



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA  
FEDERAL DO PARANÁ**  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de  
Alimentos

**MICROENCAPSULAÇÃO DE CORANTE NATURAIS EM  
MICROESFERAS DE QUITOSANA PREPARADAS PELO MÉTODO  
DE COACERVAÇÃO**

**Grasiele Mônica Matté**

**Medianeira/Campo Mourão**

**2013**

**Grasiele Mônica Matté**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE CORANTES NATURAIS EM  
MICROESFERAS DE QUITOSANA PREPARADAS PELO MÉTODO  
DE COACERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

**Medianeira/Campo Mourão**

**2013**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

LM33p Matté, Grasielle Mônica

Microencapsulação de corante naturais em microesferas de quitosana preparadas pelo método de coacervação / Grasielle Mônica Matté – 2013.

104 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Sirlei da Rosa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Adsorção. 2. Quitosana. 3. Curcumina 4. Alimentos – Dissertações. I. Rosa, Sirlei da., orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219



## TERMO DE APROVAÇÃO

### MICROENCAPSULAÇÃO DE CORANTES NATURAIS EM MICROESFERAS DE QUITOSANA PREPARADAS PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO

Por

**GRASIELE MONICA MATTÉ**

Essa dissertação foi apresentada às dezenove horas do dia doze de julho de dois mil e treze, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa - Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Sirlei da Rosa (Orientadora)

Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler (Membro interno - UTFPR)

Profa. Dra. Saraspathy Naidoo T. G. de Mendonça (Membro interno - UTFPR)

Prof. Dr. Helton José Alves (Membro externo - UFPR)

**Orientador**  
**Prof(a) Dr(a) Sirlei da Rosa**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de estar vivenciando este momento.

Aos meus pais Adilor e Domingas, pela vida, e anos de ensinamento e boa educação, sem vocês com certeza meu caminho não teria começado e não seria possível, obrigada pelo apoio incondicional e amor acima de tudo;

Aos meus irmãos: Angela, Marcio, Junior e Marcelo, meus companheiros eternos de batalhas e nesta não poderia ser diferente, sem vocês o caminho é sempre mais difícil o amor que sinto por vocês não tem tamanho. Aos meus cunhados-irmãos Andre e Francieli, pela torcida e felicidade com que recebem minhas notícias, Tayrine minha ouvinte, que além de escutar minhas lamentações também participou comigo neste projeto de várias maneiras, meu muito obrigado a vocês.

Ao meu carregador de energia, meu sobrinho amado, Martín, saiba que foi muito difícil resistir aos seus chamados para brincar enquanto tinha que terminar este projeto e que mesmo sem saber me deu mais força para continuar.

As minhas amigas de Mestrado, Juliana, Juliany, Rosana, Paula e Tania, pelas horas de atenção, pelos desabaços, pela força, sem vocês meu caminho seria mais pesado, com certeza as levarei comigo pra sempre. A amiga irmã de todas as horas Marcia, obrigada por todo apoio e ajuda.

Em especial ao meu companheiro de caminho, meu namorado Juliano, meu maior incentivador, se jamais pensei em desistir foi por você, sem você este caminho simplesmente não existiria e eu não estaria aqui podendo agradecê-lo por todo o apoio. Obrigada pela paciência nestes anos de trabalho.

À minha Professora Orientadora Sirlei da Rosa pelo companheirismo e pela sinceridade com que seguimos juntas nessa caminhada às vezes tortuosa, porém sempre juntas tentando encontrar o melhor caminho, mais um passo estamos dando agora, cresci e aprendi muito ao seu lado.

À UTFPR – Campus Medianeira e ao PPGTA (Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos), por toda a estrutura e apoio necessário para que este projeto tenha sido realizado.

Às Professoras Deisy e Saraspathy, por gentilmente aceitarem participar de mais este momento da minha vida acadêmica, por sempre estarem dispostas a me ouvir e me ajudar, e sem dúvida contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal, assim como ao Professor Helton J. Alves por fazer parte desta banca.

À Capes por todo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	9
INTRODUÇÃO .....	9
CAPÍTULO 2.....	13
APRESENTAÇÃO .....	13
CAPÍTULO 3.....	14
A TECNOLOGIA DA MICROENCAPSULAÇÃO ATRAVÉS DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	14
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 MICROENCAPSULAÇÃO.....	15
2.1 Micropartículas: Microesferas e Microcápsulas .....	16
2.2 Métodos de encapsulação .....	17
2.3 Agentes encapsulantes .....	17
3 QUITOSANA .....	18
4 MICROESFERAS .....	20
5 MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	21
5.1 Métodos para a preparação de microesferas de quitosana.....	21
5.2 Aplicações de microesferas de quitosana.....	22
6 CONCLUSÃO .....	25
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 4.....	29
ESTUDOS DA ATIVIDADE DE ÁGUA , DO GRAU DE INTUMESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS DE QUITOSANA PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO .....	29
1 INTRODUÇÃO .....	30
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
2.1 Materiais.....	31
2.2 Métodos.....	31
2.2.1 Preparação das Microesferas de quitosana.....	31
2.2.2 Determinação do Grau de intumescimento.....	31
2.2.3 Determinação da atividade de água.....	32
2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
3.1 Atividade de água.....	32
3.2 Determinação do Grau de intumescimento.....	33
3.3 Microscopia eletrônica de Varredura.....	35
4 CONCLUSÃO .....	36
CAPÍTULO 5.....	39
ADSORÇÃO COMPETITIVA DE CORANTES NATURAIS ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO COMO ADSORVENTE MICROESFERAS DE QUITOSANA OBTIDAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO .....	39
1 INTRODUÇÃO .....	40



2	MATERIAS E MÉTODOS .....	41
2.1	Materiais .....	41
2.2	Métodos .....	42
2.2.1	Preparação das microesferas das quitosana .....	42
2.2.2	Preparação das soluções dos corantes .....	42
2.2.3	Avaliação do comportamento do corante frente ao pH .....	42
2.2.4	Curva de calibração .....	42
2.2.5	Experimentos de adsorção .....	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1	Deslocamento do pH dos corantes .....	44
3.2	Construção das curvas analíticas das soluções .....	45
3.3	Efeito do pH dos corantes na adsorção .....	46
3.4	Cinética de adsorção .....	48
4	CONCLUSÕES .....	52
	REFERENCIAS .....	53
	CAPITULO 6.....	55
	ESTUDO DA ADSORÇÃO (IMPREGNAÇÃO) DOS CORANTES NATURAIS CURCUMINA E CARMIM DE COCHONILHA EM MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	55
1	INTRODUÇÃO .....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Materiais .....	57
2.2	Instrumentação .....	57
2.3	Métodos .....	57
2.3.1	Preparação das microesferas das quitosana .....	57
2.3.2	Preparação das soluções .....	58
2.3.3	Deslocamento do pH .....	58
2.3.4	Curva de calibração .....	58
2.3.5	Experimentos de adsorção .....	59
2.3.6	Isotermas de Adsorção .....	60
2.3.7	Determinação do Grau de intumescimento .....	61
2.3.8	Determinação da quantidade do corante encapsulado .....	61
2.3.9	Microscopia eletrônica de varredura .....	62
2.3.10	Estudo da liberação do corante .....	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
3.1	Curva de Calibração para os corantes individuais e em mistura .....	62
3.2	Deslocamento do pH para os corantes curcumina, carmim e a mistura Binária de ambos.65	
3.3	Efeito do pH na impregnação do corante curcumina, carmim e a mistura dos corantes em microesferas de quitosana .....	67
3.4	Estudo da Cinética de Adsorção dos corantes na microesfera de quitosana .....	68
3.5	Isotermas de adsorção de corantes individuais .....	72
3.5.1	Fração de superfície ocupada .....	75
3.6	Determinação da quantidade de corante encapsulado .....	77

3.7	Estudo da Liberação dos Corantes .....	77
3.8	Grau de Intumescimento .....	80
3.9	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	82
4	CONCLUSÃO .....	84
	REFERENCIAS .....	85
	CAPÍTULO 7.....	88
	ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE CORANTES NATURAIS IMPREGNADOS EM MICROESFERAS DE QUITOSANA E A APLICAÇÃO EM BALAS DE GELATINA.....	88
	RESUMO .....	88
1	INTRODUÇÃO .....	88
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1	Desenvolvimento das microesferas de quitosana impregnadas.....	90
2.2	Estudo da liberação dos corantes frente pH e Temperatura .....	90
2.3	Desenvolvimento da bala de gelatina .....	90
2.4	Determinação de cor por colorimetria .....	91
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
3.1	Estudo da Liberação dos Corantes carmim e curcumina em diferentes pHs e temperaturas.....	92
3.2	Avaliação Colorimétrica das Balas de Gelatina .....	97
4	CONCLUSÃO .....	99
	ABSTRACT .....	100
	REFERENCIAS .....	100
	CAPÍTULO 8.....	103
	CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS .....	103

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A cor de um alimento influencia diretamente na aceitação do produto e é o primeiro atributo a fornecer impressões ao consumidor, pois através da cor tem-se a noção do sabor e da qualidade de um alimento, sendo este, portanto, um fator importante a ser levado em consideração pela indústria.

Entretanto, não é somente a cor o grande desafio da indústria. Os corantes são adicionados aos alimentos a fim de torná-los mais atraentes e também para restituir a sua aparência original, a qual é afetada durante o processamento do produto, sendo este fator tão significativo, a indústria lança mão do uso destes aditivos. O uso de corantes artificiais, mais econômicos e mais estáveis às matrizes alimentares, faz destes os mais usados, porém, estes aditivos têm sido cada vez mais questionados pela população que possui a mentalidade de que o que é artificial traz malefícios à saúde. Com isso, tem-se a abertura do mercado para os pigmentos naturais, os quais apresentam o inconveniente de se mostrarem menos estáveis na presença de oxigênio, luz, acidez, temperatura, entre outros fatores, fazendo com que os corantes naturais percam o interesse por parte da indústria, por serem menos estáveis, e conseqüentemente, menos econômicos.

Com os avanços da tecnologia da microencapsulação, a indústria e a academia, buscam e pesquisam, novas formas de proteger e aumentar a estabilidade de compostos e torná-los mais atrativos economicamente. Não sendo diferente para os corantes, esta é então uma possibilidade de aliar o uso desta tecnologia a aplicação de corantes naturais em alimentos.

O uso da quitosana como agente encapsulante, além de ser viável por suas características químicas e estruturais, o que fazem dela um excelente agente encapsulante para grande número de compostos, também torna sua aplicação em alimentos interessante, pois, a mesma, sendo uma fibra alimentar apresenta características que vão de atividade hipocolesterolêmica a capacidade antimicrobiana, tendo assim, além de um apelo tecnológico também um apelo nutricional.

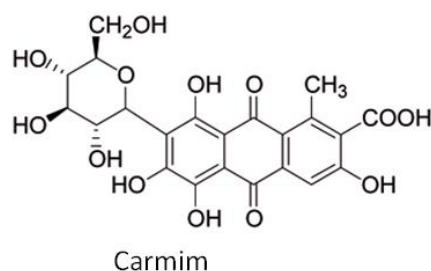
Além dos corantes serem importantes para restituir e intensificar a cor dos alimentos, muitos corantes naturais possuem características funcionais e terapêuticas, o que abre mais um caminho para a aplicação destes corantes em matrizes alimentares.

Dois corantes naturais foram escolhidos para a realização deste trabalho, Carmim e Curcumina. O Carmim que tem sua estrutura química apresentada na Figura 1 é um composto orgânico derivado da antraquinona ligada a uma unidade de glicose.

O

carmim

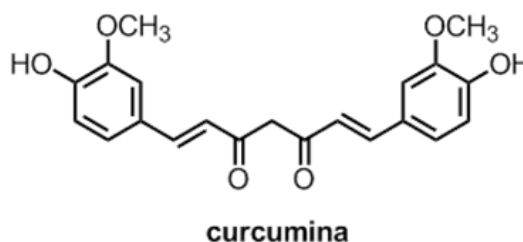
tem sua coloração dependente do pH do meio, sendo vermelha em valores de pHs mais baixos e azul na região alcalina (Volp, et al, 2009, Constant, et al, 2002). Considerando suas propriedades funcionais, o carmim tem sido estudado em relação aos efeitos regulatórios nas concentrações de lipídeos plasmáticos. Oliveira e colaboradores (2002) estudaram a associação de um flavonóide e do corante carmim sobre o metabolismo lipídico de ratos e obtiveram resultados positivos reduzindo significativamente os resultados de colesterol total e triacilgliceróis e os mesmos constataram um efeito sinérgico dos compostos.



**Figura 1** - Estrutura química do ácido carmínico.

**Fonte:** Adaptado de Volp, Rene, Stringueta (2009).

A curcumina é um composto fitoquímico proveniente do rizoma do açafrão (*Curcuma longa*). O principal componente extraído da Cúrcuma é a curcumina, pigmento insolúvel em água e cor amarelo limão brilhante e alaranjado (Figura 2). Responsável por ações bioativas, como a sua ação antioxidante, estudos relatam sua eficácia na inibição da promoção e progressão do câncer, principalmente o de pele, mama (Dowhan e Collins, 2000) e cólon (Jhonson,2007).



**Figura 2** - Estrutura química da curcumina.

**Fonte:** Adaptados de Volp, Rene, Stringueta (2009).

Sendo assim os objetivos principais deste trabalho foram estudar e comparar a encapsulação dos corantes naturais curcumina e o carmim em matriz polimérica de quitosana na forma de microesferas preparadas pelo método de coacervação; estudar a

liberação destes corantes individuais e em mistura, utilizando o pH e a temperatura como formas de liberação do corante e aplicar o corante encapsulados em balas de gelatina, um produto bastante consumido pelo público infantil e que atualmente são produzidas utilizando corantes artificiais.

## **CAPÍTULO 2**

### **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação encontra-se dividida nos seguintes capítulos: Nos Capítulos 1 e 2 estão a introdução do trabalho e a apresentação do mesmo. O Capítulo 3 traz um artigo de revisão que discorre sobre o uso da quitosana como agente encapsulante e a aplicação de microesferas de quitosana em diversas áreas. Outro artigo explicando a metodologia da produção das microesferas de quitosana aplicadas neste trabalho é apresentado no Capítulo 4, além de algumas análises que caracterizam a microesfera. Nos Capítulos 5 e 6 são apresentados dois artigos que estudam a aplicação das microesferas como adsorvente de corantes naturais. No capítulo 5 são relatados os dados obtidos nos ensaios de cinética e a aplicação de alguns modelos para impregnação de corantes naturais industriais em solução de mistura na proporção de 1:5. No capítulo seguinte, foram utilizados corantes com teores de pureza mais elevados a fim de se obter uma melhor encapsulação, neste capítulo a proporção da mistura dos corantes foi de 1:1; dados como cinética, aplicação de modelos, isotermas de adsorção e cinética de liberação entre outras análises, completam o capítulo. O Capítulo 7 apresenta um artigo onde as microesferas encapsuladas foram aplicadas em matriz alimentar, no caso, balas de gelatina, a fim de verificar a aplicabilidade dos corantes encapsulados. Para finalizar o trabalho o Capítulo 8 apresenta algumas sugestões para trabalhos futuros.

## CAPÍTULO 3

Artigo submetido à Revista Iberoamericana de Polímeros.

### A TECNOLOGIA DA MICROENCAPSULAÇÃO ATRAVÉS DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

**Grasiele M. MATTE<sup>1\*</sup> ; Sirlei da ROSA<sup>1</sup>**

1) Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos – UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Avenida Brasil, 4232. CEP: 85884-000.

Correio eletrônico: [sirleirosa@gmail.com](mailto:sirleirosa@gmail.com)

Chitosan is a natural amino polysaccharide, biodegradable, hydrophilic, biocompatible and low toxicity and can be found in the wall of microorganisms, especially in *Mucor* species, but especially in crustacean shells waste from the fishing industry. By owning several functional characteristics chitosan has emerged as an excellent encapsulating agent, either through the formation of microcapsules or microspheres. Several studies have been conducted to demonstrate the efficiency of chitosan microspheres in adsorption, protection and release of active compounds, thus benefiting, several segments, including pharmaceutical, food, agribusiness, chemical, biomedical and cosmetics.

KEYWORDS: chitosan, microencapsulation, microspheres of chitosan.

#### Resumo

A quitosana é um aminopolissacarídeo natural, biodegradável, hidrofílico, atóxico e biocompatível que pode ser encontrada na parede de micro-organismos, especialmente nas espécies *Mucor*, mas principalmente nas cascas de crustáceos oriundos dos resíduos da indústria pesqueira. Por possuir diversas características funcionais a quitosana tem se destacado como um excelente agente encapsulante, seja através da formação de microcápsulas ou de microesferas. Diversos estudos têm sido realizados a fim de demonstrar a eficiência das microesferas de quitosana em adsorver, proteger e liberar compostos ativos e resíduos, beneficiando assim, diversos segmentos como: farmacêutico, alimentar, agroindustrial, químico, biomédico e de cosméticos.

PALAVRAS CHAVES: quitosana, microencapsulação, microesferas de quitosana.

## 1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação é um processo no qual ocorre a formação de partículas em escala micrométrica, onde um ingrediente ativo é coberto por uma fina camada de outro material, que possibilita o isolamento e a manutenção das características ideais de uma substância e com isso, protege o ativo de meios adversos, estabilizando o produto e aumentando sua vida útil.[1]. Os agentes encapsulantes normalmente empregados na microencapsulação são: hidrocolóides de goma vegetal, gelatina, amidos modificados, dextrinas, lipídeos, emulsificantes, entre outros [2].

No processo de microencapsulação as micropartículas formadas podem ter a forma de microcápsulas ou microesferas [3; 4]. Enquanto as microcápsulas são partículas onde o ativo se encontra envolto por uma camada do agente encapsulante, as microesferas são



micropartículas onde o material ativo está disperso por toda a matriz que é composta por um material homogêneo; neste caso, o material encapsulado pode ser incorporado à matriz polimérica através do processo de adsorção, ou também, ligado covalentemente [3].

A quitosana é um copolímero linear, composto por monômeros de D-glicosamina e resíduos de N-acetil – D-glicosamina, que são distribuídos aleatoriamente e ligados por ponte glicosídicas  $\beta$ -(1→4) [5]. Este polímero natural pode ser encontrado na parede microorganismos, como o fungo *Mucor* [6]; mas é proveniente, principalmente, da desacetilação da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza e disponível em grande quantidade na indústria pesqueira, na forma de subprodutos [7; 8; 6].

Devido às características, tais como: abundância, atoxicidade, hidrofobicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e, também, por sua configuração química, a quitosana vem sendo empregada na preparação de filmes, géis, microcápsulas e microesferas sendo designada para diversos fins em áreas tecnológicas, como por exemplo, a biotecnológica, de cosméticos e de processamento de alimentos [9], produtos biomédicos e, principalmente em sistemas de liberação de compostos ativos [10; 11].

Contudo, este trabalho tem por objetivo, demonstrar as possibilidades da aplicação de microesferas de quitosana em diversas áreas, reunindo informações sobre os métodos de processamento e aplicações.

## 2 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é definida como a tecnologia de “empacotamento” de materiais ativos na forma de sólidos, líquidos ou até mesmo gasosos; estes materiais são encapsulados em camadas poliméricas que podem vir a liberar o material sob condições específicas e, ainda, em taxas controladas de velocidade e quantidade [12]. *Gharsallaoui et al.* [13], definem esta técnica como um processo em que pequenas partículas ou gotículas são cercadas por um revestimento ou são incorporados à uma matriz homogênea ou heterogênea para se obter pequenas cápsulas com diversas propriedades úteis.

Segundo Ré [14] a microcápsula surgiu da idealização do modelo celular onde a membrana que envolve e protege o citoplasma exerce a função de controlar a entrada e a saída do material da célula. *Gibbs et al.* [12] denominam o material encapsulado como o agente ativo ou núcleo e o material que cobre esse ativo como membrana, carregador, ou ainda, como é mais comumente denominado, parede. As partículas obtidas pelos processos de

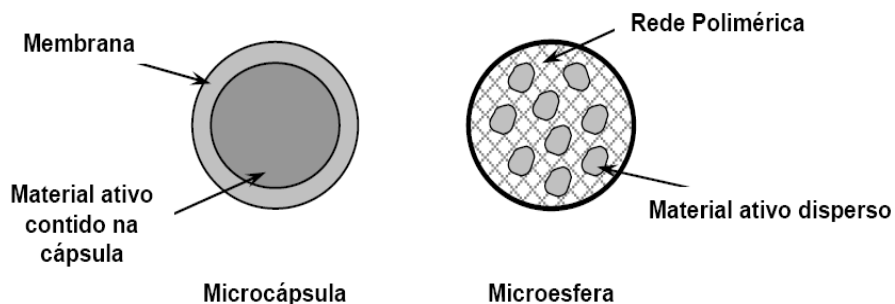
microencapsulação podem ter tamanhos que variam de micrômetros a alguns milímetros e apresentarem diferentes formas, dependendo do material e do método usado para a sua preparação [15; 16].

As primeiras tentativas do uso da técnica de microencapsulação foram registradas na década de 30 e a partir deste momento, esta técnica vem sendo estudada e empregada em diversas áreas industriais, sobretudo nas áreas farmacêutica, química, agroquímica e alimentícia, onde vem sendo cada vez mais explorada quanto a encapsulação de células vivas como os micro-organismos probióticos e enzimas, compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos, acidulantes, e também, os corantes [11; 16]. Devidos aos ingredientes microencapsulados, muitos produtos que foram considerados tecnicamente inviáveis antes, são agora possíveis [17; 13].

Alguns autores citam os motivos para o uso da microencapsulação: capacidade de modificar e melhorar a aparência de uma substância; reduzir a reação do agente ativo com o ambiente em que o mesmo será aplicado; diminuir a velocidade de difusão do agente ativo do interior da célula para o meio, promovendo a liberação controlada; mascarar odores e sabores desagradáveis; e, finalmente, facilitar uma diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia [18; 19]. Enfim, a microencapsulação pode proporcionar uma barreira física entre o composto do núcleo e os outros componentes do produto onde a capacidade de retenção destes núcleos é regulada pela sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e a volatilidade do agente encapsulante [13].

## **2.1 Micropartículas: Microesferas e Microcápsulas**

Quanto a morfologia, estas micropartículas são classificadas segundo a sua estrutura, podendo ser microcápsula quando esta possuir um núcleo com o material ativo, rodeado por uma membrana que será composta pelo agente de parede, ou ainda, pode ser classificada como microesfera quando o material ativo está disperso por toda a matriz polimérica composta por uma matriz homogênea e, neste caso, o material encapsulado pode ser incorporado à matriz polimérica através da adsorção ou ligação covalente, conforme ilustração da Figura 1 [3; 20; 21].



**Figura 1** - Ilustração esquemática para a microencapsulação de compostos.

## 2.2 Métodos de encapsulação

Atualmente, quase todo material que necessite ser protegido, isolado de outros compostos, ou até mesmo, ter sua liberação controlada, pode ser encapsulado. Tendo em vista a importância desta técnica, uma grande atenção deve ser dedicada à escolha do método a ser utilizado para a encapsulação onde o mesmo deve estar de acordo com a aplicação que será dada à micropartícula, tamanho desejado da cápsula, mecanismo de liberação do núcleo e as propriedades físico-químicas tanto do agente ativo quanto do material encapsulante [16].

Alguns pesquisadores [16;17;22] citam que os métodos de preparação de micropartículas classificam-se:

- a) Métodos Físicos: *Spray drying* (secagem em atomização); *Spray chilling* (nebulização em corrente ar frio); *Spray cooling*, co-cristalização e liofilização.
- b) Métodos Químicos: Inclusão molecular e polimerização interfacial;
- c) Métodos Físico-químicos: coacervação, separação de fase orgânica em formação de lipossomas

## 2.3 Agentes encapsulantes

Por ser a substância que manterá o ativo protegido do meio, ou ainda, ser a matriz onde o ativo estará distribuído, a escolha do material encapsulante para determinado ativo deve seguir alguns critérios; dentre eles, pode-se citar de preferência a baixa viscosidade em altas concentrações, a fácil manipulação durante o processo, com baixa higroscopicidade, a capacidade de transformar líquido em sólido para uso em sistemas secos, não ser reativo com o composto a ser encapsulado e, proteger o ativo quanto às condições adversas (luz, acidez, oxigênio, calor e outros compostos presentes) e ainda, possuir as propriedades desejadas de

liberação do ingrediente encapsulado; além de não possuir sabor desagradável e finalmente, ter baixo custo [23; 24].

De acordo com *Suave et al.* [17] os materiais mais utilizados como encapsulantes são:

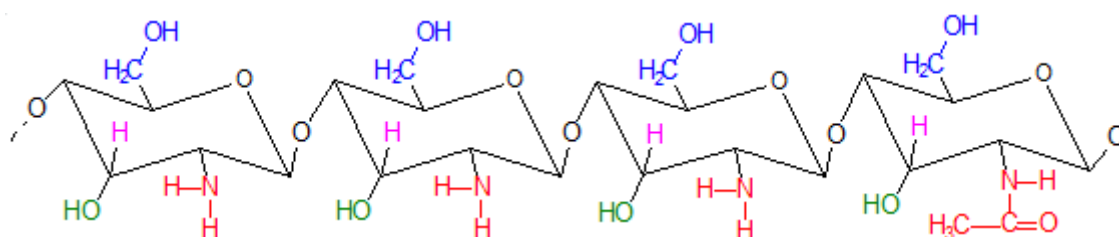
- Carboidratos: amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celuloses e a quitosana;
- Gomas: goma arábica, alginato de sódio, carragena;
- Lipídeos: cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
- Poliésteres naturais: poli(hidroxicanoatos), tais como poli (3-hidroxiбутирато) P(3HB), poli (3-hidroxi valerato) P(3HV) e seus copolímeros;
- Polímeros sintéticos: poli (D, L-ácido láctico) (PDLA), poli(acrilatos), copolímeros de polietileno-co-propileno, poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL);
- Proteínas: glúten, caseína, gelatina, albumina;

### 3 QUITOSANA

O início da história da quitosana data dos anos de 1859 quando pesquisadores discutiram a forma desacetilada deste polímero; mas somente nas últimas décadas é que este polímero vem sendo explorado em aplicações industriais e isso é devido o aumento da sua importância por ser uma fonte renovável e biodegradável e, também pelo conhecimento da sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas [25- 27].

A quitosana é um aminopolissacarídeo natural, biodegradável, hidrofílico, atóxico e biocompatível; pode ser encontrada na parede de micro-organismos, especialmente nas espécies *Mucor* [6]; é obtida principalmente a partir da desacetilação da quitina. Esta, tida como o segundo polímero mais abundante na natureza e proveniente, comercialmente, a partir de cascas de camarão e sirí disponíveis em grandes quantidades na indústria pesqueira como subprodutos [6-8].

A estrutura química da quitosana (Figura 02) é formada pelos copolímeros  $\beta$  – (1 $\rightarrow$ 4) – 2-amino 2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) – 2- acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença do grupo amino e grupos hidroxila primário e secundário [5; 28].



**Figura 2** - Ilustração esquemática da estrutura da quitosana.

A quitosana é um biopolímero cujo grau de desacetilação, massa molar e o conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais da matéria-prima e dos métodos de preparação; pode ser facilmente dissolvida em soluções ácidas em função da protonação dos seus grupos amínicos livres, característicos da quitosana *in natura*, sendo o ácido acético o solvente mais empregado [22; 27]. Outra característica importante da quitosana está relacionada a possibilidade de modificações estruturais podendo-se obter diversas formas de interações químicas e resistência mecânica, através da reticulação [28].

Os usos da quitosana e seus derivados na indústria agroindustrial e alimentícia envolvem o recobrimento de sementes, a proteção de alimentos através de sua característica antimicrobiana, formação de biofilmes, clarificação de sucos de frutas e, também, como suplemento alimentar para a redução de peso e do colesterol em seres humanos (9).

Muitos pesquisadores relatam os efeitos positivos da ingestão de quitosana, Damian e demais pesquisadores [6] citam os fatores responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico da dieta fibrosa; dentre elas, estão a indigestibilidade no trato digestório superior, alta viscosidade, natureza polimérica e a baixa afinidade pela água no trato digestório inferior. Um dos primeiros estudos realizados para testar o poder hipocolesterolêmico da quitosana foi realizado por *Sugano et al.* [29]; estes pesquisadores submeteram ratos à alimentação controlada de colesterol e quitosana por um determinado período de tempo, e concluíram que a quitosana reduziu significativamente o nível de colesterol no plasma e no fígado, mostrando que a quitosana se mostrava um eficaz agente hipocolesterolêmico. *Ormond et al.* [30] realizaram o primeiro estudo correlacionando a diminuição do colesterol através da quitosana e a inibição da aterogênese. Cherem e Bramorski [31] também relataram a eficiência da quitosana como inibidor da absorção da gordura pelo intestino.

Além da sua capacidade de inibir a absorção de gordura pelo intestino, a quitosana possui capacidade antimicrobiana e antifúngica. Esta característica do polímero pode estar relacionada às interações eletrostáticas entre os grupos amins da quitosana e os sítios aniônicos na parede celular do microrganismo devido à presença de resíduos de ácido carboxílico e de fosfolipídios [32]. *Cai et al.* [33] estudaram um complexo entre quitosana e nisina e inibiram o crescimento de micro-organismos. *Rodriguez-Nuñez et al.* [18] comparam a atividade antimicrobiana da quitosana em filmes, ou seja, em plásticos revestidos com quitosana e em soluções de quitosana, os mesmos concluíram que as soluções foram as que obtiveram os melhores resultados de inibição para *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. *Botrel et al.* [34] estudaram a quitosana como uma barreira protetora (filme) em alhos

minimamente processados e concluíram que a quitosana ajudou a manter as características do alho. *Camili et al.* [35] aplicaram a quitosana em cachos de uva “Itália” e constataram positivamente, que houve a inibição do crescimento de patógenos.

Com o aumento do interesse pelo uso de substâncias bioativas, como o potencial de atividade antimicrobiana, muitos estudos têm sido realizados a fim de comprovar e potencializar esta função, utilizando outros compostos juntamente com a quitosana, como por exemplo, o uso de óleos essenciais e outros compostos presentes naturalmente em alimentos [36; 37].

Outros estudos que apontam a capacidade antimicrobiana da quitosana, também são realizados na área biomédica [38]. A liberação controlada de fármacos é uma das áreas em que a quitosana apresenta seus benefícios e tem encontrado grandes aplicações [9] onde muitos estudos têm sido realizados para desenvolver sistemas seguros de liberação de fármacos a partir da quitosana [25]. *Liu et al.* [39] estudaram um sistema de gelificação *in situ* feito a partir de quitosana na presença de bicarbonato de sódio e o estudo apresentou resultados eficazes na administração de medicamentos injetáveis. Por ser também, um polímero muco bioadesivo, a quitosana aumenta o tempo de permanência de uma formulação na cavidade bucal e isto pode auxiliar na penetração do fármaco e melhorar sua eficiência e aceitabilidade [40].

#### 4 MICROESFERAS

Os estudos sobre as técnicas de microencapsulação utilizando o formato de microesferas iniciaram-se na década de 1930; entretanto, foi a partir de 1960 que as pesquisas avançaram e as indústrias começaram a usufruir desta técnica. As microesferas podem ser definidas como um sistema matricial micrométrico, composto de partículas aproximadamente esféricas em uma faixa de tamanho que vai de 1 a 1000  $\mu\text{m}$ , utilizando como principal matéria-prima, polímeros biodegradáveis e biocompatíveis [41]. A aplicação desta técnica tem como principais objetivos: a proteção dos ativos contra agentes agressores externos, como: temperatura, oxidação, interação com outros compostos, luz, umidade, calor, acidez e a possibilidade de modificação e controle da liberação de substâncias encapsuladas; ou seja, controlar a liberação do ativo para o meio [42].

São diversas as áreas que lançam mão desta tecnologia e usam as microesferas como matriz para encapsular compostos ativos, principalmente aqueles que necessitam de liberação controlada e, com isso, a escolha do agente encapsulante para este método de encapsulação

depende uma série de fatores, dentre eles a não reatividade com o agente de núcleo, o processo a ser utilizado para a formação da micropartícula e o mecanismo de liberação ideal do ativo [16].

Para o desenvolvimento das microesferas, existe uma grande variedade de polímeros biodegradáveis, que podem ser sintéticos ou naturais, embora, poucos sejam biocompatíveis. Entre os sintéticos, têm-se, os polímeros e co-polímeros dos ácidos lático e glicólico, que estão entre os mais utilizados devido a sua segurança e uso autorizado para aplicações em humanos [43; 42]. Entre os naturais tem-se a albumina [1], gelatina [44], colágeno [45] e também a quitosana [46; 47].

*Liu et al.* [48] estudaram o tempo de liberação de fármacos em microesferas de etilcelulose com o objetivo de aumentar o tempo de liberação e concluíram que esta técnica pode ser vantajosa para doenças estomacais. Com microesferas de alginato, *Rastogi et al.* [49] encapsularam com sucesso o fármaco isoniazida.

## **5 MICROESFERAS DE QUITOSANA**

A quitosana tem se tornado objeto de grande interesse industrial e o desenvolvimento de novos materiais baseados neste polímero para aplicações tecnológicas e biomédicas, tem se tornado um campo de pesquisa muito atraente [27]. Por possuir caráter semicristalino, a utilização da quitosana em alguns casos, pode não ser eficiente, mas com o desenvolvimento das microesferas esse inconveniente pode ser diminuído, pois, as microesferas possuem caráter amorfo [22].

Dentre as aplicações já citadas de quitosana, as microesferas são especialmente utilizadas como potencial carreador para liberação controlada de fármacos e compostos bioativos, macromoléculas, vetorização, aumento de biodisponibilidade de substâncias degradáveis e aumento da absorção de substâncias hidrofílicas através das camadas epiteliais [42].

### **5.1 Métodos para a preparação de microesferas de quitosana**

A preparação destas micropartículas pode ser realizada de diversas maneiras; são considerados aspectos como a hidrofobicidade, a lipofilicidade e a estabilidade térmica do agente a ser encapsulado [22].

Um dos métodos de produção de microesferas comumente propostos é a gelificação ionotrópica, onde a solução do polímero é extrusada através de uma agulha em solução

coagulante, e, em seguida, as esferas são lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente [42]. Ma e Liu [50] preparam microesferas de quitosana através deste método e os resultados sugerem ser um método eficaz para a liberação controlada de proteínas.

A Coacervação também é outro método muito utilizado para a preparação de microesferas e é uma das técnicas mais antigas; a coacervação pode ser simples, onde o polímero é solubilizado e um soluto é adicionado formando um derivado insolúvel com a conseqüente precipitação, ou pode ser complexa, onde a micropartícula será formada pela interação interiônica entre polímeros de cargas opostas [51].

Horst [24] estudou a encapsulação de corantes utilizando ambas as técnicas e observou uma maior impregnação do corante na matriz quando utilizou a coacervação complexa entre quitosana e alginato. *Zhang et al.* [52] utilizaram microesferas coacervadas de gelatina e goma arábica reticuladas com ácido tânico e observaram alto rendimento de encapsulação de isotiocianato de alila, um composto responsável pelo sabor pungente da mostarda.

O método de Emulsificação com evaporação de solvente é considerado um método simples; este método envolve a formação de uma emulsão entre a solução polimérica e uma fase contínua imiscível. A emulsão é submetida à agitação até que o solvente seja evaporado, ocorrendo assim a conseqüente solidificação da microesferas que podem ser centrifugadas e/ou liofilizadas para obterem-se as microesferas secas [42]. A microencapsulação da azitromicina também já foram realizados utilizando este método em estudos de liberação controlada de fármacos [53].

A técnica de *spray drying* vem sendo bastante estudada e utilizada por diversos segmentos industriais, pois apresenta vantagens, como por exemplo, a grande disponibilidade de equipamentos, baixo custo do processo, a aplicação de ampla variedade de agentes encapsulantes, excelente retenção de compostos voláteis e estabilidade do produto final que justificam sua aplicação [42]. Utilizando esta técnica Jyotsna e Rajendra [10] encapsularam benzoato de rizatriptan em microesferas de quitosana para um sistema de liberação nasal de medicamento. Com o objetivo de desenvolver um método de administração oral de vitamina C, Desai e Park [11] encapsularam este composto em microesferas de quitosana reticulada com tripolifosfato utilizando a técnica de *spray drying*.

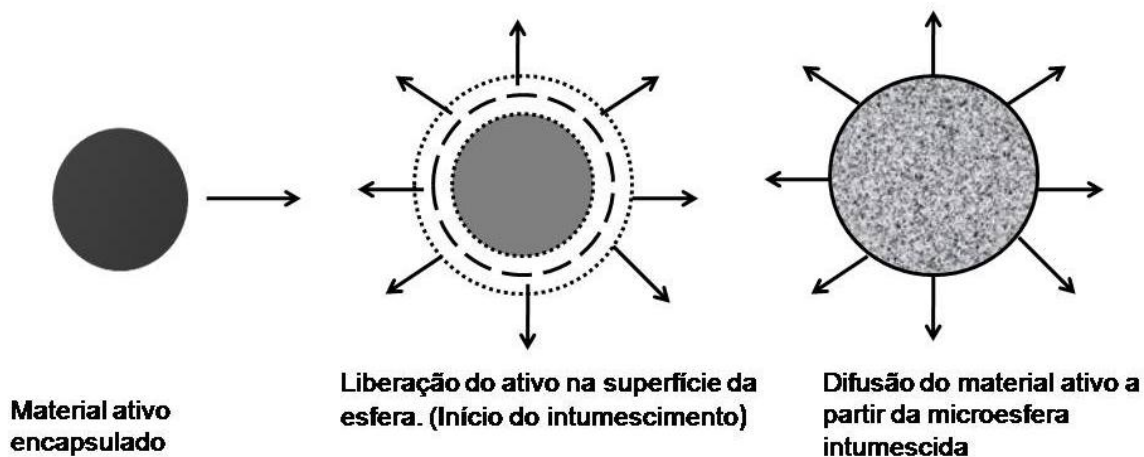
## **5.2 Aplicações de microesferas de quitosana**

A quitosana tem atraído à atenção como matriz para a liberação controlada de fármacos, pois possui características biofarmacêuticas interessantes; citam-se: sensibilidade ao



pH, biocompatibilidade e baixa toxicidade, além de ser metabolizada por certas enzimas, o que a torna biodegradável [27].

A Figura 3 apresenta uma ilustração do funcionamento da liberação de um fármaco ou outro composto ativo encapsulado em uma microesfera.



**Figura 3** - Esquema de liberação de substâncias ativas a partir de microesferas [41].

A liberação do agente encapsulado é muito dependente da geometria da partícula e do agente encapsulante; estes fatores que ditarão o mecanismo de liberação (efeitos de ação do solvente, difusão, degradação, fratura), qualquer tipo de estímulo (pH, estresse mecânico, temperatura, atividade de enzimatca, tempo, força osmótica, entre outros) pode ocasionar a liberação do ativo encapsulado [11; 54].

De acordo com *Bazzo et al.* [55] em matrizes hidrofílicas observa-se dois estágios que normalmente vão regular a liberação do encapsulado; o primeiro, observa-se o “efeito burst” que está relacionado à solubilização rápida no meio de liberação do agente ativo livre, presente na camada superficial da cápsula e é onde acontece o início do intumescimento, ou inchamento, da microesfera. Após o completo intumescimento da matriz polimérica, inicia-se a difusão do agente ativo para o meio a ser liberado. A entrada da água intumescer a microesfera, forma-se um gel hidratado, através do qual o ativo deve passar pela dissolução e difusão para o meio aquoso [54].

A tecnologia de sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido estudada em detalhes nos últimos 30 anos, desde então, cada vez mais surgem pesquisas relacionadas à área [27]. Park et al [20] realizaram estudos para verificar a eficiência da “entrega direta” do fármaco ofloxacina, um fármaco utilizado no tratamento de tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). A aplicação foi direta aos pulmões através de emulsões contendo o fármaco encapsulados em microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. Eles observaram

que o sistema proposto pode melhorar a eficiência da entrega da ofloxacina para os pulmões, o que pode diminuir o período de tempo que seria necessário para curar a doença, que atualmente através do uso de medicamentos por via oral, levaria 6 meses. A encapsulação de bacteriófagos, utilizados em recentes estudos como substitutos de antibióticos, também foram eficientemente encapsulados em microesferas de quitosana e alginato [50]. Estudo realizado com insulina em microesferas de quitosana ingerido por via oral apresentou efeito anti hiperglicêmico em ratos com diabetes induzida, mostrando assim, o potencial desta micropartícula em aumentar a disponibilidade de substâncias degradáveis (56; 42). Paracetamol e acetaminofeno foram eficientemente encapsulados em microesferas de quitosana reticulada com tripolifosfato e a liberação da droga foi controlada, principalmente pela densidade apresentada pela matriz da microesfera. [11].

Seguindo a mesma linha a microencapsulação de compostos bioativos, como os nutracêuticos, ou os funcionais, é outra área que também chama atenção para a aplicação das microesferas. Estes alimentos podem ser probióticos e prébióticos, alimentos sulfurados, nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras (21). Desai e Park [11] (2004) encapsularam Vitamina C em microesferas de quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio, a fim de utilizar a função nutracêutica da vitamina C e administrá-la por via oral e eles concluíram que sua liberação ocorreu através de difusão. Extrato de folha de oliveira rica em compostos fenólicos, microencapsulados em microesferas de quitosana, foram estudadas por *Kosaraju et al.* [57] para obter um sistema de carregamento de antioxidantes. Estudo com encapsulação de polifenóis, também foi proposto por *Peng et al.* [46] que encapsularam resveratrol em microesferas de quitosana reticulada com vanilina e eles concluíram que este sistema aumentou significativamente a estabilidade do polifenol estudado. Estudos também foram realizados a fim de encapsular fitoterápicos [28]. *Harris et al.* [58] encapsularam extratos de *Ilex paraguariensis* em matriz de quitosana e verificaram a eficiência do sistema na proteção do composto ativo e na liberação adequada do composto para o meio; os autores sugerem este sistema com o ativo ideal para uso como nutracêutico, ou também, em cosméticos.

Estudos relatam a microencapsulação de corantes naturais em microesferas de quitosana para aplicação em nutracêuticos em alimentos funcionais e focam no estudo da liberação destes corantes, em um meio adequado, a fim de colorir uma matriz alimentar. Horst et al [24] estudaram a encapsulação de antocianinas, *Parize et al.* [54] estudaram o corante urucum, um corante natural com ação antioxidante.

Existem diversas aplicações sendo estudadas para as microesferas de quitosana; além das citadas, destaca-se o uso deste sistema com algumas modificações estruturais na matriz polimérica, para o tratamento de efluentes industriais. *Kimura et al.* [59] estudaram através do método de adsorção, a remoção de corantes reativos de efluentes têxteis e observaram resultados positivos usando microesfera de quitosana. *Laus et al.* [60] adsorveram em microesferas de quitosana, a acidez, o ferro (III) e o Manganês (II) de águas contaminadas da indústria extrativa de carvão. Estudos também foram realizados a fim de remover macromoléculas como as proteínas de efluentes e também para encapsular e proteger estes compostos. [52; 28].

*Vitali et al.* [61] estudaram a microencapsulação de sulfoxina em microesferas de quitosana, e, propuseram um novo adsorvente para íons metálicos, como o Cu(II) e os resultados obtidos mostraram que este adsorvente, poderia ser testado em processos de separação e pré-concentração de íons metálicos, tanto em soluções aquosas, quanto em águas naturais. *Laus et al.* [60] utilizaram a mesma matriz, porém, realizaram a reticulação da microesfera com tripolifosfato e esta se mostrou um material promissor para a remoção de ferro e manganês de águas contaminadas pela mineração de carvão. Microesferas poliméricas foram desenvolvidas com o intuito de adsorver o boro de águas contaminadas [45].

## 6 CONCLUSÃO

As funções apresentadas pela quitosana, como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, perfil atóxico, entre outros citados é que caracterizam este polímero como um material bastante estudado e explorado, seja em sua forma natural, seja em filmes, micro ou nanopartículas, ou ainda, através de microesferas em diversos setores, como por exemplo, agroindustrial, alimentar, farmacêutico, cosmético, biomédico e ambiental. Suas propriedades biológicas abrem grandes oportunidades de pesquisa e aplicações na liberação de fármacos e nutracêuticos, além da sua atividade antimicrobiana, hipocolesterolêmica na redução de peso corporal.

A quitosana, além de ser um material proveniente de um subproduto da indústria pesqueira, também está em evidência por ser um excelente agente encapsulante na proteção de compostos suscetíveis a instabilidades e oxidações através de matrizes na forma de microesferas. Diversos estudos foram citados neste trabalho, a fim de demonstrar a amplitude e a importância deste polímero em aplicações industriais. Os principais estudos de microesferas de quitosana estão voltados para a área farmacêutica, porém, por ser uma fibra, e

possuir também características funcionais, podem ter sua aplicação ampliada na indústria alimentícia; ou seja, as microesferas podem ser excelentes agentes de liberação de compostos bioativos em alimentos, além de diminuir a suscetibilidade de algumas matrizes alimentares a microrganismos patogênicos.

Tendo em vista o exposto neste trabalho considera-se que o interesse pelo emprego da quitosana por suas diversas potencialidades poderá ser ampliado permitindo que mais pesquisas sejam realizadas.

## REFERÊNCIAS

1. Almond AB, Hadba AR, Freeman ST, Cuevas, BJ, York, AM, Detrisac CJ, Goldberg E, *J. control. Release*, (91), 147 (2003)
2. Stringheta PC, Constant, PB, *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e tecnologia de alimentos*, (36) (2002)
3. Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry, *Int. J Food Sci Tech* , (41), 1 (2006)
4. Mendes, LG, 2012, 132f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.
5. Couto DS, Hong Z, Mano JF, *Acta Biomaterialia*, (5), 115 (2009)
6. Damian C, Beirão LH, Francisco A, Espirito Santo MLP, Teixeira E, *Revista Alimentos e Nutrição*. (16), 195 (2005)
7. Guibal E, *Sep Purif Technol*, (38), 43 (2004)
8. Assis OBG, Leoni AM, *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, (6) (2003)
9. Filho SPC, Cardoso MB, Signini R, *Revista de Processos Químicos*, (2), 9 (2007)
10. Chavan Jyotsna D, Doijad Rajendra C, *Int J. of Pharm Tech Research*, (2), 2391 (2010)
11. Desai KGH, Park HJ, *Drug Develop Res*, (64), 114 (2005)
12. Gibbs BS, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, (50), 213 (1999)
13. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R, *Food Res. Int.*, (40), 1107 (2007)
14. Ré MI, *Ciência Hoje*, 27(162), 24 (2006)
15. Desai KGH, Park HJ, *Drying Technology*, (23), 1361 (2005)
16. Favaro Trindade CS, Pinho SC, Rocha GA, *Brazilian Journal Food of Technology*, (11), 103 (2008)
17. Suave J, Dall'angol EC, Pezzin APT, Silva DAK, Meier MM, Soldi V, *Revista Saúde e Ambiente*, (7), (2006)
18. Rodríguez-Núñez JR, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Wong BR, Chavez PT, Rocha MOC, *Int. J. Food Sci. Tech*, (47), 2127 (2012)
19. Silva C, Ribeiro A, Ferreira D, Veiga F, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, (39), (2003)
20. Park J, Jin H, Kim D, ChunG S, Shim W, Shim C, *Int. J. Pharm.*, (12),.8 2012
21. Moraes FP, Colla LM, *Revista Eletrônica de Farmácia* (3), 2 (2006)
22. Silva HSRC, Santos KSCR, Ferreira EI, *Quím Nova*, (29), 776 (2006)
23. Santos AB, Ferreira VP, Grosso CRF, *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Disponível em: [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16\\_micro.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_micro.pdf). Acesso em 02/12/2012.

24. Horst BL, Parize AL, Souza TCR “Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana utilizando tartarato de sódio e potássio como solução de impregnação”. In: 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos do 10º CBPol, 2009.
25. Dodane V, Vilivalam VD *Elsevier Science Ltd - PSTT*. (1), 6 (1998).
26. Azevedo VVC, Chaves AS, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, (23), 27 (2007)
27. Laranjeira MCM, Fávère VT, *Quím Nova*, (32) 672, (2009)
28. Torres AAFN, Souza, JMO, Amorim AFV, Lima MLM; Araújo RS, In: *IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica*. Belém, 2009.
29. Sugano M; Fujikawa T; Hiratsuji Y; Hasegawa Y, *Nutr. Rep. Int.*, (18), (1978)
30. Ormrod DJ, Holmes CC; Miller TE, *Atherosclerosis*, (138), 329 (1998)
31. Cherem AR, Bramorski A, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, (44), (2008)
32. Hejazi R, Amiji M, *J. Control Res.*, (89), 151 (2003)
33. Cai J, Yang J, Wang C, Hu Y, Lin J, Fan L, *J. Appl. Polym. Sci.*, (116), 3702 (2010)
34. Botrel DA, Soares NFF, Geraldine RM, Pereira RM, Fontes EAF, *Ciência Tecnologia Alimentos*, (27), 32 (2007)
35. Camili EC, Benato EA, Pascholati SF, Cia P, *Summa Phytopathologica*, (33), 215, (2007)
36. Zivanovic S, Chi S, Draughon AF, *Food Microbiology and Safety* (70), 2005.
37. Giner MJ, Vegara S, Funes L, Martí N, Saura D; Micol V, Valero M, *J. Sci. Food Agriculture* (92), 1917, (2012)
38. Eldin MSM, Soliman EA, Hashem AI, Tamer TM, *Advanced in Polymer Technology* (31), 414 (2012)
39. Liu L, Tang X, Wang Y, Guo S, *Int. J. Pharm.* (414), 6 (2011)
40. Senel S, Kremer MJ, Kas S, Wertz PW, Hincal, AA, Squier CA, *Biomaterials*, (21), 2067 (2000)
41. Tewes F, Boury, F.E, Benoit JP, Patent: WO2007072106 A1 (2006).
42. Oliveira FBF Campinas, 2005, 118f. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
43. Amass W, Amass A, Tighe B, *Polym. Int*, (47), 89 (1998)
44. Boanini E, Bigi A, *J. Colloid Interface Sci.*, (362), 594, (2011)
45. Wolska J, Bryjak, *Desalination* (283), 193, (2011)
46. Peng H, Xiong H, Li J, Xie M, Liu Y, Bai C, Chen, *Food Chemistry*, (121), 23, (2010)
47. Zeng M, Zhang X, Shao L, Qi C, Zhang XM, *J. Organomet. Chem.*, (704), 29 (2012)
48. Liu Y, Zhang J, Gao Y, Zhu J, *Int. J. Pharm.*, (413), 103, (2011)
49. Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, Ali A, Kumar S, Chuttani K, Mishra AK, *Int. J. Pharm.*, (334), 71, 2007
50. Ma L, Lui C, *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*, (75), 448 (2010)
51. Schrooyen PMM, Meer RVD, Kruif CG, *Proceedings of the Nutrition Society*, (60), 475, (2001)
52. Zhang ZQ, Pan CHP, Chung D, *Food Res Int.*, (44), 1000, (2011)
53. Li X, Chang S, Dua G, Li Y, Gong J, Yang M, Wei Z, *Int. J. Pharm.*, (433), 79 (2012)
54. Parize A, Stulzer H, Laranjeira MCM, Brighente IMC, Souza TCR In: *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*. Foz do Iguaçu- Pr, 2009.
55. Bazzo GC, Lemos – Senna E, Gonçalves MC, Pires ATN, *J. Brazilian Chemistry Society*, (19), 914 (2008)
56. Huang H, Tian H, Li X, Zhao G, *J. Biom. Engineering*, (18) (2001).
57. Kosaraju SL, D’ath L, Lawrence A, *Carbohydr. Polym.*, (64), 163, (2006)

58. Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras A, *Carbohydr. Polym.*, (84), 803 (2011)
59. Kimura I, Gonçalves AC, Stolberg J, Laranjeira MCM, Fávere VT, *Revista Polímeros*, 1999
60. Laus R, Laranjeira M.C, Martins AO, Fávere VT, *Quím Nova* (19), (2006)
61. Vitali L, Laranjeira MCM, Fávere VT, *Quím Nova* (31) 1400 (2008).

## CAPÍTULO 4

O artigo será enviado para a Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia

### **ESTUDOS DA ATIVIDADE DE ÁGUA , DO GRAU DE INTUMESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS DE QUITOSANA PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO**

Grasiele Mônica Matté<sup>1</sup>  
Sirlei da Rosa<sup>2</sup>  
Ígor Cíolin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: grasiele\_matte@hotmail.com).

<sup>2</sup> Dr em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: sirleirosa@gmail.com)

<sup>3</sup> Graduando em Engenharia de Alimentos. UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil

#### RESUMO

Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, fazem da quitosana um dos polímeros mais estudados em áreas como agroindustrial, alimentar, biomédica e farmacêutica. As microesferas de quitosana têm sido amplamente estudadas, principalmente, como agente encapsulante de proteção de compostos ativos e por ocasionar a liberação controlada destes compostos. Objetivou-se neste trabalho a produção das microesferas de quitosana utilizando o método de coacervação e a caracterização dessas esferas através das análises de atividade de água, grau de intumescimento e microscopia eletrônica de varredura. Através das análises foi possível padronizar o tempo de secagem através da atividade de água fixada em aproximadamente 0,53; o grau de intumescimento se mostrou dependente do pH e os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram uma excelente esfericidade das amostras.

**PALAVRAS CHAVES:** Coacervação, atividade de água, grau de intumescimento.

#### ABSTRACT

Biocompatibility, biodegradability and atoxicity make the chitosan one of the most studied polymers in areas such as agribusiness, food, biomedical and pharmaceutical industries. The chitosan microspheres have been widely studied, especially as the encapsulating agent protection active compounds and lead to the controlled release of these compounds. The objective of this work was the production of chitosan microspheres using the coacervation method and characterization of these spheres through the analysis of water activity, degree of swelling and scanning electron microscopy. Through the analysis it was possible to standardize the drying time by water activity fixed at approximately 0.53, the degree of swelling is pH dependent and showed the results of scanning electron microscopy showed an excellent sphericity of samples.

**KEYWORDS:** *ionotropic gelation, water activity, swelling.*

## 1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um aminopolissacarídeo natural, biodegradável, hidrofílico, atóxico e biocompatível <sup>[1]</sup>, e também o mais importante polissacarídeo natural após a celulose, podendo ser encontrada em cascas de crustáceos ou em paredes celulares de fungos <sup>[2]</sup>, mas é principalmente obtida a partir da desacetilação da quitina, abundantemente encontrada na natureza <sup>[3]</sup>. Comercialmente a quitosana é obtida a partir de cascas de camarão e siri sendo esta uma das vantagens de seu uso, pois são encontrados em grande quantidade na indústria pesqueira como subprodutos <sup>[4,5,1]</sup>.

A estrutura química da quitosana é constituída de unidades 2-amino 2-desoxi-D-glicose e 2- acetamida 2-desoxi-D-glicose interligadas por ligações glicosídicas ( $\beta$  1-4) com a presença do grupo amino e grupos hidroxila primário e secundário <sup>[6,7,8]</sup>. Um dos aspectos mais importantes da quitosana consiste nas diversas possibilidades de modificações químicas, como quaternização <sup>[9]</sup>, acetilação <sup>[7]</sup>, imobilização de quelantes, carboxilação, acilação, sulfonação, amidação e formação de complexo polieletrólítico, associadas a presença de grupos aminos reativos que são distribuídos pela matriz polimérica <sup>[10]</sup>. A quitosana também pode ser modificada fisicamente podendo oferecer várias formas, como: flocos, microesferas <sup>[11,3]</sup>, nanopartículas <sup>[11]</sup>, membranas <sup>[12]</sup>, esponjas <sup>[13]</sup>, entre outras formações.

A produção de microesferas, a partir das microesferas tem sido estudadas como carreador potencial para a liberação controlada de fármacos e compostos bioativos, corantes alimentícios <sup>[14-17]</sup>, além de macromoléculas, vetorização, aumento de biodisponibilidade de substâncias degradáveis e aumento da absorção de substâncias hidrofílicas através das camadas epiteliais <sup>[18]</sup>.

O desenvolvimento de novos materiais com base de quitosana empregados em inovações tecnológicas e biomédicas é um campo de pesquisa bastante atraente. Isto é comprovado através da quantidade de estudos e patentes na área <sup>[10]</sup>. Há diversos estudos aplicando microesferas de quitosana como método de encapsulação, métodos de secagem por atomização com *spray drier* <sup>[16]</sup> e também nanopartículas por gelificação ionotrópica <sup>[19]</sup>. Este trabalho teve por objetivo produzir microesferas de quitosana utilizando um método de coacervação formando as microesferas através da técnica da extrusão, e caracterizar através da microscopia eletrônica de varredura as esferas produzidas.



## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A quitosana empregada para preparação das microesferas foi cedida pela empresa Polymar, e apresentava grau de desacetilação de 86%. Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Preparação das Microesferas de quitosana**

Para a preparação das microesferas o método utilizado foi baseado em Parize (2009)<sup>14</sup> com adaptações, onde foram dissolvidos 3 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5% (v/v) e o sistema foi mantido sob agitação até a completa homogeneização da solução. Esta solução foi gotejada através de sistema extrusor composto por uma agulha de tamanho de 0,8mm acoplado a uma pipeta graduada, para aumentar o fluxo da solução viscosa de quitosana através o sistema extrusor, foi utilizado uma bomba de ar comprimido da marca Tecnal modelo 058. A solução foi gotejada em banho de precipitação, contendo solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Através do fenômeno de inversão de fases ocorreu a precipitação das microesferas. Após estar em contato por 2 horas na solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, as microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada até pH 7,0 e, em seguida, secas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

#### **2.2.2 Determinação do Grau de intumescimento**

A determinação do grau de intumescimento para as microesferas, foi realizada em soluções tampão com o pH entre 1 e 5. As microesferas foram previamente secas em estufa até atingir atividade de água constante, e em seguida foram pesadas 30 mg de microesferas. A solução tampão foi adicionada às esferas, e as mesmas imediatamente levadas ao *Shaker*, sob temperatura de 25 ± 0,1°C e agitação de 150 rpm. Em tempos pré-determinados de 2 em 2 minutos, as amostras foram retiradas do sistema, secas em papel absorvente e pesadas.

O grau de intumescimento das amostras se deu através da Equação 1:

$$GI (\%) = \frac{(W_t - W_o)}{W_o} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

onde,  $W_t$  refere-se ao peso da amostra no tempo  $t$  e  $W_o$  refere-se ao peso inicial da amostra. As medidas foram realizadas em triplicata.

### **2.2.3 Determinação da atividade de água**

Após a confecção das microesferas, as análises de atividade de água foram realizadas com o objetivo de acompanhar o processo de secagem e determinar a atividade de água da microesfera seca, podendo, assim, padronizar a utilização das microesferas em uma condição de equilíbrio. As análises foram realizadas através da leitura direta, a 25°C das amostras acondicionadas em cápsula plástica, em equilíbrio com a atmosfera interna do equipamento AQUALAB, modelo 4TE. As análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia interna, externa e o tamanho médio das amostras de microesferas de quitosana foram determinadas utilizando-se a técnica da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram colocadas sobre estabes e recobertas com uma camada de ouro. O diâmetro médio das amostras foi obtido a partir da média de uma população de microesfera. Para todas as amostras foram analisados os cortes transversais com objetivo de avaliar as superfícies das amostras.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Atividade de água**

A determinação da atividade de água tem por objetivo determinar o ponto para finalizar o processo de secagem da esfera e padronizar uma possível aplicação destas microesferas.

Os resultados para a atividade de água em função do tempo (horas) são apresentados na Tabela 1, assim como o seu desvio padrão, as análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela 1.** Atividade de água em função do tempo de secagem das microesferas de quitosana

Tempo (horas)	Atividade de água
0	0,9993 ±0,000058
12	0,7847 ±0,001389
24	0,6131 ±0,0049
30	0,5684 ±0,0058
36	0,5349 ±0,0029
42	0,5342 ±0,0039

A Tabela 1 apresenta a cinética de secagem das microesferas realizadas na temperatura ambiente próxima de 25°C. Através do Tabela pôde-se observar que há uma diminuição bastante acentuada da atividade de água nas primeiras 24 horas; após este tempo, a atividade de água foi diminuindo lentamente até atingir o equilíbrio em 0,5342 no tempo de 36 horas.

### 3.2 Determinação do Grau de intumescimento

A liberação de um agente ativo pode ocorrer através de ruptura mecânica, ação do pH, biodegradação, solubilidade do meio e também por difusão. Um fator importante a ser considerado na difusão de um composto é a sua solubilidade na matriz polimérica quando um composto está disperso em uma matriz polimérica, a difusão ocorrerá à medida que ocorrer sua solubilização no polímero [20].

A capacidade de intumescimento de um polímero influencia diretamente na difusão de um composto ativo encapsulado [21]. Quando um sistema de microencapsulação entra em contato com a água ou outro meio de liberação, pode ocorrer a hidratação do agente encapsulante e a consequente gelificação da cadeia polimérica, essa cama viscosa aumenta à medida que ocorre a hidratação ou o intumescimento, assim a difusão do composto ativo é determinada pela velocidade de intumescimento do polímero [20].

A quitosana é um polímero que adsorve grande quantidade de água em meio ácido, o que resulta em acentuado grau de intumescimento e aumento de volume.

Seu intumescimento gera o aumento da porosidade da matriz e como consequência a permeabilidade do hidrogel levando à liberação do composto [22,23].

**Tabela 2.** Grau de intumescimento para as microesferas de quitosana em diferentes pH a 25°C.

pH	Intumescimento	
	Tempo (min) (*)	Grau de Intumescimento (%)
1,0	8	310,83 ±3,58**
2,0	12	292,76 ±2,08**
3,0	14	497,23 ±0,85**
4,0	20	527,83 ±1,05**
5,0	24	437,81 ±1,82**

(\*) Tempo necessário para obter microesferas de massa constante.

\*\* Dados de desvio padrão.

A Tabela 2 apresenta os resultados para o grau de intumescimento em função do pH, pode-se observar que conforme o pH é aumentado o grau de intumescimento também aumenta até o pH 4, no pH 5 há um decréscimo do valor, os valores encontrados variaram de 292,76 para o pH 2 e 527,83% para o pH 4. O tempo necessário para se obter o grau de intumescimento máximo da microesfera foi aumentando ao passo que o pH da solução também aumentava, variando de 8 a 24 minutos.

O comportamento entre o pH e o tempo de intumescimento conseguidos estão de acordo com os encontrados por Parize (2009) [16], porém o mesmo atingiu valores menores de grau de intumescimento. Horst (2009) [17] encontrou valores maiores para o grau de intumescimento, porém o comportamento entre pH e tempo estão de acordo com o encontrado neste trabalho.

Tendo em vista a importante relação entre o grau de intumescimento e a liberação de um composto, a partir destas microesferas, pode-se observar que utilizando a microesfera em questão, um ativo encapsulado nesta matriz polimérica pode ter sua liberação controlada de acordo com a necessidade da aplicação, pois a liberação para este caso está diretamente relacionada com o pH no meio de liberação.

### 3.3 Microscopia eletrônica de Varredura

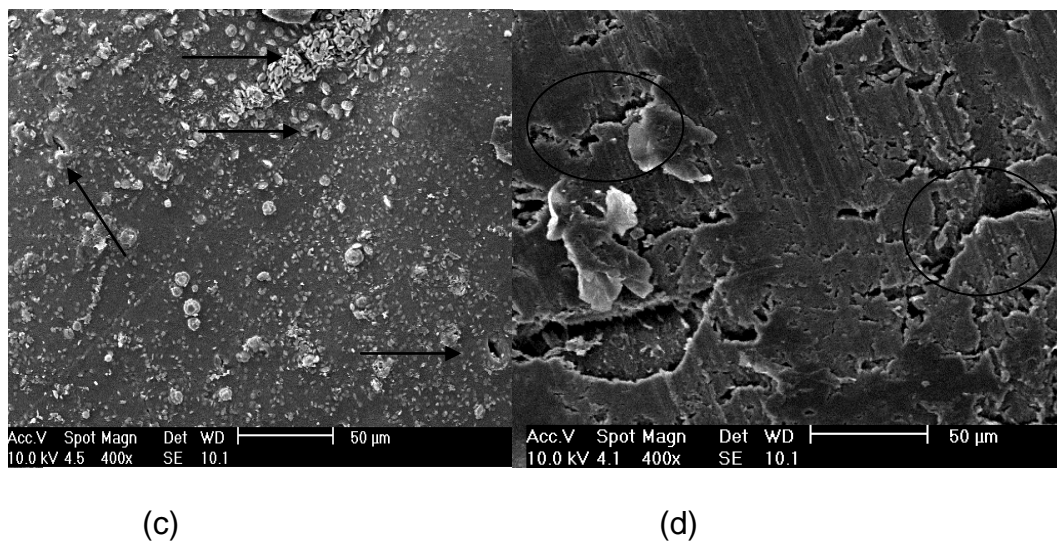
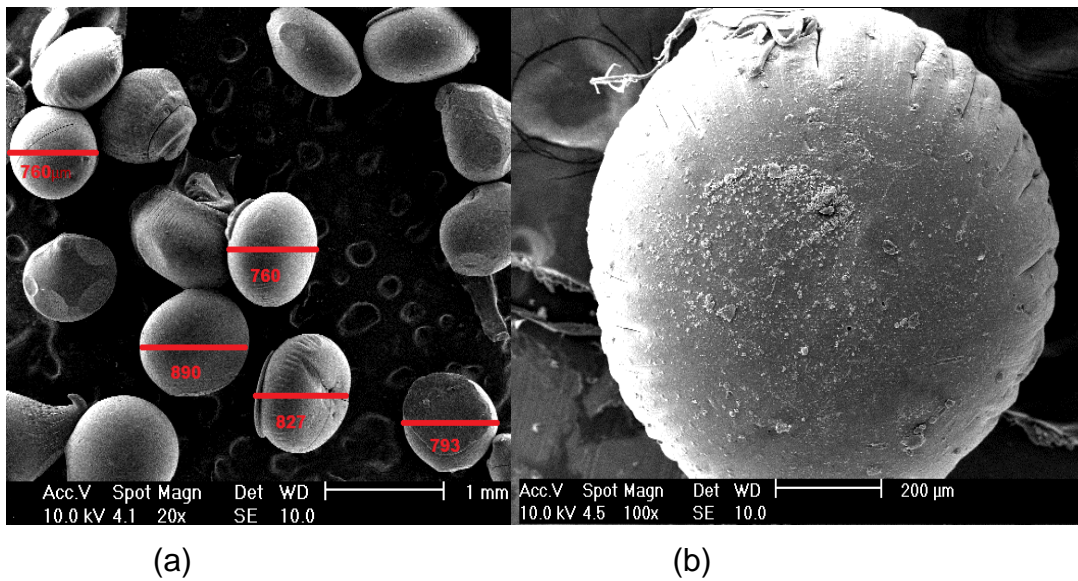
A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o objetivo de avaliar a morfologia e o diâmetro da microesfera produzida. A Figura 2 apresenta as imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura, as quais foram reveladas a partir de população mista de microesferas de quitosana.

De forma geral as microesferas apresentaram boa esfericidade; em alguns casos, as esferas obtiveram forma oval, revelando a necessidade de padronizar a velocidade de agitação da solução coagulante durante processamento das microesferas.

O diâmetro médio das microesferas foi de aproximadamente 806  $\mu\text{m}$ , possuindo assim um diâmetro menor dos que as realizadas por Horst, Parize e Souza (2009) <sup>[17]</sup> as quais tiveram a média de 973  $\mu\text{m}$ . Já Torres e demais pesquisadores (2005) <sup>[8]</sup> desenvolveram microesferas com diâmetros médios de 140  $\mu\text{m}$ , porém os mesmos utilizaram o método de atomização por *spray drier*

A superfície das esferas apresentou rugosidade em algumas regiões e também pequenos poros, o que pode ser um ponto bastante interessante para a aplicação destas partículas como agentes adsorventes. Segundo Kimura, Laranjeira e Fávere (2002) <sup>[24]</sup> quando em meio ácido pode ocorrer uma forte repulsão entre as cadeias de quitosana carregadas positivamente e resultar na expansão dos poros favorecendo a adsorção.

Para o corte transversal das microesferas pode-se perceber alguns pontos com fissuras. Porém em sua maior parte, a superfície do corte da microesfera se mostrou compacto.



**Figura 2-** Microscopia eletrônica de varredura: (a) microsferas de quitosana; (b) microsfera de quitosana; (c) corte transversal da microsfera de quitosana; (d) superfície da microsfera de quitosana.

#### 4 CONCLUSÃO

Através da análise de morfologia e diâmetro, pode-se observar que as microsferas produzidas neste trabalho apresentaram boa esfericidade e o diâmetro dentro da escala micrométrica com tamanho médio de 806  $\mu\text{m}$ . A determinação do grau de intumescimento indicou que a microsfera intumescce mais rapidamente em pHs mais ácidos, o que resultaria em liberação de um composto encapsulado em pHs ácidos. A metodologia aplicada neste trabalho para o desenvolvimento das microsferas se mostrou eficiente, porém há necessidade de padronização de

velocidade de agitação e altura entre o sistema extrusor e a solução coagulante a fim de melhorar as características morfológicas das esferas.

## REFERENCIAS

1. DAMIAN, C; BEIRÃO, L,H; FRANCISCO, A, de; ESPIRITO SANTO, M,L,P; TEIXEIRA, E – Rev. Alim. Nutri., **16**. p.195-205 (2005).
2. BRUGNEROTTO, J; LIZARDI, J; GOYCOOLEA, F,M; ARGUELLES-MONAL, W; DESBRIERES, J; RINAUDO, M, - Polym., **42**, p.3569-3580 (2001).
3. HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A.- Carb. Polym.,**84**, p.803-809 (2011).
4. GUIBAL, E. – Sep. and Purific. Technol., **38**, p.43-74 (2004).
5. ASSIS, O.B.G.; LEONI, A.M. – Revist. Biotecnol. Ciên. Desenv., **6**, p.33-38 (2003).
6. HUANG, R,Y,M; MOON, G,Y; PAL, R., - Journ. Membr.Scienc., **184**, p. 1-15 (2001).
7. GARCIA, R,B; SILVA, D,L,P, DA; COSTA, M; RAFFIN, F,N; SILVA, N,M,DA – Quim.Nova., **31**, p, 486-492 (2008).
8. TORRES, M.A; VIEIRA, R,S; BEPPU, M.M; SANTANA, C,C. – Polím. Ciênc. Tecnol, **15**, p, 306-312 (2005).
9. ROSA, S; LARANJEIRA, M, C,M; RIELA, H,G; FÁVERE, V,T. – Journ. Hazard. Mat., **155**, p, 253-260 (2008).
10. LARANJEIRA, M.C.M; FÁVERE, V.T.- Rev.Quím. Nova, **32**, p, 672-678, (2009).
11. ZHANG, Z,Q; PAN,C,H,P; CHUNG, D. - Food Res. Internat, **44**, p, 1000-1007 (2011).
12. COSTA, T,A,C; ANDRADE, A,L DE; BINOTTO, T, E; PLEPIS, A, M, DE, G; BEVILACQUA, L; SOUZA, W, M, DE. – Arq Bras Oftalmol, **6**, p, 817-821 (2006).
13. LOCILENTO, D, A. – *“Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva”*, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil (2012).

14. PARIZE, A.;STULZER, H.; LARANJEIRA, M.C.M.; BRIGHENTE, I.M.C.; SOUZA, T.C.R. “*Desenvolvimento de micropartículas de quitosana contendo Cúrcuma pelo método Spray Drying e Reticuladas com Tripolifosfato de Sódio.*”, in: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu- Pr, Outubro, 2009.
15. PARK, J.; JIN, H.; KIM, D.; CHUNG, S.; SHIM, W.; SHIM, C. – Inter. Jour.of Pharm, p, 8, (2012).
16. PARIZE, A, L. – “*Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (2009).
17. HORST, B.L.; PARIZE, A.L.; SOUZA, T.C.R. – “*Microencapsulação de corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana utilizando tartarano de sódio e potássio como solução de impregnação*”, in: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu – Pr, outubro, (2009).
18. OLIVEIRA, F.B.F.de. – “*Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica*”, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Brasil (2005).
19. SANTANA, N; SIPOLI, C,C; LA TORRE, L, G, DE, - “*Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana com controle de polidispersidade pelo pH*”, in: XX congresso interno de iniciação científica da Unicamp, São Paulo – SP, outubro (2012).
20. GOUIN, S. – Food Sciencie.Techn., **15**, p, 330-347 (2004).
21. SANTOS, A,B; FERREIRA,V.P; GROSSO, C.R.F. “*Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica*”. Rev. Biotec. Ciênc. Desenv. Disponível em: [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16\\_micro.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_micro.pdf). Acesso em 09/05/2013.
22. MUZZARELI, C.; VESNA, S.; GOBBI, L.; Tosi, G.; MUZZARELLI, R. A. A.; Carbohydr. Polym, **57**, (2004).
23. CAMPANA FILHO, S,P; SIGNINI,R; CARDOSO, M,B. – Rev.Proces,Quim. **2**, p, 9-18 (2007).
24. KIMURA, I. Y; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V. T.; Int. J. Polym. Mater – **51**, p, 284 (2002).



## CAPÍTULO 5

Artigo será enviado para a Revista Química Nova

### ADSORÇÃO COMPETITIVA DE CORANTES NATURAIS ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO COMO ADSORVENTE MICROESFERAS DE QUITOSANA OBTIDAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO

\* GRASIELE MÔNICA MATTÉ<sup>1</sup>  
SIRLEI DA ROSA<sup>2</sup>

#### Resumo

A adsorção competitiva entre os corantes carmim e curcumina em microesferas de quitosana foram realizadas em um proporção de 1:5 (curcumina: carmim) em massa. Ensaio de adsorção realizados em diferentes valores de pH, mostraram que esta é dependente do pH para os dois corantes. Observou-se uma baixa afinidade entre o corante carmim e a quitosana em pH alcalino e neutro, de forma contrária, a curcumina foi adsorvida melhor em pH alcalino, em que a quitosana está mais protonada. Dois modelos cinéticos de adsorção foram testados: o de pseudo-primeira ordem e o de pseudo-segunda ordem, tanto para as soluções individuais do corante quanto para a mistura, em ambos os casos, os modelos se ajustaram melhor ao modelo de pseudo-segunda ordem.

*PALAVRAS CHAVES: adsorção, quitosana, corante natural*

#### Abstract

The competitive adsorption of the dyes curcumin and carmine in chitosan microspheres were performed with a ratio of 1:5 (curcumin: carmine). Adsorption tests carried out at different pH values showed that adsorption is pH dependent for the two dyes. It was observed low affinity between the carmine dye and chitosan in alkaline and neutral pH, unlike curcumin dyes, that adsorbed at alkaline pH, in which chitosan is less protonated. Two kinetic adsorption models were tested: pseudo-first-order and pseudo-second-order solutions of the dyes alone and in mixtures, and in both situations, the models were best fitted to the pseudo-second-order model.

*KEYWORDS: adsorption, chitosan, natural dye*

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: grasielle\_matte@hotmail.com).

<sup>2</sup> Dr em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: sirleirosa@gmail.com)

## 1 INTRODUÇÃO

Os corantes utilizados como aditivos na indústria de alimentos tornam os alimentos mais atraentes; entretanto, o processamento ou armazenamento dos alimentos, em muitos casos, produz modificações de coloração a qual deve ser restituída ou recondicionada mediante a adição de corantes apropriados <sup>1</sup>.

A legislação brasileira permite o uso de alguns corantes sintéticos e também de sintéticos idênticos aos naturais. A Resolução - CNNPA nº 44, de 1977, Publicada DOU - Seção I, 01/02/78 e 24/04/78 no anexo II mostra a lista dos corantes naturais permitidos em produtos alimentícios <sup>2</sup>.

As clorofilas, cúrcuma e curcumina, carmim e betalínas são substâncias bioativas encontradas em alimentos que estão relacionadas à nutrição e saúde. <sup>3,4</sup>. Estudos tem demonstrado que a curcumina é potente antioxidante protegendo contra danos oxidativo <sup>5,6</sup>.

Outro tipo de corante que tem sido utilizado na indústria de alimentos é o corante carmim. Este corante apresenta a propriedade de fixar-se em proteínas, o que o torna útil na coloração de produtos à base de leite, como iogurtes, sorvetes, bebidas lácteas, produtos cárneos e bolachas, geléias e bebidas, bem como em revestimentos de produtos farmacêuticos <sup>7</sup>.

O ácido carmínico é solúvel em água e a sua coloração depende do pH do meio (laranja em pH ácido, vermelho na faixa de pH 7 e azul na faixa alcalina); forma complexo com metais (alumínio, por exemplo) e obtém-se o corante carmim ou lacas de alumínio; estas lacas de alumínio apresentam coloração de maior intensidade do que o ácido carmínico; são solúveis em meio alcalino e insolúveis em pH ácido. A diferença entre o ácido carmínico e as lacas de alumínio é que a cor não se altera com variações de pH – é vermelho em pH 4 e azul em pH 10 <sup>8</sup>.

Em razão de sua estabilidade, o carmim é considerado sob o ponto de vista tecnológico um excelente corante. A baixa solubilidade em pH reduzido é a única limitação técnica para o seu emprego <sup>7</sup>.

Um polímero que tem se mostrado promissor na adsorção de corantes é a quitosana. Os grupos amino presentes na matriz são fortemente reativos devido à presença dos pares eletrônicos livres no átomo de nitrogênio e são facilmente protonados em solução ácida. Por esta razão, a protonação destes grupos pode causar uma atração eletrostática de compostos aniônicos, incluindo ânions metálicos ou corantes aniônicos<sup>9</sup>. Esta interação depende do pH da solução, o qual deve ser ajustado em torno de 3 para protonação completa dos grupos amino <sup>10, 11,12,13, 14</sup>. Por outro lado, a grande quantidade de sítios catiônicos formados devido à protonação dos grupos amino pelo ácido, ao longo da cadeia

da quitosana, aumenta a solubilidade pelo aumento da polaridade e o grau de repulsão eletrostática <sup>15, 16, 17</sup>.

Quase todos os ácidos dissolvem a quitosana, sendo, os mais comumente usados, o ácido acético e o ácido fórmico. Visto que o meio ácido pode levar a desintegração da quitosana e uma forma de evitá-la é promover uma modificação transformando a quitosana em microsferas através de técnicas de coacervação e reticulação <sup>17</sup>.

Muitos experimentos de adsorção se concentram na capacidade de adsorção de componentes orgânicos de uma solução sintética simples e poucos trabalhos têm relatado a eficiência dos adsorventes quando se comportam quando estão em misturas<sup>18</sup>.

Muitas formulações de produtos comerciais utilizam misturas de corantes. Pontes (2004) preparou formulações de refrescos em pó, gelatina e bebidas isotônicas em laboratório e coloriu utilizando corantes naturais como urucum, antocianina, curcuma, beterraba e carmim de cochonilla e comparou com as cores de produtos comerciais. Usando proporções de combinações ele concluiu que os parâmetros colorimétricos L,a,b assim, como a tonalidade e saturação dos produtos com corantes naturais ficaram próximas aos corantes comerciais <sup>19</sup>.

Os objetivos deste trabalho são avaliar a adsorção competitiva dos corantes curcumina e carmim em microsferas de quitosana numa mistura na proporção 1:5 (curcumina : carmim); estabilizar o tom resultante desta mistura (coloração alizarin) e, posteriormente, estudar a cinética de liberação em meio aquoso na faixa de pH ácido a neutro.

## **2 MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A quitosana empregada para a preparação das microsferas foi adquirida da Sigma Aldrich com um grau de desacetilação de 75%. O corante curcumina WS (pureza 7,6 – 8,6%, densidade 1,1 g/mL) e o corante carmim CC-300-FCCII (densidade 1,05 g/mL, pureza 2,3 % em ácido carmínico) foram doados pela empresa CHR HANSEN (Valinhos, S. P).

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Preparação das microesferas das quitosana**

Para a preparação das microesferas o método utilizado foi baseado em Parize (2009)<sup>20</sup> com adaptações, onde foram dissolvidos 3 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5% (v/v) e o sistema foi mantido sob agitação até a completa homogeneização da solução. Esta solução foi gotejada através de sistema extrusor composto por uma agulha de tamanho de 0,8mm acoplado a uma pipeta graduada, para aumentar o fluxo da solução viscosa de quitosana através o sistema extrusor, foi utilizado uma bomba de ar comprimido da marca Tecnal modelo 058. A solução foi gotejada em banho de precipitação, contendo solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Através do fenômeno de inversão de fases ocorreu a precipitação das microesferas. Após estar em contato por 2 horas na solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, as microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada até pH 7,0 e, em seguida, secas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

### **2.2.2 Preparação das soluções dos corantes**

Soluções estoques dos corantes com concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> foram preparadas, levando em consideração o grau de pureza de cada corante.

A solução tampão de pH na faixa de 3,0; a 6,0 foi preparada a partir da mistura CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa (0,1 mol L<sup>-1</sup>), enquanto que a solução tampão de pH igual a 7 foi preparada utilizando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>). Para verificação da adsorção em meio alcalino, foi utilizada a solução tampão NH<sub>4</sub>OH/NH<sub>4</sub>Cl (0,1 mol L<sup>-1</sup>).

### **2.2.3 Avaliação do comportamento do corante frente ao pH.**

O deslocamento do pH foi realizado na faixa de pH de 1 a 10 utilizando-se as soluções tampões descritas anteriormente para cada corante individual e na mistura binária na proporção 1 : 5 (corante curcumina : corante carmim), ou seja, 10 mL da solução dos corantes nas concentrações de 10 : 50 mg. L<sup>-1</sup>. Água destilada também foi utilizada e foi denominada de "pH0". As leituras foram realizadas após 30 minutos de contato do corante com a solução tampão, em espectrofotômetro UV-VIS marca PerkinElmer modelo XLS.

### **2.2.4 Curva de calibração**

Para os experimentos de adsorção dos corantes curcumina e carmim, em soluções individuais e binárias, foram construídas curvas de calibração de concentração de corante

( $C_{\text{corante}}$ ) *versus* a absorvância (Abs.) das soluções, sendo que para adsorção dos corantes em misturas, a absorvância do corante curcumina foi lida no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante curcumina (424 nm) e no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante carmim (519 nm). Assim como, a absorvância do corante carmim foi lida no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante carmim (519 nm) e no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante curcumina (424 nm).

## 2.2.5 Experimentos de adsorção

Uma quantidade conhecida de adsorvente e um volume de solução dos corantes foram colocados em erlenmeyers fechados de 125 mL. O sistema permaneceu sob agitação, em incubadora termostatzada tipo “shaker” modelo INR, marca Lactea, a 25°C, tendo valores de quantidade e tempo variando para cada ensaio de adsorção sendo eles efeito do pH e cinética de adsorção. O material foi separado da solução por centrifugação e a concentração do corante não-adsorvido foi determinado por espectrofotometria UV-Vis usando uma curva de calibração no  $\lambda_{\text{max}}$  de cada corante. A quantidade adsorvida de corante foi determinada empregando-se a equação 2:

$$Q_e = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{W} \quad \text{Eq. (2)}$$

onde,  $Q_e$  é a quantidade de íons adsorvidas no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_o$  é a concentração inicial de íons em solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_f$  é a concentração dos corantes em solução,  $V$  é o volume da solução (L) e  $W$  é a massa do adsorbato (g).

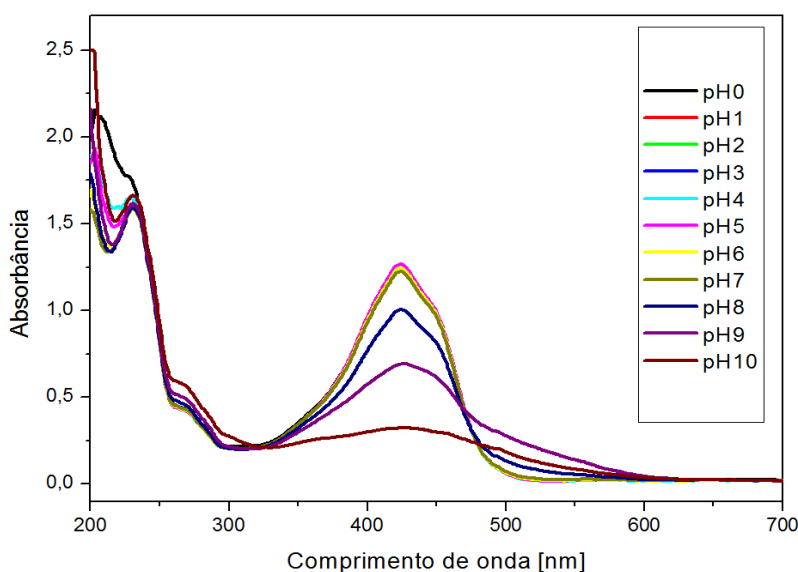
O efeito do pH foi conduzido empregando-se 50 mg de microesferas de quitosana, 50 mL de solução de corante ( $45 \text{ mg L}^{-1}$ ), velocidade de agitação 150 rpm e as soluções tampão ácido (pH 3, 4, 5, e 6); tampão neutro (pH 7 e 8). O comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máximo}}$ ) foi 424 e 519 nm para os corantes curcumina e carmim, respectivamente.

A cinética de adsorção foi conduzida empregando frascos fechados contendo 100 mg das microesferas, 100 mL de solução dos corantes e tamponada em pH 6,0. As concentrações das soluções individuais foram  $167 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $833 \text{ mg.L}^{-1}$  e para a mistura binária foi  $167 \text{ mg.L}^{-1} : 833 \text{ mg.L}^{-1}$  (curcumina : carmim). Em tempos predeterminados, uma alíquota foi removida e absorvância foi lida.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Deslocamento do pH dos corantes

A Figura 1 apresenta o espectro do corante curcumina. A cúrcuma contém três componentes amarelos, a curcumina (CC), e seus dois derivados demetoxilados: a demetoxicurcumina (DMC) e a bisdemetoxicurcumina (BDMC). Os pigmentos da cúrcuma apresentam 50 a 60 % de CC, 20 a 30 % de DMC e de 7 a 20% de BDMC. Esses três componentes apresentam absorção máxima em de 429, 424 e 419 nm, respectivamente e na pratica são expressos como curcumina.<sup>20, 5</sup>



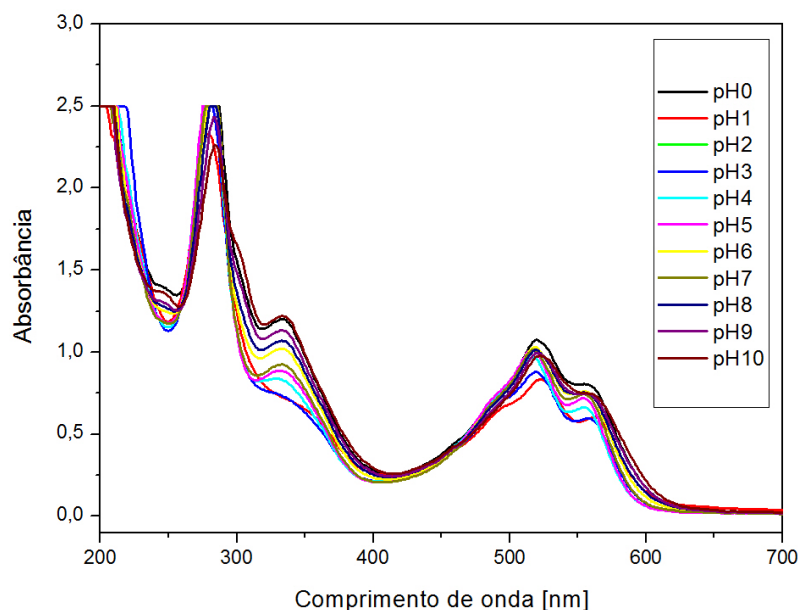
**Figura 1** - Deslocamento do pH utilizando corante curcumina em diferentes valores de pH.

Nenhum comportamento de deslocamento do pH foi observado na faixa de 1 a 7. Entretanto, um efeito hipocrômico foi observado nos valores de pH 8, 9 10, apresentando alteração na coloração, visualmente, o corante apresentou uma cor amarelo limão em meio ácido e laranja em meio básico. Estes valores mostram que o corante usado neste trabalho, fornecido na forma hidrossolúvel e emulsionado em polisorbato 80 é estável em meio ácido.

A Figura 2 apresenta o espectro do corante carmim (200 a 700 nm). Os picos de absorbância que apresentaram menor intensidade se localizavam na faixa de pH mais baixos e um efeito batocrômico foi observado no pH 1.

O pH do corante utilizado neste trabalho foi de 8,3. Trata-se de um corante hidrossolúvel sendo recomendado para uso em vários produtos alimentícios onde a cor final seja vermelha a vermelha rosada. A coloração do ácido carmínico dependeu do pH do meio.

Visualmente em pH ácido o corante adquiriu a cor laranja, tornando-se vermelho na faixa de 5,0 a 7,0 e a intensidade da coloração mostrou-se relativamente baixa <sup>7</sup>.



**Figura 2-** Deslocamento do pH utilizando corante carmin em diferentes valores de pH.

### 3.2 Construção das curvas analíticas das soluções

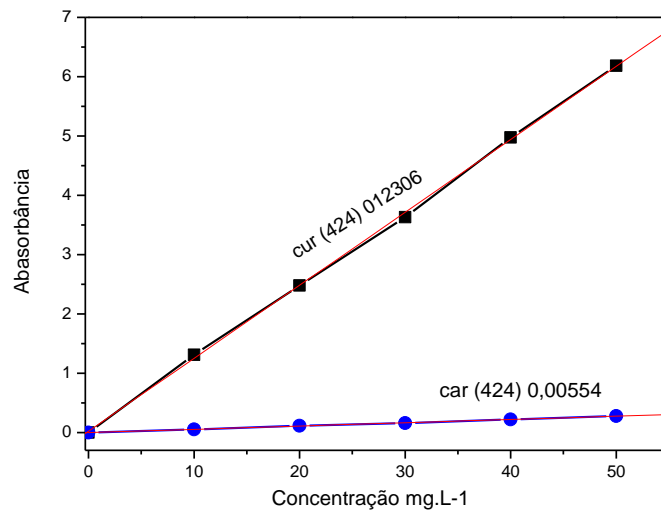
Para os experimentos de adsorção dos corantes curcumina e carmin, em soluções individuais e binárias, foram construídas curvas de calibração de concentração de corante ( $C_{\text{corante}}$ ) versus a absorbância (Abs.) das soluções.

As Figuras 03 (a, b) indicam as curvas de calibração para os corantes curcumina e carmin em soluções binárias, medidos em 424, 519 nm e correspondem ao pico de absorbância máxima dos corantes curcumina e carmin, respectivamente.

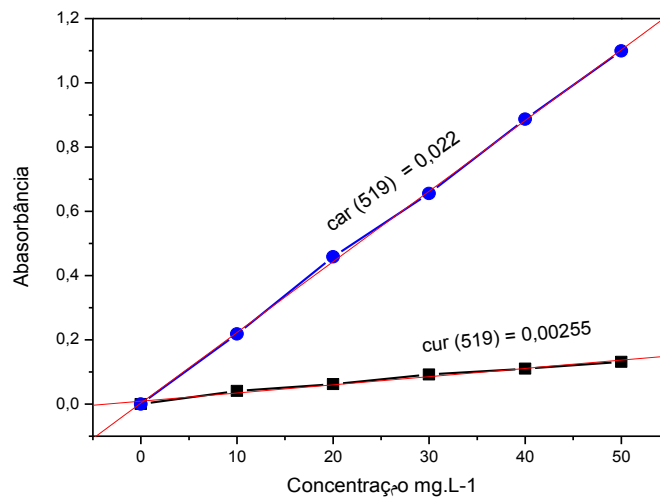
A partir das curvas de calibração, foi possível compor as equações lineares que permitiram conhecer as concentrações dos corantes curcumina e carmin na mistura na fase líquida e em função destas obter a quantidade de corante adsorvida.

$$A(424\text{nm}) = 0,12306.C_{\text{cur}} + 0,0054.C_{\text{car}}$$

$$A(519\text{nm}) = 0,00255.C_{\text{cur}} + 0,0220.C_{\text{car}}$$



(a)



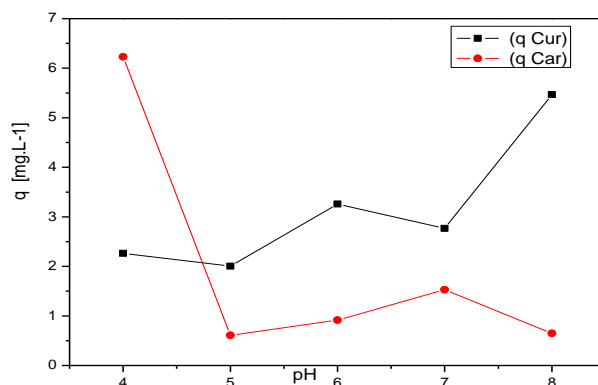
(b)

**Figura 3 - Curva de calibração dos corantes curcumina (a) e carmim (b)**

### 3.3 Efeito do pH dos corantes na adsorção

O pH é um dos parâmetros mais importantes que afeta o processo de adsorção. A análise da Figura 04 mostra que a quantidade de corante adsorvida em função do pH teve uma variação significativa na adsorção na faixa de pH estudada para os dois corantes.



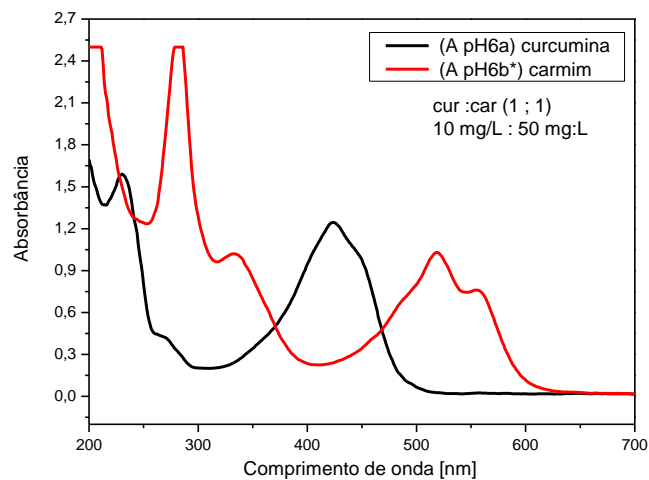


**Figura 4** - Quantidade adsorvida dos corantes nas microesferas de quitosana a diferentes valores de pH

Observa-se que no pH 4, o corante carmim adsorveu melhor do que curcumina, pois, a quantidade de grupos  $-NH_3^+$  na quitosana é maior comparada a quantidade destes grupos em valores de pH mais altos. Foi observado que, em pH menores que pH 4, o corante carmim mudou a cor e houve precipitação do corante indicando que pode ter ocorrido a deslacação - processo em que o composto formado pela reação do corante com alumina é revertido, diminuindo a estabilidade do mesmo <sup>7</sup>.

Já o corante curcumina apresentou uma melhor adsorção em valores de pHs mais altos, neste caso o pH 8. Estudos de impregnação utilizando quitosana e o corante curcumina foram realizados no pH 10 <sup>21</sup>, os autores avaliaram através deste estudo de dependência de pH (6 - 12) e por eletroforese capilar, que o pH 10 seria o “pH ótimo” para impregnação do corante curcumina na quitosana, indo de acordo com a tendência apresentada neste trabalho. Estudos tem sido realizados sugerindo que o emulsificante polisorbato 80 pode contribuir na adsorção deste corante <sup>22</sup>, estando este emulsificante presente na formulação do corante utilizado neste trabalho o que pode ter auxiliado na maior adsorção da curcumina.

Com o objetivo de atingir a coloração proposta inicialmente e com o proposito de estudar o comportamento dos corantes na mistura 1: 5 (curcumina : carmim) e verificar qual a contribuição na quantidade adsorvida de cada corante na mistura em função de ambos os corantes serem adsorvidos em um determinado pH, onde a quitosana apresenta grupos protonados na cadeia polimérica prosseguiu-se os experimentos em pH 6, onde não foi verificada alteração na coloração proposta. A Figura 05 mostra os espectros dos corantes curcumina e carmim, individuais, ambos em pH 6 para análise de sobreposição dos espectros, quando em mistura.



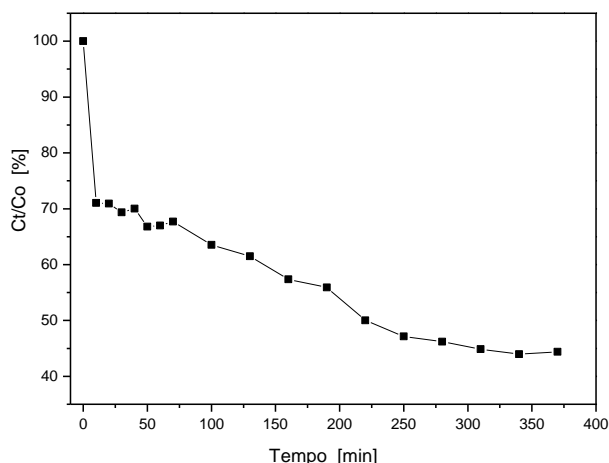
**Figura 5** - Espectro dos corantes curcumina e carmim na concentração 10 mg.L<sup>-1</sup> (1:5) em pH 6

Como pode ser visto a área de sobreposição é bastante pequena. Vale lembrar, que esses corantes foram usados nos processos de adsorção tal como recebidos e a largura da banda mostra que outros compostos podem estar presentes.

### 3.4 Cinética de adsorção

Os experimentos de cinética tiveram como objetivo estudar os modelos de mecanismo que controlam o processo cinético e encontrar o tempo em que ocorre o equilíbrio adsorvente dos corantes.

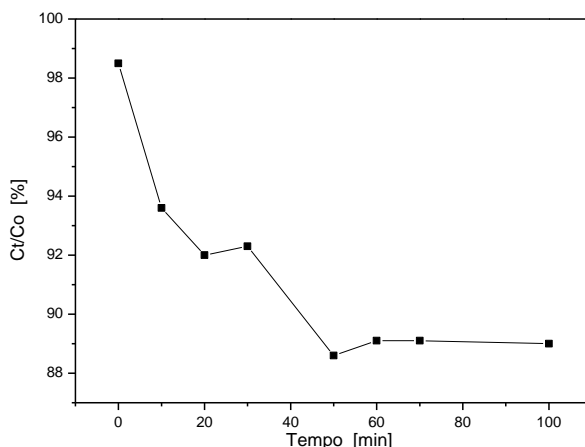
A Figura 6 mostra a variação da concentração da fase líquida ( $C_t$ ) do corante curcumina em função do tempo de contato com o adsorvente;  $C_t$  e  $C_0$  correspondem à concentração do corante em um tempo  $t$  e a concentração inicial, respectivamente.



**Figura 6** - Variação da concentração da solução do corante curcumina sozinho em função do tempo,  $C_o = 166 \text{ mg.L}^{-1}$ , microesfera = 100 mg, Volume da solução = 100 mL, pH 6 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), velocidade de agitação = 150 rpm, temperatura =  $25^\circ\text{C}$ .

Comparando-se as frações adsorvidas do corante curcumina, observou-se que, aos 10 minutos, foi adsorvido 30% da concentração inicial do corante e o equilíbrio foi alcançado em 370 minutos com aproximadamente 55% da concentração inicial do corante adsorvido.

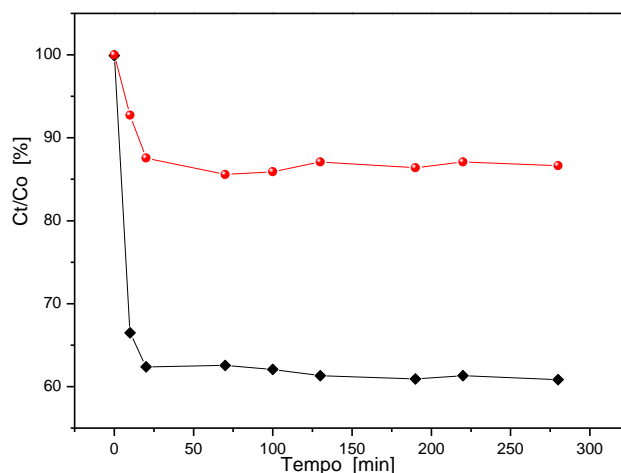
A Figura 7 mostra a variação da concentração da fase líquida ( $C_t$ ) do corante carmim em função do tempo de contato.



**Figura 7** - Variação da concentração da solução do corante carmim em função do tempo sozinho,  $C_o = 833 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $m = 100 \text{ mg}$ ,  $V = 100 \text{ mL}$ , pH 6 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), velocidade de agitação 150 rpm, temperatura =  $25^\circ\text{C}$

Comparando-se as frações adsorvidas do corante carmim, observou-se que, aos 20 minutos, foi adsorvido 8% da concentração inicial do corante e o equilíbrio foi alcançado em 70 minutos com cerca de 11% da concentração inicial do corante adsorvido.

A Figura 8 mostra a variação da concentração da solução dos corantes curcumina e carmim (1 : 5) em função do tempo na mistura, onde os corantes apresentaram curvas mais lineares, na mistura obteve-se comportamento semelhantes aos corantes em solução individuais. O corante curcumina adsorveu melhor quando comparado ao corante carmim, apresentando adsorção cerca de 3,5 vezes maior.

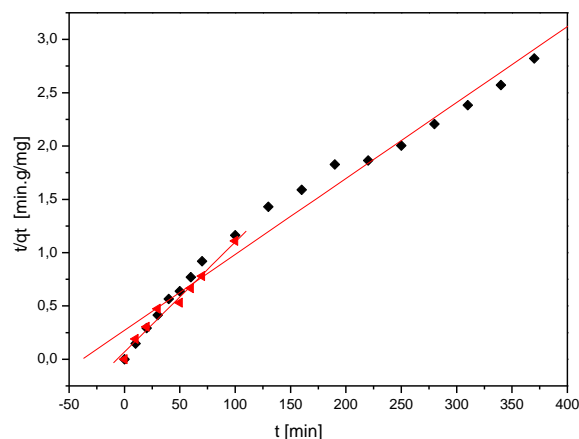


**Figura 8** - Variação da concentração da solução dos corantes em função do tempo na mistura, (•) Co curcumina = 166 mg.L<sup>-1</sup> e (•) Co carmim = 833 mg.L<sup>-1</sup> massa microesfera = 100 mg, Vsolução = 100 mL, pH 6 (0,1 mol L<sup>-1</sup>), velocidade de agitação = 150 rpm, temperatura=25°C.

Para avaliar o mecanismo que controla o processo, os modelos de pseudo primeira-ordem<sup>23</sup> e pseudo segunda-ordem<sup>24</sup> foram testados, e a validade dos modelos foi verificada pelas equações destes modelos. Uma boa correlação dos dados cinéticos comprova o possível mecanismo cinético de adsorção na fase sólida.

O modelo de pseudo primeira-ordem pode ser interpretado pelo gráfico do  $\log(q_e - q_t)$  vs  $t$  e analisando as equações deste modelo, estas não apresentam boa linearidade e uma discrepância foi observada, os valores experimentais de  $Q_e$  não foram iguais aos valores calculados em nenhuma das situações experimentais (sozinho e mistura).

A equação de pseudo segunda-ordem pode ser interpretada pelo gráfico do  $(t/q_t)$  vs  $t$  (Figura 09). A equação linear do modelo cinético forneceu as equações  $Y = 2,71 \cdot 10^{-1} + 7,1 \cdot 10^{-3} X$  ( $R^2 = 0,973$ ) e  $Y = 6,86 \cdot 10^{-2} + 1,0 \cdot 10^{-2} X$  ( $R^2 = 0,978$ ) do corante curcumina e do corante carmim sozinhos, respectivamente.



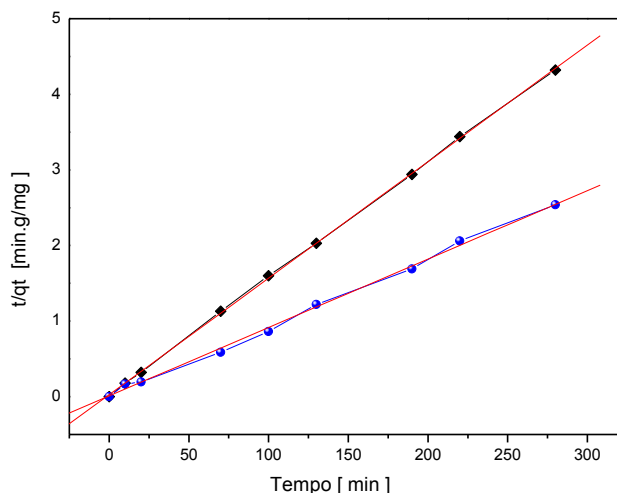
**Figura 9** - Modelo cinético de pseudo segunda-ordem. (•) corante curcumina (•) corante carmim sozinhos, (•)  $C_0$  curcumina = 166 mg.L<sup>-1</sup> e (•)  $C_0$  carmim = 833 mg.L<sup>-1</sup> massa microesfera = 100 mg,  $V_{\text{solução}}$  = 100 mL, pH 6 (0,1 mol L<sup>-1</sup>), velocidade de agitação = 150 rpm, temperatura= 25°C.

Os gráficos forneceram coeficiente de ajuste de aproximadamente  $R^2 \approx 0,975$  para os dois corantes, portanto, este modelo foi selecionado para calcular os parâmetros cinéticos. As constantes de velocidade ( $k_2$ ) obtidas foram:  $1,87 \times 10^{-4}$  e  $1,55 \times 10^{-3}$  g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> para os corantes curcumina e carmim, respectivamente.

Comparando-se os valores experimentais de  $Q_e$  de 131 e 90,44 mg g<sup>-1</sup> com os valores calculados 140,4 e 96,99 mg g<sup>-1</sup>, estes mostraram uma boa concordância, com desvios de -7,13 % e -7,25 %, respectivamente.

Os valores iniciais de velocidade de adsorção encontrados foram 3,69 e 14,6 mg (g min)<sup>-1</sup> para solução dos corantes curcumina e carmim, respectivamente. Estes resultados mostraram que a velocidade de adsorção do corante curcumina foi maior que a velocidade de adsorção do corante carmim e considerando-se que a concentração do corante carmim é cinco vezes maior, a velocidade inicial deveria ser 19,8 mg (g min)<sup>-1</sup> e não 14,6 mg (g min)<sup>-1</sup>.

Para estudos cinéticos dos corantes em mistura 1 : 5 (curcumina :carmim), a equação linear do modelo cinético forneceu as equações  $Y = 2,6 \cdot 10^{-2} + 1,5 \cdot 10^{-2} X$  ( $R^2 = 1,000$ ) e  $Y = 9,76 \cdot 10^{-3} + 9,1 \cdot 10^{-3} X$  ( $R^2 = 0,997$ ) (Figura 10).



**Figura 10** - Modelo cinético de pseudo segunda-ordem. ( • ) corante curcumina ( • ) corante carmim na mistura 1 : 5, ( • ) Concentração inicial curcumina = 166 mg.L<sup>-1</sup> e ( • ) Concentração inicial de carmim = 833 mg.L<sup>-1</sup>, massa microesfera = 100 mg, Volume de solução = 100 mL, pH 6 (0,1 mol L<sup>-1</sup>), velocidade de agitação = 150rpm, temperatura =25°C.

Os gráficos forneceram excelentes linearidades com um  $R^2 \approx 0,999$ , portanto este modelo foi selecionado para calcular os parâmetros cinéticos. As constantes de velocidade ( $k_2$ ) obtidas foram:  $9,14 \times 10^{-3}$  e  $8,39 \times 10^{-3}$  g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> para os corantes curcumina e carmim, respectivamente. Comparando-se os valores experimentais de  $Q_e$  de 64,75 e 110,1 mg g<sup>-1</sup> com os valores calculados 64,85 e 110,5 mg g<sup>-1</sup>, estes mostraram uma boa concordância, com desvios de -0,16% e -0,36%, respectivamente. Os valores iniciais da velocidade de adsorção encontrados foram 38 e 102 mg (g min)<sup>-1</sup> para solução dos corantes curcumina e carmim, respectivamente. Estes resultados mostraram que a velocidade de adsorção do corante curcumina foi maior que o corante carmim e considerando que a concentração é corante carmim é cinco vezes maior do que o corante curcumina, a velocidade inicial (h) deveria ser 190 mg (g min)<sup>-1</sup> e não 102 mg (g min)<sup>-1</sup>.

#### 4 CONCLUSÕES

Ao realizar os estudos de adsorção dos corantes isolados verificou-se que o corante curcumina possui uma adsorção de aproximadamente 3,5 vezes maior que o corante carmim, indicando assim, uma afinidade maior da curcumina pela quitosana.

Ao analisar a cinética da mistura de ambos os corantes verificou-se que a curcumina foi impregnada em menor quantidade pela microesfera na mistura do que em sua cinética isolada. Através da cinética da mistura pode-se observar também que não foi possível encapsular os corantes mantendo a proporção da mistura proposta inicialmente

neste trabalho (1:5), pois as mesmas não são impregnadas na microesfera em proporções adequadas de forma semelhante, pois os corantes possuem comportamento distintos durante processo de adsorção pela microesfera, assim não foi possível manter a coloração proposta.

Os dados experimentais da cinética se ajustaram melhor ao modelo de pseudo segunda-ordem, o qual forneceu uma constante de velocidade,  $k_2$ , de  $9,14E^{-3}$  e  $8,39E^{-3} \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , para o corante em mistura 1 : 5 (curcumina : carmim), e esses valores foram maiores que os valores encontrados nas cinéticas individuais

## REFERENCIAS

1. Toni, J. L., Fonseca Xavier, M., Novy Quadri, M. G. N., Bastos Quadri, M. B., R.; *Bras. Agrociência* **2007**, 13, 291.
2. <http://www.anvisa.gov.br>. Acessada em novembro, 2012.
3. Downham, A.; Collins, P.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2000**, 35, 5.
4. Hasler, C.M. ; *J. Am. Coll. Nutr.* **2000**, 19, 499S.
5. Govindarajan, V. S.; *Food Science and Nutrition* **1980**, 12, 199.
6. Jayaprakasha, G. K., Jaganmohan Rao, L., Sakariah, K. K.; *Food Chem* **2006**, 98, 720.
7. Constant, P.B.L.; Stringheta, P.C.; Sandi, D. B.; *CEEPA* **2002**, 20, 203.
8. <http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>, acessada em outubro, 2012.
9. Juang, R.; Tseng, R. K. L.; Wu, F. C.; Lee, S.H.; *Bioresource Tech.*, 2001, 80, 187.
10. Guibal, E.; *Separation and Purification Technology* **2004**, 38, 43.
11. Kimura, I. Y; Laranjeira, M.C.M.; Fávère, V. T.; *Int. J. Polym. Mater.* **2002**, 51, 284.
12. Chiou, M.; Ho, P.; Li, H.; *Chemosphere*, **2003**, 50, 1095.
13. Cestari, A. R.; Vieira, A.F.S.; Santos, A. G P.; Mota, J. A.; Almeida, V. P.; *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, 280, 380.
14. Uzun, I.; *Dyes Pigments*, 2006, 70, 76.
15. Campana Filho, S. P.; Signini R.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **2001**, 4, 169.
16. Santos, J. E.; Soares, J. P.; Dockal, E. R.; Campana Filho, S.P.; Cavalheiro, E.T.G.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*; **2003**, 13, 242.

17. Mourya, V. K.; Inamdar, N. N.; *Reactive and Functional Polymers* **2008**, 68, 1013.
18. King, A. H., In: RISH, S. J., REINECCIUS, G. A; *Encapsulation and controlled release of food ingredients*, 1995, 8.
19. Pontes, L. V., *Tese de doutorado*, Universidade Federal de viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2004.
20. Parize, A.L., *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
21. Krishnamurthy, N.; Mathew, A.G.; Nambudiri, E.S.; Shivashankar, S.; Lewis, Y.S. & Natarajan, C.P.; *Tropical Science* **1976**, 18, 37.
21. Parize, A. L., Stulzer, H. K. ,Laranjeira, M. C. M., Brighente, I. M. C., Souza, T. C. R., *Quim. Nova* **2012**, 35, 1127.
22. Boruah, B. M. Saikia, P. M., Dutta, R. K.; *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2012**, 245, 18
23. S. Lagergren, *Handlingar*. **1988**, 24, 1.
24. Ho, Y.S.; McKay, G.; *Process Biochem.* **1999**, 34, 451.



## CAPITULO 6

Artigo será enviado a Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia

### **ESTUDO DA ADSORÇÃO (IMPREGNAÇÃO) DOS CORANTES NATURAIS CURCUMINA E CARMIM DE COCHONILHA EM MICROESFERAS DE QUITOSANA**

GRASIELE MÔNICA MATTÉ<sup>1</sup>  
SIRLEI DA ROSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: grasiole\_matte@hotmail.com).

<sup>2</sup> Dr em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) UTFPR – Campus Medianeira. Avenida Brasil, 4232, CEP, 85.884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: sirleirosa@gmail.com)

#### RESUMO

A cor é um dos atributos mais importantes em um alimento, porém a aplicação de corantes artificiais tem sido alvo de polêmicas, pois alguns estudos têm relacionado seu consumo a malefícios causados à saúde. Objetivou-se neste trabalho encapsular corantes naturais em microesferas de quitosana, com o intuito de verificar o comportamento de impregnação e liberação dos corantes carmim e curcumina. Utilizando o método de impregnação por adsorção observou-se que o corante curcumina teve uma impregnação 10 vezes maior quando comparada ao corante carmim. A liberação dos corantes encapsulados se mostraram pH dependente apresentando uma situação de liberação controlada conforme o pH é alterado.

**PALAVRAS CHAVES:** *ADSORÇÃO, CORANTES NATURAIS, LIBERAÇÃO CONTROLADA.*

#### ABSTRACT

Color is one of the most important attributes in a food, but the application of artificial dyes have been the subject of controversy, as some studies have linked consumption of these dyes to the harm caused to health. The objective of this study was to encapsulate natural dyes on chitosan microspheres, in order to verify the behavior of dye uptake and release of carmine and curcumin. Using the impregnation method by adsorption revealed that curcumin dye uptake had a 10 times higher compared to the carmine dye. The release of the encapsulated dye is shown presenting a situation pH dependent controlled release as the pH is changed.

**KEY WORDS:** *ADSORPTION, NATURAL DYES, CONTROLLED RELEASE.*

## 1 INTRODUÇÃO

A cor é uma das principais características de um produto, ela torna o produto mais atraente e também aponta a qualidade do mesmo. Os corantes alimentares, utilizados na indústria, seja natural ou sintético, são normalmente adicionados aos alimentos, a fim de compensar a perda de cor que são afetadas durante o

processamento ou armazenamento do produto, a qual, deve ser restituída ou recondicionada mediante a adição de corantes apropriados, a quantidade permitida de corantes sintéticos, porém, é estritamente regulado por questões de segurança dos alimentos, pois apresentam natureza tóxica, principalmente quando consumido em excesso. [1;2], com isso, a aplicação destes corantes produzidos sinteticamente gerou questionamentos em organismos mundiais de saúde e o seu uso foi proibido em muitos países [3;4].

O uso dos corantes artificiais se dá, principalmente, pela sua estabilidade e por seu poder de coloração, entretanto, além do uso de alguns destes corantes serem proibidos em muitos países, os consumidores têm se atentado para a qualidade dos alimentos, com isso, as indústrias e pesquisas têm voltado sua atenção para a substituição dos corantes artificiais por fontes naturais [5].

Alguns pigmentos naturais possuem efeitos benéficos que estão relacionados com sua propriedade antioxidante, proteção contra danos oxidativos a células, efeitos inflamatórios e prevenção de algumas doenças crônicas [6]. Porém, por serem compostos instáveis a algumas condições de processamento comuns em alimentos, como: luz, acidez, temperatura, oxigênio, os pigmentos naturais necessitam de proteção e com isso, surge a microencapsulação como método de proteção destes compostos [7;8].

Dentre os corantes naturais com benefícios aos seres humanos, está o corante curcumina, principal pigmento amarelo extraído do açafrão, especiaria muito consumida na Índia e na Ásia e com grande potencial quimiopreventivo e anticarcinogênico [9;10]. A curcumina, encontrada naturalmente na *Cúrcuma longa*, possui uma cor amarelo intenso; entre outras características, está a insolubilidade em água e também em éter, além de ser degradado em soluções alcalinas e instáveis à luz, o que limita a aplicação deste pigmento puro em alimentos [11, 9,12].

Outro tipo de corante que tem sido utilizado na indústria de alimentos é o corante carmim. Este corante apresenta a propriedade de fixar-se em proteínas, o que o torna útil na coloração de produtos à base de leite, como iogurtes, sorvetes, bebidas lácteas, produtos cárneos e bolachas, geléias e bebidas, bem como em revestimentos de produtos farmacêuticos [7].

O ácido carmínico é solúvel em água e a sua coloração depende do pH do meio (laranja em pH ácido, vermelho na faixa de pH 7 e azul na faixa alcalina); forma

complexo com metais; são solúveis em meio alcalino e insolúveis em pH ácido, sendo esta a única limitação para o seu emprego [6,7].

Este trabalho tem por objetivo estudar o comportamento da impregnação dos corantes naturais curcumina e carmim em microesferas de quitosana pelo método de adsorção, e estudar o processo de liberação destes corantes em diferentes valores de pH.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A quitosana empregada para preparação das microesferas foi gentilmente cedida pela empresa Polymar, com um grau de desacetilação de 86%. O corante Curmina em pó (pureza 60%) e o Corante carmim (pureza 45%) foram obtidos da Sigma Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### **2.2 Instrumentação**

Os ensaios de adsorção foram realizados em incubadora termostaticada tipo “shaker” modelo INR, marca Lactea; as massas foram pesadas em balança Marte analítica e as medidas de absorvância para determinação da concentração dos corantes em solução foram feitas em espectrofotômetro Perken Elmer UV-vis modelo XLS, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Sigma modelo 3K30 antes de cada leitura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.3 Métodos**

#### **2.3.1 Preparação das microesferas das quitosana**

Foram dissolvidos 3 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5% (v/v) e o sistema foi mantido sob agitação até a completa homogeneização da solução; em seguida, 0,5g de acetato de sódio foram adicionadas a solução. Esta solução foi gotejada através de sistema extrusor, em banho de precipitação, contendo solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Através do fenômeno de inversão de fases ocorreu a precipitação das microesferas. Após estar em contato por 2 horas na solução de

NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, as microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada até que a água de lavagem atingisse o pH 7,0 e, em seguida, as amostras secas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Para aumentar o fluxo da solução viscosa de quitosana através o sistema extrusor, foi utilizado uma bomba de vácuo e ar comprimido Tecnal, modelo 058.

### 2.3.2 Preparação das soluções

Soluções estoques de 1000 mg L<sup>-1</sup> dos corantes foram preparadas, levando em consideração o grau de pureza de cada corante.

As soluções tampão com pH 1,0 e 2,0 (HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e HCl 0,01mol.L<sup>-1</sup>), soluções tampão com pH na faixa de 3,0; a 6,0 foram feitas partir da mistura CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa (0,1 mol L<sup>-1</sup>), enquanto que a solução tampão de pH igual a 7 foi utilizado NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>). Para verificação da adsorção em meio alcalino, foi utilizado a solução tampão NH<sub>4</sub>OH/NH<sub>4</sub>Cl (0,1 mol L<sup>-1</sup>).

### 2.3.3 Deslocamento do pH

O deslocamento do pH foi realizado na faixa de pH 1 – 10 utilizando-se as soluções tampões descritas anteriormente para cada corante sozinho, ou seja, nas soluções de carmim e curcumina, e também, na mistura binária destes corantes, na proporção 1 : 1 (corante curcumina : corante carmim). Um ensaio sem a utilização da solução tampão foi realizado e denominado “Sem tampão”.

### 2.3.4 Curva de calibração

Para os experimentos de adsorção dos corantes curcumina e carmim, em soluções individuais e binárias, foram construídas curvas de calibração de concentração de corante ( $C_{\text{corante}}$ ) *versus* a absorbância (Abs.) das soluções, sendo que para adsorção dos corantes em misturas, a absorbância do corante curcumina foi lida no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante curcumina (424 nm) e no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante carmim (519 nm). Assim como, a absorbância do corante carmim foi lida no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante carmim (519 nm) e no  $\lambda_{\text{máximo}}$  do corante curcumina (424 nm). Para a curva de calibração da curva binária utilizou-se a Equação 3.

$$\begin{aligned} A(\lambda_1) &= \varepsilon_1 \cdot C_{\text{Cur}}(\lambda_1) + \varepsilon_2 \cdot C_{\text{Car}}(\lambda_1) \\ A(\lambda_2) &= \varepsilon_1 \cdot C_{\text{Cur}}(\lambda_2) + \varepsilon_2 \cdot C_{\text{Car}}(\lambda_2) \end{aligned} \quad \text{Eq.(3)}$$

onde,  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$  e  $\varepsilon_3$  representa os coeficiente de absorvidade da curvas de calibração do corante individua.

A concentração de cada corante na mistura binária foi obtida usando o aplicativo Maple 12 (Waterloo Maple Inc.). Com os dados de concentração de equilíbrio buscou-se construir as isotermas para cada corante para que fosse possível extrair os parâmetros de cada isoterma.

### 2.3.5 Experimentos de adsorção

Uma quantidade conhecida de adsorvente e um volume de solução dos corantes foram colocados em erlenmeyers fechados de 125 mL. O sistema permaneceu sob agitação, numa incubadora tipo “shaker” termostatizada modelo 058 da marca Tecnal, a 25°C. O material foi separado da solução por centrifugação e a concentração do corante não-adsorvido foi determinado por espectrofotometria UV-Vis usando uma curva de calibração no  $\lambda_{\text{max}}$  de cada corante. A quantidade adsorvida de corante foi determinada empregando-se a equação 4:

$$Q_e = \frac{(C_o - C_f) \cdot V}{W} \quad \text{Eq. (4)}$$

onde,  $Q_e$  é a quantidade de íons adsorvidas no equilíbrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_o$  é a concentração inicial de íons em solução ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_f$  é a concentração dos corantes em solução,  $V$  é o volume da solução (L) e  $W$  é a massa do adsorbato (g).

O efeito do pH foi conduzido empregando-se 50 mg adsorvente, 50 mL de solução de corante ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), velocidade de agitação de 150 rpm. As microesferas foram expostas as soluções de corantes tamponadas com pHs entre 6 e 10. O comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) foi 424 e 519 nm para os corantes curcumina e carmim, respectivamente.

A cinética de adsorção foi conduzida empregando frascos fechados contendo 100 mg de adsorvente, 100 mL de solução dos corantes e tamponadas em pH 7.0. As concentrações das soluções individuais foram  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  para cada corante individualmente, e para a mistura binária foi  $250 \text{ mg.L}^{-1} : 250 \text{ mg.L}^{-1}$  (proporção

curcumina : carmim). Em tempos pré-determinados, uma alíquota foi removida e o valor de absorvância foi lido.

### **2.3.6 Isotermas de Adsorção**

Todos os experimentos de equilíbrio de adsorção usaram aproximadamente 50mg de adsorvente. A essa massa foram adicionadas 50mL de soluções dos corantes naturais curcumina e carmim, individualmente e, em misturas. As amostras, tamponadas ( $\mu= 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), foram colocadas em erlenmeyers fechados e mantidas sob agitação constante até atingir o equilíbrio de adsorção. As faixas de concentração e condições físicas utilizadas nestes experimentos estão apresentadas a seguir.

#### **2.3.6.1 Isotermas de adsorção de corantes individuais**

Previamente aos experimentos de adsorção em equilíbrio da mistura dos corantes curcumina e carmim, otimizou-se o sistema através da obtenção de curvas de adsorção dos corantes em soluções individuais. Soluções dos corantes na faixa de concentração de 50 a 500  $\text{mg L}^{-1}$ , tamponadas em pH igual a 7 e ( $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), foram mantidas nas temperaturas de 25°C e agitadas a 150 rpm por 90 minutos.

#### **2.3.6.2 Isotermas de adsorção em soluções binárias**

Após os experimentos de adsorção em equilíbrio dos corantes curcumina e carmim em soluções individuais, foram obtidas curvas de adsorção destes corantes a temperatura de 25°C, em soluções binárias.

Soluções dos corantes na faixa de concentração de 25 a 250  $\text{mg L}^{-1}$  foram tamponadas em pH igual a 7 ( $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). A absorvância para construção das isotermas obtidas por varredura, na faixa de 400 a 700nm, teve como objetivo observar o deslocamento do espectro na mistura dos corantes e compará-lo com espectro do corante individual, uma vez que a concentração que foi obtida, usando a equação expandida para dois termos, requer que o comportamento em mistura seja

linear. Ou seja, que não haja interação entre os corantes e, ainda, que as condições experimentais sejam as mesmas daquelas aplicadas para os experimentos de adsorção dos corantes individuais <sup>[13]</sup>.

Para interpretação dos dados de adsorção foram empregados os modelos de isotermas Langmuir, Freundlich, linear e de Dubinin-Radushkevich. A isoterma de Langmuir considera a superfície do adsorvente com sítios idênticos em termos de energia, ou seja, considera superfície do adsorvente homogênea, enquanto que a isoterma de Freundlich é aplicada à superfície heterogênea <sup>[14]</sup>. A isoterma de Dubinin-Radushkevich analisa se adsorção entre os corantes é de natureza física ou química <sup>[15, 16, 17,18]</sup>.

### **2.3.7 Determinação do Grau de intumescimento**

A determinação do grau de intumescimento, tanto para as microesferas sem corante quanto para as microesferas impregnadas, foi realizada em soluções tampão com o pH entre 1 e 5. As microesferas foram previamente secas em estufa, e em seguida foram pesadas 30 mg de microesferas para cada ensaio. Depois de pesadas as esferas, a solução tampão foi adicionada às esferas, e imediatamente, levadas ao Shaker, sob temperatura de 25°C e agitação de 150 rpm. Em tempos pré-determinados as amostras foram retiradas do sistema, secas em papel absorvente e pesadas. Em seguida, foram recolocadas no sistema juntamente a solução tampão.

O grau de intumescimento das amostras se deu através da Equação 5:

$$GI = \frac{(W_t - W_o)}{W_o} \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

onde,  $W_t$  refere-se ao peso da amostra no tempo  $t$  e  $W_o$  refere-se ao peso inicial da amostra.

### **2.3.8 Determinação da quantidade do corante encapsulado.**

Foram utilizados para esta determinação 50 mg de cada amostra de microesfera de quitosana impregnada com Carmim, Curcumina e a Mistura binária de

ambos. As amostras foram mantidas em contato com solução tampão pH 3 por 60 minutos e sob agitação 150 rpm em temperatura de 25°C. Os valores finais foram obtidos a partir de uma curva de calibração realizada para cada corante.

### **2.3.9 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia interna, externa e tamanho médio das amostras foram determinados utilizando-se a técnica da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram colocadas sobre *estabes* e recobertas com uma camada de ouro. O diâmetro médio das amostras foi obtido a partir da média de uma população de microesferas. Para todas as amostras foram analisados os cortes transversais para avaliar as características internas da amostras.

Para encontrar o tamanho das microesferas foi utilizado o software de domínio público ImageJ utilizado para processamento e análise de imagens, programado na linguagem de programação Java, desenvolvido por Wayne Rasband.

### **2.3.10 Estudo da liberação do corante.**

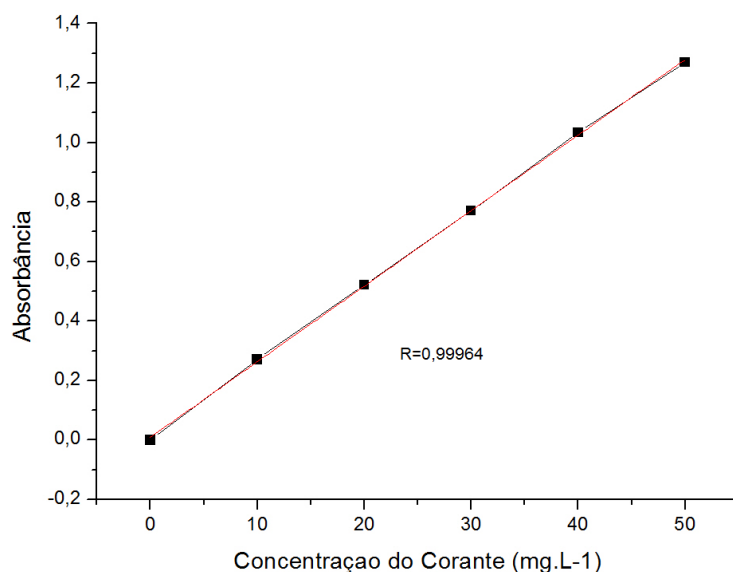
Amostras de 25,0mg de microesferas impregnadas, em pH 7, com os diferentes corantes, foram suspensas em 25,0 mL de tampão de pH entre 1 e 5, tendo sido o pH ajustado com a adição de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ou HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Em seguida as amostras foram mantidas em agitação constante (150 rpm) em Shaker na temperatura de 25°C, onde o tempo para completa dissolução das mesmas foi monitorado.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

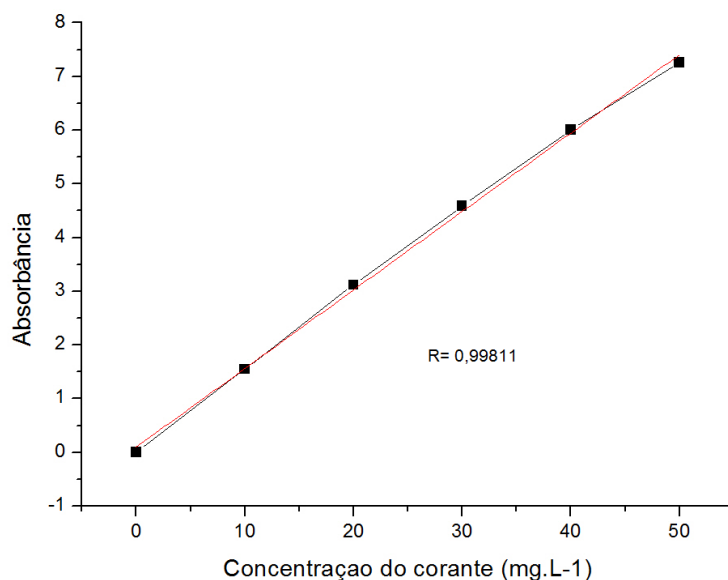
### **3.1 Curva de Calibração para os corantes individuais e em mistura.**

Para determinar a quantidade de corante presente durante os processos de adsorção, e assim, descobrir a quantidade de corante encapsulado, curvas de calibração de cada corante foram realizadas e são apresentadas na Figura 1 (a) para o corante Carmim e (b) para o corante Curcumina.





(a)

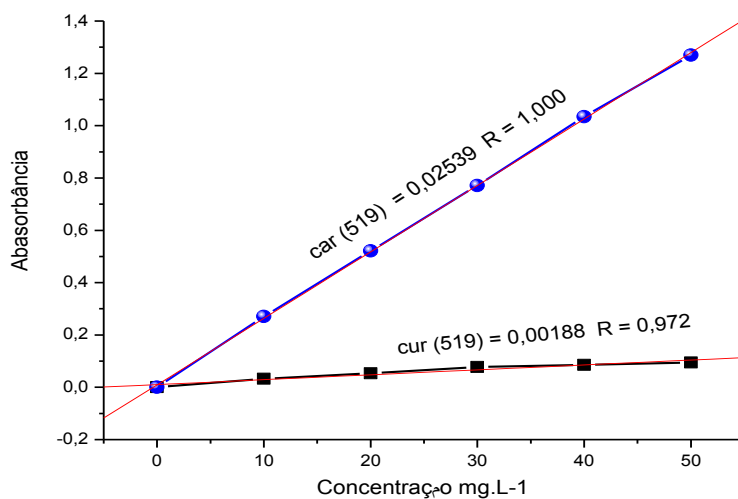


(b)

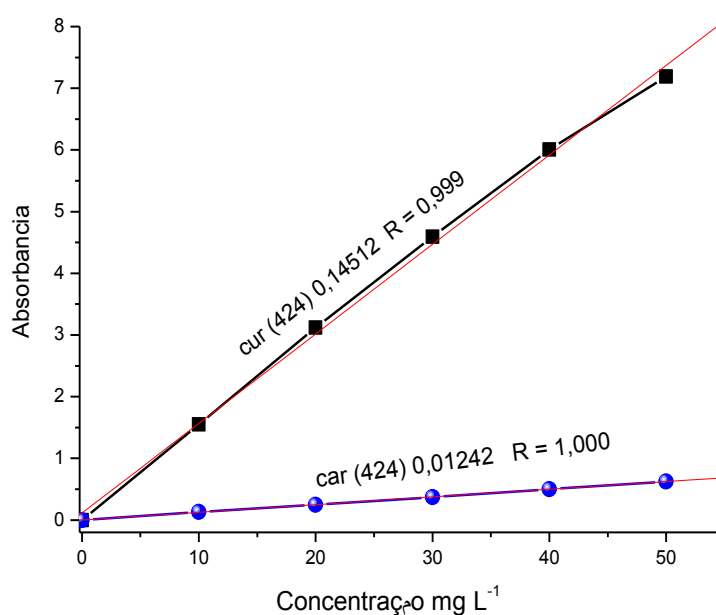
**Figura 1** - Curva de calibração para o Corante Carmim (a) e Curcumina (b).

Para encontrar os valores referentes as quantidades de cada corante presente na mistura binária (1:1), uma curva de calibração foi realizada através da leitura da absorbância do corante curcumina obtida no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) do corante 424 nm e também no comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) 519 nm do carmim, e o mesmo foi realizado para obter uma curva do corante carmim na mistura realizando leituras nos comprimentos 424 nm e 519 nm.

A Figura 2 (a) e (b) indicam as curvas de calibração para os corantes: carmim e curcumina respectivamente, onde suas leituras foram obtidas nos comprimentos de onda 519 nm e 424 nm, os quais correspondem ao pico de absorbância máxima encontrada.



(a)



(b)

**Figura 2** – Curva de calibração dos corantes: Carmim (a) e Curcumina (b).

A partir das curvas obtidas, foi possível realizar as equações lineares (Equações 6 e 7), as quais permitiram conhecer as concentrações dos corantes

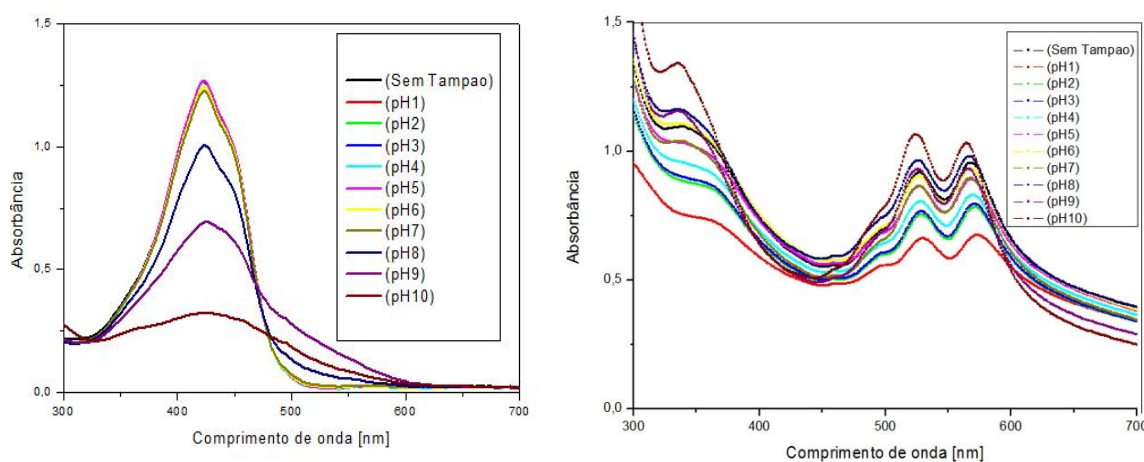
Carmim e Curcumina na mistura na fase líquida e em função destas obter a quantidade de corante adsorvida pela microesfera de quitosana.

$$A_{(519\text{nm})} = 0,00188.C_{\text{cur}} + 0,0054.C_{\text{car}} \quad \text{Eq (6)}$$

$$A_{(424\text{nm})} = 0,14512.C_{\text{cur}} + 0,01242.C_{\text{car}} \quad \dots \quad \text{Eq. (7)}$$

### 3.2 Deslocamento do pH para os corantes curcumina, carmim e a mistura Binária de ambos.

A Figura 3(a) ilustra o espectro UV-Vis do corante curcumina e seus respectivos comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) com variação de pH entre 1 e 10. Observa-se no gráfico que o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) da curcumina é alterado na medida em que o valor do pH aumenta e os valores de pH vão de encontro aos valores de pKa para curcumina que são, 8,3, 9,8 e 10,5 estando de acordo com a literatura [19,20]. Os comprimentos de onda máximos não variaram quando submetidos a pH ácidos e neutros (pH 1 a 7) sendo o valor encontrado de 424 nm, porém, em soluções de pH alcalino houve o efeito batocrômico, onde foram encontrados os valores de comprimento de onda máximo de 426nm para o pH 8 e 9, e 431 nm para a solução de pH 10.



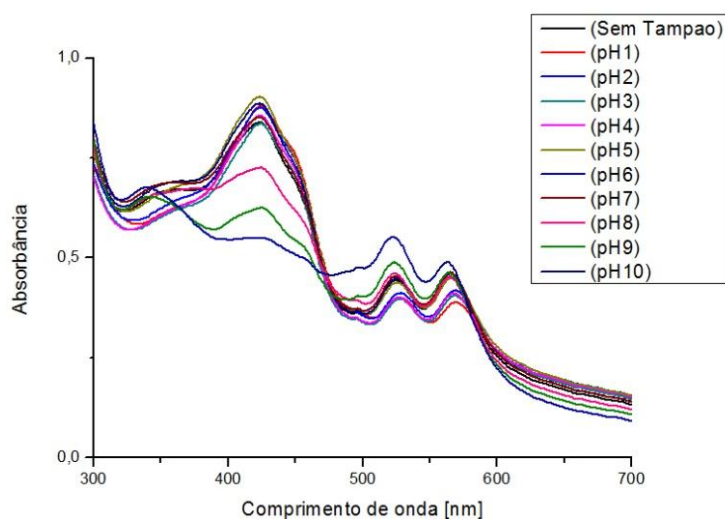
**Figura 3.** Espectros de UV-Vis para os corantes Curcumina (a) e Carmim (b), respectivamente, obtidos em soluções tampão de pH 1,0 a 10,0.

A intensidade da cor da curcumina e a sua fluorescência pode ser alterada pela quantidade de água e também pelo pH da solução, quando este varia de neutro para soluções muito ácidas ou básicas a partir do pH 8 [21], o que também pode ser

observado através da Figura 3(a), que mostra o efeito hipocrômico do corante curcumina quando encontrado em soluções alcalinas (pH 8,9 e 10).

O espectro UV-Vis para o corante Carmim é encontrado na Figura 3(b), observa-se neste gráfico o efeito hipocrômico gradual do corante conforme o pH da solução se tornou mais ácido. Alterações na coloração do Carmim podem ser obtidas através de algumas mudanças no pH, neste trabalho, as soluções de pH ácido apresentaram uma coloração mais avermelhada, ao passo que as soluções com pH alcalino apresentaram coloração arroxeada. O espectro da Figura 3(b) apresenta um efeito hipsocrômico para o corante Carmim, onde o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) do corante variou conforme o pH da solução apresentando um decréscimo no ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) conforme o pH aumentou, indo de 529 nm para os pHs 1,2,3 e 4, 526 nm para os pHs 9 e 8 e 525 nm na solução pH10.

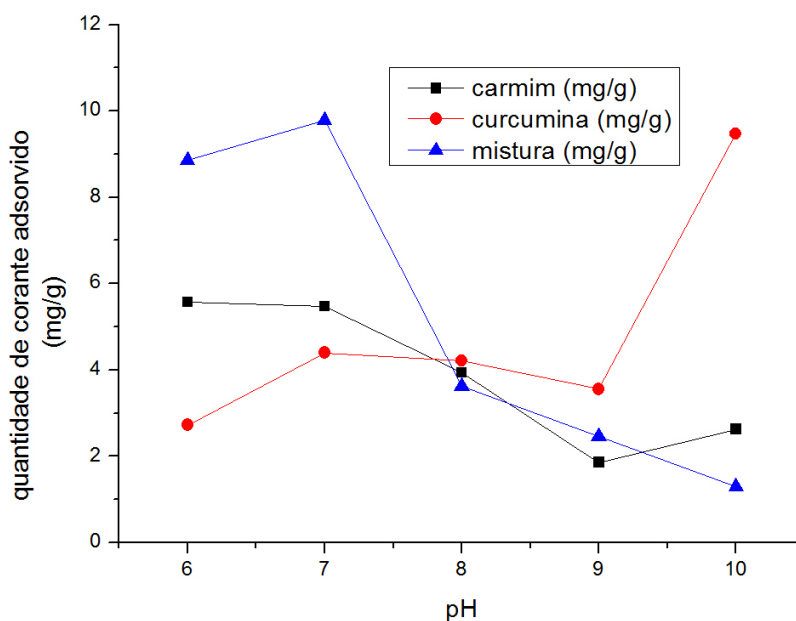
A Figura 4 apresenta o espectro UV-Vis para a mistura de Carmim e Curcumina na proporção de 1:1 e concentração de  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de ambos corantes. O espectro apresenta duas regiões de destaque entre os picos máximos, na região entre 424 nm, região de leitura da Curcumina e também na região de 525 nm picos de corantes avermelhados como o Carmim, o espectro para a mistura apresenta um comportamento similar observado também para os corantes separadamente, podendo-se observar a presença pronunciada dos dois corantes na mistura.



**Figura 4.** Espectro de UV-Vis para a mistura (1:1) dos corantes curcumina e Carmim, frente aos pHs de 1 a 10.

### 3.3 Efeito do pH na impregnação do corante curcumina, carmim e a mistura dos corantes em microesferas de quitosana

A fim de determinar o melhor pH para a impregnação do corante, foi realizado o estudo da dependência do pH na impregnação destes corantes separadamente e também na mistura, a fim de identificar o melhor pH para a impregnação de ambos os corantes na mistura.



**Figura 5** - Efeito do pH na impregnação dos corantes Carmim, Curcumina e Mistura (1:1) à 25°C ± 0,1°C Concentração inicial=50mg/L:tempo de contato 1 h.

O estudo foi realizado na faixa de pH 6,0 – 10,0. Estes limites foram definidos tendo em vista o alto grau de solubilidade da quitosana em meios ácidos, inferior ao pH 6 [22], onde a quitosana forma géis e a capacidade adsortiva do corante pela quitosana não poderia ser avaliada.

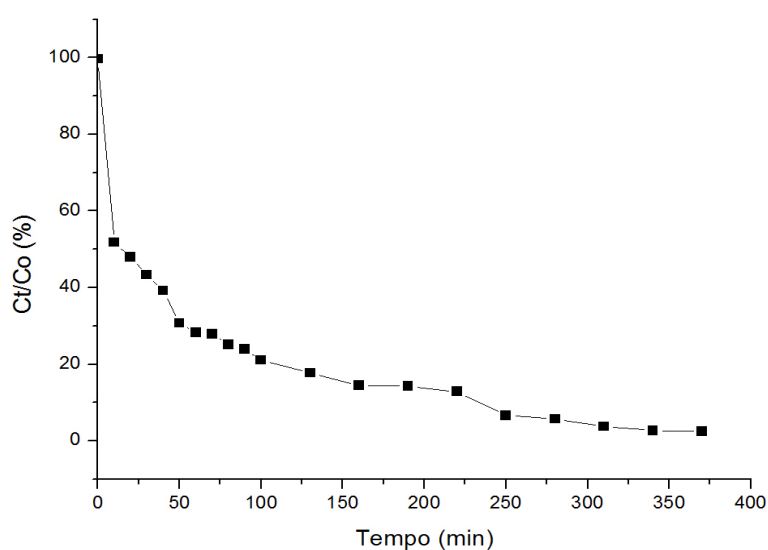
O estudo foi conduzido até o pH 10,0 para verificar o comportamento dos 2 corantes frente a impregnação na microesfera, porém alguns autores citam a ocorrência de degradação do corante Curcumina em pHs mais altos devido a ocorrência da hidrólise alcalina, que primeiramente desprotona o corante fragmentando o mesmo em moléculas menores [23,19,20]. Pode-se observar através da Figura 5, que a curcumina apresentou uma boa adsorção no pH 10, porém, nos pHs mais altos apresentou uma variação significativa na cor da solução do corante, podendo indicar uma possível degradação da curcumina, além disso, o corante

carmin apresentou baixa afinidade com a microesfera em pH mais alto, apresentando uma baixa atividade adsortiva.

Tendo em vista o exposto na Figura 5 e levando em consideração a possível degradação do corante curcumina nos pHs 9 e 10, o pH 7,0 foi selecionado para o estudo de impregnação do corante nas microesferas de quitosana, tendo em vista ser este o pH que apresentou melhores resultados para ambos os corantes no processo de adsorção no período de tempo estudado.

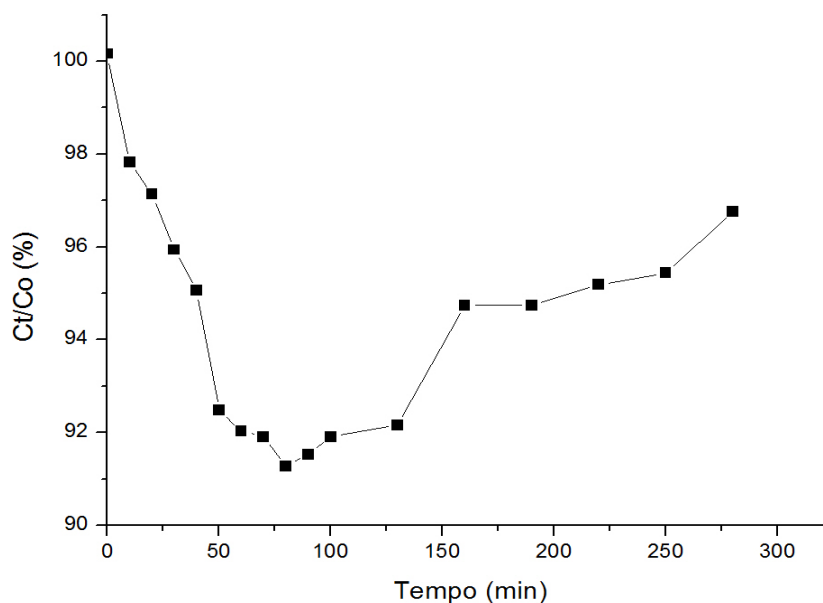
### 3.4 Estudo da Cinética de Adsorção dos corantes na microesfera de quitosana

Os experimentos de cinética de adsorção tiveram como objetivo estudar os modelos de mecanismo que controlam o processo cinético e encontrar o tempo em que ocorre o equilíbrio adsorvente dos corantes. De acordo com o estudo de efeito do pH, o pH 7 foi estabelecido para realizar os ensaios de cinética. A Figura 6 apresenta o decréscimo na concentração da solução do corante Curcumina na fase líquida em função do tempo de contato com o adsorvente. Observou-se que, aos 10 minutos do processo de adsorção, cerca de 50% da concentração inicial do corante curcumina foi impregnado nas microesferas de quitosana e a concentração de equilíbrio foi atingido em aproximadamente 300 minutos e quantidade de corante impregnando foi de aproximadamente 89% do corante no meio aquoso.



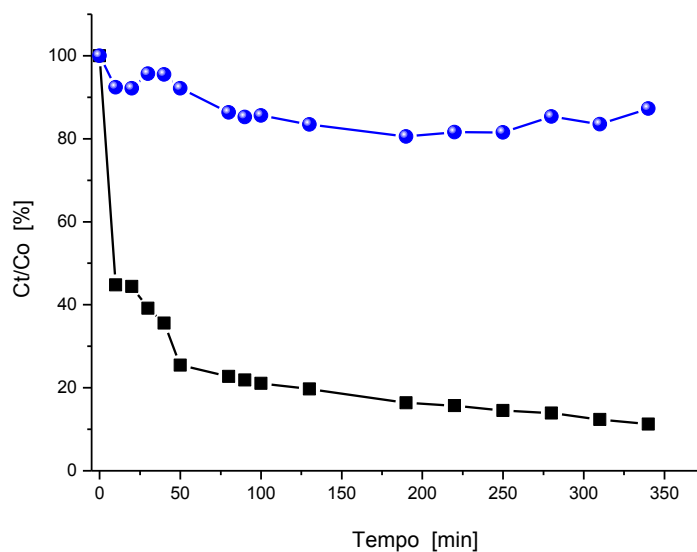
**Figura 6** - Quantidade de corante curcumina remanescente na solução (%) em função do tempo (min).  $C_0=250\text{mg.L}^{-1}$ , Agitação=150rpm,  $T^\circ\text{C}=25^\circ\text{C}$ .

Realizou-se também a cinética para o corante Carmim, e o gráfico é apresentado na Figura 7, observou-se que para o Carmim a quantidade de corante adsorvido não foi tão significativa quanto para o corante curcumina. No tempo de 10 minutos apenas 2% da concentração inicial da solução do corante foi adsorvida e em aproximadamente 70 minutos a impregnação do corante atingiu seu pico máximo, incorporando cerca de 10% do corante Carmim na matriz de quitosana.



**Figura 7** - Quantidade de corante Carmim adsorvido (%) em função do tempo (min) Concentração inicial =  $250\text{mg/L}^{-1}$ (Ct/Co), Agitação = 150 rpm,  $T^{\circ}\text{C}=25^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 8 apresenta as curvas para a concentração dos corantes: Carmim e Curcumina (1:1) na solução (Ct/Co %) em função do tempo, na mistura.



**Figura 8** - Variação da concentração da solução dos corantes em função do tempo na mistura sendo (•) Curcumina (◼) Carmim.

As curvas demonstram uma maior impregnação do corante curcumina na microesfera, comparativamente com as curvas da cinética dos corantes sozinhos, ambos tiveram um comportamento semelhante também na solução da mistura, assim, a curcumina apresentou uma maior interação com a quitosana impregnando cerca de 90% do corante na microesfera, já o corante carmim teve sua concentração reduzida apenas em aproximadamente 15% sugerindo assim, uma menor interação entre a matriz polimérica de quitosana, a diminuição e aumento na concentração do carmim indicam uma possível entrada e saída do corante da microesfera.

Com o objetivo de avaliar o mecanismo que controla o processo de adsorção dois modelos foram testados, pseudo primeira-ordem; pseudo segunda-ordem, a validade dos modelos foram testadas através das equações destes modelos. O modelo que apresentar uma boa correlação dos dados cinéticos apresentados sugere o possível mecanismo cinético de adsorção na fase sólida.

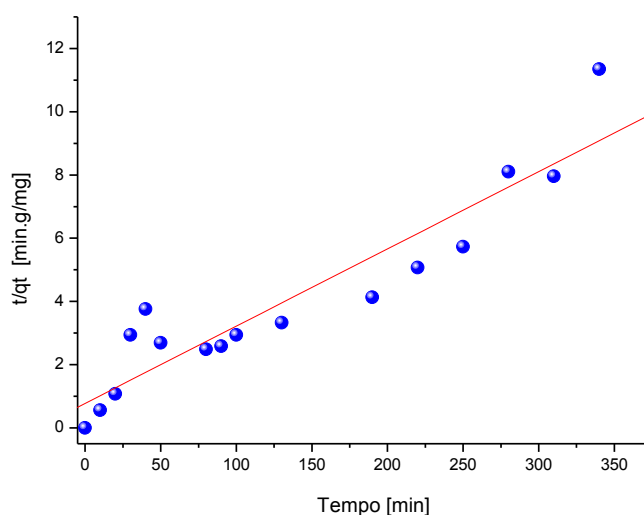
O modelo de pseudo primeira ordem não apresentou boa linearidade e uma discrepância foi encontrada, os valores de concentração experimental e calculada dos corantes não coincidiram em nenhuma situação, sozinho ou mistura, com isso o modelo foi descartado, apresentando  $R^2 = 0,1501$  para o carmim e  $R^2 = 0,9286$  para a curcumina.



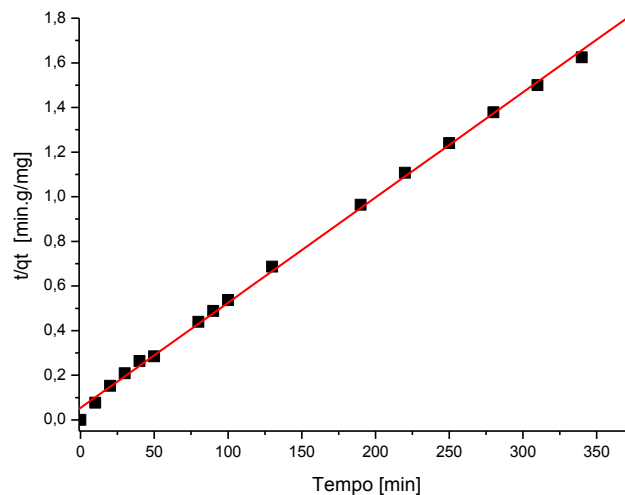
Os valores de correlação encontrados na aplicação do modelo de pseudo segunda ordem (Figura 9), apresentaram uma boa linearidade, encontrando  $R^2=0,998$  para o corante curcumina e  $R^2=0,869$  para o corante carmim, os resultados apresentaram coeficiente de ajusta de aproximadamente  $R^2 = 0,9335$  para os dois corantes, com isso optou-se pela aplicação deste modelo no cálculo dos parâmetros cinéticos.

As constantes de velocidade de impregnação dos corantes ( $k_2$ ) foram obtidas:  $4,11 \times 10^{-4}$  e  $7,66 \times 10^{-4}$   $\text{mg} \text{ (g.min}^{-1}\text{)}$ , para carmim e curcumina, respectivamente, demonstrando a maior velocidade na impregnação do corante curcumina nas microesferas desenvolvidas. Os valores iniciais de velocidade de adsorção encontrados foram de  $1,28 \text{ mg (g.min)}^{-1}$  para o carmim e  $18,5 \text{ mg (g.min)}^{-1}$  para a curcumina, assim denota-se a diferença na velocidade e na quantidade dos corantes encapsulados, reforçando a interação entre curcumina e quitosana e a falta de interação entre o corante carmim e a matriz polimérica.

Comparando-se os valores experimentais da constante de concentração de equilíbrio ( $Q_e$ ), sendo,  $29,98 \text{ mg.g}^{-1}$  para o corante carmim e  $209,28 \text{ mg.g}^{-1}$  para a curcumina, com os valores calculados pelo modelo,  $40,95 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $212,3 \text{ mg.g}^{-1}$  para os corantes respectivamente, observa-se uma boa concordância para o corante curcumina e uma diferença significativa entre os valores encontrados para o corante carmim, retificando assim a baixa interação entre polímero e carmim.



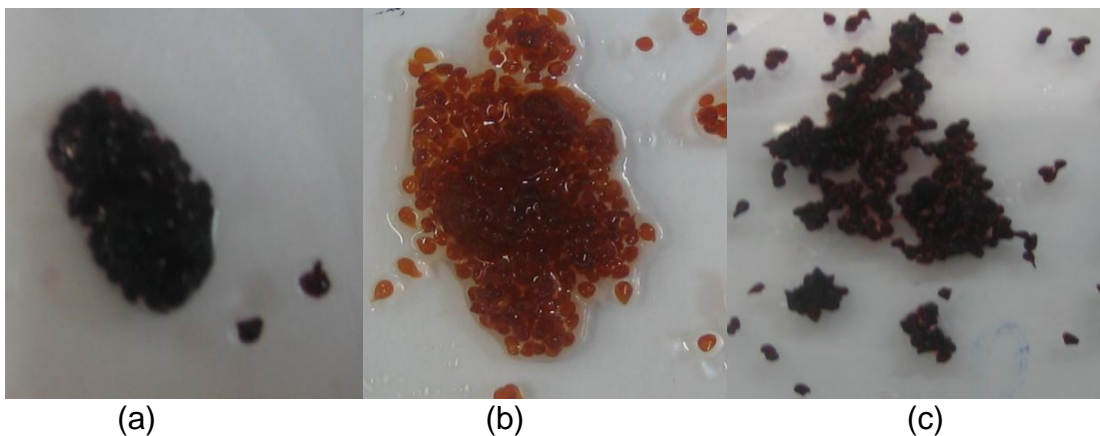
(a)



(b)

**Figura 9** - Modelo cinético de pseudo segunda ordem. Corante Carmim (a);  
Corante Curcumina (b)

A Figura 10 apresenta imagens das microesferas de quitosana logo após processo de impregnação, sendo (a) Carmim, (b) Curcumina e (c) Mistura (1:1).



(a)

(b)

(c)

**Figura 10** - Imagens das microesferas logo após processo de impregnação. (a) Carmim; (b) Curcumina; (c) Mistura.

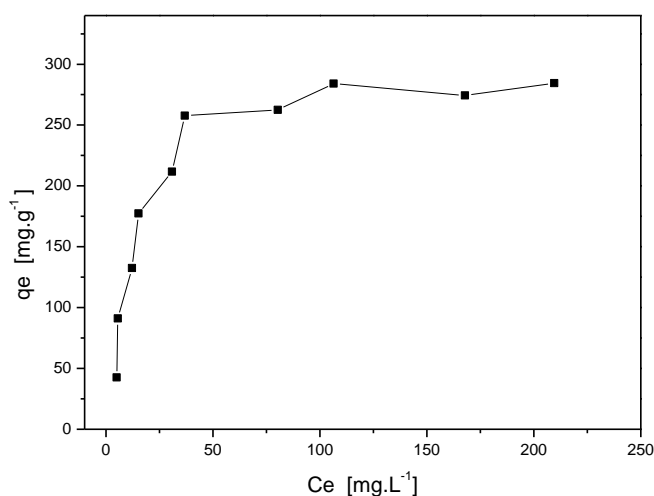
### 3.5 Isotermas de adsorção de corantes individuais

Para otimizar um projeto de um sistema de adsorção de um corante é importante estabelecer a correlação mais apropriada para as curvas de equilíbrio. A

capacidade de adsorção no equilíbrio pode ser obtida pela medida da isoterma de adsorção dos corantes no adsorvente [24].

Para verificar o comportamento na adsorção dos corantes curcumina e carmim adsorvidos sozinhos pelas microesferas de quitosana foram realizados experimentos de equilíbrio a, 25°C, 150 rpm por 90 minutos. A Figura 11 mostra a isoterma de adsorção do corante curcumina.

Foi observada que a capacidade de adsorção aumenta com a concentração de equilíbrio ( $C_e$ ) do corante na solução devido à saturação progressiva da monocamada para este corante. A isoterma do corante curcumina apresentou a forma retangular pois a capacidade de adsorção " $q_e$ " dependeu da concentração inicial do corante nas concentrações iniciais mais baixas. A partir da saturação da monocamada, a capacidade de adsorção não dependeu da concentração inicial do corante na solução, indicando que ocorreu uma afinidade entre as moléculas do corante e os sítios na superfície do adsorvente.



**Figura 11** - Isotherma de Adsorção do corante Curcumina realizado em pH 7 ( $\mu=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), 25°C.

Os dados experimentais de adsorção foram analisados segundo os modelos de isoterma linear, de Langmuir, de Freundlich e de Dubinin-Radushkevich. A aplicação destes modelos analisa se a adsorção entre os corantes é de natureza física ou química.

Os parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Dubinin Radushkevich são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros de adsorção determinados pela equação linear, de Langmuir, de Freundlich, de Dubinin-Radushkevich - isoterma individual: pH 7 (força iônica 0,1 molL<sup>-1</sup>), 25 °C.

	Linear		Langmuir		Freundlich			Dubinin-Radushkevich				
Co r	KD Lg <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	qm m <sub>g</sub> g <sup>-1</sup>	K <sub>L</sub> g <sub>m</sub> g <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub> g <sub>m</sub> g <sup>-1</sup>	b <sub>F</sub>	R <sup>2</sup>	qm m <sub>g</sub> g <sup>-1</sup>	K <sub>D-R</sub> m <sub>g</sub> <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup>	E K <sub>j</sub> mol <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>
Cur	0,077	0,810	307	0,067	0,992	42,8	0,40	0,766	1232	-1322	11,8	0,803

Baseado nos coeficientes de correlação, R<sup>2</sup>, a adsorção do corante pelas microesfera de quitosana, para o sistema contendo uma espécie, correlacionou bem com todas as isotermas estudadas.

Baseado na isoterma de Langmuir, os valores de q<sub>m</sub>, na qual representa a capacidade máxima de adsorção do corante em monocamada, foi 307 mg.g<sup>-1</sup>. A constante de Langmuir, K<sub>L</sub>, que está relacionada com a afinidade dos sítios de ligação foi 0,067 g mg<sup>-1</sup> mostrando que os sítios tinham afinidade pelo corante curcumina.

Baseado na isoterma de Freundlich, a capacidade de adsorção, K<sub>F</sub> obtida para o corante foi 42,8 g mg<sup>-1</sup> e o valor de b<sub>F</sub> que representa uma adsorção favorável, foi menor que 1 (0,4), indicando uma boa intensidade de adsorção. Este parâmetro está relacionado com o grau de heterogeneidade da superfície e quanto menor o valor de b<sub>F</sub> maior heterogeneidade da superfície, e um valor próximo da unidade indica uma superfície relativamente com sítios de ligação mais homogêneos [24].

Em relação à isoterma de Dubini-Radushkevich, a energia (E) obtida na adsorção do corante curcumina foi maior do que 8kJ mol<sup>-1</sup> (11,8kJ mol<sup>-1</sup>), indicando que o processo de adsorção foi um processo de quimiossorção para este corante. A capacidade máxima de saturação da monocamada do adsorvente determinado pelo melhor ajuste experimental dos dados, isoterma de Langmuir, foi de 307mg de corante por grama de adsorvente.

As quantidades de corante curcumina adsorvidas foram calculadas em mmol g<sup>-1</sup> para avaliar a fração de sítios ocupados pelos corantes na superfície do adsorvente (item 3.5.1).

### 3.5.1 Fração de superfície ocupada.

Considerando que o mecanismo de adsorção pode ser representado pela equação química (Equação 8):



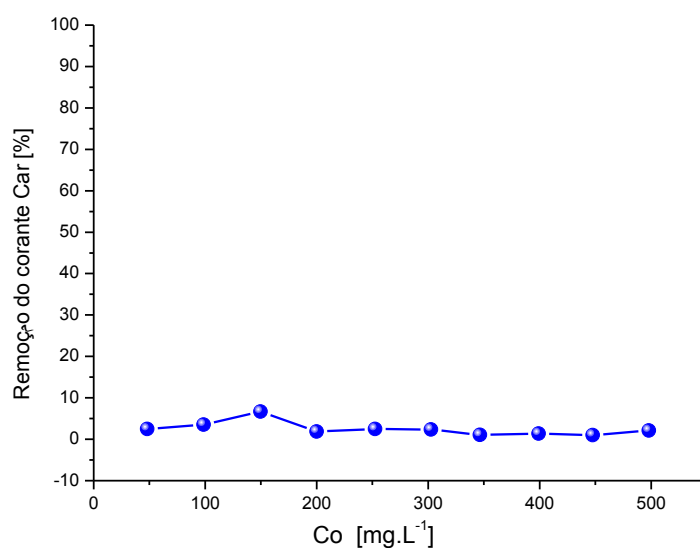
onde, “s” representa a fase sólida e “sol” representa a solução.

A fração de superfície ocupada pelos íons do corante é dada pela Equação 9:

$$\theta_{\text{Ccur}^{\ominus}} = \frac{N}{N_0} \dots\dots\dots \text{Eq. (9)}$$

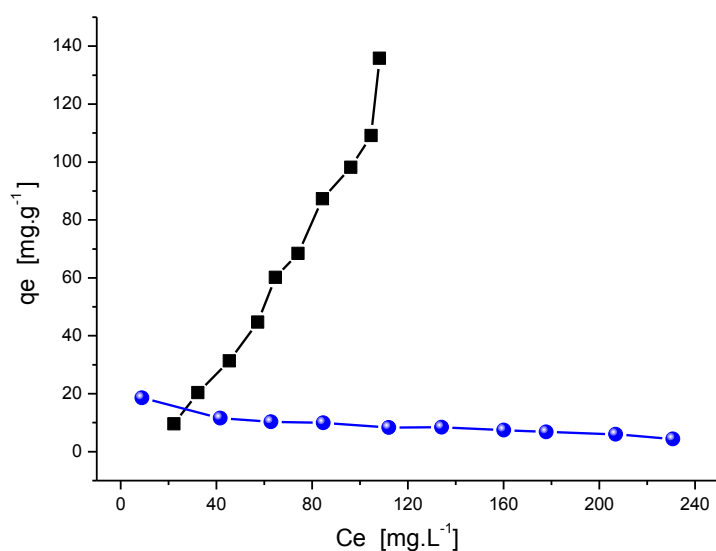
onde,  $\theta_{\text{Ccur}^{\ominus}}$  representa a fração de superfície ocupada pelo corante na fase sólida,  $N_0$  é a quantidade de íons do sitio de ligação por grama de adsorvente (em  $\text{mmol g}^{-1}$ ) e  $N$  é a quantidade de corante adsorvido  $\text{mmol g}^{-1}$ , que foi determinado experimentalmente a partir da capacidade máxima de adsorção do corante pelo adsorvente empregando a isoterma de Langmuir. O valor calculado representa uma fração de ocupação dos sítios de adsorção no adsorvente a 36,3%.

Não foi possível aplicar os mesmos modelos de isoterma para o corante carmim. Como foi evidenciado nos ensaios de cinética, este corante tem muito pouca afinidade pela quitosana. Analisando os resultados dos ensaios de equilíbrio, observa-se que este comportamento se manteve praticamente constante mesmo com a concentração sendo aumentada de 50 para  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  e a percentagem máxima removida foi de 6%, como mostra a Figura 12.



**Figura 12** – Porcentagem da remoção do corante carmim da fase líquida em função da concentração inicial: pH 7 ( $\mu=0,1 \text{ mol}^{-1}$ ), 25°C.

Com o objetivo de analisar o comportamento das microesferas de quitosana frente a misturas de corantes, experimentos de equilíbrio foram realizadas na proporção 1:1 partindo-se de concentrações iniciais de 25 a 250 mg.L<sup>-1</sup>. As Isotermas dos corantes curcúmina e carmim em adsorção competitivas em pH 7 são ilustradas na Figura 13.



**Figura 13** - Isotermas de adsorção competitivas dos corantes curcúmina ( e carmim na proporção 1:1 - pH 7 ( $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), 25°C, sendo ( • ) Curcúmina ( • ) Carmim.

A diferença entre quantidade adsorvida do corante curcumina em relação ao corante carmim pode ser atribuída a falta de afinidade do corante carmim com a quitosana e esta diminuição na adsorção não pode ser atribuída à competição dos corantes pelos sítios de adsorção. No entanto, para o corante curcumina o melhor ajuste obtido foi empregando a isoterma linear com constante distribuição,  $K_D$ , de  $2,57L\ g^{-1}$  ( $R^2 = 0,966$ ) mostrando que a concentrações mais baixas existe uma afinidade entre o adsorvente e o corante uma vez que a concentração de cada corante foi reduzida pela metade. Ou seja, se a faixa de concentração fosse mantida de 50 a 500  $mg.L^{-1}$ , uma saturação da monocamada seria possível.

### 3.6 Determinação da quantidade de corante encapsulado

Seguindo a metodologia proposta os valores para a quantidade de corante encapsulado foram obtidos e são apresentados na Tabela 2. Os dados apresentados na tabela indicam uma maior adsorção do corante curcumina pela microesfera de quitosana, o corante curcumina está encapsulado em uma quantidade aproximadamente 10 vezes maior que a do corante carmim, apresentando assim uma afinidade maior entre o corante curcumina e a matriz polimérica da quitosana. Os valores encontrados na mistura demonstram uma pequena diminuição ao serem comparados aos valores da quantidade de corante encapsulados sozinhos.

**Tabela 2** – Quantidade de corante encapsulado em microesferas de quitosana

<b>Microesfera (corante)</b>	<b>Quantidade de corante encapsulado (mg/g)</b>
Microesfera quitosana (Curcumina)	$202,19 \pm 1,27^*$
Microesfera quitosana (Carmim)	$19,25 \pm 0,80^*$
Microesfera quitosana (Mistura 424nm)	$198,39 \pm 2,32^*$
Microesfera quitosana (Mistura 519nm)	$15,76 \pm 1,88^*$

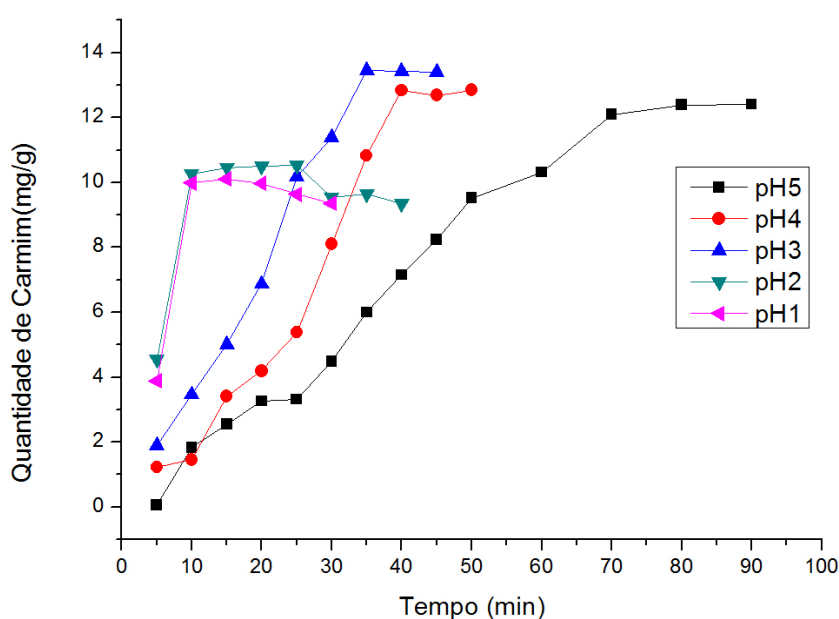
\* Os valores de média da quantidade de corante encapsulado seguido de erro padrão.

### 3.7 Estudo da Liberação dos Corantes

As Figuras 14 e 15 apresentam a cinética de liberação do corante Carmim e Curcumina respectivamente, em função do tempo, tendo como agente de liberação o

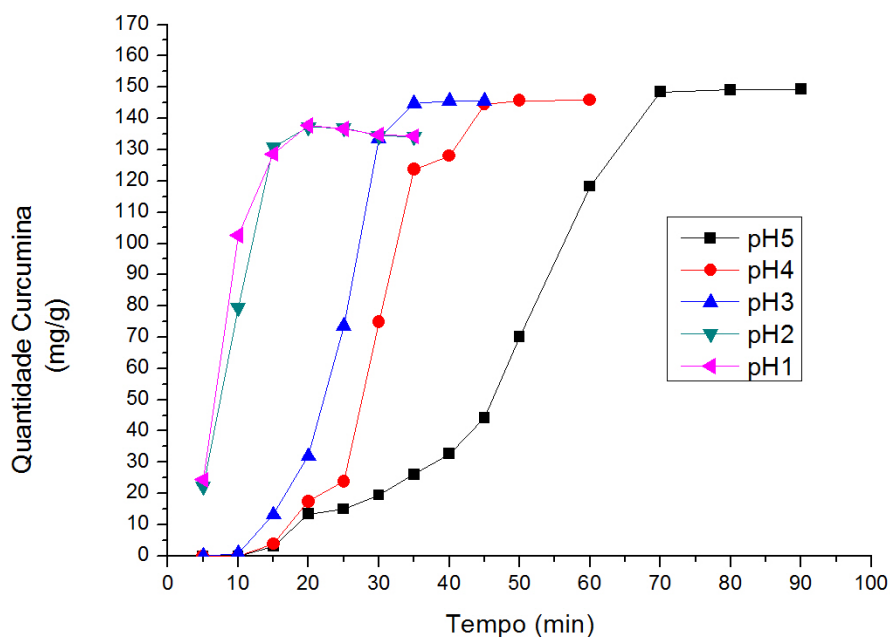
pH. Os gráficos mostraram que a liberação do composto encapsulado nesta matriz polimérica é dependente do pH. O mesmo resultado foi obtido por Liu, Zhang e Zhu [25] (2011) ao estudarem a liberação de mono-oleato de glicerila a partir de microesferas de etilcelulose e identificarem que a matriz era pH dependente.

A cinética indica uma velocidade de liberação maior para pH mais baixo apresentando uma liberação máxima nos pHs 1 e 2 em torno de 10 a 15 minutos, para o pH 5 observou-se uma liberação mais lenta, tendo a liberação máxima em torno de 70 minutos, sugerindo mais uma vez a importância do pH para a liberação do composto encapsulado na matriz de quitosana. Leidens et al. [26], (2009) sugerem que o pH também é influente na liberação de um composto, porém constataram velocidades opostas ao estudar a liberação de antocianina a partir de microesferas de quitosana e alginato os autores verificaram uma liberação mais rápida para o pH 5 e mais lenta para o pH 3, indicando a possibilidade do alginato ter influenciado nas condições de liberação. A liberação nos pHs 3, 4 foram semelhantes, e apresentaram o tempo de liberação máxima em torno de 35 e 40 minutos respectivamente. A explicação da liberação mais rápida em pHs mais ácidos reside na característica do polímero quitosana ser facilmente dissolvida em soluções ácidas e isto se deve pela protonação do seu grupo amínico livre [27], tendo como consequência da dissolução da microesfera a liberação do corante.



**Figura 14** – Influencia do pH na liberação do corante carmim em função do tempo.





**Figura 15** – Influência do pH na liberação do corante curcumina em função do tempo.

Dentre os pHs estudados para a liberação dos corantes através da microesfera de quitosana desenvolvida sem reticulação preparadas neste trabalho, observou-se a dependência do sistema para com o pH, e assim, sugere-se a aplicação desta matriz polimérica como uma forma de liberar um composto controladamente em alimentos, dependendo da necessidade da liberação do corante no alimento emprega-se um pH mais adequado e assim consegue-se uma liberação em tempos determinados. A maioria das matrizes alimentares possuem pHs mais baixos favorecendo a aplicação deste método, porém caso haja necessidade de uma liberação mais lenta, pode-se bloquear os grupos amino presentes na quitosana através dos métodos de reticulação [28], a reticulação não foi aplicada neste trabalho a fim de manter-se uma característica mais natural do polímero para aplicação em alimentos.

A liberação do corante carmim nos pHs 1 a 4 teve início no tempo de 5 minutos, já no pH 5 iniciou-se a liberação do corante a partir dos 10 minutos. O efeito “burst” que está relacionado à solubilização rápida do agente no meio de liberação [29] é bem evidenciado nas curvas dos corantes nos valores de pH 1 e 2 entre os tempos de 5 e 10 minutos, onde um aumento repentino de liberação foi observado, demonstrando-se assim o rápido intumescimento da microesfera e a solubilização do corante na matriz, logo, sua consequente liberação. Os demais pHs não

apresentaram uma velocidade de liberação tão rápida, porém se mostraram constantes até total liberação do corante.

A Figura 14 também indica uma menor liberação do corante carmim em pHs menores sendo liberado em torno de 65% de corante disponível na microesfera, a figura também apresenta um declínio na quantidade de corante presente após 20 minutos de contato entre o corante e meio de solubilização nos pHs 1 e 2, o que segundo Downhan e Collins (2000)<sup>[30]</sup> e Constant, Stringueta e Sandi (2002)<sup>[12]</sup> pode ser explicado pelo fato do carmim iniciar um o processo de deslacação em pHs muito baixos, resultando em instabilidade, ocorrendo mudança de cor e até mesmo precipitação do corante. Downhan e Collins (2000)<sup>[30]</sup> também indicam a aplicação deste corante em alimentos com pHs maiores que 3,5.

A Figura 15 apresenta os resultados para liberação do corante curcumina e pode-se observar que diferentemente do que ocorreu com o corante carmim, o corante curcumina apresentou o efeito “burst” de forma evidenciada nos pHs 1,2,3 e 4, os quais apresentarem uma liberação maior do corante entre os tempos de 5 e 10 minutos para os pHs 1 e 2 e os tempos entre 20 e 30 minutos para os pHs 3 e 4, já o pH 5 apresentou o efeito com menor intensidade entre os tempos de 50 e 70 minutos.

Com relação à quantidade de corante liberado pela matriz polimérica entre os pHs estudados, observou-se uma quantidade semelhante de curcumina liberada entre os pHs 3,4 e 5, apenas nos pHs mais baixos 1 e 2 observou-se uma quantidade pouco menor, porém não tão significativa quanto a apresentada pelo corante carmim.

Observa-se através da Figura 15 que o corante iniciou sua liberação em tempos diferentes dependendo do pH do meio, nos pHs 1 e 2 o tempo inicial foi aos 5 minutos, para os pHs 3, 4 e 5 a liberação foi iniciada aos 15 minutos, porém em quantidade diferentes. Resultados semelhantes foram obtidos por Parize (2009)<sup>[31]</sup> o qual encapsulou o mesmo corante em microesferas de quitosana.

### **3.8 Grau de Intumescimento**

A liberação de um composto através de matrizes hidrofílicas é uma interação importante entre intumescimento do polímero, difusão, erosão e relaxação<sup>[26]</sup>. Segundo Munday e Cox (2000)<sup>[33]</sup> a penetração de água em cadeias poliméricas,

promove seu relaxamento formando um gel hidratado, o que permite a passagem de um soluto por meio de dissolução para o meio aquoso.

A quitosana é um polímero que adsorve grande quantidade de água em meio ácido, o que resulta em acentuado grau de intumescimento e aumento de volume. Seu intumescimento gera o aumento da porosidade da matriz e como consequência a permeabilidade do hidrogel levando à liberação do composto <sup>[34]</sup>

Estando a liberação de um composto através das microesferas, diretamente relacionado com a relaxação da cadeia polimérica, o estudo do grau de intumescimento é um fator importante o qual auxilia na elucidação do mecanismo da liberação de um composto encapsulado a partir de matrizes poliméricas.

A Tabela 3 apresenta o grau de intumescimento (GI%) para as microesferas de quitosana impregnadas com os corantes: carmim e curcumina encapsulados sozinhos e também para a mistura (1:1) de ambos os corantes, além do tempo necessário para alcançar o intumescimento máximo. As microesferas foram submetidas a soluções com pH ajustados entre 1,0 e 5,0, sendo que em pHs maiores a microesfera de quitosana não intumesceria, pois a mesma necessita de meios ácidos para realizar o relaxamento de sua cadeia.

A partir dos dados apresentados é possível observar que o grau de intumescimento das microesferas impregnadas aumenta conforme o pH do meio também aumenta, obtendo os valores máximos de Grau de Intumescimento (GI%) no pH 3,0, resultados semelhantes foram obtidos por Horst (2009) <sup>[35]</sup>, Parize e Souza, (2009) <sup>[30]</sup>. Para os pH 4,0 e 5,0 houve uma diminuição no Grau de Intumescimento e um aumento no tempo para obtenção da massa constante da microesfera, o comportamento se repetiu para os três tratamentos apresentados na Tabela 3. Pode-se observar também que nos pHs mais baixos, 1,0 e 2,0, os valores de GI% são menores quando comparado aos outros tratamentos, isto pode ser um indicativo de que devido à alta acidez do meio, a quitosana, iniciou seu processo de dissolução mais rapidamente evitando assim um alto valor do grau de intumescimento da microesfera.

**Tabela 3** - Grau de Intumescimento das microesferas de quitosana impregnadas com os corantes: carmim, curcumina e a mistura de ambos.

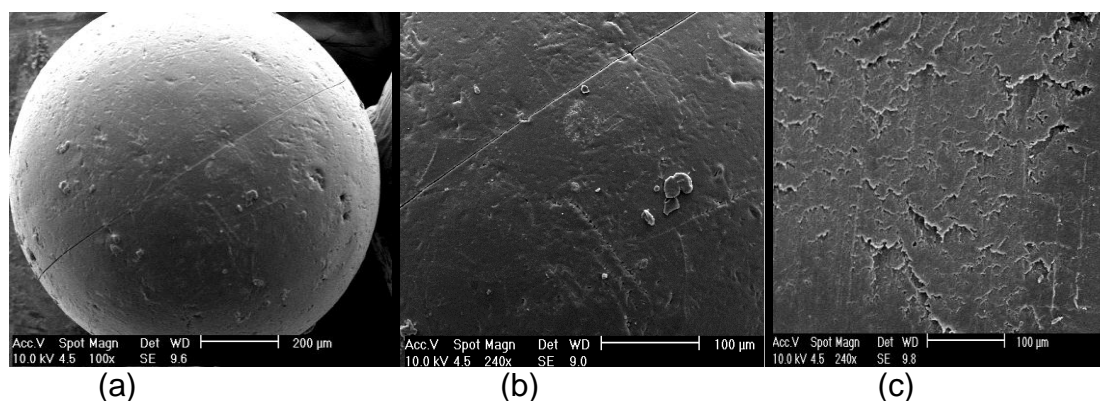
pH	Grau de Intumescimento (GI%)					
	Microesferas (Carmim)		Microesferas (Curcumina)		Microesferas (Mistura)	
	Tempo(*) (min)	GI(%)	Tempo(*) (min)	GI(%)	Tempo (min)	GI(%)
<b>1,0</b>	8	353,65	8	347,98	10	369,90
<b>2,0</b>	12	420,03	12	398,90	14	437,37
<b>3,0</b>	18	712,10	18	596,71	20	678,43
<b>4,0</b>	24	594,99	24	506,79	24	574,82
<b>5,0</b>	30	533,55	30	449,50	30	499,01

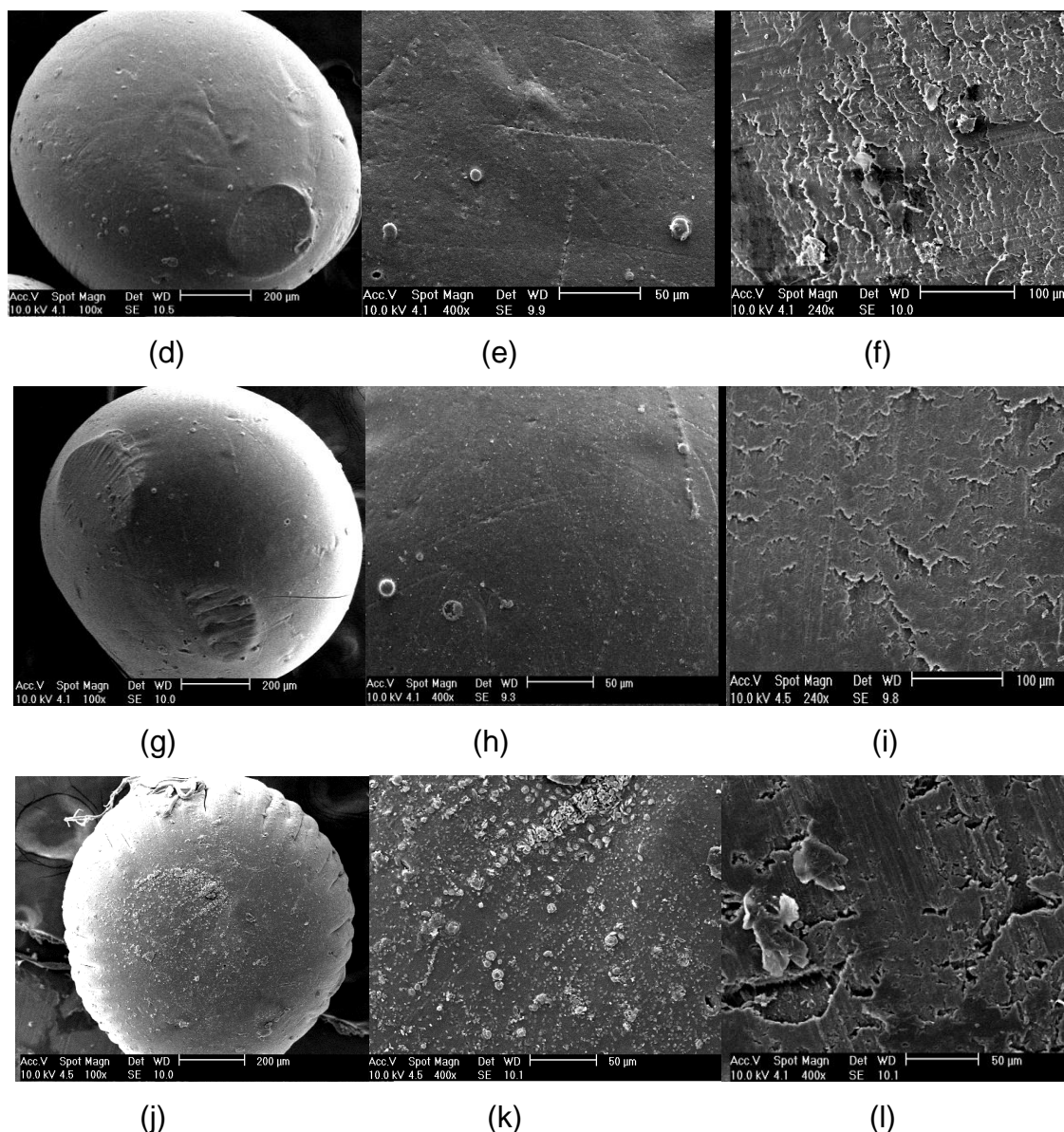
\* Tempo para obtenção das microesferas com massa constante.

Pôde-se observar que o pH pode ser considerado como um estímulo inicial para a liberação dos corantes, partindo do ponto que a protonação dos grupos aminos do polímero atua no sentido de auxiliar no processo de intumescimento da matriz polimérica, resultando na liberação do corante <sup>[37]</sup>.

### 3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura aplicada neste estudo teve por objetivo avaliar a morfologia e o tamanho das partículas após a realização do processo de impregnação dos corantes: carmim, curcumina e a mistura de ambos.





**Figura 15** – Microscopia Eletrônica de Varredura: (a) Microesferas de quitosana impregnada com carmim; (b) Superfície da Microesfera impregnada com carmim; (c) Corte transversal da microesfera impregnada com carmim; (d) Superfície da Microesfera impregnada com curcumina; (e) Superfície da microesfera impregnada com Curcumina; (f) Corte transversal da microesfera impregnada com curcumina; (g) Microesfera de quitosana impregnada com a Mistura; (h) Superfície da microesfera impregnada com a mistura; (i) Corte transversal da microesfera impregnada com a mistura; (j) Microesfera de quitosana sem corante; (k) Superfície da microesfera sem corante; (l) Corte transversal da microesfera sem corante.

A Figura 15 apresenta as imagens realizadas a partir da microscopia obtidas a partir da população mista de microsferas. Observando amplamente, as amostras apresentaram boa esfericidade e pouca rugosidade ou poros se mostrando homogênea em sua maior parte (Figura 15 (a), (d), (g) e (j)), porém a amostra sem corantes impregnados apresentou uma superfície mais rugosa do que as demais já impregnadas com corante, indicando uma solubilidade do corante na matriz

polimérica, o mesmo foi encontrado por Josué e demais pesquisadores (2000) [38], que ao encapsular eosina em matriz polimérica de quitosana observaram uma diminuição da rugosidade e porosidade da matriz.

O corte transversal das amostras (c), (f), (i) e (l) apresentam uma diferença, na amostra (l) onde não há a presença de corante, a microesfera apresentou mais fissuras quando comparada as demais amostras impregnadas, sugerindo mais uma vez, a solubilidade do corante na matriz.

O diâmetro das amostras variou de 806  $\mu\text{m}$  para as microesferas sem corante impregnado, 813  $\mu\text{m}$ , para as microesferas com carmim, 821  $\mu\text{m}$  para as microesferas impregnadas com carmim e 818  $\mu\text{m}$  para as microesferas impregnadas com a mistura binária dos corantes: carmim e curcumina atingindo assim valores necessários para a escala micro, observou-se também um aumento no tamanho das microesferas após a impregnação dos corantes. Valores maiores foram encontrados por Leidens e colaboradores (2009) [26] onde os diâmetros variaram entre 956  $\mu\text{m}$  e 974  $\mu\text{m}$  para microesferas de quitosana e alginato impregnadas com antocianina, já as micropartículas desenvolvidas por Parize (2009) [31] atingiram o tamanho de 22  $\mu\text{m}$ , porém os mesmos utilizaram a metodologia de impregnação de corante através da atomização em *spray drier*.

#### 4 CONCLUSÃO

Através do exposto neste trabalho pode se observar que os corantes estudados apresentaram comportamentos diferentes no processo de adsorção, a curcumina apresentou uma maior interação com a quitosana e assim impregnada em maior quantidade, o oposto foi apresentado pelo carmim o qual foi adsorvido em uma quantidade significativamente menor, não apresentando um comportamento competitivo com a curcumina.

Os dados de liberação sugerem que os corantes são liberados mediante a ação do pH, em meios ácidos a quitosana é dissolvida, as cadeias da matriz polimérica relaxam e os corantes são liberados. Tanto o carmim quanto a curcumina apresentaram liberação condizente com a quantidade encapsulada através do processo de adsorção.

O Carmim em pH mais baixos (1 e 2) apresentou uma diminuição na intensidade da cor, sugerindo que em pHs muito baixos pode ocorrer a deslacação do corante e o mesmo pode ser degradado.

A morfologia da microesfera apresentou-se com boa esfericidade, e tamanhos variando entre 806µm a 821µm entre as microesferas com ou sem corante. Microesferas impregnadas apresentaram menor rugosidade e fissuras, tamanhos maiores, sugerindo uma solubilidade do corante na matriz polimérica.

As microesferas impregnadas apresentaram boas condições de liberação dentre os pHs estudados, assim, as microesferas podem ser aplicadas em alimentos desde que seja obedecido a quantidade da ingestão diária aceitável (IDA), pois os pHs estudados para a liberação, são em sua maioria, os pHs característicos na maioria das matrizes alimentares.

## REFERENCIAS

1. Toni, J. L., Fonseca Xavier, M., Novy Quadri, M. G. N., Bastos Quadri, M. B., R.; *Bras. Agrociência* **2007**, 13, 291.
2. Huang, H.; Chiu, C.; Sue, S. & Cheng, C. – *Journal of Chromatography A*, **995**, p.29-36 (2003).
3. Gamarra, F.M.C.; Leme, G.C.; Tambourgi, E. B. & Bittencourt, E. – *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **29(1)**, p.62-69 (2009).
4. Antunes, L.M.G. & Araújo, M.C.P.– *Rev. Nutr.*, **13(2)**, p.81-88 (2000).
5. Saona-Rodriguez, L,E; Giusti, M.; Wrolstad, R,E – *J. Food, Sci.* **63**, p, 458-465, (1998).
6. Volp, A. C. P.; Rene, I. R. T; Stringueta, P.C. – *Alim. Nutr.*, **20**, p.157-166 (2009).
7. Valduga, E.; Lima, L.; Prado, R.; Padilha, F. F. & Treichel, H. – *Cienc. Agrotec.*, **32**, p.1568-1574 (2008).
8. Del Valle, E.M.M. – *Process Biochemistry.*, **39**, p.1033-1046 (2004).
9. Laus, R; Laranjeira, M.C; Martins, A,O; Fávere, V,T; *Revista Quím. Nova*, **19**, p, 34-39 (2006).
10. Xu, G.; Ren, G.; Xu, X.; Yuan, H.; Wang, Z.; Kang, L.; Yu, W. & Tian, K. – *Food and Chemical Toxicology*, **48**, p.390-395 (2010).
11. Marcolino, V. A. – *“Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos”*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2008).
12. Scooter, M.J. – *Food and Science of Technology*, **42**, p.1345-1351 (2009).
13. AL-DEGS, Y. Competitive adsorption of reactive dyes from solution: Equilibrium isotherm studies in single and multisolite systems. *Chemical Engineering Journal*, v. **128**, p. 163-167, 2007.

14. UOZOMI, S. et al. Dinuclear nickel (II) complexes of an unsymmetric "end-off" compartmental ligand: conversion of urea into cyanate at a nuclear nickel core. *Inorganic Chemistry*, v. **37**, p. 6281-6287, 1998.
15. RUTHVEN, D. M. Principles of adsorption and adsorption process. New York: John Wiley & Sons, 1984.
16. TRIPATHY, S. S.; RAICHUR, A. M. *Journal of Hazardous Materials*. n. 153, p. 1043, 2007.
17. FEO, J. C. et al. Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Research*, v. 41, p. 531-542, 2007.
18. QUINTELAS, C. et al. Treatment of chromium (VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of *Arthrobacter viscosus* supported on GAC. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 220-226, 2009.
19. Constant, P.B.L.; Stringheta, P.C.; Sandi. *Corantes Alimentícios*. CEPPA, **20**, p. 203-220, (2002).
20. Bernadé-Pineda, M.; Ramírez- Silva, M.T.; Romero- Romo, M.; González-Vergara, E. & Rojas- Hernández, A. – *Spectrochimica Acta Part A.*, **60**, p.1091-1097 (2004).
21. Leung, M. H. M.; Colangelo, H. & Kee, T. W. – *Langmuir*, **24**, p.5672-5675 (2008).
22. HoonBong, P.; *Bull. Korean Chem. Soc*, **21**, p.81-86 (2000).
23. Damiam, C; Beirão, L,H; Francisco, A, de; Espírito Santo, M,L,P; Teixeira, E – *Rev. Alim. Nutri.*, **16**. p.195-205 (2005).
24. CHEUNG, W.H.; SZETO, Y. S.; MCKAY, G. Enhancing the adsorption capacities of acid dyes by chitosan nano particles. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1143-1148, 2009.
25. Wang, Y.; Pan, M.; Cheng, A.; Lin, L.; Hoo, Y.; Hsieh, C. & Lin, J. – *J. Pharm. Bio. Anal.*, **15**, p.1867-1876 (1997).
26. Zhang, Z.; Pan, C. & Chung, D. – *Food.Res. Intern.*, **44**, p.1000-1007 (2011).
27. Leidens, K.; Horst, B.L; Parize, A.L.; Brighente, I.M.C.; Souza, T.C.R.; in: 8º Congresso Brasileiro de Polímeros. p.591-592.
28. Silva, H. S. R. C.; Santos, K. S. C. R. & Ferreira, E. I. – *Química Nova*, **29**, p.776-785 (2006).
29. Beppu, M. M; Arruda. E.J; Santana.C.C.; - *Polímeros: Cienc. Tecnol*, p, 163-169, (1999).
30. Bazzo, G.C.; Lemos-Senna, E.; Gonçalves, M.C. & Pires, A.T.N. – *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**, p.914-921 (2008).
31. Downham, A. & Collins, P. – *International Journal of Food Science and Technology*.; **35**, p.5-22 (2000).
32. Parize, A.L. – "*Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma*", Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (2009).
33. Harland, R. S.; Gazzaniga, A.; Sangalli, M. E.; Colombo, P. & Peppas, N. A. – *Pharmaceutical Research.*, **5**, p.488-494 (1988).
34. Munday, D. L. & Cox, P. J. – *International Journal of Pharmaceutics*, **203**, p.179-192 (2000).
35. Campanha Filho, S,P; Signini,R; Cardoso, M,B. – *Rev.Proces,Quim.* **2**, p, 9-18 (2007).
36. Horst, B.L. – "*Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginate através das técnicas de*



- impregnação, coacervação e spray drying*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (2009).
37. Parize, A. L; Souza, T. C. R; Brighente, I. M. C. – *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, **2**, p, 15-18, (2008).
38. Josué, A; Laranjeira, M.C.M; Fávere, V. T; Kimura, Y. – *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **10**, p,116-121, 2000.

## CAPÍTULO 7

Artigo será enviado a Revista CEPPA UFPR.

### ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE CORANTES NATURAIS IMPREGNADOS EM MICROESFERAS DE QUITOSANA E A APLICAÇÃO EM BALAS DE GELATINA.

GRASIELE MÔNICA MATTÉ<sup>3</sup>  
SIRLEI DA ROSA<sup>4</sup>

#### RESUMO

A cor de um produto alimentar está totalmente relacionado à sua qualidade e é o principal atributo a atrair a atenção das crianças; porém, muitos produtos destinados a este público possuem corantes artificiais os quais estão sendo cada vez mais questionados quanto a segurança alimentar. Uma solução para este problema seria a aplicação de corantes naturais; entretanto, os corantes naturais têm se demonstrado menos estáveis em condições de processamento e armazenamento. Baseado nisso o objetivo foi estudar a aplicação de corantes naturais encapsulados em microesferas de quitosana para sua utilização em balas coloridas de gelatina e verificar as melhores condições para a liberação frente ao pH e a temperatura. O estudo da liberação dos corantes carmim, curcumina e da mistura binária (1:1) foi realizado através do delineamento composto central rotacional (DCCR) e os resultados apontaram o valor do pH como o efeito principal na liberação destes corantes, e também mostraram falta de interação significativa entre o pH e a temperatura. Análises colorimétricas foram realizadas e estas mostraram que não houve diferenças significativas entre os tempos de armazenamento dos produtos.

*PALAVRAS-CHAVES: CARMIM; CURCUMINA; MICROESFERAS DE QUITOSANA*

#### 1 INTRODUÇÃO

A utilização de corantes em alimentos tem por objetivo restaurar a aparência original de um produto, que pode ser afetada durante o processamento, estocagem, embalagem e distribuição (Toni, et al. 2007; Polônio e Peres, 2009). Como forma de restaurar a cor perdida ou de tornar o produto mais atraente visualmente, a indústria utiliza o corante como um aditivo para conquistar o consumidor.

Por serem mais estáveis quando comparados aos corantes naturais os corantes artificiais (Azeredo, 2005) acabam sendo mais aplicados nos alimentos, entretanto o emprego destes aditivos tem gerado muita polêmica, a justificativa para sua utilização está relacionada principalmente a estética e ao *marketing* do produto (Schumam, et al, 2008; Polônio e Peres, 2012), porém estudos têm relatado ocorrências de reações adversas a curto e longo prazo, em produtos que contenham estes aditivos( Ortolani, et al. 1999; Krause, 2005; Schumann, et al. 2008).

---

<sup>3</sup> Aluna de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos – UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Medianeira (e-mail: [grasiele\\_matte@hotmail.com](mailto:grasiele_matte@hotmail.com)).

<sup>4</sup> Professora Adjunta, Doutora em Engenharia Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos – UTFPR – campus Medianeira. (e-mail: [sirleirosa@gmail.com](mailto:sirleirosa@gmail.com))

Alguns trabalhos encontrados na literatura apontam o consumo de corantes artificiais como causa de alguns efeitos danosos à saúde como as neoplasias, reações alérgicas, urticárias, asma (Moutinho, et al. 2007), outros estudos relacionam o consumo destes corantes ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em crianças ( Arnold, et al. 2012; Mcann, et al. 2007) e estudos também apontaram efeitos adversos no consumo destes corantes nas funções de aprendizagem e memória em ratos (Gao, et al. 2011).

Os estudos sobre os malefícios causados pelo consumo de corantes artificiais ainda é insuficiente e em muitos casos contraditórios (Prado e Godoy, 2006), porém o que se sabe é que o público infantil é o maior consumidor de produtos coloridos que chamam a atenção pela diversidade de cor, logo a indústria investe neste mercado (Polônio e Peres, 2009). O motivo preocupante neste caso é justamente o público infantil ser o mais vulnerável aos efeitos adversos destes aditivos, pois a quantidade ingerida destes alimentos pelas crianças é maior do que quando comparada a um adulto em relação ao peso corporal, além disso, a criança ainda se encontra em um momento de imaturidade fisiológica que pode prejudicar o metabolismo e a excreção destes aditivos (Schumann, et al. 2009; Polônio e Peres, 2009; Pinheiro e Abrantes, 2011).

Estudos de consumo de corantes artificiais por crianças foram realizados e nestes casos observou-se que o público infantil pode estar excedendo a ingestão de corantes artificiais permitido pela legislação (Pinheiro e Abrantes, 2011; Schumann, et al. 2011). A fim de obter dados sobre os teores de corantes artificiais em alimentos Prado e Godoy (2006) realizaram estudo e avaliaram alguns produtos alimentícios disponíveis no mercado e observaram que muitos destes produtos analisados apresentaram valores acima do permitido pela legislação, o que pode ser um indício ainda mais preocupante.

Sendo a cor um dos principais atrativos em um produto, os corantes naturais podem ser uma possibilidade mais saudável para este inconveniente dentro da indústria. Os pigmentos naturais além de colorir promovem saúde e bem estar podendo prevenir e auxiliar na cura de doenças (Downhan e Collins, 2000; Volp et al. 2009). Entre os pigmentos naturais com capacidade bioativa estão: curcumina, antocianinas, carmim, betalaínas e os pigmentos de *monascus* e *tagetes* (Volp et al. 2009).

Apesar de se apresentarem menos estáveis as condições de processamento, os corantes naturais podem ser protegidos através da microencapsulação. Um dos métodos utilizados é a impregnação de corantes em microesferas que tem por objetivo liberar o corante gradativamente ou proteger o corante até que uma condição físico-química seja alcançada (Shaidi e Han, 1993).

Com o intuito de verificar a aplicabilidade de corantes microencapsulados, o objetivo deste trabalho foi estudar a liberação dos corantes Carmim e Curcumina a partir das microesferas de quitosana em condições específicas de pH e temperatura e identificar as condições otimizadas da liberação destes corantes em balas de gelatina, produto rico em fibra, consumido principalmente pelo público infantil e assim, avaliar a cor do produto através das análises colorimétricas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As matérias primas utilizadas para o desenvolvimento da bala foram obtidas em mercado local. As microesferas de quitosana impregnadas com os corantes

naturais carmim e curcumina foram obtidas previamente em laboratório da UTFPR campus Medianeira.

## 2.1 Desenvolvimento das microesferas de quitosana impregnadas

Foram dissolvidos 3 g de quitosana em 100 mL de ácido acético 5% (v/v) e o sistema foi mantido sob agitação até a completa homogeneização da solução; em seguida, 0,5g de acetato de sódio foram adicionadas a solução. Esta solução foi gotejada através de sistema extrusor, em banho de precipitação, contendo solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>. Através do fenômeno de inversão de fases ocorreu a precipitação das microesferas. Após estar em contato por 2 horas na solução de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>, as microesferas geleificadas foram lavadas com água destilada até que a água de lavagem atingisse o pH 7,0 e, em seguida, as amostras secas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Para aumentar o fluxo da solução viscosa de quitosana através o sistema extrusor, foi utilizado uma bomba de vácuo e ar comprimido modelo 058 da marca Tecnal.

Os corantes foram impregnados nas microesferas de quitosana pelo método de adsorção, onde as microesferas foram adicionadas em frascos com soluções individuais e em mistura dos corantes carmim e curcumina durante 6 horas e em pH 7.

## 2.2 Estudo da liberação dos corantes frente pH e Temperatura

Para avaliar a influência do pH e da temperatura na liberação dos corantes para bala de gelatina um estudo prévio foi realizado para obter as melhores condições de liberação utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR), os limites de pH e temperatura foram escolhidos levando em consideração a liberação dos corantes pelas microesferas em meios ácidos (pH 1 a 5) e as variações de temperatura para o processamento da bala de gelatina (60°C a 80°C). Os limites das variáveis são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valores utilizados no DCCR para o estudo das liberações dos corantes encapsulados.

Variável	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
pH	1	2	3	4	5
Temperatura °C	60	65	70	75	80

## 2.3 Desenvolvimento da bala de gelatina

As balas de gelatina foram desenvolvidas seguindo metodologia proposta por Wally e colaboradores (2006) com adaptações, a Tabela 2 apresenta as formulações realizadas para cada corante individualmente, e para a mistura binária de ambos os

corantes, carmim e curcumina. As quantidades das microesferas de quitosanas impregnadas adicionadas nas formulações foram determinadas levando em consideração a quantidade dos corantes encapsulados nas microesferas e a legislação vigente.

**Tabela 2-** Formulação da bala de gelatina adicionada de corantes naturais

Ingrediente	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
Água	120g	120g	120g
Xarope de Milho	120g	120g	120g
Açúcar	115g	115g	115g
Gelatina	12g	12g	12g
Aromatizante	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Corante Curcumina	-	0,100g	-
Corante Carmim	0,500g	-	-
Corante Mistura	-	-	0,300g
Ácido Cítrico	qsp*	qsp*	qsp

\* qsp: quantidade suficiente para.

Em um béquer a gelatina incolor foi previamente hidratada em água, paralelamente em outro béquer misturou-se xarope de milho, açúcar e água, após a hidratação da gelatina, os ingredientes foram misturados. Em seguida as microesferas contendo os corantes foram adicionadas à solução juntamente com a solução de ácido cítrico em condições de pH e temperatura previamente estudadas através da análise de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), após ser liberado o corante o aromatizante foi adicionado a mistura e a mesma foi homogeneizada e aquecida durante 20 minutos. O xarope final obtido foi acondicionado em placas de petri e mantido em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C até completa secagem (36 horas).

#### 2.4 Determinação de cor por colorimetria

A cor instrumental dos corantes encapsulados foi avaliada a partir da liberação dos corantes em bala de gelatina, e as amostras foram avaliadas por meio da leitura direta em espectrofotômetro da marca minivolta ® CR-31 com fonte de iluminação D65. As coordenadas foram fornecidas diretamente do aparelho, a resposta L\* indica a luminosidade do branco ao preto, a\* indica o eixo da cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+) e o b\* do eixo do azul (-) ao amarelo (+). As amostras foram escolhidas aleatoriamente e realizadas em triplicata. As análises foram realizadas após o tempo

de secagem das balas de gelatina, ou seja, após as 36h do preparo e, uma leitura foi realizada após 10 dias.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Estudo da Liberação dos Corantes carmim e curcumina em diferentes pHs e temperaturas

A microencapsulação pode proporcionar uma barreira física entre o composto ativo a ser encapsulado e os demais compostos que fazem parte de um produto. A capacidade de retenção destes ativos é regulada pela funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade do ativo e do agente encapsulante (Gharsallaoui, et al. 2007). A liberação de uma substância pode se dar através de ruptura mecânica, pH, temperatura, difusão, solubilidade para o meio e de biodegradação (Santos, et al. 2000).

Poucos estudos foram encontrados sobre encapsulação de corantes naturais e, principalmente, sobre a liberação destes corantes a partir de matriz alimentar. Dentre as várias formas de liberações possíveis para microcápsulas, optou-se em avaliar o mecanismo de liberação aplicando como variáveis pH e temperatura. A quitosana solúvel em ácidos (Santos et al. 2005) podendo, assim, favorecer a dissolução da microesfera, e além disso a maioria dos alimentos naturais e processados estão situados na faixa de pH mais baixo. Os limites de temperatura foram escolhidas baseados nas temperaturas utilizadas no processamento da bala de gelatina de acordo com Wally, et al. 2006 e Lazzarotto, et al. 2008, optando por estes fatores eles identificaram as condições ideais para a liberação dos corantes. A

Tabela 3 apresenta os dados dos coeficientes de regressão encontrados para o corante carmim; através do valor de p, pode-se observar que os efeitos da temperatura linear e quadrática e da interação entre pH e temperatura não foram significativas ao nível de 95% de confiança. Entretanto, apenas a interação entre as variáveis foi descartada; os demais efeitos foram considerados e mantidos no modelo como pode ser visto na equação reparametrizada ( Equação 1).

$$Qtd_{\text{carmim}} = 14,92 + 2,09x_1 - 1,75x_1^2 + 0,35x_2 - 0,46x_2^2 \quad (1)$$

**Tabela 3** Coeficientes de regressão para a resposta quantidade liberada de corante carmim.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	T(6)	p-valor
Média	14,92579	0,716340	20,83620	0,000005
(1)pH (L)	2,09728	0,439326	4,77385	0,004998
pH (Q)	-1,75205	0,524230	-3,34213	0,020505
(2)Temperatura(L)	0,35434	0,439326	0,80654	0,456562*
Temperatura (Q)	-0,46681	0,524230	-0,89046	0,414006*
1*2	0,21199	0,620376	0,34171	0,746461*

Nota: (L) Linear; (Q) Quadrático; (\*) Efeitos não significativos a 95%

A Tabela 4 apresenta a análise de variância para a quantidade liberada do corante carmim e pode-se perceber que o valor do F calculado é maior que o valor do F tabelado, sendo assim há rejeição da hipótese nula, e a porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo é de aproximadamente 87%, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

**Tabela 4-** Análise de Variância para a quantidade liberada de corante carmim.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$	p-valor
Regressão	53,293	3	17,76433	15,78651	4,3468314	0,0017
Resíduo	7,877	7	1,125286	$R^2 = 0,87123$		
Total	61,17	10				

Os tratamentos estatísticos para a liberação do corante curcumina se encontram apresentados na Tabela 5 e 6, onde são apresentados os valores de coeficientes de regressão e análise de variância, respectivamente. Observado o valor de p da Tabela 5 pode-se observar que apenas os fatores pH linear foi significativo, porém, após avaliar os valores de  $R^2$  ao retirar alguns parâmetros do modelo, optou-se por manter os fatores pH quadrático e a temperatura quadrática afim de não prejudicar o modelo. A Equação 2 apresenta o modelo reparametrizado da quantidade de corante curcumina liberado.

$$Qtd_{\text{curcumina}} = 150,05 + 3,47x_1 - 1,31x_1^2 - 0,7676x_2^2 \quad (2)$$

**Tabela 5 –** Coeficientes de Regressão para a resposta de quantidade liberada do corante curcumina.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	T(6)	p-valor
Média	150,05	0,992754	151,1457	0,00000
(1)pH (L)	3,4735	0,608848	5,7050	0,002311
pH (Q)	-1,3154	0,726515	-1,8106	0,129970
(2)Temperatura(L)	0,180	0,608848	0,3104	0,768785*
Temperatura (Q)	-0,7676	0,726515	-1,05	0,339078*
1*2	0,6180	0,859760	0,7188	0,504427*

Nota: (L) Linear; (Q) Quadrático; (\*) Efeitos não foram significativos no intervalo de 95% de confiança.

A Tabela 6 apresenta a análise de variância para a quantidade liberada do corante curcumina, assim como para o corante carmim, o F calculado foi maior do que o F tabelado desse modo rejeitando a hipótese nula concluindo que a variação dos parâmetros interfere nas respostas encontradas, juntamente com o valor da porcentagem explicada pelo modelo é 86,55%, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

**Tabela 6** - Análise de Variância para a quantidade liberada de corante curcumina

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	p-valor
Regressão	106,8291	2	53,41455	25,74754	4,4589701	0,0003269
Resíduo	16,5964	8	2,07455	R <sup>2</sup> = 0,86553		
Total	123,4255	10				

Nota: (L) Linear; (Q) Quadrático; (\*) Efeitos não foram significativos no intervalo de 95% de confiança.

São apresentados nas Tabelas 7 e 8 os tratamentos estatísticos para a liberação da mistura dos corantes, onde são apresentado os valores de coeficientes de regressão e análise de variância, respectivamente.

**Tabela 7** – Coeficientes de Regressão para a resposta da quantidade de corante liberada na mistura.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	T(5)	p-valor
Média	92,75249	1,055	87,91271	0,00000
(1)pH (L)	2,33576	0,647	3,6098	0,015383
pH (Q)	-1,87398	0,772	-2,42710	0,05959*
(2)Temperatura(L)	-0,00170	0,647	-0,00263	0,99800*
Temperatura (Q)	-1,52316	0,772	-1,97273	0,105554*
1*2	-1,12016	0,9137	-0,13150	0,900504*

Observado o valor de p da Tabela 7 pode-se concluir que apenas o fator pH linear foi significativo, porém após avaliar os valores de R<sup>2</sup> e reparametrizar o modelo onde alguns fatores são retirados do modelo e realizar novamente a análise de variância, o pH Quadrático e a Temperatura quadrática tornaram-se significativas e optou-se por manter estes fatores no modelo. A Equação 3 apresenta o modelo reparametrizado da quantidade liberada da mistura dos corantes.

$$Qtd_{mistura} = 92,75249 + 2,33576x_1 - 1,87398x_1^2 - 1,52316x_2^2 \quad (3)$$

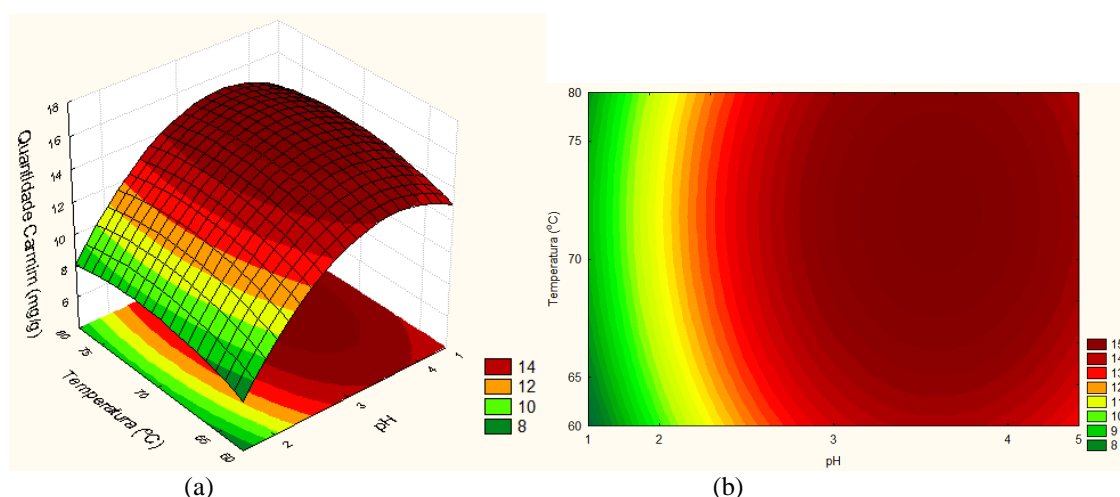
A Tabela 8 apresenta a análise de variância para a quantidade liberada da mistura de corantes, assim como para as demais análises de variância, a mistura dos corantes, o F calculado foi maior do que o F tabelado desse modo também rejeitando a hipótese nula, juntamente com o valor de porcentagem explicado pelo modelo 80,47%, pode-se concluir que este modelo também se ajusta aos dados experimentais



**Tabela 8 – Análise de Variância para a quantidade liberada da mistura de corantes.**

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	p-valor
Regressão	69,033	2	34,51664	16,48045	4,458970	0,0015
Resíduo	16,755	8	2,094399		R <sup>2</sup> = 0,8047	
Total	85,788	10				

Através da superfície de resposta (a) gerada pelo modelo (Figura 1), pode-se obter as condições de pH e temperatura que resultaram em uma maior quantidade liberada do corante carmim a partir das microesferas de quitosana. É possível verificar através de ambos os gráficos (a) e (b) apresentados na Figura 1, uma região otimizada que pode ser encontrada no contorno entre pH 3 e 4 e temperatura entre 65°C a 75 °C.



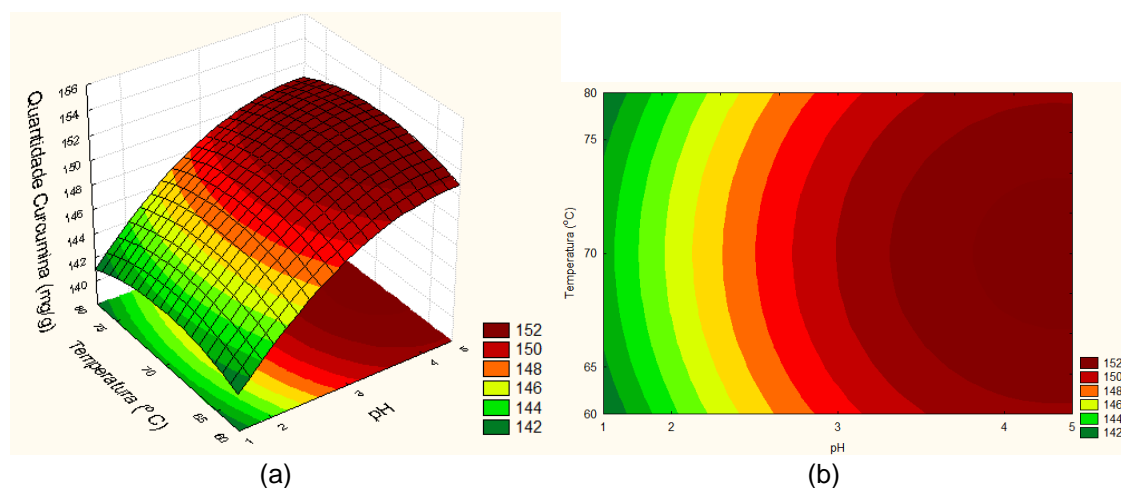
**Figura 1 - Superfície de Resposta (a) e curva de contorno (b) em função da Temperatura e pH para a quantidade liberada do corante Carmim.**

A Figura indica uma tendência ao aumento da liberação do corante conforme o pH aumenta; porém, o corante apresentou uma maior liberação entre os valores de pH 3 e 4. A menor quantidade de corante liberado nos pHs 1 e 2 pode ser explicada pelo fato do carmim apresentar o processo de deslocamento em pHs muito baixos, resultando em instabilidade, ocorrendo mudança de cor e até mesmo precipitação do corante (Constant, et al. 2002; Volp, et al. 2009). Constant e colaboradores (2002) e Dowhan e Collins (1999) sugerem o uso do corante carmim em produtos com pH acima de 3,5.

Juntamente com os resultados dos coeficientes de regressão e análise de variância pode-se observar também através da Figura 1 que o pH foi o fator que influenciou de forma significativa para a liberação do corante sugerindo que a temperatura não se apresenta como um meio de liberação do corante carmim impregnado nas microesferas de quitosana nas condições em que foram aplicadas neste estudo.

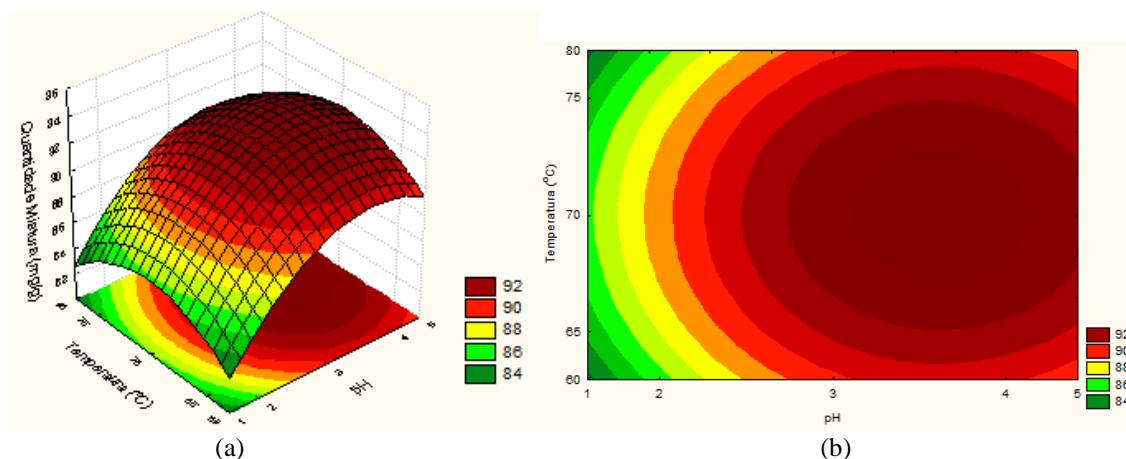
Assim como para o corante carmim, o mesmo foi observado para o corante curcumina que apresentou o pH como o fator significativo para a liberação do corante; a Figura 2 apresenta a superfície de resposta (a) e a curva de contorno (b) para a quantidade de curcumina liberada frente às condições estudadas de temperatura e pH neste trabalho. O comportamento dos corantes foi semelhante demonstrando, também, a significância do fator pH para a liberação do composto, sugerindo que a liberação do corante pode se dar através do efeito "burst" (Bazzo, et al. 2008) que relaciona o relaxamento da cadeia polimérica; ou seja, do intumescimento da microesfera com a liberação do ativo encapsulado para o meio (Parize, 2009).

A Figura 2 indica que há uma tendência no aumento na quantidade de curcumina liberada conforme o pH é aumentado até atingir o pH4, e os valores se mantêm no pH5, sendo este o limite máximo aplicado neste estudo. A figura também sugere uma região ideal para a liberação com o pH em torno de 3,5 e 5 e este comportamento semelhante ao encontrado por Parize (2009) que estudou a liberação do corante curcumina a partir de microesferas de quitosana reticuladas. Pôde-se observar também que as temperaturas aplicadas neste estudo não foram significativas para a liberação da curcumina e apresentaram valores semelhantes em torno de 65°C a 80°C.



**Figura 2** - Superfície de Resposta (a) e Curva de contorno(b) em função da Temperatura e pH para a quantidade de liberada do corante Curcumina.

Assim como para a liberação do corante carmim e da curcumina, a liberação da mistura de ambos os corantes foi determinada principalmente pelo pH, fato apresentado através da Figura 3 e, também, pelos coeficientes de regressão.



**Figura 3** – Superfície de Resposta (a) e curva de contorno (b) em função da Temperatura e pH para quantidade liberada da mistura de corante (1:1)

De uma forma geral, a mistura dos corantes apresentou um comportamento semelhante ao comportamento individual destes corantes, indicando um aumento na quantidade de corante liberado conforme o pH do meio e aumentando até atingir um máximo em torno do pH 3 e 4. Isto demonstra a pouca influencia da temperatura na liberação do composto. A Figura 3 apresentou uma região otimizada de liberação com os valores de pH entre 3 e 4 e temperatura 75°C e 65°C

### 3.2 Avaliação Colorimétrica das Balas de Gelatina

A literatura oferece uma grande quantidade de estudos demonstrando diversas metodologias de encapsulação de corantes naturais, como por exemplo, betalaínas (Drunkler et al. 2006), óleo-resina de páprica (Santos, et al. 2005); bixina, betanina (Marcolino, 2009); alguns estudos utilizando também o método de impregnação de corantes como antocianinas, urucum e a curcumina através das microesferas de quitosana (Horst, 2009; Parize, 2009). Porém, poucos estudos trazem a aplicação destas micropartículas em alimentos e apresentam poucos resultados para a determinação da cor dos mesmos.

Após realizar o estudo para definir as melhores condições de liberação aplicando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), as condições escolhidas foram o pH 3,5 e a temperatura de 75°C para realizar a liberação dos corantes para aplicação nas balas de gelatina; assim, verificou-se a coloração do produto através da análise colorimétrica.

A Tabela 9 apresenta a determinação dos parâmetros da cor para as balas de gelatina preparadas utilizando os corantes naturais empregados neste estudo; as análises foram realizadas no tempo denominado “0” e no tempo “10” dias e todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Para o tratamento 1, onde foi adicionado o corante carmim, as características cromáticas da bala de gelatina se localizaram dentro do primeiro quadrante onde obtiveram valores positivos para os eixos (a) e (b) os quais representam as cores vermelho e amarelo respectivamente. Carvalho e colaboradores (2000) encontraram valores negativos para o eixo (b) apresentando um tom mais arroxeadado para o carmim extraído; porém, vale ressaltar, que os mesmos autores não aplicaram o

corante extraído em matriz alimentar e realizaram as análises apenas com o corante. Comparando os tempos “0” e “10” dias não houve diferenças significativas e isto sugere que não ocorreu alteração na cor durante o tempo de armazenamento.

O tratamento 2 onde o corante Curcumina foi adicionado, os parâmetros de cor apresentaram valores negativos para o eixo (a) e positivo para o (b) demonstrando a coloração amarela como predominante, característica do corante curcumina. Os valores negativos para o eixo (a) apontam uma influencia do tom verde, explicando o tom amarelo-limão encontrado na bala de gelatina e o mesmo foi encontrado por Cretu e colaboradores (2005) que aplicaram a mesma metodologia para avaliar a cor do corante Curcumina em microemulsificação. Tanto este tratamento como o tratamento 1 não apresentaram diferença significativa entre os tempos, demonstrando que a cor foi mantida durante armazenagem.

A terceira formulação aplicou as microesferas de quitosana impregnadas com a mistura dos corantes em questão. Pôde-se observar que para o parâmetro (b) foram obtidos valores semelhantes para os tratamentos 2 e 3 sugerindo uma influencia maior da cor amarela e um possível predomínio do corante curcumina na microesfera impregnada com a mistura. O tratamento 3 assim como os demais, não apresentou diferença significativa entre os tempos estudados, mantendo o mesmo comportamento dos corantes impregnados sozinhos.

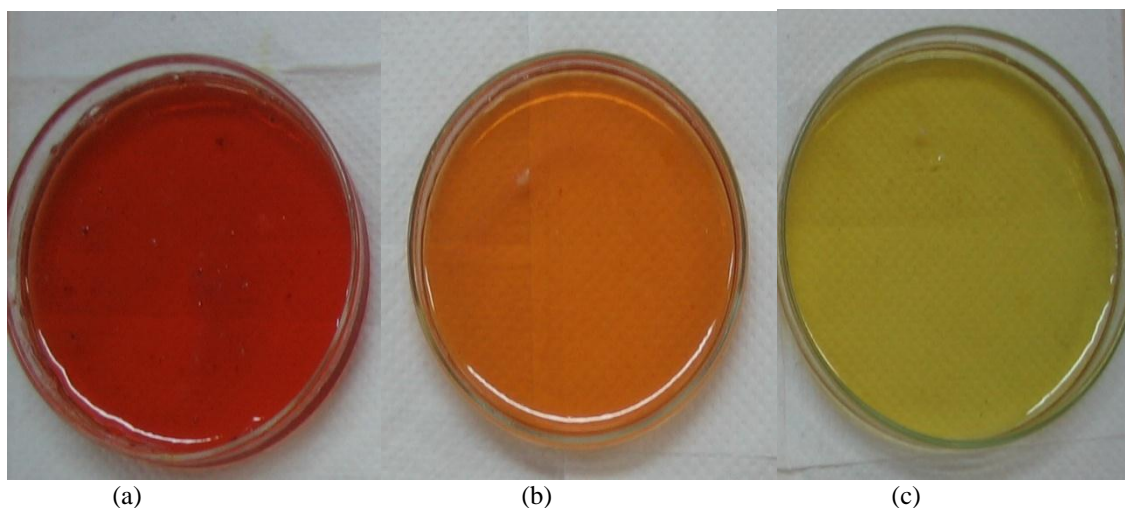
De uma forma geral as formulações apenas se diferiram entre si demonstrando a diferença de cores entre o carmim e a curcumina. Para os três tratamentos, tanto para os parâmetros de luminosidade (L) e o parâmetro (a) houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, não houve diferença significativa entre o tempo de estocagem para cada tratamento. Já, o parâmetro (b) o corante curcumina e a mistura binária dos corantes, não apresentaram diferença significativa a nível de 95% de confiança; entretanto ambas diferiram da bala de gelatina adicionada do corante carmim.

A Figura 4 apresenta as imagens das balas de gelatina produzidas, após o processo de secagem.

**Tabela 9** – Determinação dos parâmetros de cor para os diferentes corantes aplicados em função do tratamento e tempo de estocagem

Tratamento	Tempo	L	*a	*b
<b>1 (Carmim)</b>	0 dias	45,12 ± 1,36 <sup>Cc</sup>	37,06 ± 1,53 <sup>Aa</sup>	33,75 ± 1,47 <sup>Bb</sup>
	10 dias	43,40 ± 1,52 <sup>Cc</sup>	36,94 ± 1,87 <sup>Aa</sup>	33,59 ± 2,27 <sup>Bb</sup>
<b>2 (Curcumina)</b>	0 dias	67,55 ± 0,92 <sup>Aa</sup>	-4,95 ± 0,16 <sup>Cc</sup>	48,90 ± 1,14 <sup>Aa</sup>
	10 dias	66,15 ± 0,52 <sup>Aa</sup>	-4,44 ± 0,21 <sup>Cc</sup>	47,21 ± 1,58 <sup>Aa</sup>
<b>3 (Mistura)</b>	0 dias	56,21 ± 0,67 <sup>Bb</sup>	20,48 ± 0,81 <sup>Bb</sup>	46,68 ± 1,09 <sup>Aa</sup>
	10 dias	56,02 ± 0,38 <sup>Bb</sup>	21,27 ± 0,90 <sup>Bb</sup>	46,60 ± 1,11 <sup>Aa</sup>

NOTA: Os resultados apresentam a média ± erro padrão dos tratamentos realizados em triplicata; Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os tempos para cada tratamento ao nível de 5% de significância; Médias seguidas de letras minúsculas iguais e na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância.



**Figura 4** – Fotografias após processo de secagem das balas de gelatina: (a) Bala de gelatina contendo Carmim; (b) Bala de gelatina contendo a mistura de ambos corantes; (c) Bala de gelatina contendo corante curcumina.

#### 4 CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados foi possível observar que o pH foi o efeito responsável pela liberação dos corantes impregnados em microesferas de quitosana. O contrário foi observado para a temperatura, onde esta, não influenciou na liberação dos corantes. Os resultados também apresentaram a não significância da interação entre o pH e a temperatura nos limites estudados para a quantidade de corante liberado.

O delineamento composto central rotacional aplicado neste trabalho apresentou uma região ideal para a liberação dos corantes nos limites fixados, demonstrando que há um efeito maior de liberação dos corantes quando estes são submetidos aos pHs entre 3 e 5.

O estudo da aplicação dos corantes naturais impregnados em microesferas de quitosana mostrou-se viável para aplicação destas microesferas em alimentos com pHs baixos, como a bala de gelatina que possui pH em torno de 3,3.

Estudos futuros podem verificar a manutenção da cor destes corantes aplicados em alimentos por tempo prolongado, tendo em vista que este estudo apenas verificou o armazenamento refrigerado por 10 dias. Sendo o pH indicado como o fator que determina a liberação do corante e neste caso, a aplicação destas esferas em outros alimentos podem ser utilizadas visando a liberação controlada destes corantes.

## ABSTRACT

The color of a food product is completely related to its quality, and is the main attribute to attract children's attention, but many products aimed at that public have artificial dyes which are increasingly being questioned about food security, a solution to this problem would be the use of natural pigments, but these have been shown to be less stable on storage and processing conditions. This work aims to apply natural dyes encapsulated with chitosan microspheres in gelatin candies and check the best conditions for release against the pH and temperature. The study of the release of dye carmine, curcumin and binary mixture (1:1) was performed using the central composite rotational design (DCCR) and the results indicate the pH as the main effect on the release of these dyes, with no significant interaction between the effects pH and temperature. For colorimetric analyzes there were no significant difference between the times of storage products.

**KEY WORDS:** CARMINE, CURCUMIN, MICROSPHERES OF CHITOSAN.

## REFERENCIAS

- 1 ARNOLD, E; LOFHOUSE, N; HURT, E. Artificial Food Colors and Attention-Deficit/Hyperactivity Symptoms: Conclusions to Dye for. **Neurotherapeutics**, v.(9), p.599-609, Augst. 2012.
- 2 AZEREDO, H,C, DE. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, jan/mar. 2005.
- 3 BAZZO, G.C; LEMOS-SENNA, E.; GONÇALVES, M.C; PIRES, T.N. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of Poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v.19, p.914-921. 2008.
- 4 CARVALHO, P, N; COLLINS, C,H; CARVALHO, C,R,L. Extração e Produção do Corante Carmim de Cochonilha. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, p.9-17, Nov, 2001.
- 5 CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI. Corantes Alimentícios. **CEPPA**, v.20, p. 203-220, 2002.
- 6 CRETU, R; DIMA, C; BAHRIM, G; DIMA, S. *Improved Solubilization os curcumin with a microemulsification formulation*, in: The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, 32, p, 46-55, 2011.
- 7 DOWNHAM, A; COLLINS, P. Colouring our foods in the last next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5-22, Julho, 1999.
- 8 DRUNKLER, A, D; FETT, R; LUIZ, M, T, B. Avaliação da estabilidade de betalaínas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - ciclodextrinas. **B.CEPPA**, v.24, n.1, p.259-276, jan/jun. 2006.
- 9 GAO, Y; LI, C; SHEN, J; YIN, H; AN, X; JIN, H. Effect of Food Azo Dye Tartrazine on Learning and Memory Functions in Mice and Rats ant the Possible Mechanisms Involved. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.125-129. 2011.
- 10 GHARSALLAOUI, A; ROUDAUT, G; CHAMBIN, O; VOILLEY, A; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation od food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, p. 1107-1121. 2007.
- 11 HORST, B.L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginate através das técnicas de impregnação, coacervação e**

- spray drying**. Florianópolis, 2009, 95 f. Dissertação (Pós graduação em Química), Universidade Federal de Santa Catarina.
- 12 KRAUSE, M.V. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005. 1242p.
  - 13 LAZZAROTTO, E.; CUNHA, M. A. A. DA.; RODRIGUES, M. B.; MENDONÇA, S. N. T. G. Bala de gelatina com fibras: Caracterização e avaliação sensorial. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.02, n.01, p. 22-34, 2008.
  - 14 MARCOLINO, V. A. **Inclusão de bixina, curcumina e betanina em ciclodextrina para aplicação na indústria de alimentos**. Campinas, 2008. 125f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos), Faculdade de Engenharia em Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
  - 15 MCANN, D; BARRETT, A; COOPER, A; CRUMPLER, D; DALEN, LINDY, GRIMSHAW, K; KITCHIN, E; LOK, C; PORTEOUS, L; PRINCE, E; BARKE-SONUGA, E; WARNER, J,O; STEVENSON, J. Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randoised, double-blinded, placebo-controlled trial. **The lancet**, v,370, p- 1560-1567, novembro, 2007.
  - 16 MOUTINHO, I,L,D; BERTEGES, L,C; ASSIS, R.V.C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n°C) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal Biology**, v.67, p. 141-145, 2007.
  - 17 ORTOLANI, C; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; BENGTTSSON, U; BINDSLEV-JENSEN, C; BJORKSTÉN, B; HOST, A; ISPANO, M.; JARISH, R; MADSEN, C; NEKAN, K; PAGANELLI, R; POULSEN, L.K; WUTHRICH. Controversial aspects of adverse reactions to food. **Allergy**, v, 54, p. 27-45, 1999.
  - 18 PARIZE, A, L. – **Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Florianópolis, 2009, 160f. Doutorado (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
  - 19 PARIZE, A,L; SOUZA, T.C.R; BRIGHENTE, I. M. C. Obtenção e Caracterização de microesferas de quitosana contendo o corante urucum. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v, 2, n1, p. 15-18, 2008.
  - 20 PINHEIRO, M,C O; ABRANTES, S, M, P. **Avaliação da exposição aos corantes artificiais presentes em balas e chicletes por crianças entre 3 e 9 anos estudantes de escolas particulares da Tijuca/Rio de Janeiro**. Revista Analytica: Disponível em: <http://www.revistaanalytica.com.br/artigos/8.pdf>. Acesso em: 24/04/2013.
  - 21 POLONIO, M. L. T; PERES, F. Consumo de corantes artificiais por pré-escolares de um município da baixada fluminense, RJ. **Revista de pesquisa: Cuidado é fundamental**, v, 4, p. 2748-2757, 2012.
  - 22 POLONIO, M, L, T; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno Saúde Pública**, v, 25, p. 1653-1666, agosto, 2009.
  - 23 PRADO, M. A; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v,30, n.02, p.268-273. Mar/Abril, 2007.
  - 24 SANTOS, A. B; FERREIRA, V. P; GROSSO, C. R.F. Microcápsulas uma alternativa viável: Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação: óleo-resina de páprica. **Revista Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, p. 26-30, 2000.
  - 25 SANTOS, A. B; FÁVARO-TRINDADE, C. S; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de óleo-resina de páprica obtidas por atomização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v, 25, p. 322-326, 2005.

- 26 SCHUMANN, S. P; POLONIO, M. L. T; GONÇALVES, E. C. B.A. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v, 28, p. 534-539, 2008.
- 27 SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v, 33, p. 501-547, 1993.
- 28 TONI, J. L., FONSECA XAVIER, M., NOVY QUADRI, M. G. N., BASTOS QUADRI, M. B., R.; *Bras. Agrociência*, v, 13, 291, 2007.
- 29 TRINDADE, M.A; GROSSO, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of Rice starch and in gum arabic. **Journal of Microencapsulation**, v.17, n.2, p. 169-176. 2000
- 30 VOLP, A.C.P; RENHE, I. R. T; STRINGUETA, P.C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição.**, Araraquara, v, 20, n 1, p.157-166, 2009.
- 31 WALLY, A. P; PESTANA, V.R; PIGNOL, M; LEITÃO, A. **Balas de Goma com diferentes agentes geleificantes**, in: XV Congresso de Iniciação Científica, VIII Encontro de Pós Graduação, UFPEL, 2006.



## CAPÍTULO 8

### CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Através do exposto neste trabalho pode-se avaliar positivamente a quitosana como um importante agente tecnológico para diversas áreas; dentre elas, as microesferas apresentam uma excelente opção de proteção de compostos ativos; assim como para os corantes, para a indústria alimentícia e farmacêutica. As microesferas de quitosana reticuladas, ou não, têm cada vez mais despertado o interesse quando estudadas as condições de liberação controlada de substâncias.

As microesferas produzidas neste estudo apresentaram boa esfericidade, e tamanhos variando entre 806  $\mu\text{m}$  e 821  $\mu\text{m}$ , demonstrando que apesar de simples, o método escolhido para a confecção das esferas mostrou-se eficaz.

Comparativamente o corante Carmim não apresentou uma afinidade com as microesferas, incorporando menos corante à matriz, já o corante Curcumina apresentou resultados positivos ao se incorporar à matriz de quitosana, impregnando sempre mais corante. Comparando a aplicação dos corantes de alta e baixa pureza, pôde-se observar algumas diferenças na quantidade de corante encapsulado. Ao avaliar os resultados de cinética pôde-se observar que o corante curcumina quando em mistura binária com o corante carmim na proporção de 1:5 teve uma impregnação em torno de 60% partindo da concentração inicial, já no estudo realizado com a proporção de 1:1, a curcumina teve uma porcentagem de adsorção fixada em 90%, sugerindo que o corante carmim em grande quantidade na mistura (1:5) pode ter interferido significativamente na baixa encapsulação do corante curcumina.

Os estudos realizados para liberação dos corantes através das microesferas mostram que a liberação é pH dependente, ou seja, os corantes serão liberados da matriz na dependência do pH do meio, necessitando estar na presença de pHs baixos; os estudos também evidenciaram que a liberação dos corantes é realizada devido a solubilidade da quitosana em meios ácidos. Através do delineamento composto central rotacional (DCCR) empregado para verificar a influência da temperatura para liberação dos corantes, verificou-se que a temperatura não

influencia diretamente na liberação, mostrando mais uma vez, o pH como fator determinante para sua liberação que pode ser controlada conforme o pH do produto.

Ao aplicar as microesferas em balas de gelatina verificou-se a viabilidade do uso dos corantes naturais nessas matrizes, tendo o corante sido liberado completamente em pH 3,5. A curcumina possui caráter hidrofóbico, porém foi aplicada com sucesso em balas de gelatina que possui caráter hidrofílico, mostrando mais uma vez, a eficácia do método na liberação do composto.

#### Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar a estabilidade dos corantes encapsulados em tempos de armazenamento definidos;
- Avaliar a estabilidade do corante Curcumina avaliando a atividade antioxidante;
- Avaliar a mistura de três corantes e a sua impregnação em microesferas de quitosana;
- Realizar a análise de FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, a fim de verificar a interação entre corante e matriz encapsulante;
- Análises calorimétricas para determinar a estabilidade térmica dos corantes, microesferas sem corante e microesferas impregnadas.
- Avaliar a liberação dos corantes em outras matrizes alimentares;
- Avaliar a estabilidade dos corantes em matrizes alimentares diferentes através de análises colorimétricas em períodos de tempos equivalentes a vida útil do produto estudado.
- Realizar Análises Sensoriais a fim de obter um estudo de aceitabilidade do produto.