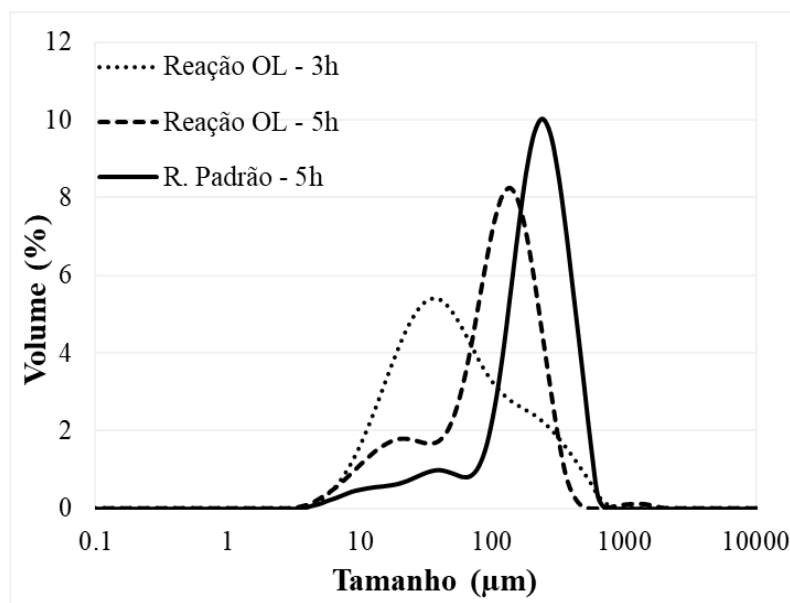


Figura 4. 56. Distribuições de tamanho de partícula de gelatina obtidas em reação com óleo de laranja comercial ao longo do tempo.

- **Análises Microscópicas**

Para determinar a morfologia das partículas preparadas na presença de óleo essencial de laranja, foram realizadas análises de microscopia óptica e eletrônica, conforme ilustrado na Figura 4. 57 e Figura 4. 58. Os resultados parecem de alguma forma corroborar os dados de distribuição de tamanho. A Figura 4. 57a indica que as partículas após 3 horas possuem tamanho muito pequeno e parecem estar aglomeradas, o que pode explicar o perfil de distribuição largo mostrado no gráfico de distribuição (Figura 4. 56). Na Figura 4. 57b, as partículas são um pouco maiores e de tamanhos mais regulares, confirmando também os dados de distribuição de tamanho. No entanto, além de aparentar um aspecto aglomerado, é notável que a adição do aroma colaborou com o retardamento da formação da partícula e prejudicou a morfologia esférica do produto final. A adição do óleo afetou tanto no aumento o tamanho (comparado com a reação padrão em 5 h) como a morfologia final das partículas.

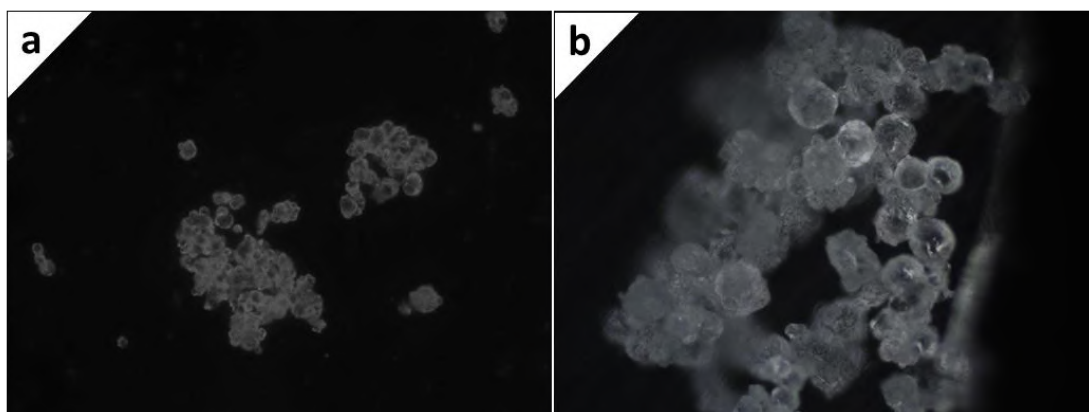


Figura 4. 57. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação com óleo de laranja comercial: a) 3 h de reação e b) 5h de reação.

De forma semelhante, as partículas foram caracterizadas também a partir de microscopia eletrônica de varredura. Pode-se perceber que a superfície final da partícula é irregular e enrugada. Além disso, ficou ainda mais clara a tendência de formar partículas de tamanho mais regulares após 5h de reação; no entanto, com a presença de poucas partículas de tamanho menores e muitos aglomerados. Esses resultados são qualitativamente similares aos obtidos para o extrato de casca de laranja na Seção 4.3. Portanto, parece que o óleo de laranja de fato prejudica o processo de formação das partículas de gelatina.

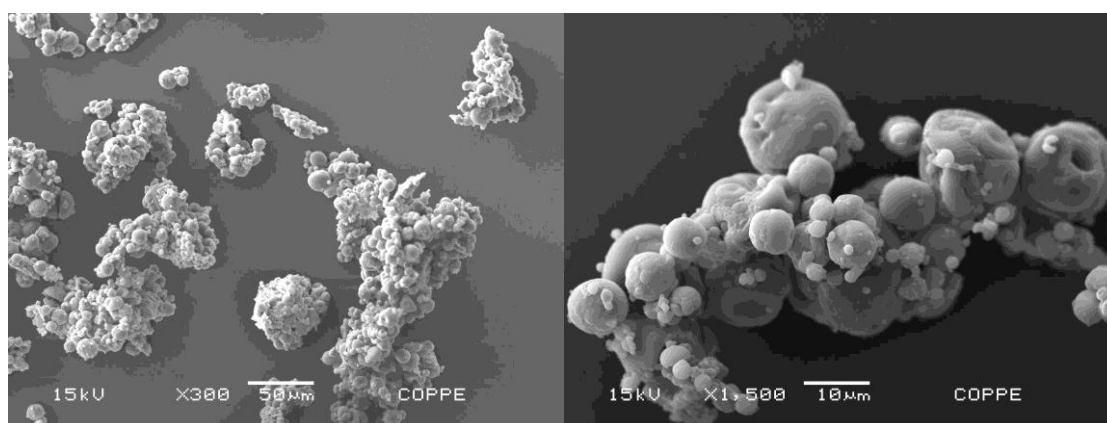


Figura 4. 58. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja comercial no final da reação (5 horas).

- **Análise Termogravimétrica (TGA)**

O comportamento térmico é um parâmetro crítico para definir mudanças nos atributos físicos dos óleos essenciais analisados, do polímero utilizado para encapsulamento e das esferas contendo óleo. A perda de peso e os padrões de degradação térmica dos produtos poliméricos antes e depois do encapsulamento usando curvas de TGA (faixa de temperatura de 30 a 700 °C) são mostrados Figura 4. 59. O comportamento térmico das micropartículas contendo óleo essencial foi similar ao comportamento térmico da amostra controle (Reação padrão). É importante mencionar que a incorporação do óleo de laranja resultou em um leve aumento da resistência térmica da partícula, quando comparado com partículas na ausência do óleo, embora o comportamento nas altas temperaturas seja distinto, o que pode se associado ao óleo. Deve ser também observado que não há pico pronunciado na faixa de 100 °C, sugerindo o aprisionamento efetivo do óleo na matriz de gelatina.

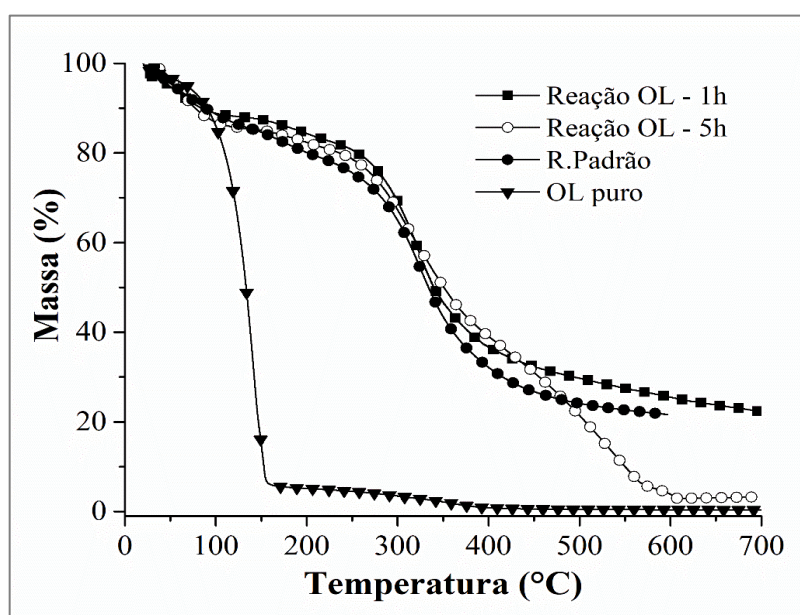


Figura 4. 59. TGA das partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja comercial em diferentes tempos de reação.

- **Análise de Viscosidade**

Perfis de viscosidade foram obtidos com o intuito de avaliar como a adição do óleo essencial de laranja podia afetar o andamento da reação de reticulação e conseqüentemente explicar outros dados já aqui reportados. Perfis de viscosidade dinâmica das soluções de gelatina dispersas são mostrados na Figura 4. 60. Como pode ser visto, a adição do óleo de laranja levou à redução significativa da viscosidade, quando comparada a soluções de gelatina preparadas na ausência de óleo essencial (Reação padrão). A curva apresentada mostra que os valores de viscosidade tiveram um aumento muito pouco pronunciado na presença do óleo essencial, o que pode ser resultado da inibição das reações de reticulação. Sabe-se (dados reportados na Seção 4.2) que a viscosidade é um indicador de aumento de massa molar, resultando no aumento do tamanho das partículas, promovido pela reticulação das cadeias. Dessa forma, é possível conjecturar que a adição do óleo de laranja interfere de maneira singular no desempenho da reação de reticulação e na formação da partícula. Esse dado também confirma os resultados obtidos nos ensaios de distribuição de tamanho e nas análises de microscopia.

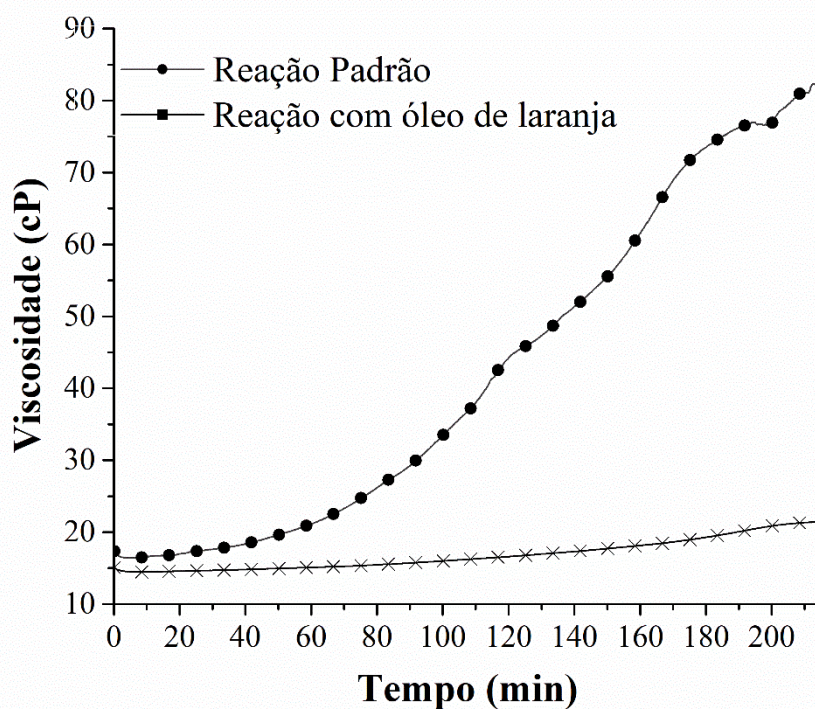


Figura 4. 60. Perfis de viscosidade da reação conduzida com óleo de laranja comercial e da reação padrão.

A fim de caracterizar melhor a influência do óleo essencial no curso da reação, a quantidade de agente reticulante foi duplicada em uma experiência adicional, como mostrado na Figura 4. 61. Quando a quantidade de glicose foi duplicada e o óleo laranja foi utilizado, a viscosidade aumentou pouco mais após cerca de 200 minutos de reação. Isto mostra claramente que a adição do óleo essencial ao sistema de reação retarda o curso da reação de reticulação e afeta a ação reticulante da glicose.



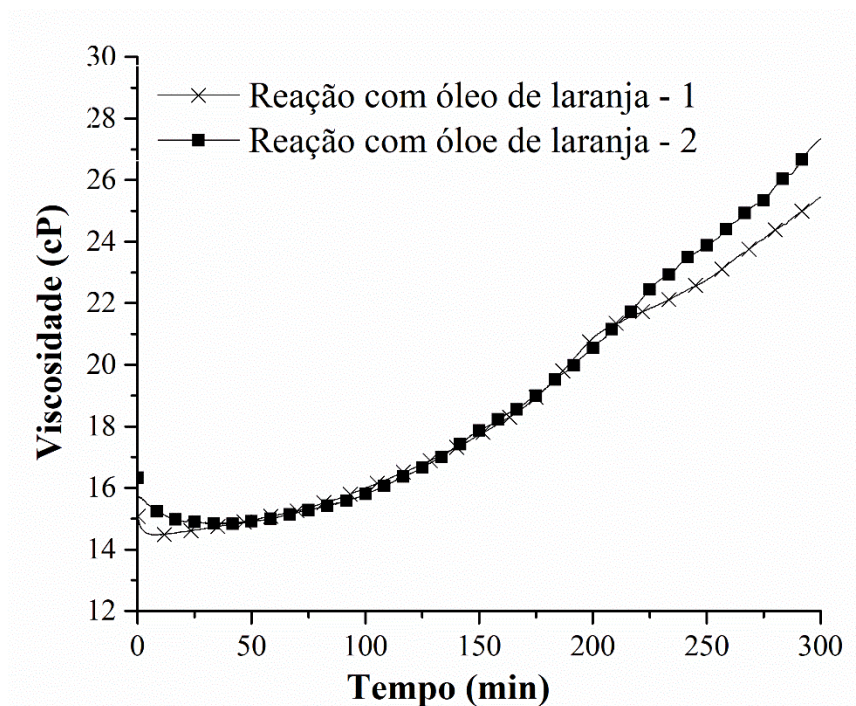


Figura 4. 61. Perfis de viscosidade dinâmica de soluções de gelatina tratadas na presença de óleo essencial de laranja e usando o dobro da quantidade de glicose.

- **Análise de Tensão Superficial**

A tensão superficial avalia propriedades da interface. Portanto, essa é uma propriedade importante para a formação de partículas, pois está relacionada com a estabilidade das gotas na suspensão. No geral, para formação de gotas maiores é necessário que a tensão superficial aumente. Supõe-se que no processo realizado nesse trabalho pode ocorrer uma variação da tensão superficial, devido as mudanças observadas na morfologia do produto final.

As análises de tensão superficial foram realizadas com intuito de observar como a presença do óleo de laranja afeta a tensão superficial e se os resultados explicariam a má formação das partículas. A Figura 4. 62 mostra os perfis de tensão superficial das soluções de gelatina analisadas e tratadas com óleo essencial de laranja, em relação aos perfis obtidos sem adição de óleo. Como pode ser visto, há variações de tensão superficial entre as condições, com aumento da tensão superficial no final da reação conduzidas na presença do óleo de laranja. Parece plausível admitir que a composição do óleo exerça alguma influência nas tensões interfaciais, o que pode afetar as distribuições de tamanho das partículas durante as reações de

suspensão inversa. Contudo, as variações de tensão superficiais são pequenas e não parecem justificar a formação de partículas pequenas e mal formadas. Esse efeito parece estar relacionado ao aumento pouco pronunciado da viscosidade, por conta da inibição da reticulação das cadeias de gelatina.

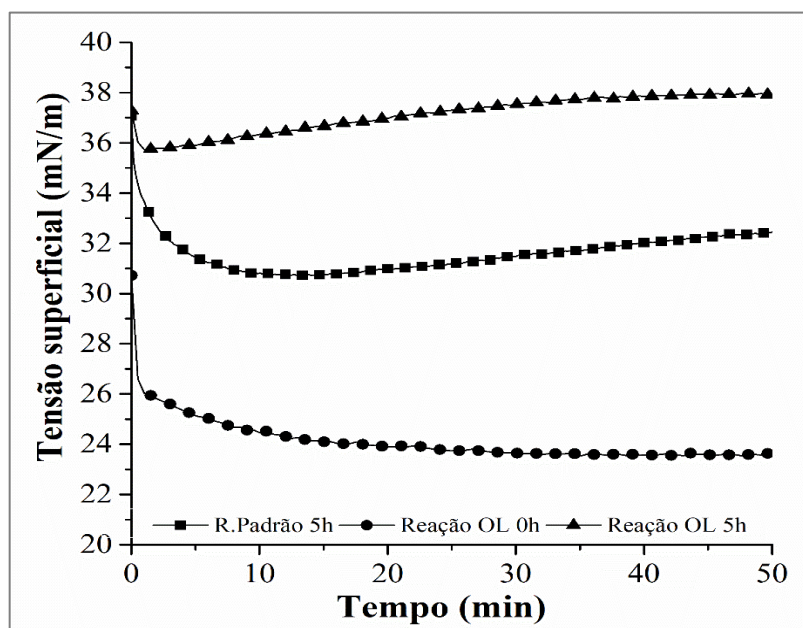


Figura 4. 62. Perfis de tensão superficial das soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de laranja.

#### 4.4.2.2 Reação com Óleo Essencial de Manjeriço

A reação conduzida na presença do óleo de manjeriço foi realizada de forma semelhante às apresentadas para óleo de laranja e as caracterizações das partículas foram realizadas com a mesma finalidade: avaliar a influência da incorporação do óleo no processo de formação das partículas de gelatina.

- **Análises de Distribuição de Tamanhos de Partícula**

As análises de distribuição de tamanho das partículas preparadas com óleo de manjeriço foram realizadas como já descrito e os resultados podem ser vistos na Figura 4. 63. Na Figura 4. 63, é apresentada apenas a curva de distribuição referente a partículas obtidas no final da reação (5 horas), que exibe um perfil de distribuição estreito, característico de uma

distribuição homogênea, e deslocado para tamanhos menores de partículas quando comparada a partículas preparadas sem adição de óleo. A ausência dos demais dados ao longo do tempo foi devido à impossibilidade de realização dos testes, em decorrência da solubilização da amostra quando ela era dispersa no equipamento de análise. Essa é uma evidência indireta de que a presença do óleo de manjeriço afetou muito o andamento das transformações químicas associadas à preparação das micropartículas de gelatina.

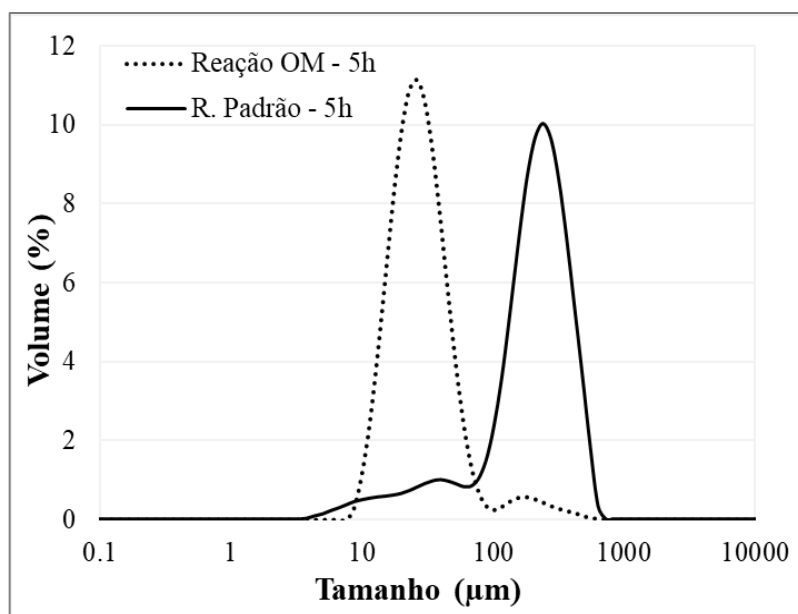


Figura 4. 63. Distribuições de tamanhos de partículas de gelatina produzida em reação conduzida com óleo de manjeriço comercial.

- **Análise de Viscosidade**

A análise de viscosidade de soluções de gelatina preparadas na presença do óleo de manjeriço foi realizada e o perfil obtido foi comparado com o perfil de viscosidades da reação conduzida na sua ausência de óleo natural. As curvas com os perfis de viscosidade obtidas são ilustradas na Figura 4. 64. A Figura 4. 64 mostra que, adicionando-se óleo de manjeriço à fase dispersa, a viscosidade do meio passa a crescer muito mais lentamente, mostrando a grande influência exercida pela adição da mistura aromática nas propriedades reológicas. É possível admitir a não ocorrência de reticulação, ou o retardamento desse processo ao longo do tempo na presença do óleo, como no caso anterior do óleo essencial de laranja. A viscosidade aumenta

muito lentamente ao longo de 5 hrs e atinge ao final do tempo de reação um valor pouco superior ao do início, sendo visto um comportamento quase linear. Esse comportamento sugere uma vez mais a inibição do processo de reticulação da gelatina.

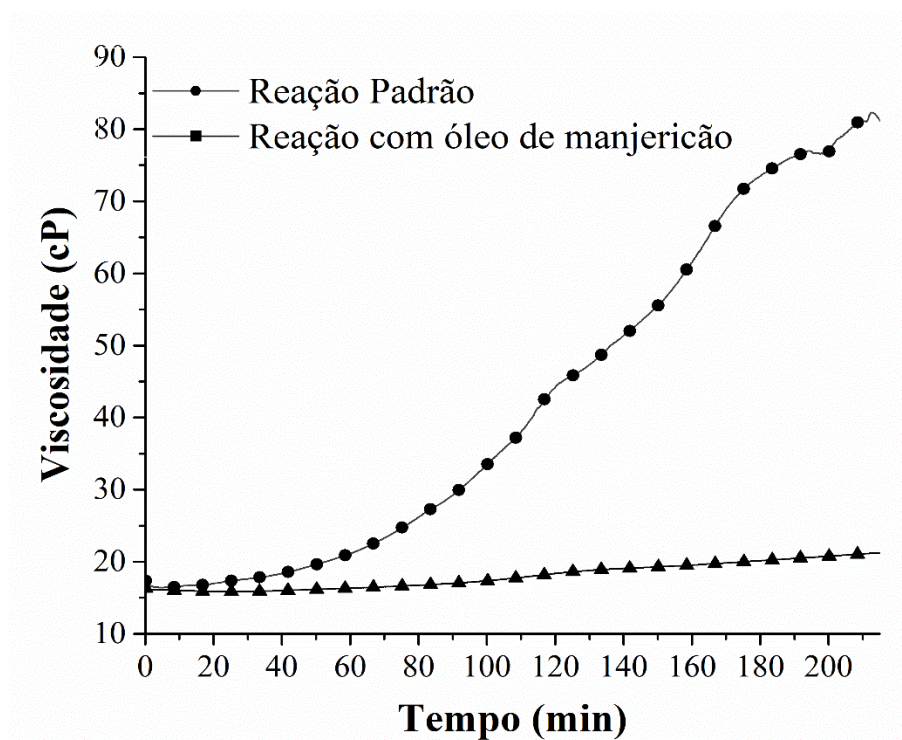


Figura 4. 64. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas na presença de óleo de manjeriço comercial e na condição padrão.

- **Análises de Microscópicas**

Os materiais obtidos ao final da reação foram caracterizados quanto à morfologia, por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. A Figura 4. 65 ilustra imagens das partículas resultantes da reação conduzidas com óleo de manjeriço. Como pode ser observado, não houve variação observável no tamanho das partículas, o que confirma os dados da distribuição de tamanho exibidos anteriormente. No entanto, na Figura 4. 65a as partículas parecem estar aglomeradas, mesmo após um tempo de reação relativamente longo, sugerindo que a adição do óleo de manjeriço afeta de alguma forma a evolução dos tamanhos das partículas. Uma análise mais detalhada da morfologia pode ser vista com auxílio de imagens de

microscopia eletrônica de varredura, ilustradas na Figura 4. 66. Pode-se perceber que a superfície das partículas é esférica, mas muito irregular, em função do processo de aglomeração.

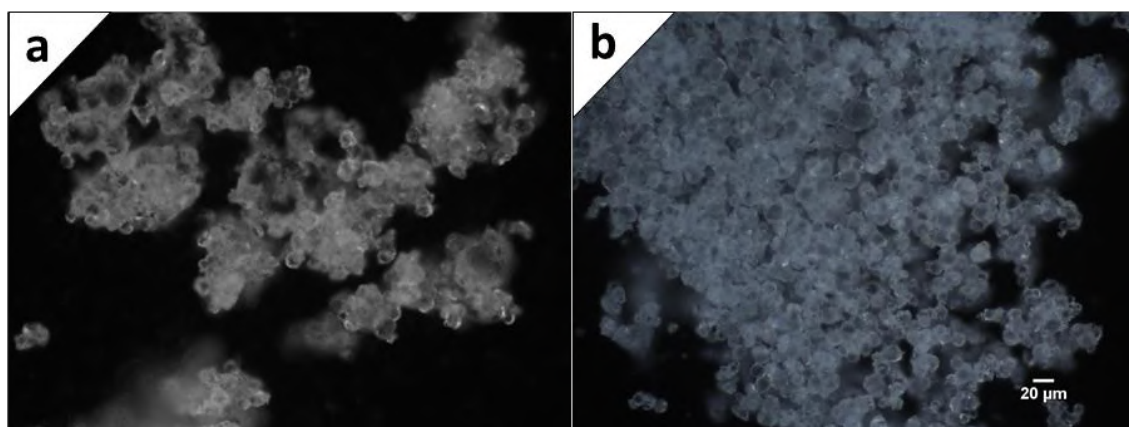


Figura 4. 65. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com óleo de manjeriço comercial: a) 3 horas e b) 5 horas.

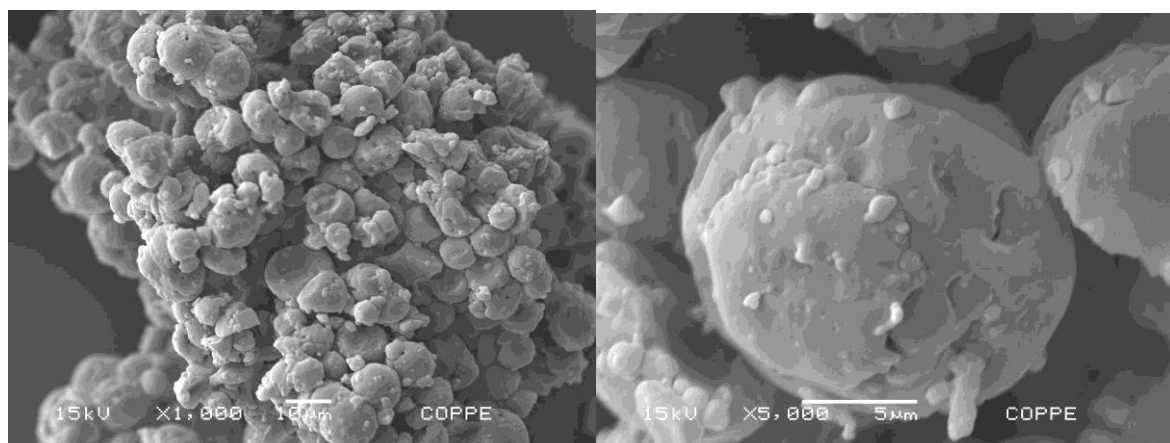


Figura 4. 66. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas em reação conduzida com óleo essencial de manjeriço comercial (5 horas).

- **Análise de Termogravimétrica (TGA)**

Os termogramas TGA das partículas obtidas da reação conduzida com óleo essencial de manjeriço podem ser visualizados na Figura 4. 67. Os resultados revelam que ocorreu razoável aumento na resistência térmica quando o óleo foi adicionado nas partículas. É possível inferir que a microencapsulação promoveu uma interação positiva entre o polímero carreador e o óleo essencial, resultando essa diferença no comportamento térmico. Além disso, foram observados

3 breves estágios de degradação das partículas após a adição de óleo. O estágio inicial, pode estar ligado à perda de componentes mais voláteis do óleo de manjeriçã. Contudo, não foi observada perda de massa significativa na região de volatilização do óleo, como no caso do óleo de laranja, o que sugere o encapsulamento eficiente do óleo na matriz de gelatina (ou a perda do óleo na fase de preparo).

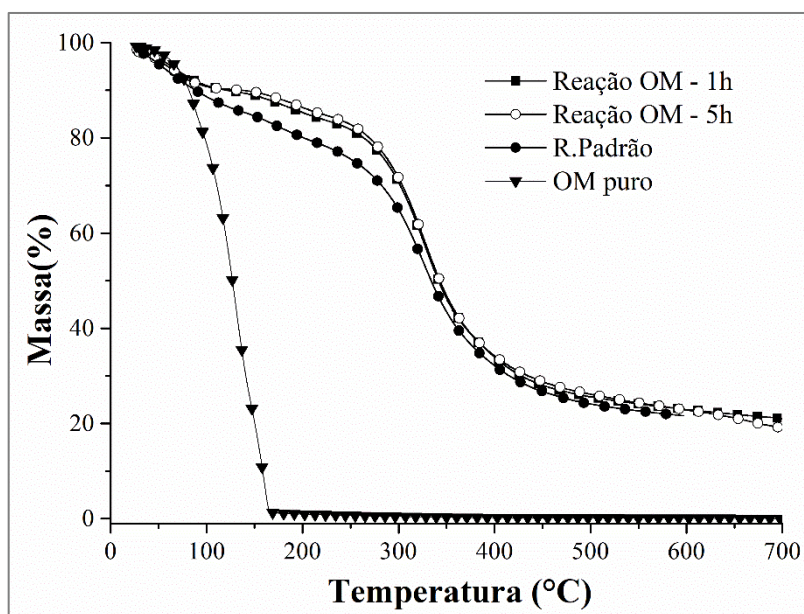


Figura 4. 67. Termograma de TGA das partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com adição de óleo de manjeriçã comercial.

- **Análise de Tensão Superficial**

Os resultados da análise de tensão superficial realizados com soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de manjeriçã são ilustrados na Figura 4. 68. Nota-se que nos primeiros segundos ocorre queda brusca da tensão superficial seguido por um continuo aumento, com perfil comportamental semelhante ao da reação padrão. A diferença observada pode estar atrelada à adição do óleo de manjeriçã no meio de reação, que leva um aumento nos valores de tensão. Como também pode ser notado, a Figura 4. 68 exhibe somente a curva de tensão superficial referente ao tempo final da reação. A ausência da curva referente ao tempo inicial de reação foi devida à impossibilidade da realização da leitura, pois um filme foi formado na superfície do recipiente, impedindo a imersão da placa e gerando erros de leitura (Figura 4. 69). Como já foi explicado, isso se deve ao atraso da reação de reticulação provocada pelo óleo.

De qualquer forma, os resultados obtidos não permitem explicar a formação de finos, dado que a tensão superficial aumenta na presença do óleo. Como visto anteriormente, o comportamento da DTP parece estar vinculado às trajetórias de viscosidade.

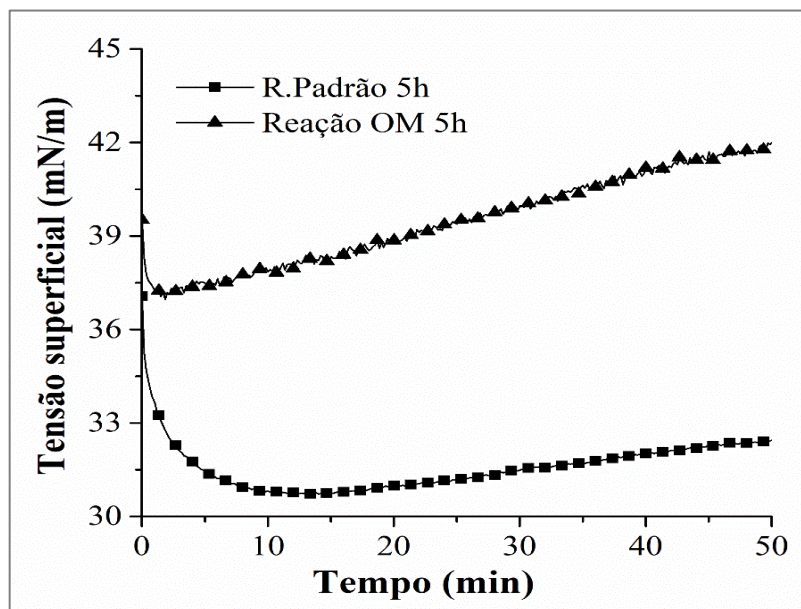


Figura 4. 68. Perfis de tensão superficial de misturas de gelatina preparadas com óleo essencial de manjeriço comercial e na condição padrão.



Figura 4. 69. Formação de filme em soluções de gelatina preparadas com óleo de manjeriço comercial durante ensaios de tensão superficial.

#### 4.4.2.3 Reação com Óleo Essencial de Canela

A reação com óleo de canela cássia (*Cinnamomum cassia*) foi conduzida de maneira semelhantes às demais. Após obtenção das partículas de gelatina dopadas com óleo de canela, as partículas foram devidamente caracterizadas como descrito a seguir.

- **Análise de Distribuição de Tamanho de Partículas (DTP)**

Os dados de distribuição de tamanho de partícula de gelatina com óleo de canela foram obtidos e estão ilustrados na Figura 4. 70. Como pode ser observado, os perfis de distribuição de tamanho das partículas com óleo de canela ao longo do tempo tiveram comportamento bimodal, com formação de distribuição larga e heterogênea, abrangendo um grande intervalo de tamanhos de partículas. Esse comportamento não foi observado nos outros casos em que compostos aromáticos foram adicionados ao meio de reação, destoando também do resultado encontrado para a reação padrão. A influência da presença do óleo de canela na distribuição de tamanho das partículas parece ser relevante. Os compostos do óleo de canela parecem interagir com o meio, comprometendo de alguma forma a homogeneidade das DTP's. O comportamento parece resultar da lenta transformação das partículas finas, que formam a moda posicionada em 50  $\mu\text{m}$ , em partículas grossas, que formam a moda posicionada em 200  $\mu\text{m}$ .

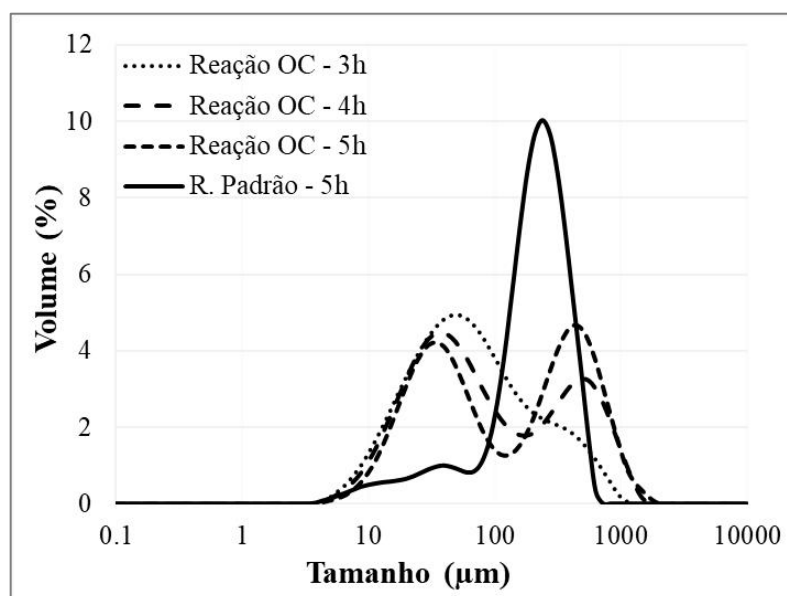


Figura 4. 70. Distribuições dos tamanhos de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial.



- **Análise de Viscosidade**

O perfil de viscosidade obtido para a reação conduzida com adição de óleo essencial de canela comercial pode ser observado na Figura 4. 71. O perfil de viscosidade obtido mostra que houve um aumento mais lento na viscosidade quando foi adicionado óleo de canela, em relação ao perfil de viscosidade da reação padrão, mas mais rápido que o observado com os demais óleos. É possível que os compostos do óleo interajam de alguma forma e promovam um lento aumento das cadeias de gelatina por meio de ligações cruzadas, considerando que o principal constituinte do óleo de canela é da classe dos aldeídos, que são considerados potenciais agentes de reticulação segundo alguns autores (BALAGUER *et al.*, 2011). Isso mostra uma vez mais que os diferentes óleos podem afetar de forma distinta o processo de formação das micropartículas de gelatina.

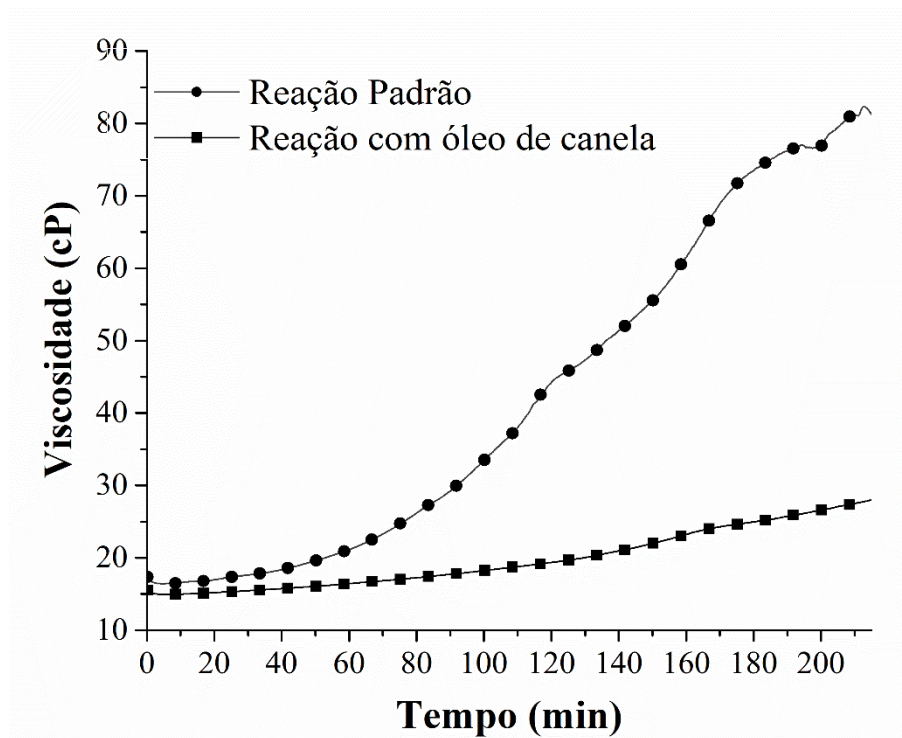


Figura 4. 71. Perfis de viscosidade de soluções de gelatina preparadas com óleo de canela comercial na condição padrão.

- **Análise Microscópicas**

Como forma de visualizar melhor as partículas, análises de microscopia e de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas e podem ser avaliadas na Figura 4. 72. Por meio das imagens fica claro que ocorreu aglomeração das partículas, gerando aglomerados de diferentes tamanhos. Além disso, as partículas têm um tamanho muito reduzido, sendo que após 5 horas não houve evolução dos tamanhos das partículas que constituem os aglomerados. Esses resultados de alguma forma explicam e confirmam os resultados das análises de distribuição de tamanho, já que a bimodalidade do perfil pode estar relacionada à aglomeração dessas partículas.

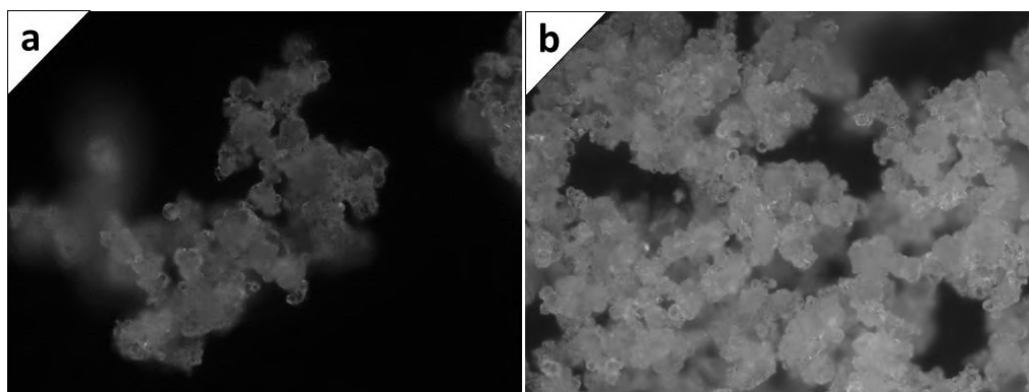


Figura 4. 72. Micrografias de partículas de gelatina obtidas em reação conduzida com óleo essencial de canela comercial. A) 3 hrs e B) 5 hrs.

As partículas de gelatina dopadas com óleo de canela também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e as imagens são exibidas na Figura 4. 73. As imagens mostram que as partículas estão de fato muito aglomeradas, gerando por isso curvas bimodais de distribuição de tamanho.

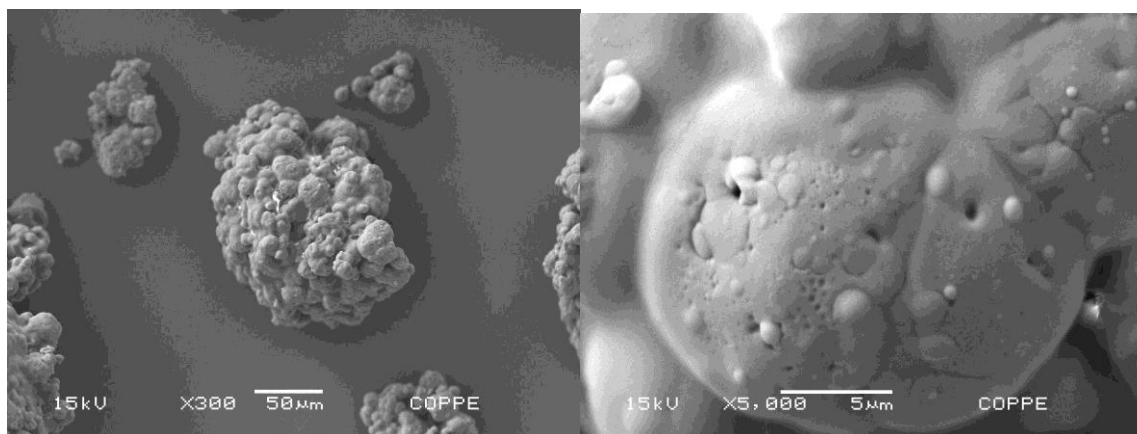


Figura 4. 73. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial.

- **Análise Termogravimétrica**

A Figura 4. 74 mostra o termograma TGA das partículas preparadas com óleo essencial de canela. É possível visualizar que houve maior resistência térmica das partículas que continham óleo de canela, quando comparadas com as obtidas na reação padrão. Esse comportamento já foi observado quando outros óleos foram utilizados, como mostrado nas seções anteriores. Neste caso, em particular, o termograma de TGA do óleo de canela puro ficou sobreposto ao termograma de TGA das partículas obtidas após 1h de reação. Como pode ser visto, essas curvas apresentaram maior resistência térmica que as curvas obtidas com amostras de partículas obtidas ao final da reação, tanto para a condição de referência como para partículas obtidas na presença do óleo. Sendo assim, é possível conjecturar que a microencapsulação promove algum tipo de interação positiva entre o polímero e o óleo essencial (ZAWADZKI *et al.*, 2016). Além disso, o uso de óleo de canela pode eventualmente causar reticulação adicional durante o tratamento térmico, devido à presença de cinamaldeído (BALAGUER *et al.*, 2011; BABU e KANNAN, 2012; BALAGUER *et al.*, 2013).

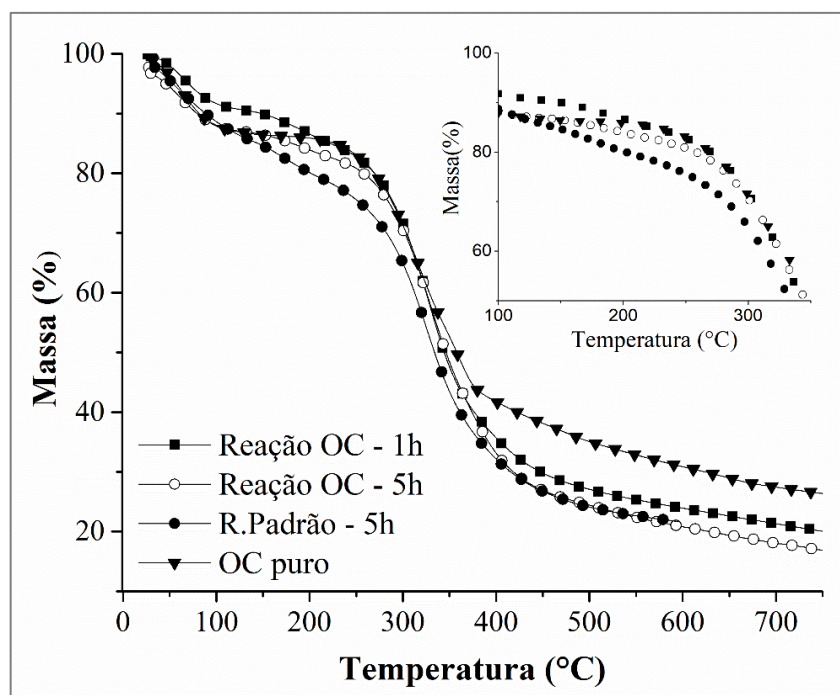


Figura 4. 74. Termograma de TGA das partículas de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial e na condição padrão.

- **Análise de Tensão Superficial**

A Figura 4. 75 mostra os perfis de tensão superficial das soluções de gelatina tratadas com óleo essencial de canela. Pode-se observar que a adição de óleo resultou em diferentes comportamentos. Conforme observado na Figura 4. 75, houve um aumento da tensão superficial na presença de óleo de canela. Como pode ser visto, houve pequena diferença entre as soluções nas condições do início da reação e as partículas do final. A presença do óleo de fato afeta a tensão superficial da fase dispersa, mas isso não parece explicar os dados de morfologia relatados nesta seção, já que as partículas obtidas eram muito finas no início do processo de dispersão e não coalescem.

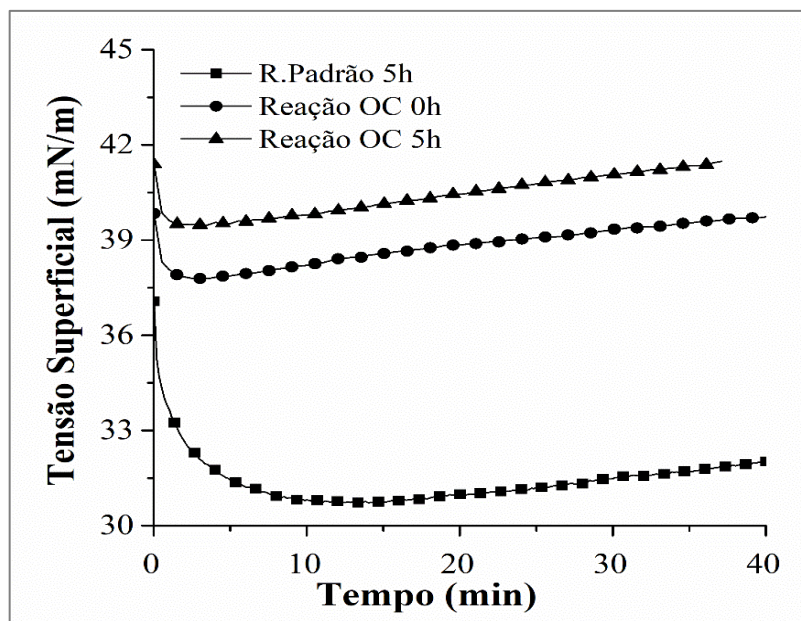


Figura 4. 75. Perfis de tensão superficial de soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de canela comercial e na condição padrão.

#### 4.4.2.4 Reação com Óleo Essencial de Citronela

Por fim, uma reação foi testada na presença de óleo de citronela. De acordo com os demais resultados apresentados, espera-se que o componente oleoso afete o sistema de forma diferente dos demais, por ser um óleo com composição diferente. Como nos demais casos, após a obtenção das partículas, estas foram caracterizadas.

- **Distribuição de Tamanho de Partículas (DTP)**

As distribuições de tamanhos das partículas tratadas com óleo de citronela são apresentadas na Figura 4. 76. As curvas mostram que foram obtidas partículas com tamanhos menores, comportamento semelhante ao observado quando os outros óleos foram utilizados. No entanto, as curvas ficaram sobrepostas e apresentaram um perfil estreito, o que pode indicar a homogeneidade do tamanho das partículas obtidas, como mostrado nas análises microscópicas apresentadas a seguir.

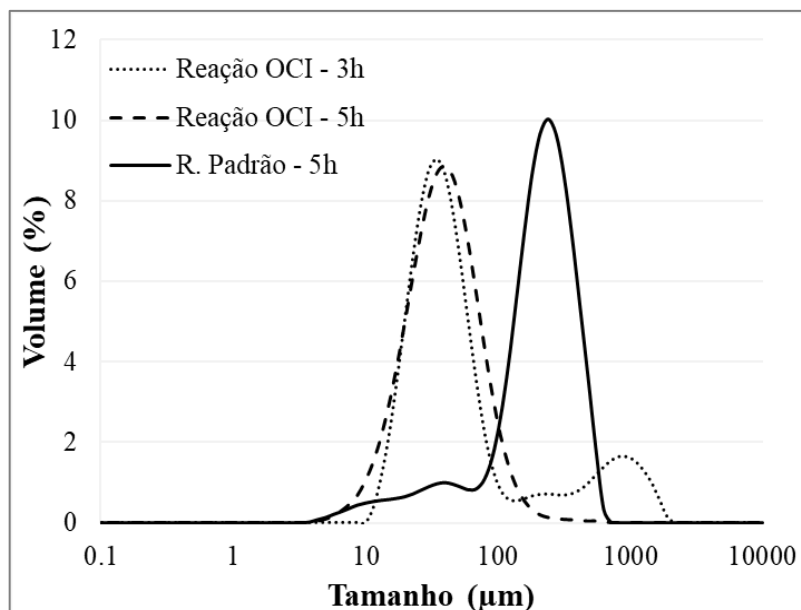


Figura 4. 76. Perfis de Distribuições de tamanhos das partículas de gelatina obtidas em reação com óleo de citronela comercial.

- **Análise de Viscosidade**

A curva da viscosidade da solução de gelatina preparada com óleo de citronela pode ser vista na Figura 4. 77. O comportamento da curva obtida com óleo de citronela foi semelhante às demais curvas apresentadas neste estudo na presença de outros óleos. A adição do óleo provoca uma redução da viscosidade (quase 70%) em relação à reação de referência (sem adição de óleo). A inibição do aumento da reticulação e da viscosidade pode ser uma das causas da instabilidade de partículas, resultando em partículas extremamente finas e aglomeradas.

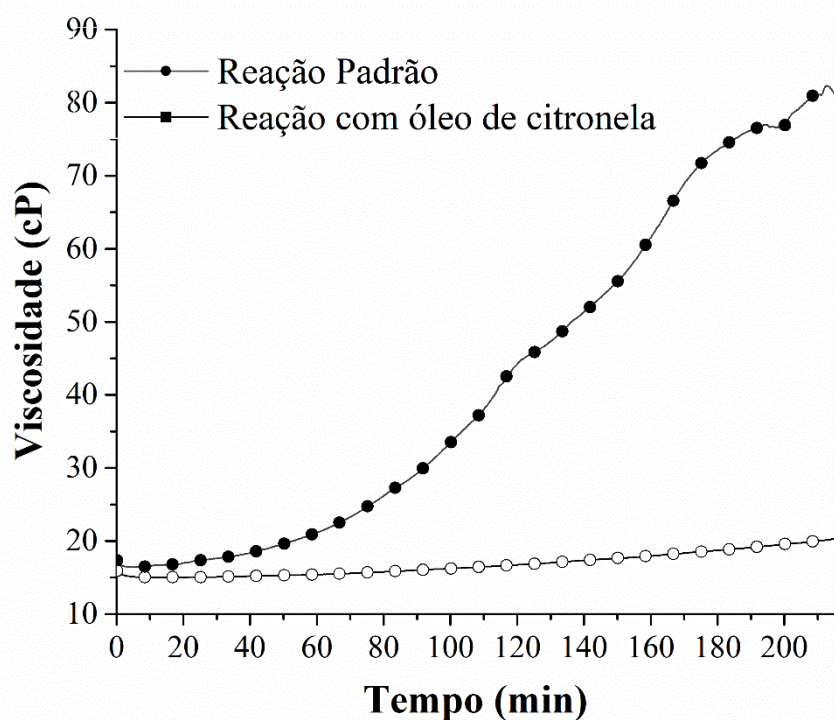


Figura 4. 77. Perfis de viscosidade das soluções de gelatina preparadas com óleo de citronela comercial e na condição padrão.

- **Análises Microscópicas**

As partículas de gelatina preparadas com óleo de citronela são mostradas, na Figura 4. 78 e Figura 4. 79. Os tamanhos das partículas parecem não terem sofrido alterações de tamanho no decorrer da reação (de 3h a 5h). As imagens de microscopia eletrônica apresentadas na Figura 4. 79 ilustram partículas de tamanho muito uniforme, o que explica o perfil de distribuição de tamanhos mostrado anteriormente. Como pode ser visto, as partículas preparadas com óleo de citronela possuem uma superfície irregular e rugosa, comportamento já apresentado para outras partículas preparadas na presença de óleos essenciais. É notado mais uma vez que a adição de compostos diferentes pode influenciar a morfologia final das partículas obtidas.

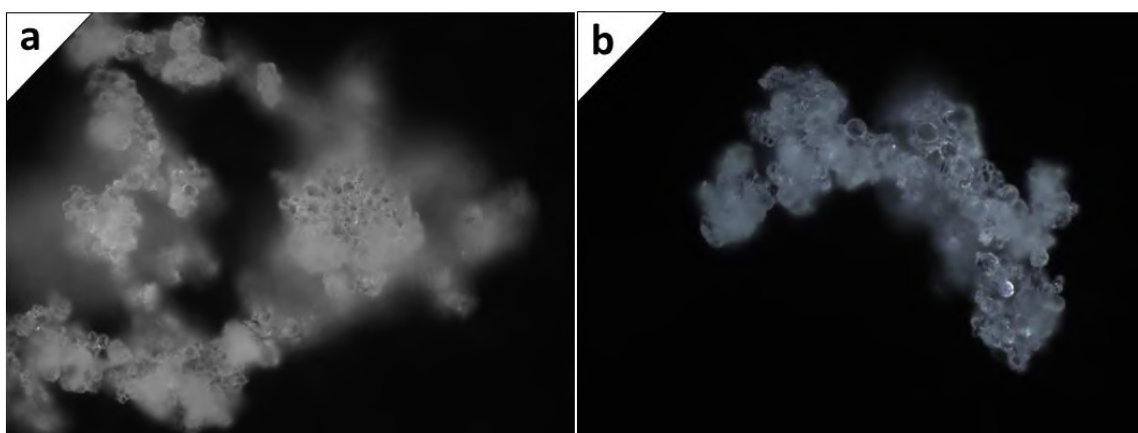


Figura 4. 78. Micrografias de partículas de gelatina preparadas em reação com óleo de citronela comercial em diferentes tempos. a) 3h e a) 5h

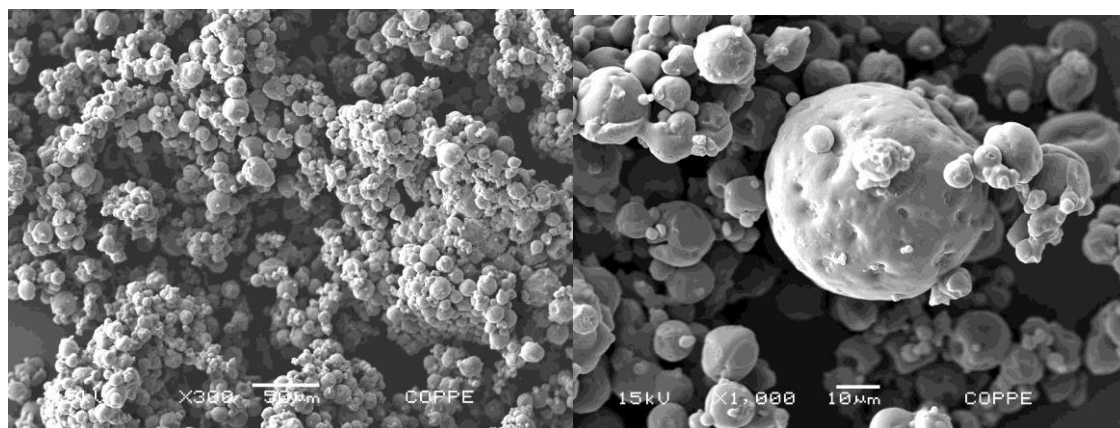


Figura 4. 79. Micrografias de MEV de partículas de gelatina preparadas na presença de óleo de citronela comercial.

- **Análise Termogravimétrica**

Os termogramas apresentados na Figura 4. 80 mostram que o comportamento térmico das partículas de gelatina preparadas com óleo de citronela se assemelha aos demais termogramas já apresentados. As partículas dopadas com o óleo apresentam uma resistência térmica levemente maior, tanto para a primeira amostra quanto para as partículas obtidas ao final da reação, confirmando dados já apresentados neste documento, que apontam o aumento leve da resistência térmica do produto com adição dos óleos essenciais.



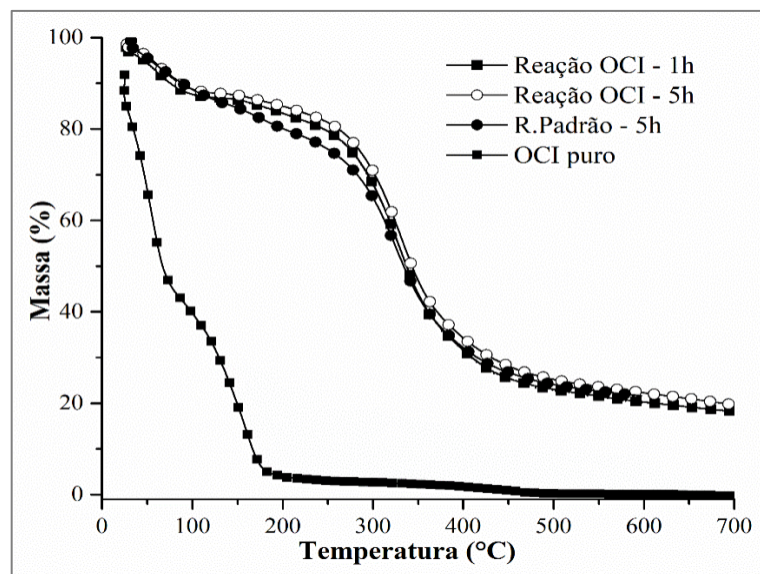


Figura 4. 80. Termograma de TGA de partículas de gelatina preparadas com óleo de citronela comercial e na condição padrão.

- **Análise de Tensão Superficial**

As curvas comparativas de tensão superficial são apresentadas na Figura 4. 81. O perfil de tensão superficial sofre um leve aumento com a adição do óleo de citronela. Esse comportamento é similar aos já observados para ensaios com outros óleos. Além disso, dados referentes ao início da reação foram comprometidos devido à formação de um filme na superfície da solução, gerando erros nas leituras, assim como reportado para soluções com óleo de manjerição.

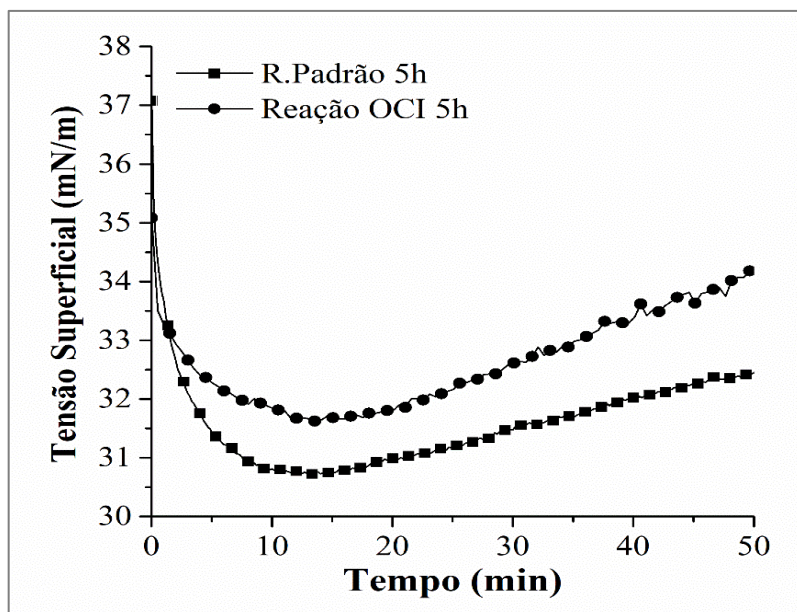


Figura 4. 81. Perfis de tensão superficial de soluções de gelatina preparadas com óleo essencial de citronela comercial e na condição padrão.

- **Considerações Finais**

Levando em consideração os resultados apresentados nesta seção, nota-se que a adição dos óleos essenciais interfere no desempenho da reação de formação de micropartículas de gelatina por suspensão inversa, inibindo de alguma forma o curso da reação de reticulação e a formação das partículas. Neste caso, a redução do tamanho das partículas pode estar relacionada com a redução da viscosidade média na presença dos óleos essenciais, devido à inibição das reações de reticulação da gelatina. De fato, foi reportado que incorporação de óleos essenciais exerceu efeito significativo sobre os perfis de viscosidade, produzindo diminuição significativa das viscosidades em relação à solução de gelatina preparada na ausência de óleos essenciais. Todos os produtos obtidos na presença dos óleos essenciais apresentaram distribuições heterogêneas de tamanho de partícula, constituídas por contas esféricas pequenas e aglomeradas, formando superfícies irregulares. Dada a mudança para tamanhos de partículas menores quando o óleo foi adicionado, pode-se concluir que os efeitos de viscosidade controlam a evolução das distribuições de tamanho de partícula. Além disso, partículas obtidas de reações realizadas na presença de óleo de canela apresentaram aparentemente maiores quantidades de aglomerados. Não foram observadas diferenças notáveis entre os perfis de viscosidade medidos

para soluções de gelatina contendo manjeriço, laranja ou citronela. Outra mudança observada foi o aumento lento da tensão superficial na presença de óleo. Assim, parece plausível supor que a composição de óleos também exerça alguma influência sobre as tensões interfaciais da fase dispersa, embora mudanças não tenham sido muito expressivas em nenhum caso. Pode-se observar que o comportamento térmico das micropartículas contendo óleos essenciais foram significativamente diferentes. É importante mencionar que a incorporação do óleo essencial promoveu o aumento da resistência térmica das partículas tratadas com óleo de laranja, óleo de manjeriço, óleo de canela e óleo de citronela. Diante disso, fica claro que mudanças relevantes podem ocorrer com a incorporação de óleo em partículas de gelatina, e assim ajustes de formulações devem ser feitos para melhor atender os produtos que devem ser incorporados nas matrizes de gelatina reticulada. Por exemplo, podem ser necessárias mudanças das composições do meio, do tempo de reação, da velocidade de agitação, dentre outras.

Para entender o efeito inibitório dos óleos naturais sobre as reações de reticulação é necessário compreender que óleos essenciais são misturas complexas de muitos compostos polares funcionalizados, como linalol, citral, estragol, cinamaldeído, citronelal e citronenol (ver Tabela 4. 17 a Tabela 4. 20). Esses compostos competem pelos mesmos sítios da gelatina que reagem com a glicose, reduzindo a disponibilidade de sítios para as reações de reticulação. Assim, de acordo com a interpretação proposta, os componentes do óleo essencial interagem com a gelatina, explicando o aumento da resistência térmica do produto final e reduzindo a eficiência da lenta reação de reticulação promovida com a glicose. Por isso, as partículas formadas permanecem finas e provocam aglomeração durante o tratamento térmico e processamento do pó obtido. O aumento da tensão superficial das misturas, por sua vez, é resultado do aumento de carga de segmentos hidrofóbicos nas soluções de gelatina quando os óleos são adicionados, embora as variações sejam pequenas e não pareçam controlar o processo de formação da partícula.

## 4.5 Eficiência de Encapsulamento dos Óleos Essenciais

Após a obtenção das partículas dopadas com os óleos essenciais, algumas análises foram realizadas para comprovar a presença e a porcentagem de óleo que foi incorporado. O cálculo do teor de óleo incorporado (ou eficiência de extração de óleo de partículas de gelatina) foi realizado. Os resultados são listados na Tabela 4. 22 e na Figura 4. 82. A Figura 4. 82 ilustra a porcentagem estimada dos componentes principais de cada óleo extraídos de dentro da partícula, como função do tempo de reação. É interessante observar que as eficiências de encapsulação foram algumas vezes pequenas, e outras vezes aumentaram com o tempo de reação. Isso não pode ser explicado apenas em termos das perdas por volatilização durante a preparação das partículas. Neste caso, a tendência dinâmica deveria ser oposta. Embora as eficiências de encapsulamento obtidas possam recomendar o uso de reatores fechados e pressurizados para encapsulamento de óleo essencial (impedindo a remoção de voláteis), vários outros fatores combinados também podem explicar os resultados obtidos, como o processo de filtração de partículas e o processo de extração de óleo. Além disso, alguns autores relataram a perda de componentes essenciais do óleo essencial por meio de reações de degradação após exposição a luz e tratamentos térmicos, o que também pode ter afetado os resultados finais obtidos (GUIMARÃES *et al.*, 2008). No entanto, mesmo se admitirmos que o óleo foi perdido durante a preparação das esferas por conta da extração com solvente e/ou evaporação, deve-se ressaltar que algumas partículas mantiveram suas propriedades aromáticas por pelo menos 12 meses sob armazenamento na temperatura ambiente, indicando taxa lenta de liberação de voláteis em condições ambientais.

Tabela 4. 22. Porcentagem em área cromatográfica dos principais componentes dos óleos essenciais extraídos das partículas de gelatina em função do tempo.

Componentes	Tempo de Reação		
	Concentração Estimada		
Partículas com óleo de Canela	1h	3h	5h
Cinamaldeído	4.1%	8.3%	46.4%
Alfa copaeno	5.4%	1.0%	0.3%
Ácido cinâmico	0.3%	0.6%	3.9%
Acetato de cinamila	0.9%	2.8%	4.7%
Metoxicinamaldeído	0.4%	0.6%	8.7%
<u>Partículas com óleo de citronela</u>			
Limoneno	3.0%	3.0%	2.1%
Citronelal	5.0%	9.4%	11.5%
Citronelol	8.7%	11.5%	7.9%
Geraniol	19.1%	22.4%	14.2%
Citral	1.3%	0.9%	0.4%
<u>Partículas com óleo de laranja</u>			
Limoneno	2.2%	1.5%	5.8%
Linalol	ND	2.5%	1.7%
Óxido de limoneno	1.2%	1.1%	1.9%
Decanal	1.2%	4.7%	3.0%
<u>Partículas com óleo de manjeriço</u>			
Linalol	7.9%	3.7%	2.2%
Estragol	10.9%	7.2%	5.2%
Anisol	0.5%	0.4%	1.4%
Citral	1.3%	3.1%	0.6%

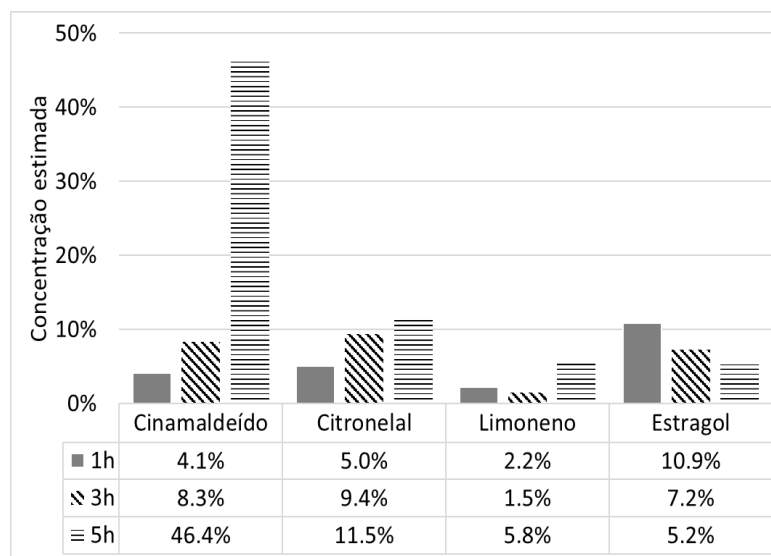


Figura 4. 82. Porcentagem em área cromatográfica dos compostos majoritários dos óleos essenciais nas partículas de gelatina para diferentes tempos de reação.

#### 4.6. Ensaio de Liberação dos Óleos Essenciais

Após os testes de eficiência, alguns ensaios de liberação no ar foram realizados com auxílio da técnica de FTIR. As amostras foram deixadas abertas em ambiente controlado ( $23^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) e medidas foram realizadas diariamente e os espectros obtidos foram correlacionados. Somente dois tipos de partículas foram submetidas aos ensaios, as obtidas das reações com óleo essencial de manjeriço e citronela e os resultados são apresentados na Figura 4. 83 e Figura 4. 84. Os resultados sugerem que não há muita mudança entre os espectros medidos. Isso pode ser um indicador de que o aroma é liberado lentamente de dentro da partícula. Esse resultado é adequado quando o seu uso for em produtos que demandem de uma permanência maior do aroma. De qualquer forma, mais medidas deveriam ser realizadas para dar continuidade a análise por períodos mais longos e com mais detalhes.

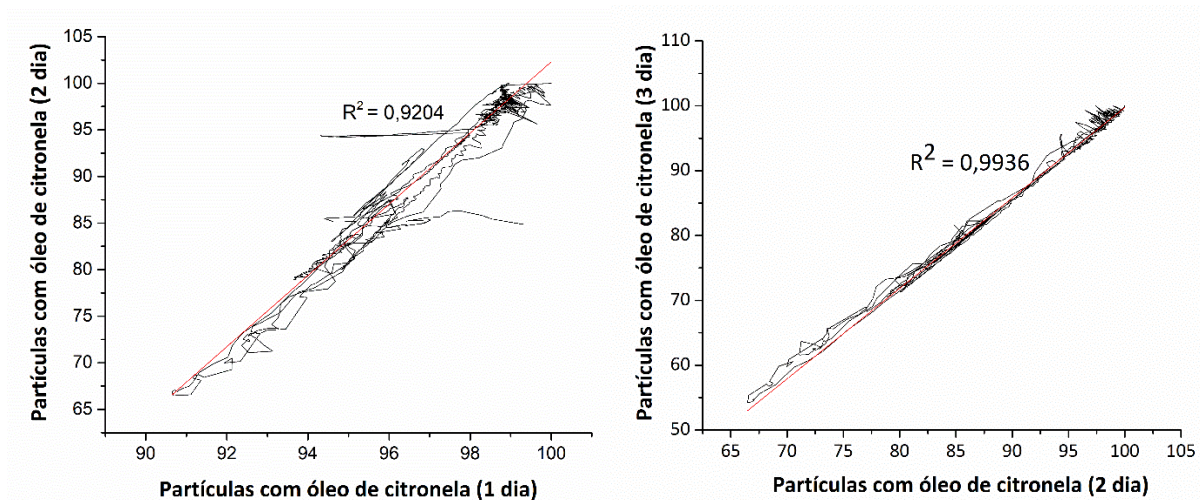


Figura 4. 83. Ensaio de liberação em partículas de gelatina dopadas com óleo de citronela em 1 hora de reação.

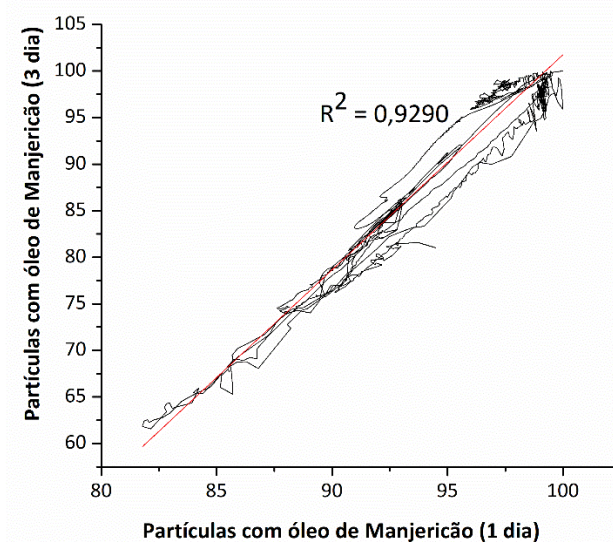


Figura 4. 84. Ensaio de liberação de partículas de gelatina dopadas com óleo de manjerição em 5 horas de reação.

#### 4.6. Desenvolvimento de Partículas de Amido

Além do desenvolvimento do processo de produção de partículas de gelatina, algumas reações com amido foram conduzidas para iniciar o desenvolvimento da elaboração de partículas de amido. A formulação base descrita na Seção 3 para ensaios com a gelatina foi inicialmente utilizada para os testes com amido como referencial de partida (Reação A1). No

entanto, não se obteve uma suspensão estável e as condições foram modificadas para evitar a aglomeração total das partículas. Assim, novas formulações e condições do ensaio foram elaboradas e são descritas na Tabela 4. 23. A formulação feita para a preparação das partículas de amido manteve as proporções utilizadas na Tabela 4. 1, sendo substituído somente amido.

As reações foram conduzidas de forma semelhante às realizadas com a gelatina e o reticulante testado também foi a glicose. O amido é um polímero bastante utilizado em aplicações práticas; no entanto, o uso do amido para elaboração de partículas apresenta o mesmo inconveniente de outros polímeros naturais: a hidrofiliabilidade. Alguns autores sugerem que o problema pode ser superado com o uso de reticulantes tóxicos, como já descrito anteriormente (PARRA *et al.*, 2004). No presente trabalho, o uso de reticulantes tóxicos é evitado. Além disso, não foi encontrado na literatura estudos que reportem a produção de partículas de amido, como reportado na Seção 2.2 .

Tabela 4. 23. Condição das reações conduzidas com amido.

Bloco de Reações com Amido				
	Tempo de reação (h)	Temperatura da reaçç (°C)	Amido (g)	pH da reação
Reação Padrão A1	5	60	4,5	-
Reação Padrão A2	5	90	1,5	-
Reação Padrão A3	5	90	1,5	9,0

#### 4.6.1. Caracterização Morfológica das Partículas de Amido – Reação A1

Os resultados da reação A1 são referentes ao teste realizado com as mesmas condições descritas para a gelatina.

A Figura 4. 85 mostra as distribuições de tamanhos das partículas de amido preparadas durante a reação A1. É possível observar a estabilidade das distribuições de tamanho das partículas até o final da reação. Os perfis são mais estreitos e homogêneos que no caso da gelatina. Os resultados podem ser confirmados com os dados de tamanho médio das partículas,



como pode ser visto na Tabela 4. 24. Isso pode indicar a ausência de mudanças expressivas no meio reacional ao longo do tempo.

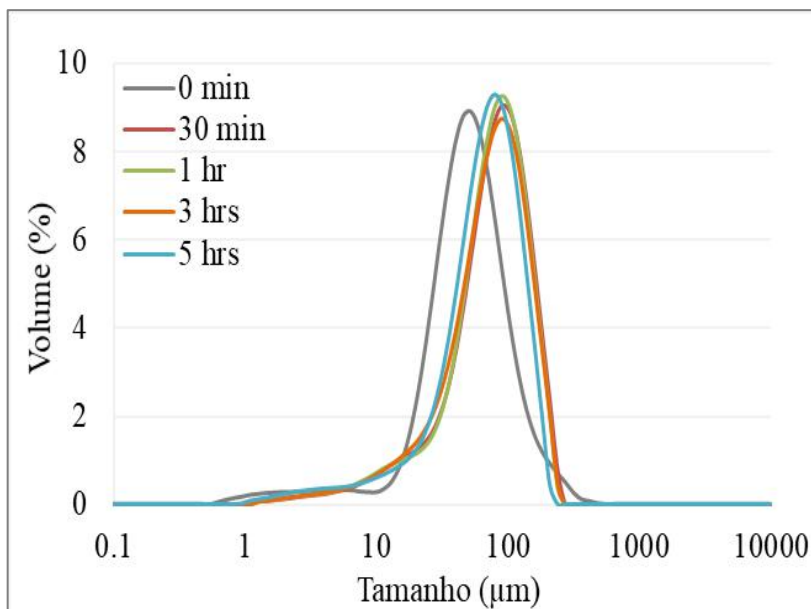


Figura 4. 85. Distribuições de tamanhos de partícula de amido produzidas ao longo do tempo da reação A1.

Tabela 4. 24. Diâmetro médio das partículas de amido obtidas na reação A1.

Tempo de reação	Diâmetro médio (μm)	PDI
<b>0 min</b>	61	1,92
<b>30 min</b>	86	2,45
<b>1 h</b>	84	2,43
<b>3 hrs</b>	82	2,30
<b>5 hrs</b>	73	2,43

As análises de microscópicas realizadas mostram a morfologia das partículas obtidas. A

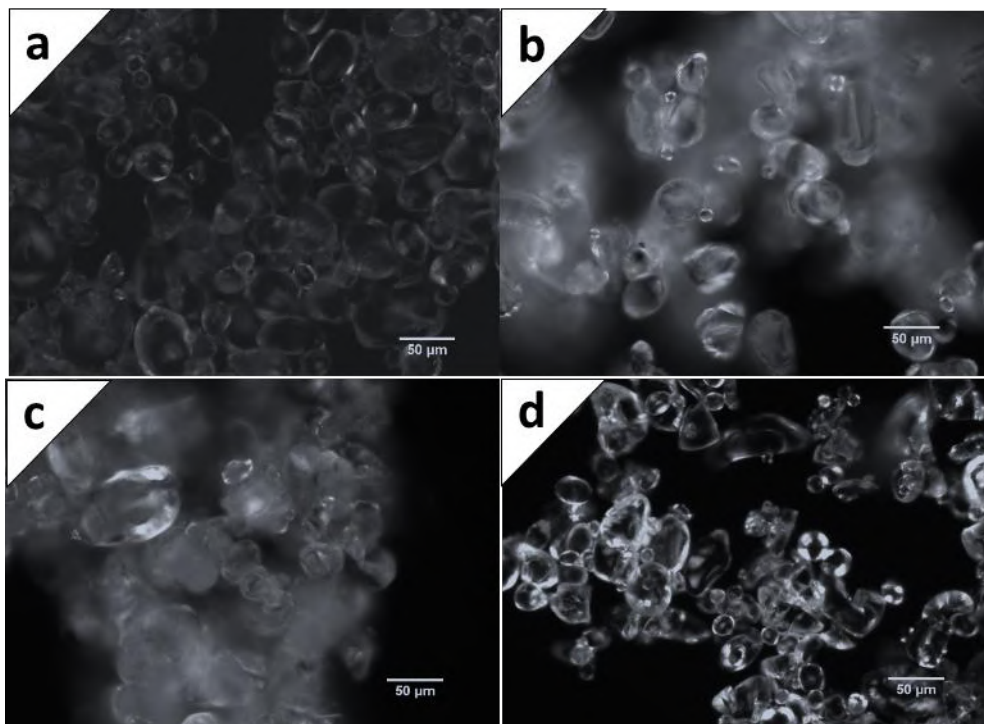


Figura 4. 86 mostra que as partículas obtidas são irregulares e têm uma geometria elipsoidal. Esse resultado não é comum em ensaios de suspensão, quando as partículas visualmente têm a forma esférica ou de aglomerados de partículas esféricas. A forma irregular foi confirmada nas análises de microscopia eletrônica de varredura mostradas na Figura 4. 87.

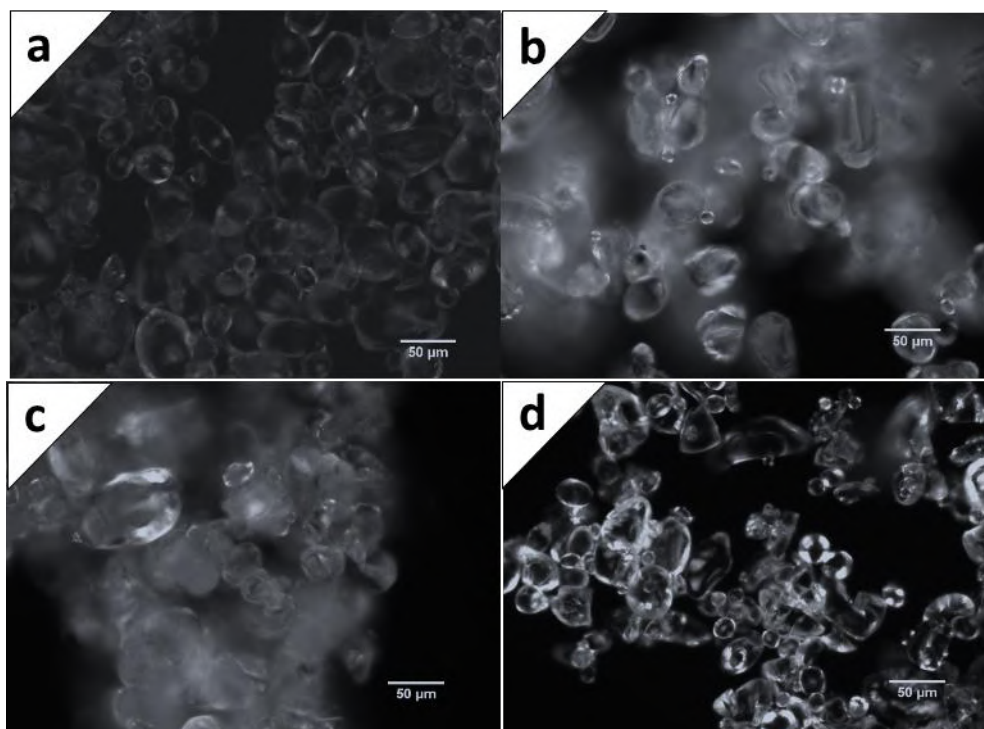


Figura 4. 86. Micrografias de partículas de amido obtidas nas condições da reação A1: a) 0 min, b) 30 min, c) 3 horas e d) 5 horas.

É reportado na literatura que os grânulos do amido apresentam diferentes formatos, dependendo do tipo de amido analisado, apresentando formato lenticular, arredondados ou poligonal (YONEMOTO *et al.*, 2007). Dessa forma, provavelmente o resultado indica que não ocorreu evolução da reação de reticulação ao longo do tempo, pois a presença de partículas com geometria não esférica é característica de grãos de amido nativo. A geometria pode ter sido estabilizada, em particular, após a secagem.

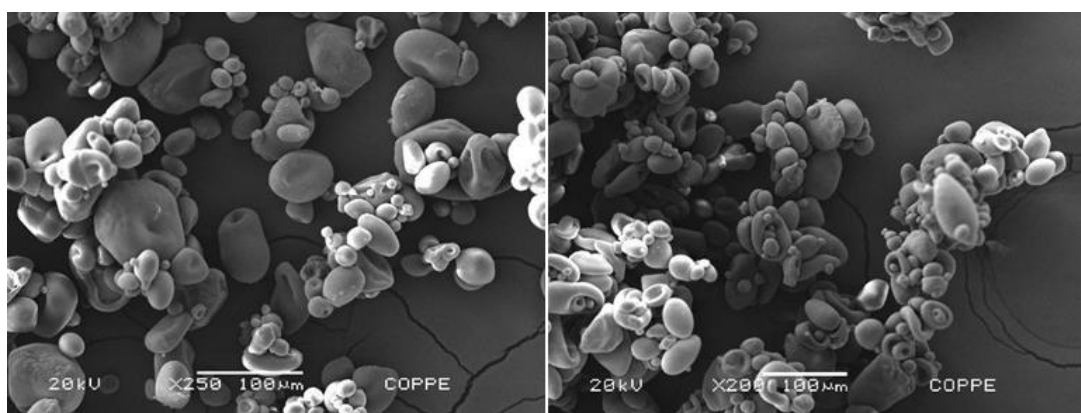


Figura 4. 87. Micrografias de MEV de partículas de amido obtidas após 5 horas da reação A1.

Na verdade, esse resultado já podia ser esperado, pois a temperatura usada na etapa de solubilização foi baixa. Quando o amido é aquecido em excesso de água, acima da temperatura de gelatinização, a estrutura cristalina é rompida pelo relaxamento das pontes de hidrogênio e as moléculas de água interagem com os grupos hidroxila da amilose e da amilopectina (LIU *et al.*, 2009). Isso causa aumento do tamanho dos grânulos, devido ao inchamento, e também ocorre parcial solubilização. Alguns trabalhos reportam que a solubilização do amido costuma ocorrer em temperaturas entre 60 °C e 90 °C (LIU *et al.*, 1999 e LIU *et al.*, 2009), com maior solubilidade obtida na temperatura de 90 °C e na concentração de 50 g/L (TAGGART e MITCHELL, 2009).

#### **4.6.2. Caracterização Morfológica das Partículas de Amido – Reação A2**

Diante dos aspectos citados na seção anterior, foi proposto o aumento da temperatura de solubilização da fase aquosa, mantendo-se a temperatura da reação (reação A2). Além disso, a concentração do amido foi reduzida para manter estabilidade do sistema (Tabela 4. 23). A reação foi conduzida de forma similar e o produto de reação foi então caracterizado.

Análises de distribuição de tamanhos de partícula foram realizadas e a Figura 4. 88 exibe os resultados obtidos. Analisando estes dados, foi possível observar que amostras retiradas até os primeiros 30 minutos da reação apresentaram perfis com distribuições mais largas, havendo aumento gradual dos tamanhos médios de partículas. Para as distribuições finais de tamanho, foi evidenciado um deslocamento para partículas de maiores diâmetros e formação de distribuições mais estreitas, de forma similar a algumas reações conduzidas com gelatina. De forma geral, os diâmetros médios de partículas obtidas foram os maiores de todos os ensaios. Esses dados podem ser vistos na Tabela 4. 25, que reporta os diâmetros médios obtidos.

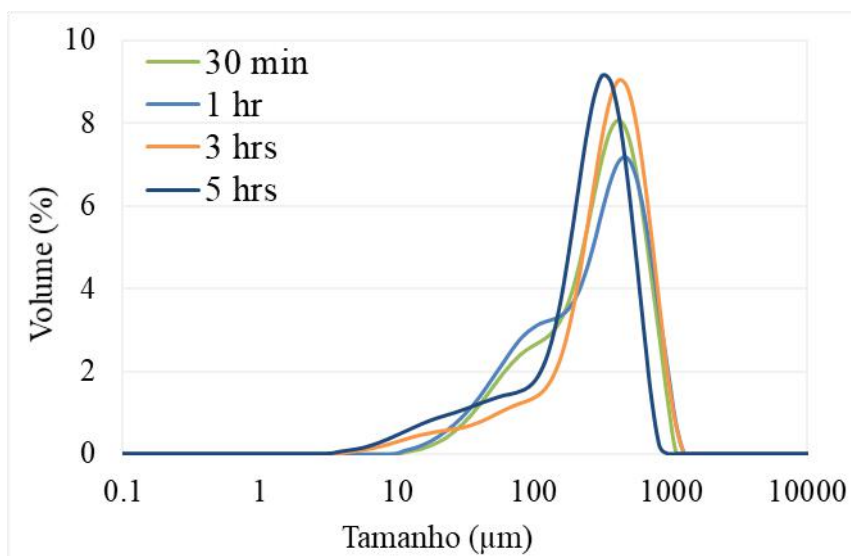


Figura 4. 88. Distribuições de tamanhos de partícula de amido obtidas da reação A2.

Tabela 4. 25. Diâmetro médio das partículas de amido ao longo do tempo da reação A2.

Tempo de reação	Diâmetro médio (µm)	PDI
0 min	303	1,3
30 min	333	1,8
1 hora	337	1,8
3 horas	376	2,7
5 horas	272	2,7

As análises de microscopia óptica exibidas na Figura 4. 89 confirmam os resultados obtidos nas medidas de distribuição de tamanho. É possível observar que, quando a temperatura foi aumentada, o aspecto do material obtido foi diferente do reportado na reação A1. As amostras retiradas nos primeiros minutos apresentaram aspecto aglomerado e sem definição de forma. Esse aspecto parece estar ligado à completa solubilização do amido, caracterizado pela modificação da estrutura do grão, devido ao rompimento das estruturas e interações com a água. À medida que a reação avançou, foi evidenciado o processo mais regular da formação das partículas, as quais, em intervalos de tempo maiores, apresentaram geometria esférica, característica das reações em suspensão. Além disso, a distribuição de partículas é claramente heterogênea.

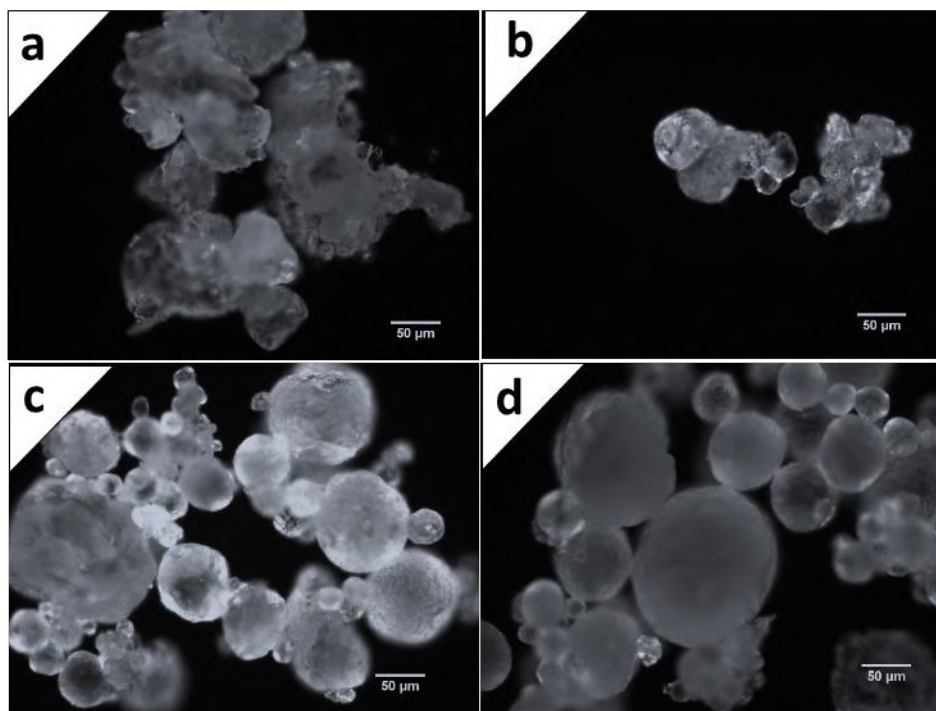


Figura 4. 89. Micrografias das partículas de amido obtidas ao longo do tempo da reação A2: **a)** 0 min, **b)** 30 min, **c)** 3 horas e **d)** 5 horas.

Para visualizar melhor a morfologia dessas partículas de amido, algumas imagens foram obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 4. 90 mostra imagens das partículas de amido (reação A2). Como mostrado nas imagens, as partículas obtidas no início da reação apresentaram estrutura indefinida e diferente da reação anterior, para o mesmo intervalo de tempo. Isso parece estar associado ao rompimento do grânulo, que torna o amido disponível para reagir. No final da reação, a mudança da geometria das partículas é clara. Apesar disso, a superfície da partícula obtida é muito irregular e rugosa. Esse resultado pode estar atrelado ao tempo de reação que parece não ter sido o suficiente para reagir completamente. Por outro lado, não sabemos de que forma a glicose interage com o amido para formar partículas. Assim, avaliações mais aprofundadas devem ser realizadas.

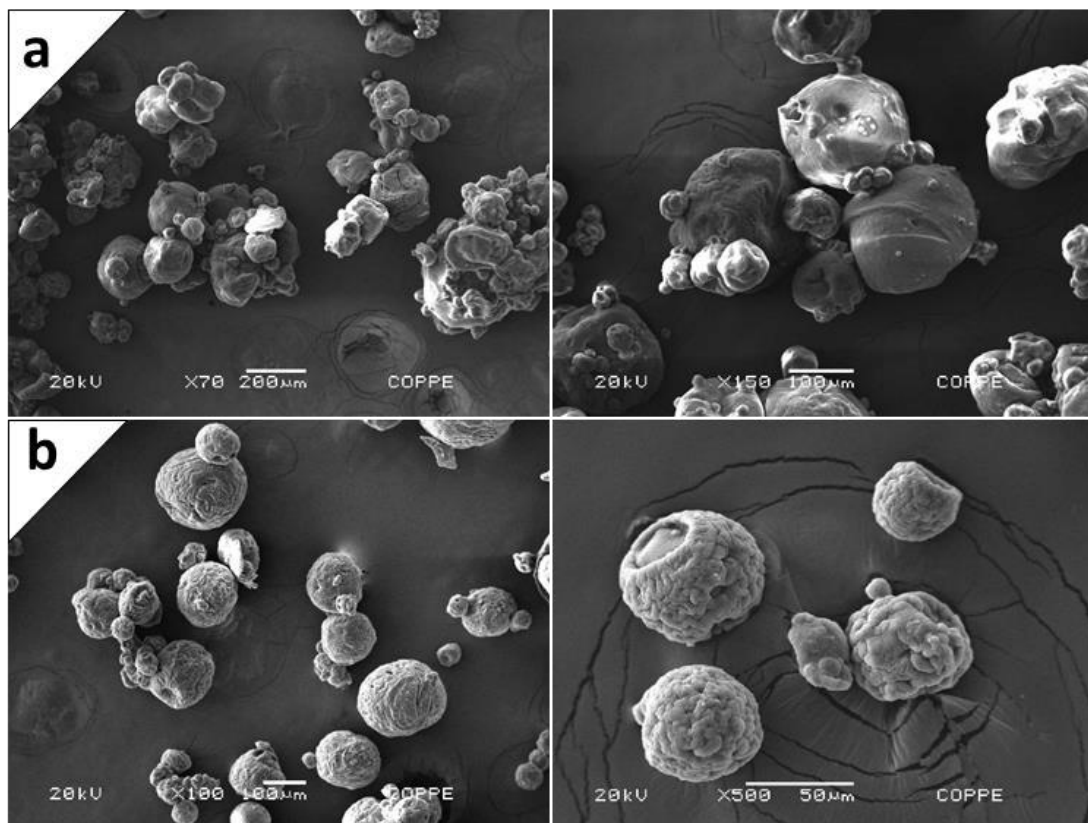


Figura 4. 90. Micrografias de MEV das partículas de amido obtidas da reação A2: **a)** 30 min e **b)** 5 horas.

- **Análise Termogravimétrica**

A fim de caracterizar de forma mais detalhada a estabilidade de partículas de gelatina obtidas ao longo do tempo e verificar a possível ocorrência da reticulação, análises de TGA foram realizadas e os resultados são apresentados na Figura 4. 91.

Os resultados obtidos mostraram que também houve pequena e constante variação das taxas de perda de massa em amostras coletadas ao longo do tempo de reação. Nota-se em particular quanto maior é o tempo de reação, menos acentuadas são as taxas máximas de perda de massa e menos acentuadas são as perdas de massa ao final do processo (indicando leve aumento da resistência à perda de massa). Esses resultados também parecem reforçar a ideia de que transformações lentas ocorrem com o passar do tempo durante o tratamento térmico de reações conduzidas com amido. Uma vez mais, tendências similares foram observadas nas condições avaliadas, que parecem ser controladas pelo tempo de reação. Como já reportado anteriormente no processo de produção de partículas de gelatina, esse resultado pode ser um

indicador de reticulação das partículas de amido, no entanto, essa única avaliação não afirma a ocorrência de reticulação.

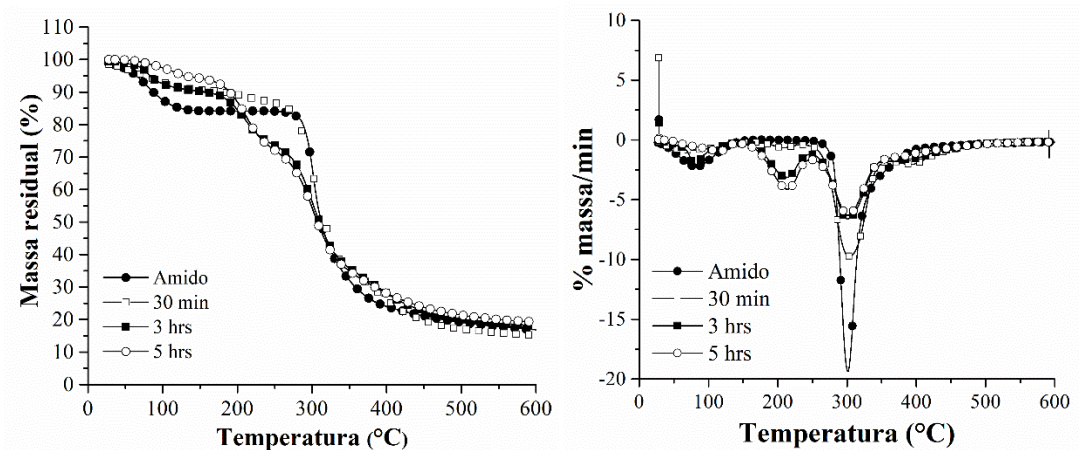


Figura 4. 91. Termogramas de TGA de partículas de amido obtidas na reação A2.

### 6.6.3 Caracterização Morfológica das Partículas de Amido – Reação A3

A partir dos resultados obtidos, outro teste foi realizado nas condições da reação A3 citadas na Tabela 4. 23, com a finalidade de ajustar as condições e melhorar ainda mais o processo. Os resultados são exibidos a seguir.

Os resultados de distribuição de tamanho de partículas obtidas da reação A3 estão ilustrados na Figura 4. 92. É possível perceber que, ao longo do tempo, há uma mudança no perfil de distribuição, no qual nas duas primeiras horas temos uma distribuição larga que caracteriza a heterogeneidade das partículas. Porém, no final da reação há um estreitamento no perfil da distribuição, caracterizando tamanhos de partícula mais homogêneos, além do deslocamento para maiores tamanhos de partícula como pode ser confirmado pela Tabela 4. 26. Parece que mudanças lentas também acontecem nessas reações com amido, como já reportado nas reações conduzidas com gelatina.



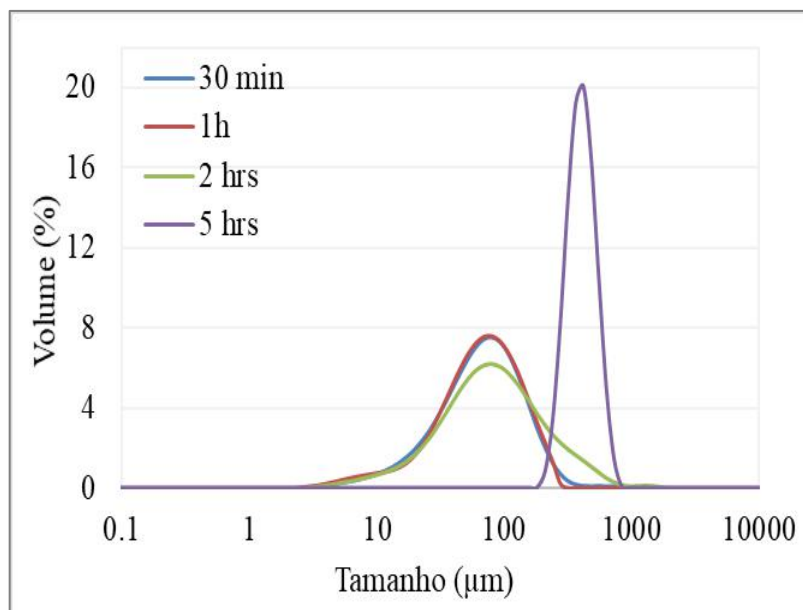


Figura 4. 92. Distribuições de tamanhos de partícula de amido obtidas da reação A3.

Tabela 4. 26. Diâmetro médio e índice de polidispersão de partículas de amido ao longo do tempo da reação A3.

Tempo de reação	Diâmetro médio (µm)	PDI
30 min	84	1,62
1 hora	78	1,53
2 horas	123	0,98
5 horas	412	0,86

Análises de microscopias foram realizadas e a morfologia das partículas são apresentadas na Figura 4. 93. Por meio das imagens fica claro que ocorreram mudanças lentas na formação da partícula e evolução de tamanho ao longo do tempo. Além disso, essas imagens confirmam os dados de distribuição de tamanho, chegando ao final com partículas maiores e mais homogêneas.

Diante dos dados de morfologia obtidos, fica claro que também é possível produzir partículas de amido. Neste caso, a reação A3 foi considerada como a de melhor desempenho, sendo definida como a formulação base (referência) para elaboração de partículas de amido. No entanto, testes de caracterização adicionais se fazem necessário melhor entender as propriedades dessas partículas.

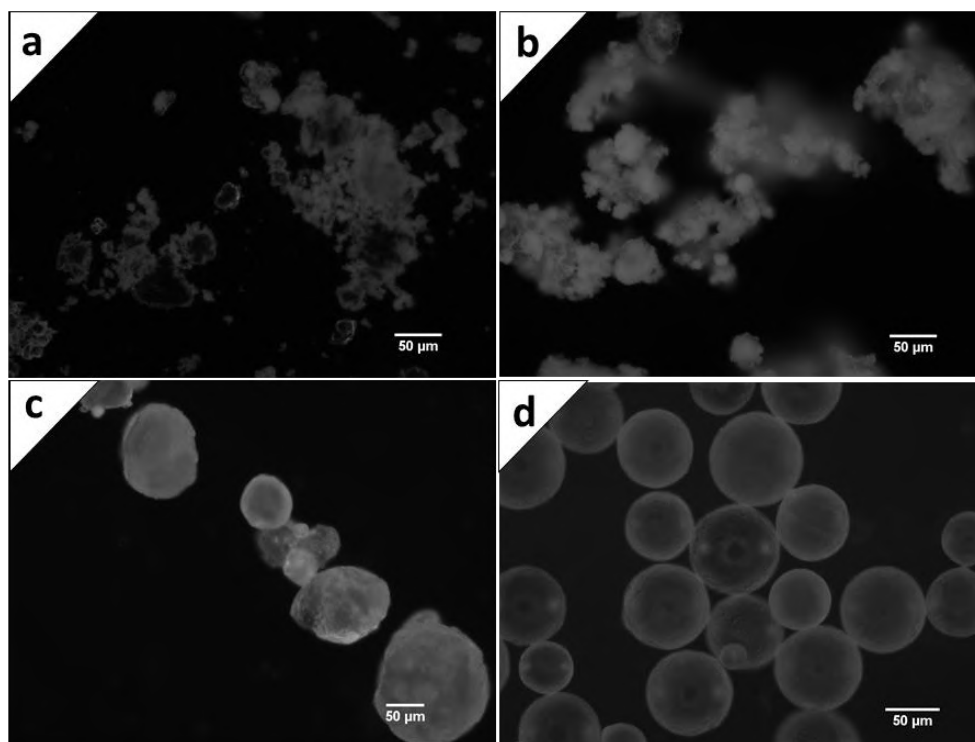


Figura 4. 93. Micrografias das partículas de amido obtidas a partir da reação A3.  
a) 0 min; b) 1h; c) 3hrs; d) 5hrs.

- **Análise Termogravimétrica**

A Figura 4. 94 mostra os termogramas de TGA de amostras tomada ao longo do tempo da reação com amido conduzidas com controle de pH e sua respectiva derivada de decomposição térmica (DTG). De forma similar aos resultados na Seção 3, a Figura 4. 94 indica que ocorreram mudanças no material. Percebe-se que longo do tempo, as taxas máximas de perda de massa são menos acentuadas (indicando um leve aumento da resistência à perda de massa). Esses resultados são semelhantes aos reportados para partículas de gelatina. Assim, esse efeito pode ser um indicio de transformações ocorridas pela reticulação do amido, contudo, avaliações mais precisas são necessárias.

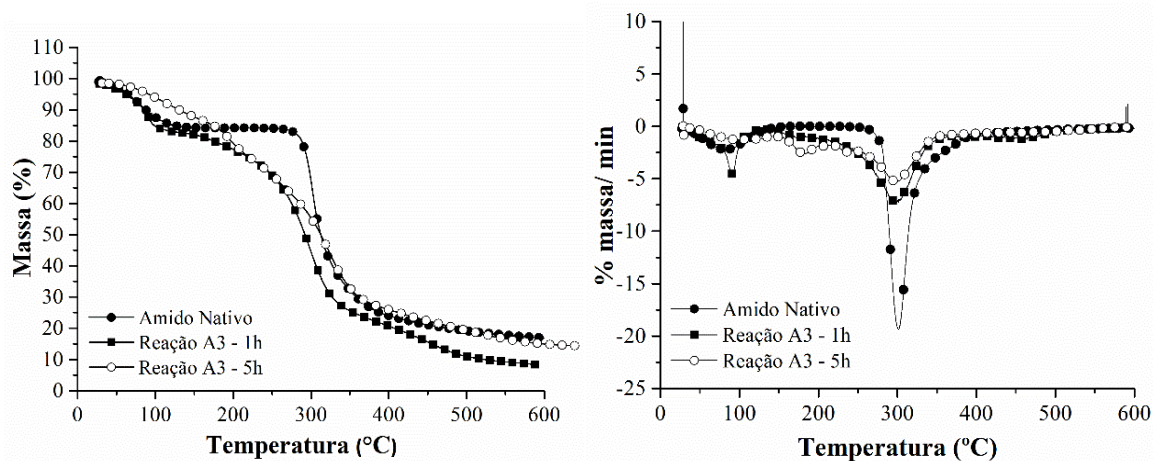


Figura 4. 94 Termogramas de TGA de partículas de amido obtidas na reação A3.

- **Avaliação de solubilidade em água**

Com intuito de avaliar a solubilidade em água das partículas de amido produzidas na reação A3, amostras foram dispersas em água e análise de microscopia foram realizadas. Os resultados são apresentados na Figura 4. 95. As imagens da Figura 4. 95 ilustram que as partículas de amido ficaram estáveis na presença de água. Pode-se perceber que as partículas de amido produzidas com glicose e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  possuem uma resistência a água. No entanto, é importante observar que as partículas incharam, mas mantiveram sua estrutura e morfologia. Esse resultado mostra de forma inequívoca que as propriedades das partículas de amido foram modificadas, gerando produtos resistentes a água, entretanto, outras análises devem ser feitas para compor esse conjunto de dados.

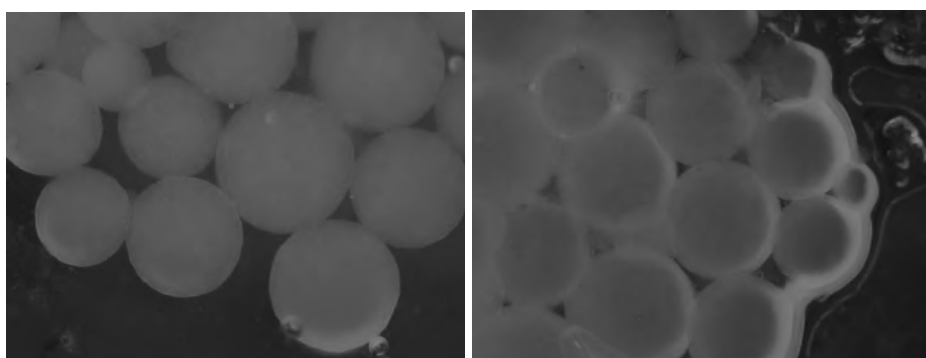


Figura 4. 95. Micrografias de partículas de amido em água para avaliação de solubilidade.

- **Considerações parciais**

Inicialmente, é válido ressaltar que, os estudos com produção de partículas de amido estão em andamento em colaboração com dados que estão sendo usados para gerar uma patente, dessa forma não puderam serem exibidos.

A análise dos dados apresentados e referentes ao bloco de reações conduzidos com amido mostra que a formulação para a produção de partículas de amido parece estar bem definida; no entanto, réplicas devem ser feitas para garantir a melhor estabilidade do sistema, quando comparado ao processo de produção de partículas de gelatina. Isso já poderia ser esperado, dado que as soluções de gelatina não apresentam as mesmas características das soluções de amido. Além disso, caracterizações mais precisas devem ser feitas na continuidade do trabalho para garantir que a formação de partículas ocorre com reticulação. Apesar de que resultados referentes a resistência térmica e solubilidade mostrarem que algumas mudanças ocorreram ao longo do tempo de reação.

## *Capítulo V*

### *Conclusões e sugestões*

Por tudo o que foi apresentado e discutido, é possível perceber a evolução satisfatória que o presente trabalho apresentou na direção de produzir, pela primeira vez, partículas poliméricas naturais pela técnica de suspensão inversa, propondo o encapsulamento de aromas *in situ*.

Com base nos resultados apresentados e discutidos, é possível concluir que a glicose pode exercer papel de agente reticulante da gelatina, embora o efeito reticulante ocorra de forma lenta nas condições testadas. Dessa forma, isso pode explicar a inobservância de efeitos significativos quando testes de reticulação foram conduzidos por tempos curtos (30 min). Portanto, o tempo é uma variável de importância a ser considerada nas reações de reticulação de gelatina e, conseqüentemente, na obtenção de partículas.

Além disso, as distribuições de tamanho de partícula mostraram um aumento continuado dos tamanhos de partícula ao longo do tempo, assim como também observado com a viscosidade do meio reacional, que podem indicar o aumento lento da massa molar e a reticulação da gelatina. Esses resultados são corroborados pela avaliação de solubilidade em água das partículas de gelatina. Os resultados de TGA indicaram também o lento, mas continuado aumento da resistência à degradação das partículas de gelatina com o tempo, o que é compatível com a ocorrência de reticulação. Com base nas análises de microscopia, foi possível observar a geometria esférica das partículas e o aumento dos diâmetros ao longo da reação. Os resultados de FTIR apresentados mostraram que nos casos em que a glicose e o cálcio foram empregados ocorreram modificações no espectro, resultado da reticulação das cadeias. É importante destacar que em reações conduzidas na ausência de glicose ocorreram modificações na estrutura da partícula, no entanto, os dados deixam claro a ação da glicose como agente de reticulação.

Com base nos resultados obtidos durante testes com água de diferentes origens (deionizada, destilada e da torneira), pode-se afirmar que a presença de íons induz a melhor formação de partículas, sendo vantajoso para aplicações industriais.

Além disso, em reações realizadas na presença de extratos naturais aromáticos, partículas com diferentes estruturas foram obtidas, o que sugere que estes compostos não podem ser considerados inertes no processo de preparo de micropartículas de gelatina, de forma que as condições do processo devem ser ajustadas para cada de ativo a ser encapsulado.

Os ensaios com óleos essenciais comerciais mostraram que a incorporação dos óleos exerceu efeito significativo sobre os perfis de viscosidade, tamanho de partículas, morfologia e comportamento térmico das partículas. Percebe-se que a presença dos óleos interfere desempenho da reação de formação de partículas em suspensão inversa, inibindo de alguma forma o curso da reação. A presença de grandes aglomerados foi marcante com redução do tamanho das partículas quando comparados com a referência sem adição dos óleos. A viscosidade das soluções com óleo reduziu significativamente, o que pode explicar os perfis de distribuição deslocados para partículas de tamanho menor. Fica claro que houve um pequeno aumento da resistência térmica das partículas com a adição dos óleos quando comparado com as partículas sem óleo. Esse aumento pode ser devido à interação dos óleos essenciais com a gelatina, promovendo ligação entre as cadeias. Mudanças na tensão superficial ocorreram com dição dos óleos, embora não tenham sido tão expressivas. É claro a complexidade dos óleos essenciais que podem ter efeito inibitório sobre as reações de reticulação da gelatina. Do mesmo modo, é válido destacar que esses compostos podem competir com os mesmos sítios que reagem com a glicose, reduzindo a interação desta com a gelatina.

Os resultados da eficiência de extração de óleo das partículas foram baixos, mas em alguns casos tendeu a aumentar com o tempo de reação, indicando que os componentes do óleo interagem com a matriz de gelatina e que a reticulação da gelatina pode afetar a eficiência do óleo, como sugerido pelo comportamento térmico observado. Apesar disso, foi possível obter pérolas de gelatina contendo óleo, embora ajustes de processo possam ser necessários para aumentar a eficiência da encapsulação de óleo em trabalhos futuros.

Em relação a ensaios iniciais com amido, foi possível concluir que o uso de temperatura mais alta de preparo permitiu uma maior solubilização do amido, permitindo obter partículas esféricas e regulares. Além disso, uma porcentagem menor de amido deve ser utilizada para garantir a estabilidade do sistema em suspensão. Análises de distribuição de tamanho de partículas e de microscopia mostraram que as partículas de amido possuem distribuições mais

homogêneas e morfologia esféricas e regulares ao longo do tempo de reação, como reportado para gelatina. A avaliação da solubilidade em água mostrou que as partículas possuem resistência a água, grande indicador de ocorrência de ligações cruzadas. Resultados mais precisos foram obtidos; no entanto, não puderam ser reportados nesta tese, devido à produção de uma patente. Mas fica claro que é possível a produção de partículas de amido nas condições testadas, podendo ser futuramente testadas para a incorporação de ativos.

## 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, sugere-se, inicialmente, o estudo do escalonamento do processo de produção das partículas de gelatina e amido, com o objetivo de viabilizar o processo.

Além disso, novas estratégias devem ser desenvolvidas para melhor remoção da água do sistema, como uso do vácuo, evitando o uso de solventes para remoção de água. O desenvolvimento de um novo processo de remoção de água (uso do vácuo) pode evitar a perda de ativos encapsulados, superando problemas de eficiência encontrados nesse trabalho.

Em relação ao método de preparação, neste estudo os ensaios com óleos essenciais foram realizados em reator aberto e sem nenhum cuidado adicional com a luz, além do fato da remoção da água ter sido feita com solvente, sendo possível carrear ativos para o filtrado (neste caso, não analisado). Assim, a proposta de reproduzir essas reações em sistema fechado é propício para avaliar se haverá aumento da eficiência dos ativos.

Neste trabalho, somente a encapsulamento de aromas foi investigado. Outros ativos podem ser também estudados e utilizados em sistemas de liberação. Dessa forma, sugere-se avaliar o encapsulamento e os perfis de liberação obtidos com outros óleos e fármacos, além de macro e micronutrientes.

Em relação a partículas de amido, novas reações devem ser realizadas com o intuito de ter reprodutibilidade do sistema formulado. Também é possível propor que as partículas de amido sejam usadas para o encapsulamento de ativos.

## *Capítulo VI*

### *Referências Bibliográficas*

AROMAS NATURAIS: Importância, variações, estrutura e aceitação, 2008, *Revista Aditivos & Ingredientes*, v. 59, pp. 28-37. Disponível em: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/88.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/88.pdf)\_ Acesso em 10 de janeiro 2015.

ARANCIBIA, C., JUBLOTB, L., COSTELLA, E., BAYARRIA, S., 2011, “Flavor release and sensory characteristics of o/w emulsions: influence of composition, microstructure and rheological behavior”, *Food Research International*, v. 44, nº 6, pp. 1632-1641.

ACHET, D., e HE, X. W., 1995, “Determination of the renaturation level in gelatin films”, *Polymer*, v. 36, nº 4, pp. 787–791.

ADINEW, B., 2014, “GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia”, *International Journal of Herbal Medicine*, v. 1, pp. 22-31.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C., 2015, “Spray drying techniques for food ingredient encapsulation.”, John Wiley & Sons.

AMMALA, A., 2013, “Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets”, *International Journal of Cosmetic Science*, v. 35, pp. 113–124.

ANDRADE, M. A., CARDOSO, M. G., BATISTA, L. R., MALLET, A. C. T., MACHADO S. M. F., 2012, “Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana”, *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, nº 2, p. 399-408.

ARVANITOYANNIS, I. S., “Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings.” In: A. GENNADIOS (Ed.), *Protein-based films and coatings*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 275 – 304, 2002.



ARVANITTOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S., 1998, “Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties”, *Carbohydrate Polymers*, v. 37, pp. 371-382.

ARVISENET, G.; BAIL, P. L.; VOILLEY, A.; CAYOT, N., 2002, “Influence of physicochemical interactions between amylase and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, n° 24, pp. 7088-7093.

AZEREDO, H. M. C., 2005, “Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos”, *Alimentos e Nutrição*, Araraquara. v. 16, n° 1, pp. 89-97.

AZIZ, F. R. A.; JAI, J.; RASLAN, R.; SUBUKI, I.; 2016, “Microencapsulation of citronella oil by complex coacervation using chitosan-gelatin (b) system: operating design, preparation and characterization”, *MATEC Web of Conferences*, v. 69, pp. 04002.

BABU, V. N., KANNAN, S., 2012, “Enhanced delivery of baicalein using cinnamaldehyde cross-linked chitosan nanoparticle inducing apoptosis”, *International journal of biological macromolecules*, v. 51, pp. 1103-1108.

BALAGUER, M. P., GÓMEZ-ESTACA, J., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUNOZ, P., 2011, “Biochemical properties of bioplastics made from wheat gliadins cross-linked with cinnamaldehyde”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v.59, pp. 13212-13220.

BALAGUER, M. P., BORNE, M., CHALIER, P., GONTARD, N., MOREL, M-H., PEYRON, S., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUNOZ, P., 2013, “Retention and release of cinnamaldehyde from wheat protein matrices”, *Biomacromolecules*, v. 14, pp. 1493-1502.

BANEGAS, R. S., 2008, “Filmes formados por goma guar: efeito do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água”, Estágio supervisionado, UFSC, Santa Catarina, SC, Brasil.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M., 2010, “Microencapsulation: a review”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 1, n° 2, pp. 38-43.

BHANDARI, B. R., DUMOULIN, E. D., RICHARD, H. M. J., NOLEAU, I., & LEBERT, A. M., 1992, “Flavour encapsulation by spray-drying: Application to citral and linalyl acetate”, *Journal of Food Science*, v. 57, pp. 217–221.

BRANNON-PEPPAS, L. “Controlled release in the food and cosmetic industries”, In: M.A. EL-NOKAY, D.M. PIATT, B.A. CHARPENTIER (Eds.), ACS symposium series n° 520, Washington, DC. P., pp. 42 – 45, 1993.

BRACK, H.P.; TIRMIZI, S.A.; RISEN, W.M., 1997, “A spectroscopic and viscosimetric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan”, *Polymer*, v. 38, pp. 2351–2362.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 104, de 14/05/1999. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes/aromas. Acesso em: 18/02/2015.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*, New York: Marcel Dekker, v. 10, pp. 1-29,1994.

BEAUCHAMP, R.O., ST CLAIR, M.B., FENNELL, T.R., CLARKE, D.O., MORGAN, K.T., 1992, “A critical review of the toxicology of glutaraldehyde”, *Critical Reviews in Toxicology*, v. 22, pp. 143 –174.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R., 2004, “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, pp. 19–34.

BERGER, R. G. “Aroma Biotechnology”, 1ª Ed., Berlin, Springer-Verlag, pp. 239, 1995.

BELGACEM, M. N. GANDINI, A., “The State of the Art”, In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A., *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Oxford: Elsevier, 2008.

BELITZ, H.; GROSCH, W., 1988, “Química de Alimentos”, Acribia, Zaragoza, pp. 263.

BILIADERIS, C.G., “Structures and phase transitions of starch in food systems”, 1992, *Food Technology*, v. 145, pp. 98-109.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N., 2001, “Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking.”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 763-768.

BOH, B.; KORNHAUSER, A. DA SILVA, 1996 “Microencapsulation for pollution prevention, developing support for introducing clean”, pp. 205-222.

BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; FERNANDES, R. V. B.; VIANA, A. D.; COSTA, J. M. G.; MARQUES, G. R., 2012, “Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil.” *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, pp. 2289–2296.

BOUTBOUL, A., GIAMPAOLI, P., FEIGENBAUM, A., DUCRUET, V., 2002, “Use of inverse gas chromatography with humidity control of the carrier gas to characterize aroma-starch interactions”, *Food Chemistry*, v. 71, nº 3, pp. 387-392.

BUTLER, M. F.; NG, YIU-FAI.; PUDNEY, P.D.A., 2003, “Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 41, pp. 3941–3953.

BRUSCHI, M.L., CARDOSO, M.L.C., LUCCHESI, M.B., GREMIÃO, M.P.D., 2003, “Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 264, pp. 45–55.

CÁNOVAS, G. V. B.; RIVAS, E. O.; JULIANO, P.; YAN, H., “Encapsulation Processes”, In: *Food Powders Physical Properties, Processing, and Functionality*, 2005.

CARVALHO, J. S. R., 2009, “Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens L.* em Matrizes de Gelatina e Gelatina/Sacarose”, Dissertação de M.Sc., Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

CASTRO, N.; DURRIEU, V.; RAYNAUD, C.; ROUILLY, A.; RIGAL, L.; QUELLET, C., 2016, "Melt Extrusion Encapsulation of Flavors: A Review", *Polymer Reviews*, v. 56, pp. 137–186.

CASANOVA, F.; SANTOS, L., 2016, "Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application—a review.", *Journal of microencapsulation*, v. 33.1, pp. 1-17.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F., 2004, "Characterization of gelatin-based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde" *Food Hydrocolloids*, v.18, pp. 717–726.

CEREDA, M. P., "Polvilho Azedo", In: BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blucher/Ed. Universidade de São Paulo, v. 3, cap. 20, pp. 413-460, 2001.

CHANG, Y. I.; SCIRE, J.; JACOBS, B., "Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil", In: *Flavour encapsulation*, Risch, S. J., Reineccius, G. A. (editors). ACS Symposium Series 370. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 87 – 102, 1988.

CHAUNDY, F. K.; BOWER, D. K.; KILBRIDE JÚNIOR, T. K, 1996, "Process for crosslinking gelatin and for incorporation a material therein", *Patente nº EP 0494417B1*.

CHATTERJEE, S.; JUDEH, Z. M., 2015, "Encapsulation of fish oil with N-stearoyl O-butylglyceryl chitosan using membrane and ultrasonic emulsification processes.", *Carbohydrate polymers*, v. 123, pp. 432-442.

CHEETHAM, P. S. J. "The flavor and fragrance industry", In: MOSES, V., CAPE, R. E. (Eds.), *The science and the business*, Harwood Acad., London, Biotechnology, pp. 481-506, 1991.

CHIEN P.J.; SHEU, F.; LIN, H. R., 2007, "Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life", *Food Chemistry*, v. 100, nº 3, pp. 1160.

CHIELLINI, E.; CINELLI, P.; FERNABDES, E. G.; KENAWY, ER. S.; LAZZERI, A., 2001 "Gelatin-Based Blends and Composites: Morphological and Thermal Mechanical Characterization". *Biomacromolecules*, v. 2, pp. 806-811.

CHIOU, B. S.; GLENN, G. M.; IMAM, S. H.; INGLESBY, M. K.; WOOD, D. F.; ORTS W. J., “Starch Polymers: Chemistry, Engineering, and Novel Products.” In: Amar, K. M., Manjusri, M., Lawrence T. D. (eds), *Natural Fibers, Biopolymers, And Biocomposites*, chapter 20, Boca Raton, USA, Taylor & Francis Group, 2005.

CONSTANT, P.B.L., 1999, “Microencapsulamento de bixina: agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações”, Dissertação M.Sc. (Ciência e Tecnologia de Alimentos), UFV, Viçosa, MG, Brasil.

COOKE, D., GIDLEY, M. J., 1992, “Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition”, *Carbohydrate Research*, v. 227, pp. 103-112.

COSTA JR., E. S. MANSUR, H. S., 2008, “Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido” *Química Nova*, v. 31, n. 6, pp. 1460-1466.

CUI, G. L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P., 2014, “Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked”, *Carbohydrate Polymers*, v. 99, pp. 31–38.

DAVIS, E. A., 1994, “Wheat starch”, *Cereal Foods World*, v. 39, pp. 34 – 36.

DE ANGELIS, A.A., CAPITANI, D., CRESCENZI, V., 1998, “Synthesis and <sup>13</sup>C CP/MAS NMR characterization of a new chitosan-based polymeric network”, *Macromolecules*, v.31, pp. 1595–1601.

DJENANE, D., 2015, “Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*”, *Foods*, v. 4, pp. 208-228.

DELVAL, F., CRINI, G., BERTINI, S., MORIN-CRINI, N., BADOT, P.M., VEBREL, J., TORRI, G., 2004, “Characterization of crosslinked materials with spectroscopic techniques”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 93, pp. 2650-2663.

DELADINO, L.; TEIXEIRA, A.S.; NAVARRO, A.S.; ALVAREZ, I.; MOLINA-GARCÍA, A.D.; MARTINO, M., 2015, “Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants.”, *Food Bioprod. Process*, v. 94, pp. 463-472.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P., 2009, “Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas”, *Ciência Rural*, v. 39, pp. 945-954.

DIGENIS, G.A.; GOLD, T.B.; SHAH, V.P., 1994, “Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro in vivo performance”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, nº 7, pp 915-921.

DING, Y., WU, E. Q., LIANG, C., CHEN, J., TRAN, M. N., HONG, C. H., JANG, Y., PARK, K. L., BAE, K., KIM, Y. H., 2011, “Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis”, *Food chemistry*, v. 127, pp. 755-760.

DÔSSIE AROMAS – Os Aromas. *Food Ingredients Brasil* Nº 8, 2009, pag. 40-68, acesso 02/04/2016 [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com).

DRAGET, K.I., 1996, “Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels”, *Polymer Gels and Network*, v. 4, pp.143–151.

DROSOU, C. G.; MAGDALINI K. K.; COSTAS, B. G., 2017, "Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications.", *Drying Technology*, v. 35, pp. 139-162.

DUGUET, E.; ABBOUD, M.; MORVAN, F.; MAHEU, P.; Fontanille, M, 2000, “PMMA encapsulation of alumina particles through aqueous suspension polymerisation processes. In *Macromolecular Symposia*”, v. 151, No. 1, pp. 365-370, Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

ELLIS, R. P.; COCHRANE, M. P.; DALE, M. F. B.; DUPUS, C. M.; LYNN, A.; MORRISON, I. M.; PRENTICE, R. D. M.; SWANSTON, J. S.; TILLER, S. A”, 1998, *Starch Production and Industrial Use*”, *Journal Science Food Agriculture*, v. 77, pp. 289-311.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. A.; CASABIANCA, H.; ELAISSARI, A., 2015, “Essential oils: from extraction to encapsulation.”, *International journal of pharmaceutics*, v. 483, pp. 220-243.

ESCHER, F. E., NUSSLI, J., CONDE-PETIT, B., “Interactions of flavor release.” In: ROBERTS, D.; TAYLOR, A. (Eds.). *Flavour release*, Washington, American Chemical Society, pp. 230-245, 2000.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C., 1996, “Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties”, *Biomaterials*, v. 17, pp. 2009–2020.

FANG, J.M., FOWLER, P.A., ESCRIG, C., GONZALEZ, R., COSTA, J.A., CHAMUDIS, L., 2005, “Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers”, *Carbohydrate Polymers*, v.60, pp. 39–42.

FANGUEIRO, J.; GONÇALVES A.S.; SOUTO, E.B., 2010, “Proteínas e polissacarídeos utilizados na preparação de sistemas de transporte de substâncias activas”, *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, nº 7, pp. 158-167.

FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q., 2009, “Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde.”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, pp. 998-1003.

FARRIS, S.; LIU, K.M.; SCHAICH, L.; COOKE, P.H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K.L., 2011, “Gelatin–pectin composite films from polyion-complex hydrogels”, *Food Hydrocolloids*, v. 25, pp. 61–70.

FARRIS, S., SONG, J., HUANG, Q., 2010, “Alternative Reaction Mechanism for the Cross-linking of Gelatin with Glutaraldehyde”, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 58, pp. 998-1003.

FELT, O., FURRER, P., MAYER, J.M., PLAZONNET, B., BURI, P., GURNY, R., 1999, “Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention”, *International Journal of Pharmaceutics*, v.180, pp. 185 –193.

FENG, T., XIAO, Z., TIAN, H., 2009, “Recent Patents in Flavor Microencapsulation”, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, v. 1, pp. 193-202.

FINCH, C.A. “Microencapsulation”, In: ELVERS, B., HAWKINS, S., SCHULZ, G. *Olmann’s encyclopedia of Industrial chemistry*, 5<sup>a</sup> ed., Neinhene, VCH Verlagsgesellschaft, v. A16, pp. 575-588, 1990.

FLORES, R.J., WALL, M.D., CARNAHAN, D.W. & OROFINO, T.A., 1992, “An investigation of internal phase losses during the microencapsulation of fragrances” *Journal of Microencapsulation*, 3, 287–307.

FRANCHETTI S. M. M.; MARCONATO J. C., 2006, “Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos”, *Química Nova*, v. 29, nº 4, pp. 811-816.

FRINGANT, C., RINAUDO, M., GONTARD, N., GUILBERT, S., & DERRADJI, H., 1998, “A biodegradable starch based coating to waterproof hydrophilic materials”, *Starch/Stärke*, v. 50, pp. 292–296.

FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E., 2006, “Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration”, *Journal of Food Engineering*, Essex. v. 75, nº 1, pp. 27-35.

GARDEN, M., 2013, “Secagem de plantas aromáticas, condimentares e medicinais”, <<https://hortajardimnavaranda.wordpress.com/2013/08/14/passo-a-passo-horta-jardim-navaranda-8-colheita-e-secagem-de-plantas-aromaticas/>> Acesso em 10 de abril de 2016.



GANGURDE, A. B.; ALI, M. T.; PAWAR, J. N.; DHANRAJ, P., 2016, “Encapsulation of vitamin E acetate to convert oil to powder microcapsule using different starch derivatives”, *Journal of Pharmaceutical Investigation*.

GLIKO—KABIR, I., YAGEN, B., PENHASI, A., RUBINSTEIN, A., 2000, “Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery. I. Preparation and physicochemical characterization”, *Journal of Controlled release*, v. 63, pp. 121-127.

GOYCOOLEA, F.; ARGUELLES-MONAL, W.; PENICHE, C.; HIGUERA- CIAPARA, I. “Chitin and chitosan”, In: DOXASTAKIS, G., KIOSSEOGLOU V. (eds), *Novel macromolecules in food systems*, Developments in food science, v. 41. Amsterdam, Elsevier, pp. 265–308, 2000.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P., 2011, “Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review”, *Food Hydrocolloids*, v. 25, pp. 1813 – 1827.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C., 2011, “Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana”, *Química Nova*, v. 34, nº 7, pp. 1215-1223.

GONSALVES, J. K. M. C., COSTA, A. M. B., DE SOUSA, D. P., CAVALCANTI, S. C. H., NUNES, R.S., 2009, “Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples”, *Scientia Plena*, v. 5, pp. 11.

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

GRAHAM, L., 1996, “A comprehensive survey of the acid-stable fluorescent cross-links formed by ribose with basic amino acids, and partial characterization of a novel Maillard cross-link”, *Biochemical et Biophysica Acta*, v.1297, pp. 9-16.

GRANDVIEWRESEARCH, Global flavor and fragrances .Disponível em <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-flavors-fragrances-market>.

GRANDVIEWRESEARCH, Flavors-fragrances-market.Disponível. Disponível em <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-flavors-fragrances-market>.

GUENET, J.M., “Chitin”, *Polymer-Solvent Molecular Compounds*, 1ª ed., Chapter 8, Oxford, Elsevier, 2008.

GUIMARÃES, L. G. L., CARDOSO, M. G., ZACARONI, L. M., LIMA, R. K., PIMENTEL, F. A., MORAIS, A. R., 2008, “Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), *Química Nova*, v. 31, pp. 1476-1480.

GRANATA, G.; STRACQUADANIO, S.; LEONARDI, M.; NAPOLI, E.; CONSOLI, G. M. L.; CAFISO, V.; GERACI, C., 2018, “Essential Oils Encapsulated in Polymer-based Nanocapsules as Potential Candidates for Application in Food Preservation.”, *Food Chemistry*.

HABRAKEN, W. J. E. M., JONGE, L. T. DE, WOLKE, J. G. C., YUBAO, L., MIKOS, A. G., JANSEN, J. A., 2008, “Introduction of gelatin microspheres into an injectable calcium phosphate cement”, *Wiley Inter Science*, pp. 43-55.

HARISH, P. K.V., THARANATHAN, R.N., 2007, “Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview”, *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, pp. 117.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A., 2004, “Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films”, *Food Hydrocolloids*, v.18, pp. 403-411.

HAYPEK, E.; SILVA, L.H.M.; BATISTA, E.; MARQUES, D. S.; MEIRELES, M.A.A.; MEIRELLES, A.J.A., 2000, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17 n.4-7, pp.705-712.

HENNINK, W.E., VAN NOSTRUM, C.F., 2002, “Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, pp.13-36.

HOFFMAN, A. S., 2002, “Hydrogels for biomedical applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 43, pp. 3-12.

HOSENEY, R.C., *Principles of Cereal Science and Technology*, Minesota: AACC. 327, 1986.

HÖGNADÓTTIR, Á., ROUSEFF, R. L., 2003, “Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, v. 998, pp. 201-211.

JAHANZAD, F., SAJJADI, S., BROOKS, B.W., 2004, “On the Evolution of Particle Size Average and Size Distribution in Suspension Polymerization Processes”, *Industrial & Engineering Chemical Research*, v.206, pp. 255-262.

JANASWAMY, S., 2014, “Encapsulation altered starch digestion: Toward developing starch-based delivery systems.”, *Carbohydrate Polymers*, v. 101, pp. 600-605.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S.R. 1996, “Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices” *Biomaterials*. Great Britain, v.17, pp.471-484.

JENKINS, P. J.; CAMERON, R. E.; DONALD, A. M., 1993, “A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources”, *Starch*, v.45, pp. 417- 420.

JYOTHI SRI.S, SEETHADEVI, A.; PRABHA, K.S., MUTHUPRASANNA, P.; PAVITRA, P., 2012, “Microencapsulation: a review”, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 3, pp. 509-531.

JONES, H.W.; WHITMORE, R.A., 1972, “Collagen Food Coating Composition and Method of Preparation”, In: U.S.P. Office (Ed.) United States of America.

KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation/phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of Pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel-Dekker, pp. 301-328, 2000.

KESENTE, M.; KAVETSOU, E.; ROUSSAKI, M.; BLIDI, S.; LOUPASSAKI, S.; CHANIOTI, S.; SIAMANDOURA, P.; STAMATOIANNI, C.; PHILIPPOU, E.; PAPASPYRIDES, C.; VOUYIOUKA, S.; DETSI, A., 2017, “Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation.”, *Bioengineering*, v. 4, pp. 75.

KOZLOV, P. V.; BURDYGINA, G.I., 1983, “The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification”, *Polymer*, v. 24, pp. 651-666.

KONG, L.; BHOSALE, R.; ZIEGLER, G. R., 2018, “Encapsulation and stabilization of  $\beta$ -carotene by amylose inclusion complexes.”, *Food Research International*, v. 105, pp. 446-452.

KUBOTA, N. E.Y., 1997, “Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility”, *Polymer Journal*, v. 29, pp. 123.

KUMAR, M.N.V.R., 2000, “A review of chitin and chitosan applications”, *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, n° 1, pp. 27.

KUREK, M.; BRACHAIS, C-H.; NGUIMJEU, C. M.; BONNOTTE, A.; VOILLEY, A.; GALI, K., COUVERCELLE, J-P.; DEBEAUFORT, F., 2012, “Structure and thermal properties of a chitosan coated polyethylene bilayer film”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 97, pp. 1232 - 1240.

KAUSHIK, V., ROOS, Y. H., 2007, “Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems”, *LWT*, v. 40, pp. 1381–1391.

KIM, C., 2011, “Preparation Method for Biodegradable Micro-Particles Containing rugs”, Patente n° 8034382, United States Patent, Little Rock, AR, USA.

KIM, J. U.; KIM, B.; SHAHBAZ, H. M.; LEE, S. H.; PARK, D.; PARK, J., 2017, “Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage.”, *International journal of food science & technology*, v. 52, pp. 519-530.

KIM, Y.; YOO, B., 2010, “Effects of cross-linking on the rheological and thermal properties of sweet potato starch Bea-Starch”, *Stärke*, v. 62, pp. 577–583

KUNIAK, L.; MARCHESSAULT, R.H., 1972, “Study of the crosslinking reaction between epichlorohydrin and starch”, *Starch/Stärke*, v. 24, pp. 110-116.

LAKKIS, J. M. “Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems” First edition, 2007.

LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; MACHADO, R. A. F.; BOLZANA, A., 2009, “Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology”, *Materials Science and Engineering*, Lausanne, v. 29, n° 2, pp. 430-436.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M. P., 1998, “Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce: um estudo de caso”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, n° 3, pp. 343-345.

LI, J. Z., “The Use of Starch-Based Materials for Microencapsulation.” In: GAONKAR, A. G., VASISHT, N., KHARE, A. R., SOBEL, R., *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*, Part IV, Chapter 18, pp. 195-209, 2014.

LI, R., WANG Y., JIANG, Z. 2010, Chemical Composition of the Essential Oils of *Cinnamomum loureirii* Nees. From China Obtained by Hydrodistillation and Microwave-assisted Hydrodistillation, *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, pp. 129-131.

LI, Y., KONG, D., WU, H., 2013, “Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy”, *Industrial Crops and Products*, v. 41, pp. 269-278.

LIU, H., RAMSDEN, L, CORKE, H., 1999, “Physical Properties of Cross-linked and Acetylated Normal and Waxy Rice Starch”, *Starch/Stärke*, v.51, n. 7, pp. 249–252.

LIU, H.; XIE, F.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L., 2009, “Thermal processing of starch-based polymers”, *Progress in Polymer Science*, v. 34, pp. 1348–1368.

LIU, X.F.; GUAN, Y.L.; YANG, D.Z.; LI, Z.; YAO, K.D., 2001, “Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan” *Journal Applied Polymer Science*, v. 79, pp. 1324–1335.

LIU, Z., “Edible films and coatings from starches”, In: HAN, J. H. (Ed.). *Innovations in food packagings*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands,. pp. 318-336, 2005.

LU, W.; MA, M.; XU, H.; ZHANG, B.; CAO, X.; GUO, Y., 2015, “Gelatin nanofibers prepared by spiral-electrospinning and cross-linked by vapor and liquid-phase glutaraldehyde.”, *Materials Letters*, v. 140, pp. 1-4.

MA, M., TAN, L., DAI, Y., ZHOU, J., 2013, “An investigation of flavor encapsulation comprising of regenerated cellulose as core and carboxymethyl cellulose as wall.” *Iran Polymer Journal*, v. 22, pp. 689–695.

MAKISHI, G.; LACERDA, R.; BITTANTE, A.; CHAMBI, H.; COSTA, P.; GOMIDE, C.; CARVALHO, R.; SOBRAL, P., 2013, “Films based on castor bean (*Ricinus communis* L.) proteins crosslinked with glutaraldehyde and glyoxal, *Industrial Crops and Products*, v. 50, pp. 375-382.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S., 2006, “Flavour encapsulation and controlled release: a review”, *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 41, n° 1, pp. 1-21.

MACHADO, J.C.; SHIMIZU, F. M.; ORTIZ, M.; PINHATTI, M. S.; CARR, O.; GUTERRES, S. S.; JR, O. N. O.; VOLPATO, N. M., 2018, “Efficient Praziquantel Encapsulation into Polymer Microcapsules and Taste Masking Evaluation Using an Electronic Tongue”, Šipailienė, A. & Petraitytė, S. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, v. 10, pp. 1.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C., 2007, “Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, n° 2, p. 166-179.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F., 2010, “Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização”. *Semana Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n° 1, pp. 137-156.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., GARCIA, M. A., MARTINO, M. N., ZARITZKY, N., 2006, “Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources”, *Journal of food engineering*, v. 75, pp. 453-460.

MANO, E.B., MENDES, L.C., 1999, “Introdução à Polímeros”, 2ª ed., São Paulo, Edgard Blücher LTDA.

MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIE`RE, J.M., VIANO, J., 2003. “Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, pp. 7115–7121.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J., 2011, “Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds” *Food Hydrocolloids*, v. 25, pp. 1865 e 1880.

MATTIODA, G., BLANC, A., 2011, “Glyoxal”, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, v. 17, pp. 83-87.

MENG, Y.; CLOUTIER, S., “Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation.” In: GAONKAR, A. G., VASISHT, N., KHARE, A. R., SOBEL, R., *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*, Part IV, Chapter 20, pp. 227-236, 2014.

MI, F.L.; SUNG, H.W.; SHYU, S.S., 2000, “Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker”, *Journal Polymer Science Part A Polymer Chemistry*, v.38, pp. 2804– 2814.

MI, F. L.; KUAN, C.Y.; SHYU, S. S.; LEE, S. T.; CHANG, S. F., 2000, “The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release”, *Carbohydrate Polymers*, v. 41, pp. 389-396.

MILIÁNA, Y.E.; GUTIÉRREZA, A.; GRÁGEDAA, M.; USHAKA, S., 2017, “A review on encapsulation techniques for inorganic phase change materials and the influence on their thermophysical properties.”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 7, pp. 983–999.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*. Chapter 20. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005

MOHANTY, B.; BOHIDAR, H. B., 2003, “Systematic of alcohol-induced simple coacervation in aqueous gelatin solutions”, *Biomacromolecules*, v. 4, pp. 1080-1086.

MONTEIRO, O.A.C., AIROLDI, C., 1999, “Some studies of crosslinking chitosan glutaraldehyde interaction in a homogeneous system”, *International journal biology macromolecules*, v. 26, pp. 119–128.

MONTEIRO, C. L. B., 1984, “Técnicas de Avaliação sensorial. 2. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, CEPPA, pp. 101.

MOUFIDA, S., MARZOUK, B., 2003, “Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange”, *Phytochemistry*, v. 62, pp. 1283-1289.

MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M.; GIL, M. H., 2007, “Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels”, *Biomacromolecules*, v. 8, pp. 3823-3829.

MURÚA-PAGOLA, B.; BERISTAIN-GUEVARA, C. I.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F., 2009, “Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying”, *Journal of Food Engineering, Essex*, v. 91, nº 3, pp. 380-386.

MUZZARELLI, R.A.A., 2009, “Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids”, *Carbohydrate Polymer*, v. 77, pp. 1–9.

NAIRN, J. G., 1995, “Coacervation-phase separation technology”, In: *Advances in Pharmaceutical Science*, Gauderton, Jones, B. T.; McGinity, J., pp. 93–219.

NAKAGAWA, K., NAGAO, H., 2012, “Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin–acacia complex coacervation”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 411, pp. 129–139.



NASTRUZZI, C.; PASTESINI, C.; CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; GAMBARI, R.; MENEGATTI, E., 1994, “Production and in vitro evaluation of gelatin microspheres containing an antitumor tetra-amidine”, *Journal Microencapsulation*, v. 11, pp. 249-260.

NICKERSON, M.T., FARNWORTH, R., WAGAR, E., HODGE, S.M., ROUSSEAU, D., PAULSON, A.T., 2006, “Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin–maltodextrin hydrogels”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, pp. 40–44.

NIAOUNAKIS, M., 2015. *Biopolymers: Applications and trends*. Waltham, USA, Elsevier.

ODIAN, G. “Principles of Polymerization”, 4<sup>a</sup> ed., New Jersey, John Wiley & Sons, 2004.

ORDOÑEZ, M.; HERRERA, A., 2014, “Morphologic and stability cassava starch matrices for encapsulating limonene by spray drying.”, *Powder Technol*, v. 253, pp. 89-97.

OS AROMAS E OS ALIMENTOS, *Revista Aditivos & Ingredientes*, v. 59, pp. 28-37. Disponível em: [http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/88.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/88.pdf). Acesso em 02 de março de 2016.

PARRA, D.F.; TADINI, C.C; PONCE, P.; LUGÃO, A.B., 2004 “Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films”, *Carbohydrate Polymers*, 58, 475-481.

PARRIS, N., COOKE, P.H., HICKS, K.V., 2005, “Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, pp. 4788–4792.

PARKER, R.; RING, S.G., 2001, “Aspects of the physical chemistry of starch”, *Journal of Cereal Science*, v.34, pp.1-17.

PATASHNIK, S., RABINOVICH, L., GOLOMB, G., 1997, “Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing bisphosphonates” *Journal of Drug Targeting*, v. 4, pp. 371 – 380.

PARK, S.; BAE, D.; RHEE, K., 2000, “Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, pp. 879-884.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H., 2000, “Hydrogels in pharmaceutical formulations”, *European Journal Pharmaceutical Biopharmaceutics*, v. 50, pp. 27-46.

PAULA, H. C. B.; OLIVEIRA, E. F.; ABREU, F. O. M. S.; PAULA, R. C. M.; MORAIS, S. M.; FORTE, M. M. C., 2010, “Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm”, *Polímeros*, v. 20, nº 2, pp. 112-120.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F.M., “Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications”, In: M.N. BELGACEM & A. GANDINI, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 1ª ed., Cap. 25, Oxford, Elsevier, 2008.

PERREIRA, A. C.; PEARSON, S.; KOSTADINOVA, D.; LEROUX, F.; D'AGOSTO, F.; LANSALOT, M.; PRÉVOT, V., 2017, “Nanocomposite latexes containing layered double hydroxides via RAFT-assisted encapsulating emulsion polymerization.”, *Polymer Chemistry*, v. 8, pp. 1233-1243

PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. “Introduction to food proteins”, In: P. HILLIPS G. O. AND WILLIAMS, P. A., “*Handbook of food proteins*”, Chapter I, pp. 1-12, 2011.

POLITEO, O., JUKIC, M., MILOS, M., 2007, “Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum L.*) compared with its essential oil”, *Food Chemistry*, v. 101, pp. 379-385.

PORZIO, M., 2013, “Two challenging flavor systems: citrus oils and vanilla extracts.”, *Perfum. Flavor* 38, v. 24, pp. 26–27.

RAO, K. M.; RAO, K. K.; RAMANJANEYULU, G.; HA, C. S., 2015, “Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery”, *International journal of pharmaceutics*, v. 478, pp. 788-795

RADULOVIĆ, N. S., BLAGOJEVIĆ, P. D., MILTOJEVIĆ, A. B., “ $\alpha$ -Linalool—a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum L.*) essential oils” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, pp. 3292-3303.

RAJA MOHD HAFIDZ, R. N., YAAKOB, C. M., AMIN, I., NOORFAIZAN, A., 2011, “Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin”, *International Food Research Journal*, v. 18, pp. 813-817.

RATANAVARAPORN, J.; RANGKUPAN, R.; JEERATAWATCHAI, H.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S., 2010, “Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats.”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 47, Issue 4, pp. 431-438.

REINECCIUS, G. A. “Flavor encapsulation”, *Food Reviews International*, 1989.

REINECCIUS, G., “Chemistry Flavor and Technology”. 2<sup>o</sup> Edition, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway, NW, Suite 300 Boca Raton, FL, pp. 33487-2742, 2006.

REINECCIUS, G., 2017, “Aroma Encapsulation and Controlled Delivery. In: Buettner A. (eds) *Springer Handbook of Odor*. Springer Handbooks. Springer.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G., “Química de Alimentos”, São Paulo, Edgard Blücher, 2004.

RINAUDO, M., 2006, “Chitin and chitosan: Properties and applications”, *Progress Polymer Science*, v.31, pp. 603–632.

RINAUDO M, DOMARD A. “Solution properties of chitosan.” In: SKJAK-BRAEK, G., ANTHONSEN, T., SANDFORD P. (eds), *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, London and New York, Elsevier; pp. 71–86, 1989.

ROBERTS, G.A.S. *Chitin Chemistry*, London, Macmillan Press, 1992.

ROSENTHAL, F. R. T.; ESPINDOLA, A. M., C., 1982, “Notas sobre amidos de ligação cruzada”, *Instituto Nacional de Tecnologia*, v. 30, pp. 11-16.

ROUSSENOVA, M. ENRIONE, J, DIAZ-CALDERON, P. TAYLOR, A. J. UBBINK, J. ALAM, M. A., 2012, “A nanostructural investigation of glassy gelatin oligomers: molecular organization and interactions with low molecular weight diluents”, *New Journal of Physics*, 14.

ROWE, D. J. “Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances” Blackwell Publishing Ltd., 2005.

RUDNIK, E., “Compostable Polymer Materials”, Oxford, Elsevier, 2008.

RUTENBERG, M. W.; SOLAREK, D., “Starch derivatives: Production and uses”, In: R. L. WHISTLER, J. N. BEMILLER, & E. F. PASCHALL (Eds.), *Starch: chemistry and technology*, London, Academic Press, pp. 312–388, 1984.

SANTOS, B. F., 2012, “Microencapsulamento de medicamentos”, *Portal da educação*, <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/19978/microencapsulacao-de-medicamentos>, Acesso em 15/04/2015.

SARLAK, N.; TAHERIFAR, A., 2017, “Encapsulation of Nanomaterials and Production of Nanofertilizers and Nanopesticides: Insecticides for Agri-food Production and Plant Disease Treatment. In: GHORBANPOUR M., MANIKA K., VARMA A. (eds) *Nanoscience and Plant–Soil Systems*. Soil Biology, vol 48. Springer.

SANTOS, A. M.; DANTAS, I. C., 2008, “Possíveis efeitos tóxicos das plantas que constituem a bebida “pau-do-índio”, *Revista de biologia e farmácia*, v. 2, nº 22, pp. 64-81.

SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Química analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F., 2000, “Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica”, *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.3, n.16, pp.26-30.

SCHRIEBER, R., GAREIS, H., 2007, “Gelatin handbook-Theory and industrial practice”, Alemanha, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SCHMITT, C., ABERKANE, L., SANCHEZ, C., “Protein-polysaccharide complexes and coacervates”, In: PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A., *Handbook of hydrocolloids*, 2 ed., cap 16, CRC Press, 2009.

SHAHIDI, F., & HAN, X. Q., 1993, “Encapsulation of food ingredients” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, pp. 501–547.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R., 2000, “Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts”, *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55, pp. 139-144.

SHARMA, P.; LOCHAB, B.; KUMAR, D.; ROY, P. K., 2015, “Interfacial encapsulation of bio-based benzoxazines in epoxy shells for temperature triggered healing.”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132.

SILVA, N.A.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, R.A., 2006, “Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia”, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. 3, pp. 52-55.

SILVA, G. O.; TAKIZAWA, F. F; PEDROSO, R. A; FRANCO, C. M. L.; LEONEL, M.; SARMENTO, S. B. S.; DEMIATE, I. M., 2006, “Características físicas químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil” *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 1, pp. 188-197.

SILVEIRA, S. M., CUNHA, A. Jr., SCHEUERMANN, G. N., SECCHI, F. L., VERRUCK, S., KROHN, M., VIEIRA, C. R. W., 2013, “Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon winterianus*(citronella),*Eucalyptus paniculata*(eucalyptus) and *Lavandula angustifolia* (lavender)”, *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n° 3, pp. 471-80.

SIMON, J. E., QUINN, J., MURRAY, R. G., “Basil: a source of essential oils”, *Advances in new crops*, pp. 484-489.

SINGH N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S., 2003 “Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources”, *Food Chemistry*, v. 81, pp. 219–231.

SINGH, J.; KAUR, L.; MCCARTHY, O.J., 2007, “Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review”, *Food Hydrocolloids*, v. 21, pp. 1–22.

SHAHIDI, F., ARACHCHI, J.K.V., JEON, Y.J., 1999, “Food Applications of Chitin and Chitosan”, *Trends in Food Science & technology*, v. 10, pp. 37 – 51.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E., 2007, “Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca”, *Ciências Agrárias*, v. 28, nº 1, pp. 79-88.

SHIRAI, M.A.; GROSSMANN, M.V.E.; MALI, S.; YAMASHITA, F.; GARCIA, P.S.; MÜLLER, C.M.O., 2013, “Development of biodegradable flexible films of starch and poly(lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters”, *Carbohydrate Polymers*, v. 92, pp. 19– 22.

SONG, J.S., SUCH, C.H., PARK, Y.B., LEE, S.H.; YOO, N.C.; LEE, J.D.; KIM, K.H.; LEE, S.K., 2001, “A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis”, *European Journal Nuclear Medicine*, v. 28, pp. 489– 497.

SONGKRO, S., HAYOOK, N., JAISAWANG, J., MANEENUAN, D., CHUCHOME, T., KAEWNOPPARAT, N., 2012, “Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with  $\beta$ -cyclodextrin for mosquito repellent”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 72, pp. 339-355.

- SOSA, N.; SCHEBOR, C.; PÉREZ, O. E., 2014, “Encapsulation of citral in formulations containing sucrose or trehalose: Emulsions properties and stability”, *Food and bioproducts processing*, v. 92, pp. 266–274.
- SOUZA, R.C., ANDRADE, T.C., 2000, “Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, pp. 24-30.
- SPADA, J.C.; NOREÑA, C.P.Z.; MARCZAK, L.D.F.; TESSARO, I.C, 2012, “Study on the stability of  $\beta$ -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch.”, *Carbohydrate Polymer*, v. 89, pp. 1166-1173.
- STAINSBY, G. “Gelatin gels.” In: A. M. PEARSON, T. R. DUTSON, & A. J. BAILEY (eds.), *Advances in meat research, collagen as a food*, New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc, v. 4, pp. 209 - 222, 1987.
- SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A., 2012, “Preparação de Nanopartículas Poliméricas a Partir de Polímeros Pré-formados – Parte II”, *Polímeros*, v. 22, pp. 101-106.
- SUAVE, J.; DALL’AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; \*MEIER, M. M.; SOLDI, V., 2006, “Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas”, *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, nº 2, pp. 12-20.
- SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T., 2000, “Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 1-21.
- SURBURG, H. E PANTEN, J. “Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses” 5º Ed. Copyright F2006WILEY-VCHVerlagGmbH&Co. KGaA, Weinheim
- SWINKELS, J. J. M., 1985, “Composition and Properties of Commercial Native Starches”, *Starch*, v.37, nº 1, pp. 1 – 5.
- TAGGART, P., MITCHELL, J. R., “Starch”, In: PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A., *Handbook of hydrocolloids*, 2ª ed., chapter 5, Woodhead Publishing Limited, pp. 108 – 140, 2009.

TASSELLI, F.; MIRMOHSENI A.; SEYED DORRAJI, M.S.; FIGOLI, A., 2013, “Mechanical, swelling and adsorptive properties of dry–wet spun chitosan hollow fibers crosslinked with glutaraldehyde”, *Reactive & Functional Polymers*, v. 73, p. 218–223.

TACKENBERG, M. W.; KRAUSS, R.; SCHUCHMANN, H. P.; KLEINEBUDDE, P., 2015, “Encapsulation of orange terpenes investigating a plasticisation extrusion process.”, *Journal of microencapsulation*, v. 32, pp. 408-417.

THAKUR, G., MITRA, A., ROUSSEAU, D., BASAK, A., SARKAR, S., PAL, K., 2011, “Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, pp. 115-123.

TIAN, Z.; LIU, W.; LI, G., 2016, “The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 130, pp. 264-270.

TIETZ, M., BUETTNER, A., CONDE-PETIT, B., 2007, “Starch flavor interactions: impact of starch structure and release from food model systems”, In: Hofmann, T., Meyerhof, W., Schieberle, P. (Eds.), *Recent Highlights in Flavor Chemistry & Biology*, Eisenach, pp. 429-432.

TIKHONOV V.E.; STEPNOVA, E.A.; BABAK, V.G.; YAMSKOV, I.A., 2006, “Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N/2(3)-(dodec-2-enyl) - succinoyl-derivatives”, *Carbohydrate Polymers*, v. 64, pp. 66 – 72.

TORRES MA, AIMOLI CG, BEPPU MM, FREJLICH J., 2005, “Chitosan membrane with patterned surface obtained through solution drying”, *Colloid Surface A*, v. 268, pp. 175-179

TROMMSDORFF, U., TOMKA, I., 1995, “Structure of amorphous starch. 1. An atomistic model and X-ray scattering study”, *Macromolecules*, v. 28, pp. 6128 - 6137.

VAN SOEST, J. J. G; VLIEGENTHART, J. F. G., 1997, “Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties”, *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 6, pp. 208- 213.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K., 2009, “Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles”, *Pharmaceutical Research*, v. 26, nº 5, pp. 1025-1058.



VANDELLIA, M. A., ROMAGNOLI, M., MONTI, A., GOZZI, M., GUERRA, P., RIVASI, F., FORNI, F., 2004, “Microwave-treated gelatin microspheres as drug delivery system”, *Journal of Controlled Release*, v. 96, pp. 67–84.

VANIER, N. L.; EL HALAL, S. L. M.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. D. R., 2017, “Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: A review”, *Food Chemistry*, v. 221, pp. 1546–1559.

VEENDAM, J. J. M. S., 1985, “Composition and Properties of Commercial Native Starches”, *Starch*, v. 37, nº 1, S. 1-5.

VIVEK R. DHOLE, B. SITHARAMAN, INDERJIT KAUR THE, 2018, “Characterization and Identification of Essential Oil Components by GC-MS”, Application Note, *Thermo Fisher Scientific*, n. 21603.

VISHWAKARMA, G. S., GAUTAM, N., BABU, J. N., MITTAL, S., JAITAK, V., 2016, “Polymeric Encapsulates of Essential Oils and Their Constituents: A Review of Preparation Techniques, Characterization, and Sustainable Release Mechanisms”, *Polymer Reviews*, v. 56, pp. 668-701.

VON ENDT, D. W.; BAKER, M. T., “The Chemistry of Filled Animal Glue Systems”, <http://albumen.conservation-us.org/library/c20/vonendt1991.html>, Acesso em 18/02/2015.

VORA, JD., MATTHEWS, RF., CRANDALL, PG., COOK, R., 1983, “Preparation and chemical composition of orange oil concentrates”, *Journal of Food Science*, v. 48, p. 1197-1199.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; FARHAD, I.; MITCHELL, J., 2005, “Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state”, *Polymer*, v. 46, pp. 12577-12585.

YAMADA K.; CHEN, T.H.; KUMAR, G.; VESNOVSKY, O.; TOPOLESKI, L.D.T.; PAYNE, G.F., 2000, “Chitosan based water-resistant adhesive”, Analogy to mussel glue, *Biomacromolecular*, v. 1, p. 252– 258.

YANNAS, I. V., 1972, “Collagen and gelatin in the solid state.” *Journal Science Reviews Macromolecules Chemical*. C1, v.1, pp. 49-104.

YONEMOTO, P. G.; DOMINGUES, M. A. C., FRANCO, C. M. L., 2007 “Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27(4), pp. 761-771.

YOSHII, H., SOOTTITANTAWAT, A.; LIU, X. D., ATARASHI, T., FURUTA, T., AISHIMA, S., OHGAWARAB, M., LINKOC, P., 2001, “Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum Arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity”, *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, v. 2, pp. 55–61.

YOUNG, H., “Fractionation of starch”, In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.), *Starch chemistry and technology*, 2ª ed., Orlando, USA: Academic Press, pp. 249-283, 1984.

YOUNG S, WONG M, TABATA Y, MIKOS A G., 2005, “Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules”, *Journal of Controlled Release*, v. 109, pp. 256-274.

YU, Y.; ZOU, H. T.; WANG, J.; Xu, M.; LIU, Y.; ZHANG, Y. L., 2012, “Preparation and properties of modified polyvinyl alcohol film for encapsulation of fertilizer [J]”, *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, v. 5, pp. 031.

WAY, D. V., 2013, *Estudo da reação de produção de partículas de gelatina para aplicação na liberação controlada de doxiciclina*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

WAY, D. V., NELE, M., PINTO, J. C., 2017, “Production of doxycycline-loaded gelatin microspheres through thermal treatment in inverse suspensions”, *Polym Eng Sci*, pp. n/a-n/a.

WANG, T., TURHAN, M., GUNASEKARAN, S. 2004, “Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel”, *Polymer Internacional*, v. 53, pp. 911-918.

WANG, R., WANG, R., YANG, B., 2009. “Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. Innovative”, *Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, pp. 289–292.

WANG, B.; AKANBI, T. O.; AGYEI, D.; HOLLAND, B. J.; BARROW, C. J., 2018, “Coacervation Technique as an Encapsulation and Delivery Tool for Hydrophobic Biofunctional Compounds.” In *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, pp. 235-261.

WAINWRIGHT, F. W. “Physical tests for gelatin and gelatin products”, In: A. G. WARD, & A. COUTS (eds.), *The science and technology of gelatin*. New York: Academic Press, pp. 507 – 534, 1977.

WATTANCHANT, S.; MUHAMMAD, K.; HASHIM, D.; RAHMAN, R. A., 2003, “Effect of cross-linking reagents and hydroxypropylation levels on dual-modified sago starch properties”, *Food Chemistry*, v. 80, pp. 463–471.

WEN, P.; ZHU, D. H.; WU, H.; ZONG, M. H.; JING, Y. R.; HAN, S. Y., 2016, “Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging.”, *Food Control*, v. 59, pp. 366-376

WELZ, M.M.; OFNER, C. M., 1992, “Examination of Self-Crosslinked Gelatin as a Hydrogel for Controlled Release”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 81, nº 1, pp. 85.

WILSON, N.; SHAH, N.P, 2007, “Microencapsulation of Vitamins” *ASEAN Food Journal*, v. 14 (1), pp. 1-14.

WILLIAMS, P. A. “Gelling agents”, In: P. A. Williams (Ed.), *Handbook of industrial water soluble polymers* (). Oxford, UK: Blackwell Publishing, pp. 73-97, 2007.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. *Starch: Chemistry and Technology*. Academic Press, Cambridge, pp. 1, 1984.

WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J.N., “Polysaccharides and Their Derivatives”, *Industrial Gums*, 3ª ed., New York, Academic Press. pp. 619, 1993.

WHISTLER, R.L. AND J.R. DANIEL, “Carboidratos”, *Química de los alimentos*, O.R. Fennema, Editor, Acricbia: Zaragoza, p. 81-156, 1993.

WOLF, F.A.” Collagen and gelatin”, *Progress in Biotechnology*, v. 23, Chapter V, 2003.

WONGSAGONSUPA, R.; PUJCHAKARN, T.; JITRAKBUMRUNG, S.; CHAIWAT, W.; FUONGFUCHAT, A.; VARAVINIT, S.; DANGTIPE, S.; SUPHANTHARIKA, M., 2014, “Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product”, *Carbohydrate Polymers*, v.101, pp. 656–665.

WOO, K. S.; SEIB, P. A., 1997, “Cross-linking of wheat starch and hydroxypropylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate”, *Carbohydrate Polymers*, v. 33, pp. 263–271.

WURZBURG, O. B., 1986a, “Nutritional aspects and safety of modified food starches”, *Nutrition Reviews*, v. 44, pp. 74–79.

WURZBURG, O. B., 1986b, “Cross-linked starches”, In: O. B. WURZBURG (Eds.), *Modified starches Properties and uses*, Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 41–53.

ZAWADZKI, S. F., PERUSSELLO, C. A., MÜLLER, P. S., SCHEER, A. P., 2016, “Encapsulation efficiency and thermal stability of orange essential oil microencapsulated by spray drying and by coacervation”, *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 34.

XIE, G.; PAN, P.; BAO, Y, 2017, “Morphology and blowing agent encapsulation efficiency of vinylidene chloride copolymer microspheres synthesized by suspension polymerization in the presence of a blowing agent”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 134.

ZHANG, L.; ZENG, M., “Proteins as Sources of Materials”, In: M.N. BELGACEM & A. GANDINI, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 1º ed., Cap. 23, Oxford, Elsevier, 2008.

ZHANG, Y.Z.; VENUGOPAL, J.; HUANG, Z.M.; LIM, C.T.; RAMAKRISHNA, S., 2006, “Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers”, *Polymer*, v. 47, pp. 2911–2917.

ZHU, Y.; GAO, C.; HE, T.; SHEN, J., 2004, “Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin”, *Biomaterials*, v. 25, pp.423–430.

ZHOU, T.; ZHANG, K.; KAMRA, T.; BÜLOW, L.; YE, L., 2015, “Preparation of protein imprinted polymer beads by Pickering emulsion polymerization”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 3, pp. 1254-1260

## *Apêndice A*

### *Caracterização da gelatina PhEur*

A gelatina utilizada neste trabalho foi cuidadosamente caracterizada por Way (2013). É indispensável conhecer as características do produto utilizado, uma vez que, a depender do tipo de tratamento a que são submetidas e da origem que tiveram, as gelatinas apresentam diferenças que podem exercer influencia muito significativa nos resultados obtidos.

- **Avaliação da massa molar**

A análise da massa molar realizada para gelatina PhEur é apresentado na Tabela 4. 27.

Tabela 4. 27. Massa molar da gelatina comerciais (PhEur) obtidas através de análise de GPC

	Gelatina PhEur
Mn (g/gmol)	67275
Mw (g/gmol)	196607
Mz (g/gmol)	526420
Mw/Mn	2,9

- **Avaliação do pH**

O resultado da análise de pH encontrado foi de 5,76, para medida realizada à 60 °C. Provavelmente, a gelatina foi obtida por condicionamento em meio ácido.

- **Composição da gelatina**

A análise de composição da gelatina é apresentada na Tabela 4. 28.

Tabela 4. 28. Resultados da análise de composição de aminoácidos da gelatina comerciais

Gelatina PhEur	
Aminoácido	Composição (%)
Hidroxiprolina	13,47
Ácido aspártico e Asparagina	5,51
Serina	2,82
Ácido glutâmico e Glutamina	10,11
Glicina	21,18
Histidina	1,32
Arginina	8,67
Treonina	1,86
Alanina	8,60
Prolina	13,14
Cisteína	0,00
Tirosina	0,65
Valina	2,09
Metionina	0,71
Lisina	3,93
Isoleucina	1,23
Leucina	2,82
Fenilalanina	1,99
Triptofano	0,00

## Apêndice B

### Avaliação da quantidade de íons na água

A avaliação da quantidade de íons na água foi realizada com formulação da reação padrão (Seção 3.2) com a variação da água do meio. Foram realizadas reações com água deionizada, água destilada e água da torneira.

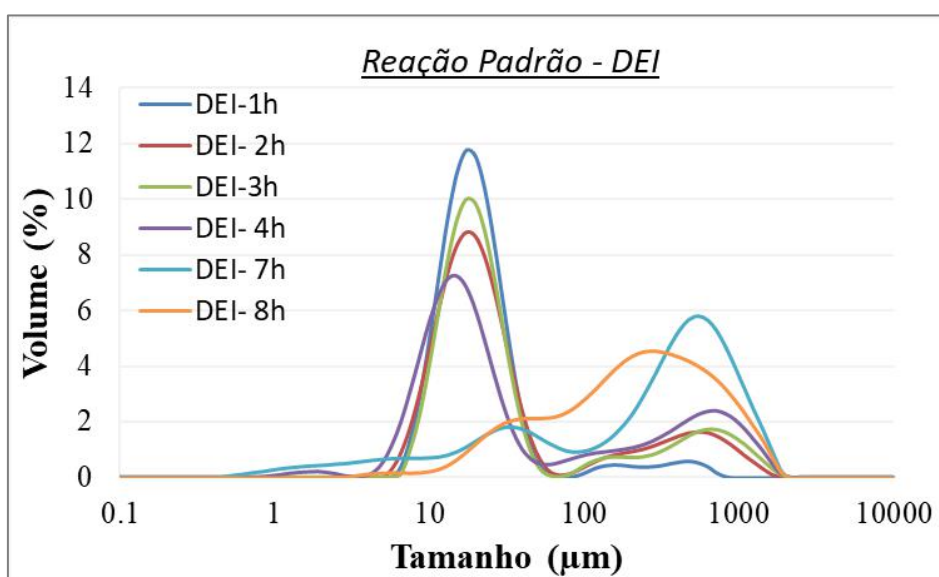


Figura 4. 96. Perfil de distribuição de tamanho de partículas de gelatina obtidos de reações com água deionizada ao longo do tempo.

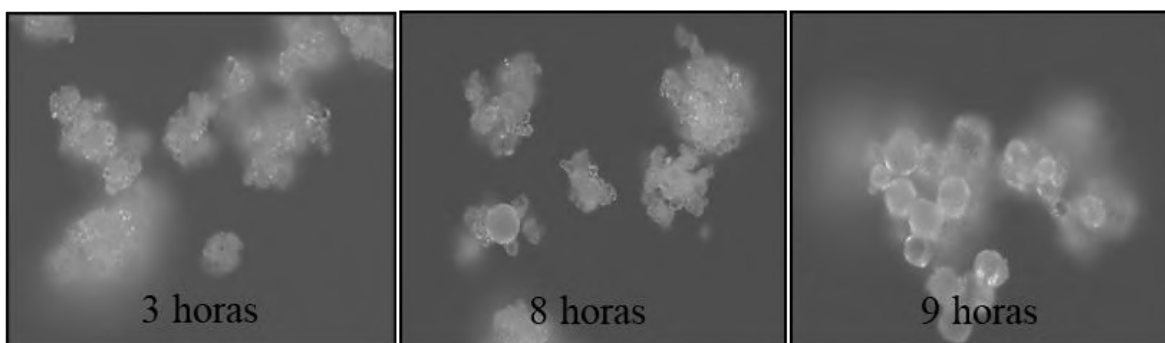


Figura 4. 97. Imagens de microscopia óptica de partículas de gelatina obtidas de reações com água deionizada ao longo do tempo.



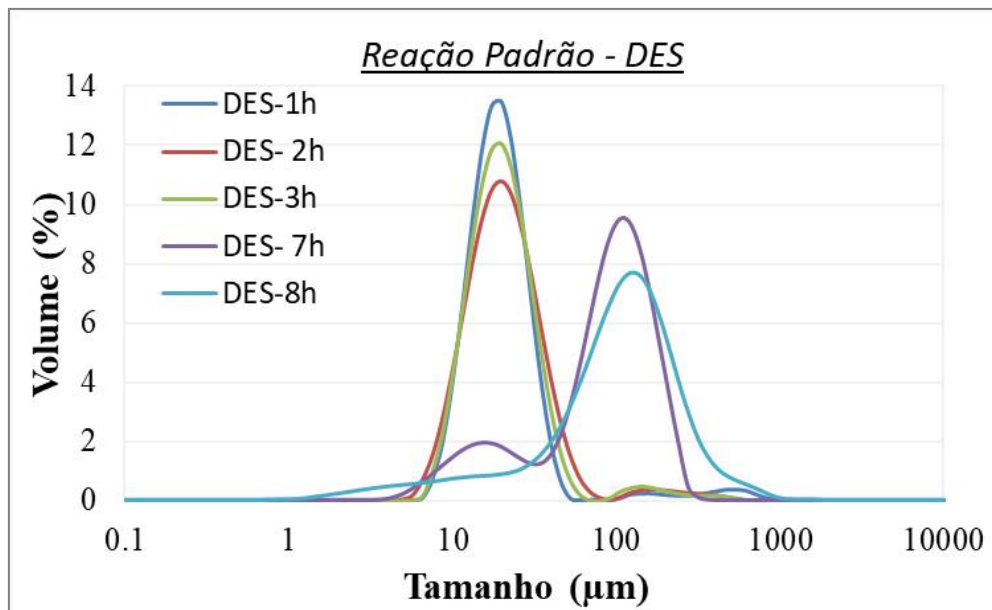


Figura 4. 98. Perfil de distribuição de tamanho de partícula de gelatina de reações com a água destilada ao longo.

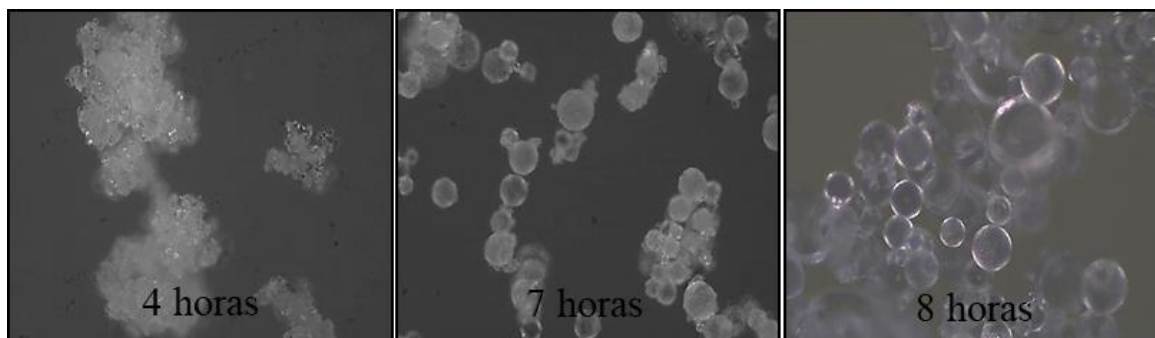


Figura 4. 99. Imagens de microscopia óptica de partículas de gelatina obtidas de reações com água destilada ao longo do tempo.

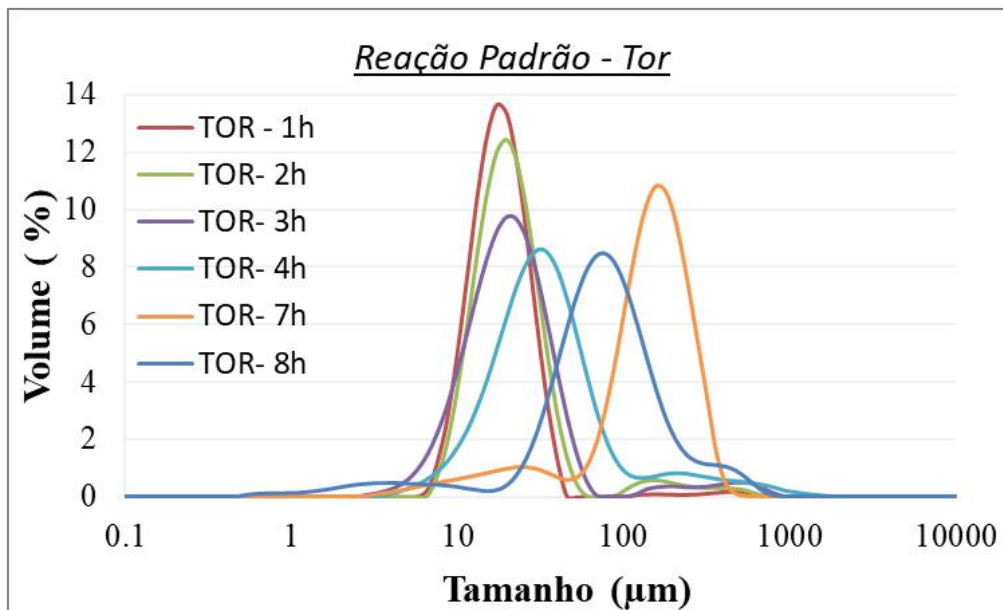


Figura 4. 100. Perfil de distribuição de tamanho de partícula de gelatina de reações com água da torneira ao longo do tempo.

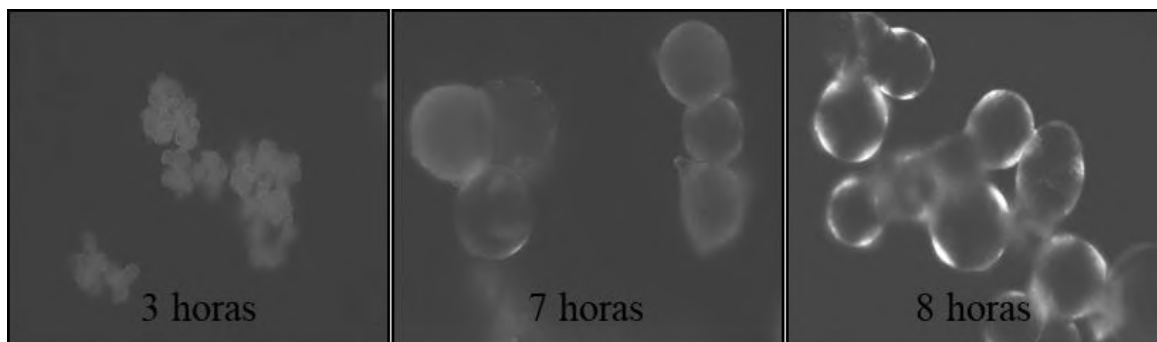


Figura 4. 101. Imagens de microscopia óptica de partículas de gelatina obtidas de reações com água da torneira ao longo do tempo

