UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TALITA ALINE COMUNIAN

MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR COACERVAÇÃO
COMPLEXA E DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS: ESTUDO ESTRUTURAL,
ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

Pirassununga

2013

TALITA ALINE COMUNIAN

MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR COACERVAÇÃO
COMPLEXA E DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS: ESTUDO ESTRUTURAL,
ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Favaro Trindade.

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

C741m	<p>Comunian, Talita Aline</p> <p>Microencapsulação de ácido ascórbico por coacervação complexa e dispositivos microfluídicos: estudo estrutural, estabilidade e aplicação das microcápsulas / Talita Aline Comunian. -- Pirassununga, 2013. 190 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos. Área de Concentração: Ciências e Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.</p> <p>1. Vitamina C 2. Encapsulação 3. Antioxidante 4. Salsicha. I. Título.</p>
-------	--

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida
passar. É melhor tentar, ainda em vão, que sentar-se
fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar
que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz,
embora louco, que em conformidade viver..." (Martin
Luther King).*

*Aos meus pais Edna e Eduardo e minha irmã
Caroline que sempre me apoiaram de todas as formas
possíveis e estiveram presentes nos momentos mais
importantes.*

Amo vocês!

BIOGRAFIA

Talita Aline Comunian, filha de José Eduardo Comunian e Edna Maria Milhorin Comunian, nasceu na cidade de Jaú, São Paulo em 26 de dezembro de 1985. É formada em Engenharia de Alimentos pela Universidade de São Paulo no ano de 2010. Durante a graduação, atuou na empresa Junior - Qualimentos Jr - por dois anos e fez iniciação científica por um ano e meio com bolsa FAPESP. No final da graduação fez estágio durante um ano no Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik (KIT) em Karlsruhe, Alemanha, com bolsa do programa PRO-3 do governo alemão.

No início de 2011, Talita ingressou no programa de mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos da FZEA/USP, também com bolsa FAPESP. Durante o mestrado, foi contemplada com a bolsa BEPE, denominada “Bolsa de estágio de pesquisa no exterior”, financiada pela FAPESP. Este benefício possibilitou à Talita fazer um estágio de seis meses na School of Engineering and Applied Sciences, da Universidade de Harvard, em Cambridge, Estados Unidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e pela oportunidade de poder concluir mais uma etapa da minha carreira, superando todos os obstáculos.

Agradeço a minha Orientadora Carmen Sílvia Favaro-Trindade por toda confiança depositada a mim, pela paciência, por todas as oportunidades e pela amizade que foi construída durante todos esses anos.

Agradeço ao Professor Marco Antonio Trindade por toda a ajuda, ensinamento, colaboração e paciência durante os experimentos realizados com salsicha.

Agradeço ao Professor David A. Weitz pela excelente oportunidade concedida para a realização do estágio na Universidade de Harvard.

Agradeço aos meus pais Edna e Eduardo, minha irmã Caroline e minha avó Vicentina (*in memorian*) por todo carinho, apoio e paciência.

Agradeço aos companheiros e amigos do laboratório, Paula, Fernando, Volnei, Adja, Mariana, Milla, Júlio, Ana Júlia, Vitória, Andrezza, Fernanda por todo o companheirismo, risadas, bolos e força durante esses anos.

Agradeço ao Especialista do Laboratório de produtos funcionais (LAPROF) Marcelo Thomazini, por toda a paciência, as brincadeiras e ajuda fundamental para a realização desse mestrado.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado (Projeto 2011/03882-9) e pela concessão da bolsa BEPE (Projeto 2012/04451-4).

Agradeço aos técnicos e especialistas Ana Monica Bittante, Nilson Ferreira, Keila Aracava, Guilherme Silva e Ednelí Monterrey por toda a ajuda durante a realização dos experimentos.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa do professor David A. Weitz por toda ajuda, auxílio e amizade durante a realização dos experimentos.

Agradeço aos professores Samantha Cristina de Pinho, Rosemary Carvalho, Christianne Elisabete da Costa Rodrigues, Eliana Kamimura, Giovana Tommaso, Judite Lapa Guimarães, Paulo José do Amaral Sobral e Mariza Pires de Melo por disponibilizar seus equipamentos e laboratórios para a realização dos experimentos.

Agradeço o professor Júlio C. de Carvalho Balieiro pela oportunidade de participar do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) em sua disciplina e também

por toda a ajuda disponibilizada na análise estatística dos dados obtidos neste trabalho.

Agradeço a empresa *Viscofan do Brasil* pela doação das tripas celulósicas utilizadas na produção das salsichas.

Agradeço toda equipe do Matadouro pela ajuda e disponibilidade durante a produção das salsichas.

Agradeço a todos os colegas da pós-graduação Mirelle, Débora, Vítor, Camila, Josi, Carol, Daniel, Paola, Grazi, Taíse, Natali e Janaína por toda ajuda, companheirismo e força durante o mestrado.

Agradeço a toda comunidade FZEA pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço a participação dos membros da banca examinadora por todas as contribuições.

RESUMO GERAL

COMUNIAN, T. A. **Microencapsulação de ácido ascórbico por coacervação complexa e dispositivos microfluídicos: estudo estrutural, estabilidade e aplicação das microcápsulas**. 2013. 190 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Reações de oxidação lipídica são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, sendo necessário o uso de antioxidantes. O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante muito eficaz, que exibe função vitamínica, no entanto é relativamente instável. Com o objetivo de aumentar a estabilidade do AA e, conseqüentemente, facilitar sua aplicação em produtos alimentícios, os métodos de encapsulação por coacervação complexa e por dispositivos microfluídicos foram testados. Primeiramente foi apresentada a Revisão Bibliográfica no Capítulo 1, e em seguida, a encapsulação por coacervação complexa, como será visto no Capítulo 2. Neste caso, nove tratamentos foram obtidos utilizando-se gelatina e goma arábica como materiais de parede e analisados com relação à morfologia, por microscopia ótica e eletrônica de varredura, umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade, potencial zeta, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (Ftir), tamanho e distribuição de tamanho de partículas, cor instrumental, eficiência de encapsulação e estabilidade do material encapsulado. No capítulo 3 serão apresentados resultados obtidos na encapsulação do AA pelo método de dispositivos microfluídicos. Cinco

tratamentos foram obtidos, sendo analisados com relação à morfologia, por microscopia ótica, eletrônica de varredura e confocal, eficiência de encapsulação, tamanho e distribuição de tamanho de partícula e estabilidade do material encapsulado. A obtenção das microcápsulas de AA pelos dois métodos citados foi viável uma vez que apresentaram altos valores de eficiência de encapsulação e ótima atuação em relação à proteção do AA durante estocagem. Comparando-se os dois métodos, as cápsulas obtidas por dispositivos microfluídicos conferiram melhor estabilidade ao ácido ascórbico, no entanto amostras obtidas por coacervação complexa foram aplicadas em salsicha devido a maior quantidade de AA presente em sua constituição. O efeito da aplicação das microcápsulas nas salsichas foi avaliado durante 40 dias de armazenamento refrigerado como será visto no Capítulo 4. Cinco tratamentos foram elaborados e analisados de acordo com a estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento, umidade, atividade de água, alteração do pH, determinação da cor instrumental, perfil de textura instrumental, estabilidade oxidativa pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aceitação sensorial. A aplicação das microcápsulas de AA em salsicha foi possível sem comprometer a qualidade do produto final. Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância com auxílio do programa SAS. Os experimentos relacionados à encapsulação por coacervação complexa e aplicação das microcápsulas em salsicha foram realizados no Laboratório de Produtos Funcionais, nas dependências do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP. Os experimentos relacionados à utilização de dispositivos microfluídicos foram realizados nos

laboratórios do professor David A. Weitz, da Escola de Engenharia e Ciências Aplicadas de Harvard, da Universidade de Harvard, Cambridge, Estados Unidos.

Palavras-chave: vitamina C, encapsulação, antioxidante, salsicha

ABSTRACT

COMUNIAN, T. A. **Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation and microfluidic devices: structural study, stability and application of microcapsules.** 2013. 190 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Lipid oxidation reactions are responsible for the development of unpleasant tastes and odors making food unfit for consumption. For this reason, the use of antioxidant is necessary. Ascorbic acid (AA) is a very effective antioxidant with vitamin function, however it is relatively unstable. With the aim of increasing the stability of AA and thus improve its application in food products, the methods of encapsulation by complex coacervation and microfluidic devices were tested. First of all the Literature Review is presented in Chapter 1. The encapsulation by complex coacervation can be seen in Chapter 2. For this methodology, nine treatments were obtained using gelatin and gum Arabic as encapsulant agent and analyzed regarding to morphology by optical and scanning electron microscopy, moisture, water activity, hygroscopicity, solubility, Zeta Potential, Fourier transform infrared Spectroscopy (FTIR), particle size and particle size distribution, instrumental color, encapsulation efficiency and stability of the encapsulated material. The results obtained for AA encapsulation by microfluidic device will be presented in Chapter 3. Five treatments were obtained and analyzed regarding to morphology by optical, scanning electron and confocal microscopy, encapsulation efficiency, particle size and particle size distribution and stability of the encapsulated material. The production of AA microcapsules by the two methods

mentioned was feasible once that showed high levels of encapsulation efficiency and optimal performance regarding to the protection of AA during storage. Comparing the two methods, the microcapsules obtained by microfluidic device conferred better stability to AA, however samples obtained by complex coacervation were applied in sausage due to the greater amount of AA in its constitution. The effect of the application of microcapsules in sausages was evaluated during 40 days at refrigerated storage as it will be seen in Chapter 4. Five treatments were prepared and analyzed according to the stability of the meat emulsion during processing, moisture, water activity, pH changes, determination of instrumental color, instrumental texture profile, oxidative stability by the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and sensory acceptance. The application of AA microcapsules in sausage was possible without compromising the quality of the final product. All data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey test, at 5% of significance with the use of SAS software. The experiments related to encapsulation by complex coacervation and application of microcapsules in sausage were carried out at Laboratory of Functional Products, at Department of Food Engineering, FZEA / USP. The experiments related to the use of microfluidic devices were performed in the laboratories of Professor David A. Weitz, at School of Engineering and Applied Sciences of Harvard, at Harvard University, Cambridge, USA.

Keywords: vitamin C, encapsulation, antioxidant, sausage

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	17
INTRODUÇÃO	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 ANTIOXIDANTES	23
1.2 ÁCIDO ASCÓRBICO	25
1.3 MICROENCAPSULAÇÃO	29
1.3.1 Emulsão dupla seguida de coacervação complexa	30
1.3.2 Emulsificação pela utilização de dispositivos microfluídicos	44
1.4 ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	47
1.5 PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS	49
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CAPÍTULO 2. MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO ESTRUTURAL E ESTABILIDADE	63
RESUMO.....	63
2.1 INTRODUÇÃO.....	64
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
2.2.1 MATERIAL.....	65
2.2.2 MÉTODOS.....	66
2.2.2.1 Estabilidade da emulsão simples.....	68
2.2.2.2 Caracterização dos tratamentos	68
(i) Eficiência de encapsulação	68
(ii) Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	69
(iii) Análise do tamanho e distribuição do tamanho de partícula	69
(iv) Atividade de água	69
(v) Higroscopicidade	70
(vi) Cor instrumental.....	70
(vii) Umidade.....	70
(viii) Solubilidade.....	71

(ix) Potencial Zeta	71
(x) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	71
(xi) Estabilidade do material encapsulado	72
(xii) Análise estatística	72
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
2.3.1 Estabilidade da emulsão simples	73
2.3.2 Caracterização dos tratamentos	75
(i) Produção das microcápsulas de ácido ascórbico	75
(ii) Eficiência de Encapsulação	76
(iii) Caracterização morfológica por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura	79
(iv) Análise do tamanho e distribuição de partículas	84
(v) Atividade de água, higroscopicidade, umidade, solubilidade e potencial zeta	90
(vi) Cor instrumental	93
(vii) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	100
(ix) Estabilidade do material encapsulado	104
2.4 CONCLUSÃO	108
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CAPÍTULO 3. PRODUÇÃO DE MACROCÁPSULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO	115
RESUMO	115
3.1 INTRODUÇÃO	116
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	119
3.2.1 MATERIAL	119
3.2.2 MÉTODOS	119
(i) Encapsulação	119
(ii) Morfologia das cápsulas por microscopia ótica, eletrônica de varredura (MEV) e confocal	120

(iii) Tamanho e distribuição de tamanho de partícula	121
(iv) Eficiência de encapsulação.....	122
(v) Estabilidade do material encapsulado	122
(vi) Análises estatísticas	123
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	123
(i) Produção de macrocápsulas lipídicas sólidas	123
(ii) Morfologia das cápsulas por microscopia ótica, eletrônica de varredura (MEV) e confocal... ..	125
(iii) Tamanho e distribuição do tamanho de partícula e eficiência de encapsulação.....	128
(vi) Estabilidade do ácido ascórbico livre e encapsulado.....	131
3.4 CONCLUSÃO	134
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
CAPÍTULO 4. APLICAÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PRODUTO CÁRNEO EMULSIONADO.....	141
RESUMO.....	141
4.1 INTRODUÇÃO.....	142
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	144
<i>Formulações</i>	144
<i>Processamento</i>	146
(i) Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento	147
(ii) Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado	148
(iii) Atividade de água	148
(iv) Umidade.....	148
(v) Avaliação de alteração do pH	148
(vi) Avaliação do Perfil de Textura Instrumental durante armazenamento refrigerado	149
(vii) Determinação da cor instrumental	149

(viii) Avaliação da aceitação sensorial durante o armazenamento refrigerado	149
(ix) Análises Estatísticas	150
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	150
(i) Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento, umidade e atividade de água.....	150
(ii) Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado.....	152
(iii) Avaliação de alteração do pH	155
(iv) Avaliação do Perfil de Textura Instrumental durante armazenamento refrigerado	156
(v) Determinação da cor instrumental	159
(vi) Avaliação da aceitação sensorial durante o armazenamento refrigerado	162
4.4 CONCLUSÃO	166
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO GERAL.....	174
APENDICE A – FICHA UTILIZADA NA ANÁLISE SENSORIAL	176
APENDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	177
APENDICE C: LISTA DE PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO	181
APENDICE D – ARTIGO COMPLETO PUBLICADO	183

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do L-AA.	26
Figura 2. Ilustração de uma emulsão O/A.	35
Figura 3. Variedades de mecanismos físicos que podem tornar uma emulsão instável.	36
Figura 4. Etapas para obtenção da lecitina de soja.....	41
Figura 5. Fórmula estrutural do Span 80.	41
Figura 6. Ilustração esquemática de como é preparada a emulsão dupla.	46
Figura 7. Metodologia utilizada para a produção das microcápsulas coacervadas.	67
Figura 8. Emulsões 2 e 3, respectivamente, após 60 minutos de análise.....	74
Figura 9. Ensaio de estabilidade das emulsões simples (azul escuro: emulsão 1; vermelho: emulsão 2; verde: emulsão 3; roxo: emulsão 4; azul claro: emulsão 5; laranja: emulsão 6).....	74
Figura 10. Amostras obtidas após liofilização e ácido ascórbico puro em pó.	76
Figura 11. Microscopia ótica da emulsão dupla e do coacervado com aumento de 100 vezes.	80
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos Tratamentos AA1 e AA2, respectivamente.....	82
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos Tratamentos AA3 e AA4, respectivamente.....	82
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos tratamentos AA5 e AA6, respectivamente.....	83
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos Tratamentos AA7 e AA8, respectivamente.....	83
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado do Tratamento AA9.	83
Figura 17. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para a emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados (colunas hachuradas) dos tratamentos AA1, AA2 e AA3 - amarelo: AA1; azul: AA2 e verde: AA3.	87

Figura 18. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA4, AA5 e AA6 (colunas hachuradas) – amarelo: AA4; azul: AA5 e verde: AA6.....	87
Figura 19. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA7, AA8 e AA9 (colunas hachuradas) – amarelo: AA7; azul: AA8 e verde: AA9.....	88
Figura 20. Comparação das distribuições de tamanho das gotículas obtidas para emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA1, AA4 e AA7 (colunas hachuradas) – amarelo: AA1; azul: AA4 e verde: AA7.....	88
Figura 21. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas das emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA2, AA5 e AA8 (colunas hachuradas) – amarelo: AA2; azul: AA5 e verde: AA8.....	89
Figura 22. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas das emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA3, AA6 e AA9 (colunas hachuradas) – amarelo: AA3; azul: AA6 e verde: AA9.....	89
Figura 23. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	94
Figura 24. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA4, AA5 e AA6 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	95
Figura 25. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA7, AA8 e AA9 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	95
Figura 26. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	96
Figura 27. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	96
Figura 28. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	97
Figura 29. Espectros dos ingredientes gelatina, goma arábica, óleo de milho, PGPR 90 e ácido ascórbico.	102
Figura 30. Espectros de cada tratamento.	104

Figura 31. Estabilidade do ácido ascórbico puro em solução (coluna azul: AA a 20°C; coluna vermelha: AA a 37°C).	106
Figura 32. Figura de um dispositivo microfluídico para elaboração das cápsulas.	120
Figura 33. Imagens de como foi mantido o aquecimento durante a produção e coleta das microcápsulas em banho de gelo.....	123
Figura 34. Esquema demonstrativo da ação do precipitado na liberação e proteção do AA encapsulado.	124
Figura 35. Esquema mostrando a formação das macrocápsulas com utilização de gordura de palma.	126
Figura 36. (a) Microscopia ótica (100x) do tratamento M2 (20% de ácido ascórbico + 1% de sal); (b) Microscopia eletrônica de varredura do tratamento M5 (3% de ácido ascórbico+ 0,25% de quitosana + 1% de sal); (c) Microscopia confocal (300x) do tratamento contendo corante e 1% de sal; (d) Microscopia confocal (300x) do tratamento contendo somente corante, sem a presença de sal.	128
Figura 37. Distribuição do tamanho de partícula referente às capsulas de todas as formulações (Colunas de cor laranja: M1; vermelha: M2; verde: M3; roxo: M4; azul: M5).....	130
Figura 38. Etapas do processamento da salsicha.....	146
Figura 39. Algumas etapas do processo de fabricação da salsicha: (a) pesagem dos ingredientes; (b) massa cominuída no cutter; (c) embutimento das salsichas; (d) separação das salsichas por tratamento; (e) preparação para cozimento; (f) embaladas à vácuo.	147
Figura 40. Avaliação sensorial de aroma, cor, textura, sabor e aceitação global dos tratamentos (T1 a T5) em 5, 20 e 40 dias de estocagem (T1: coluna de cor azul escuro e T5: coluna de azul claro).....	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de identidade do óleo de milho.	43
Tabela 2. Composição da gordura de palma em ácidos graxos (%).	44
Tabela 3. Tratamentos obtidos durante a produção das microcápsulas.	67
Tabela 4. Resumo das condições operacionais utilizadas durante a coacervação complexa.	68
Tabela 5. Relação de emulsões simples testadas.	73
Tabela 6. Eficiência de encapsulação para cada tratamento.	77
Tabela 7. Diâmetros médios das partículas correspondentes às emulsões duplas e aos coacervados.	85
Tabela 8. Valores de higroscopicidade, solubilidade, umidade, atividade de água e Potencial Zeta para cada tratamento.	91
Tabela 9. Valores de L durante o período de 90 dias nas temperaturas de 20 e 37°C.	99
Tabela 10. Estabilidade do AA nas microcápsulas armazenadas por 90 dias, nas temperaturas de 20 e 37°C, expressa em %.	107
Tabela 11. Tratamentos estudados com utilização de gordura de palma.	120
Tabela 12. Tamanho médio de microcápsulas obtidas e eficiência de encapsulação.	129
Tabela 13. Estabilidade da solução controle de ácido ascórbico e de cada tratamento durante 30 dias na temperatura de 4°C.	132
Tabela 14. Estabilidade da solução controle de ácido ascórbico e de cada formulação durante 30 dias na temperatura de 20°C.	132
Tabela 15. Formulação básica para todos os tratamentos.	145
Tabela 16. Composição de cada tratamento aplicado nas salsichas.	145
Tabela 17. Estabilidade da emulsão cárnea, umidade e atividade de água para cada tratamento.	151
Tabela 18. Valores de TBARS (mg malonaldeído/Kg amostra) para cada tratamento durante 40 dias.	154
Tabela 19. Valores de pH para cada tratamento durante 40 dias.	156
Tabela 20. Valores de dureza (g) para cada tratamento durante 40 dias.	158
Tabela 21. Valores de L para cada tratamento durante 40 dias.	160

Tabela 22. Valores de a^* para cada tratamento durante 40 dias.	161
Tabela 23. Valores de b^* para cada tratamento durante 40 dias.	161

SIGLAS E ABREVIATURAS

AA = ácido ascórbico

pKa = cologarítmo da constante de acidez

L-AA = forma reduzida do ácido ascórbico

DHAA = ácido L-deidroascórbico

PGPR 90 = poliricinoleato de poliglicerol

A/O/A = emulsão dupla água em óleo em água

O/A/O = emulsão dupla óleo em água em óleo

A/O = emulsão simples água em óleo

Ftir = Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

m/m = relação em massa

v/v = relação em volume

rpm = rotações por minuto

SDS = dodecil sulfato de sódio

HLB = Balanço hidrofílico-lipofílico

PVA = poli-vinil-álcool

TBARS = Estabilidade oxidativa pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

INTRODUÇÃO

Com a função de inibir ou retardar a oxidação lipídica de alimentos, os antioxidantes tem sido muito empregados e estudados (MUKAI, 1993; JAYASINGHE et al., 2013). As reações de oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo (KUBOW, 1993; NAWAR, 1985; SILVA et al, 1999; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O ácido ascórbico (AA) é encontrado naturalmente em frutas e vegetais e, em menor quantidade, em tecidos animais e produtos derivados. Além de sua função de vitamina e como nutriente essencial, o AA é muito usado como ingrediente/aditivo de alimentos devido a suas propriedades antioxidante e redutora. No entanto, o ácido ascórbico é muito instável quando em contato com diversos fatores, entre eles, aquecimento, luz, alta concentração de oxigênio e altos valores de atividade de água (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A emulsão cárnea pode ser definida como um sistema composto por glóbulos de gordura envolvida por uma matriz formada de água e proteína (RODRIGUES, 1978). Sendo um produto rico em gordura, o mesmo está susceptível a oxidação lipídica e, conseqüentemente, mais facilmente sujeito à degradação. Com o intuito de resolver esse problema, faz-se necessária a utilização de antioxidantes. Normalmente, o antioxidante incorporado em emulsões cárneas é o eritorbato de sódio, que não confere nenhum benefício à saúde do consumidor. Dessa maneira, a aplicação do ácido ascórbico neste tipo de produto, além de proteger contra a oxidação, agregaria valor nutricional.

A utilização do ácido ascórbico pode ser garantida a partir da encapsulação do mesmo pela técnica de coacervação complexa e por dispositivos microfluídicos. Este trabalho pode ser considerado uma ideia pioneira e inovadora, devido a maior estabilidade conferida ao ácido ascórbico durante seu armazenamento como será visto nos capítulos a seguir. Além da alta eficiência de encapsulação e estabilidade do AA obtido neste trabalho, foi possível a produção de salsicha de maior valor agregado, além da presença de vitamina C em sua formulação.

Capítulo 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANTIOXIDANTES

Com a função de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos, os antioxidantes tem sido empregados e estudados com maior frequência (JAYASINGHE et al., 2013). Reações de oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (KUBOW, 1993; NAWAR, 1985; SILVA et al, 1999; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Para a escolha de um antioxidante a ser empregado no alimento, é necessário levar em consideração alguns fatores, tais como: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e ausência de toxicidade do composto e seus produtos de oxidação, mesmo em doses muito maiores do que as que normalmente seriam ingeridas no alimento (BAILEY, 1996). Além disso, na escolha de um antioxidante, fatores como legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais também são de extrema importância (RAFECAS et al, 1998).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996). Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994). Os antioxidantes mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais (NAMIKI, 1990) (BAILEY, 1996; NAMIKI, 1990).

Estudos em relação aos antioxidantes BHA, BHT, PG e TBHQ citados anteriormente têm demonstrado a possibilidade dos mesmos apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK et al, 2000). Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Europeia (REISH; LILLIARD; EITENMILLER, 1997). No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100 mg/g para BHT como concentrações máximas permitidas (ANVISA, 2012).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

Já em relação aos antioxidantes sinergistas, segundo Bailey (1996), são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada, enquanto que os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação.

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício (BAILEY, 1996; KEHRER; SMITH, 1992); os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (LABUZA, 1972; BAILEY, 1996).

1.2 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (AA) é um composto altamente polar cujas propriedades redutoras e de acidez são dadas pela porção 2,3-enediol. O AA tem características ácidas como resultado da ionização do grupo hidroxila C-3 ($pK_{a1} = 4,04$ a 25°C) (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O AA é encontrado naturalmente em frutas e vegetais e, em menor quantidade, em tecidos animais e produtos derivados. Ele é encontrado de forma

natural quase exclusivamente em sua forma reduzida L-AA (Figura 1). A oxidação de dois elétrons e a dissociação do hidrogênio convertem o L-AA para ácido L-deidroascórbico (DHAA), apresentando a mesma atividade de vitamina que o AA, pois é reduzido a AA no organismo quase por completo (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Figura 1. Fórmula estrutural do L-AA.

Fonte: (LEE *et al.*, 2004)

A oxidação do AA pode ocorrer pelos processos de transferência de elétrons simples ou dupla, sem detecção do intermediário semideidroascorbato. No caso da oxidação de um elétron, a primeira etapa envolve a transferência de elétrons para a formação de radicais livres semi-DHAA. A perda de um elétron adicional fornece DHAA, o qual é altamente instável devido a sua suscetibilidade à hidrólise da ponte de lactona. Essa hidrólise, que forma o ácido 2,3-dicetogulônico de forma irreversível, é responsável pela perda da atividade de vitamina C (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Já foram identificados mais de 50 produtos de degradação do AA. Os tipos e as concentrações desses compostos, bem como os mecanismos envolvidos, são fortemente influenciados por fatores como reações catalisadas por íons metálicos de transição como Cu^{2+} e Fe^{3+} , calor, luz, altos valores de pH, alta

concentração de oxigênio e valores altos de atividade da água. Como a hidrólise de DHAA ocorre com muita facilidade, a oxidação de DHAA representa com frequência uma etapa fundamental de limitação de degradação oxidativa da vitamina C (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Uma propriedade geralmente esquecida do AA é sua capacidade, em baixas concentrações, de atuar como pró-oxidante em altas pressões de oxigênio. Supõe-se que isso ocorra por geração de radicais hidroxila (OH^*) mediada por ascorbato ou de outras espécies reativas. Entretanto, tal fato parece ser de pouca importância na maior parte dos aspectos da química de alimentos (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Em virtude da produção de precursores ou de compostos do *sabor* ou de sua participação no escurecimento enzimático, as muitas reações envolvidas nas fases terminais de degradação do ascorbato são importantes. As degradações dos açúcares e do AA são muito parecidas, sendo, em alguns casos, mecanicamente idênticas. Ocorrem diferenças qualitativas entre as condições aeróbias e anaeróbias, no padrão de degradação do AA, sendo que o pH exerce influência sobre todas as circunstâncias. Os principais produtos de degradação do AA em solução neutra e ácida são: L-xilosona; ácido oxálico; ácido L-treônico; ácido tartárico; 2-furaldeído (furfural); e ácido furanoico, bem como diversas carbonilas e outros compostos insaturados. Assim como acontece na degradação do açúcar, o grau de fragmentação aumenta sob condições alcalinas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A degradação do AA está associada à alteração de cor, tanto na presença como na ausência de aminas. O DHAA e as dicarbonilas formadas durante sua degradação podem participar da degradação de Strecker do DHAA com um aminoácido, o produto do ácido sorbâmico pode formar dímeros, trímeros e tetrâmeros, vários dos quais apresentam cor avermelhada ou amarelada (BUETTNER, 1988; BUETTNER, 1993, KHAN; MARTELL, 1967; LIAO; SEIB, 1987, TANNENBAUM; YOUNG; ARCHER, 1985). Além disso, o 3,4-di-hidroxi-5-metil-2-(5H)-furanona, um produto intermediário de desidratação que segue uma descarboxilação durante a degradação anaeróbia do AA, apresenta cor acastanhada. Polimerizações adicionais, desses ou de outros produtos insaturados, também formam melanoidinas (polímeros nitrogenados) ou pigmentos não nitrogenados como o caramelo (KACEM, 1987; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Além de sua função como nutriente essencial, o ácido ascórbico é bastante usado como ingrediente/aditivo de alimentos devido a suas propriedades antioxidante e redutora. O AA inibe o escurecimento enzimático de maneira eficaz. Outras funções do AA são: (1) ação redutora em massas acondicionadas; (2) proteção de alguns compostos oxidáveis, por efeitos redutores da desativação de radicais livres e de oxigênio; (3) inibição da formação de nitrosaminas em carnes curadas; e (4) redução de íons metálicos (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O papel antioxidante do AA é multifuncional, sendo que o ascorbato inibe a autooxidação lipídica por meio de diversos mecanismos (BUETTNER, 1993, LIAO; SEIB, 1987; SIES; STAHL; SSUNDQUIST, 1992). Esses mecanismos incluem: (1)

desativação do oxigênio singlete; (2) redução de radicais de oxigênio e carbono centradas, com a formação de um radical semideidroascorbato menos reativo ou de um DHAA; (3) oxidação preferencial do ascorbato, concomitante à depleção de oxigênio; e (4) regeneração de outros antioxidantes, por exemplo, por meio da redução do radical tocoferol (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Diante do exposto, uma maneira de resolver tais problemas relacionados à instabilidade do ácido ascórbico é aplicação da técnica de microencapsulação. Além disso, a microencapsulação também pode possibilitar a liberação controlada do AA durante o tratamento térmico do alimento, auxiliando no mascaramento do gosto ácido que este composto propicia. Os detalhes serão apresentados a seguir.

1.3 MICROENCAPSULAÇÃO

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

Esta tecnologia tem sido empregada com êxito na indústria alimentícia, pois tem solucionado limitações no emprego de ingredientes e aditivos alimentícios, uma vez que pode mascarar *flavors* indesejáveis, reduzir a volatilidade, a higroscopicidade e a reatividade do material encapsulado, além de

possibilitar um aumento na estabilidade destes em condições ambientais adversas (BRANNON-PEPPAS, 1993).

Na indústria de alimentos a encapsulação tem vasta aplicação, e está exigindo novas pesquisas porque o mercado de produtos amplia-se com grande velocidade. Existe uma variedade muito grande de materiais que podem ser encapsulados, entre eles, produtos utilizados em indústrias alimentícias, como ácidos, bases, vitaminas, pigmentos, sais, enzimas, microrganismos (JACKSON & LEE, 1991; SHAHIDI & HAN, 1993; AUGUSTIN et al., 2001). Além de diversos materiais a serem encapsulados, também existem variados métodos de encapsulação, tais como *spray drying*, *spray chilling*, coacervação complexa, emulsão simples e dupla, gelificação iônica, coextrusão, dispositivos microfluídicos, entre outros (NIHANT et al., 1995; YADAV et al., 1997; UDDIN, HAWLADER & ZHU, 2001; JAFARI et al., 2008; MENDANHA et al., 2009; NORI et al., 2010; COMUNIAN et al., 2011; GAMBOA, GONÇALVES & GROSSO, 2011; NEO et al., 2012; ZIANI, FANG & MCCLEMENTS, 2012; COMUNIAN et al., 2013; DONG et al. 2013).

Os métodos de microencapsulação por emulsão dupla seguido da coacervação complexa e dispositivos microfluídicos, que foram empregados neste trabalho, serão detalhados a seguir.

1.3.1 Emulsão dupla seguida de coacervação complexa

Coacervação complexa é o método no qual ocorre a separação de fases de dois hidrocolóides a partir da solução inicial e a subsequente deposição da fase

de coacervado recém-formada em torno do ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no mesmo meio de interação, sendo essa uma das técnicas mais antigas de encapsulação. É considerado um verdadeiro processo de microencapsulação uma vez que o material de revestimento envolve completamente o núcleo com um revestimento contínuo (SOPER, 1995; GOUIN, 2004; BARBOSA-CÁNOVAS; ORTEGA-RIVAS; JULIANO; YAN, 2005).

O mecanismo básico envolvido nesse método é a formação de uma emulsão O/A e subsequente precipitação da fase contínua em torno das gotas da fase descontínua, implicando em um sistema de três fases. Existem três principais etapas no processo de coacervação (SHAY, 1994; BARBOSA-CÁNOVAS; ORTEGA-RIVAS; JULIANO; YAN, 2005):

- A) Formação de três fases imiscíveis durante o processo de homogeneização sob condições controladas;
- B) Precipitação do material encapsulante em torno do núcleo;
- C) Solidificação do revestimento líquido para formar as microcápsulas.

A coacervação pode ser classificada como simples ou complexa. A coacervação simples trabalha com sistemas contendo apenas um soluto coloidal (por exemplo, apenas gelatina), enquanto que coacervação complexa trabalha com sistemas contendo mais que um soluto (por exemplo, gelatina e goma acácia) (BARBOSA-CÁNOVAS; ORTEGA-RIVAS; JULIANO; YAN, 2005).

A coacervação complexa é mais comumente usada e envolve a interação de coloides com cargas opostas. No caso da gelatina e goma arábica, isso é possível apenas se os valores de pH estão abaixo do ponto isoelétrico da

gelatina, porque nesses valores de pH, a gelatina se torna carregada positivamente e a goma arábica, negativamente. O processo de coacervação típico começa com a suspensão do material de núcleo. Então, as soluções dos polímeros são adicionadas, o pH é ajustado, o sistema é resfriado e os polímeros interagem entre si, formando as microcápsulas. Muitas vezes as microcápsulas são secas por *spray dryer* ou liofilização para obtenção de um material sólido (BARBOSA-CÁNOVAS; ORTEGA-RIVAS; JULIANO; YAN, 2005).

A coacervação é uma técnica eficiente de encapsulação para compostos lipofílicos, no qual a liberação do material encapsulado pode ser obtida através de ruptura física da parede da cápsula, aquecimento, mudança de pH ou reação química, dependendo de sua natureza e seu uso final (SHAY, 1994; BARBOSA-CÁNOVAS; ORTEGA-RIVAS; JULIANO; YAN, 2005).

(i) *Polímeros comumente usados na coacervação complexa*

Gelatina

A gelatina possui muitas aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica e é obtida a partir do colágeno encontrado na pele e ossos de animais abatidos aprovados para consumo humano (KALMAN, 2004).

A gelatina é principalmente composta pelos aminoácidos glicina (cerca de 33%) e prolina/ hidroxiprolina (22%), sendo o restante da sua estrutura constituído por 17 aminoácidos. Destes aminoácidos restantes, a alanina é a mais abundante na gelatina, seguida por ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico. Gelatinas comerciais possuem em torno de 84-90% de proteína, 8-12% de água e 2-4% de

sais minerais. A gelatina em si não contém gordura ou carboidratos, e seu valor calórico é em torno de 3,6 calorias/g (KALMAN, 2004).

Dentre as propriedades funcionais da gelatina, pode-se destacar a capacidade de atuar como um gel (sobremesas, patês), coloide protetor (carne, carne enlatada, queijos e laticínios), como agente clarificante (vinho, cerveja, sucos de frutas), como espessantes (bebidas em pó, caldo de carne), como auxiliador em processos como microencapsulação de pigmentos, aromas, óleos e vitaminas, como estabilizante (queijo, leite, iogurte, glacês), entre outros. A gelatina também é usada na indústria farmacêutica na aplicação em cápsulas de gelatina, comprimidos, revestimento de comprimidos e até mesmo como emulsificante (KALMAN, 2004).

Goma arábica

O nome "Goma Árábica" tem origem do envio desta goma para a Europa a partir de portos árabes. A goma arábica é comercializada na forma de pó branco ou amarelado obtido por atomização e constituído de partículas esféricas de tamanhos variados (SMALL, 2011).

As gomas são de extrema importância na indústria de alimentos. A goma arábica é uma das gomas mais conhecidas, sendo muito utilizada como estabilizante, emulsificante, fixador de sabor, entre outros. A goma arábica, ao atuar como emulsificante, ajuda a manter uma distribuição homogênea das partículas em certos tipos de alimentos. Para alimentos como goma de mascar e *marshmallow*, a goma arábica tem a capacidade de formar uma película

superficial ideal na proteção de componentes aromáticos contra oxidação, evaporação e absorção de umidade do ar (SMALL, 2011).

Como já citado, o método de coacervação complexa se presta para encapsular matérias hidrofóbicas. Por esta razão, sendo o AA um composto hidrofílico, o grupo agregou à coacervação a técnica de emulsão dupla assim como descrito nos trabalhos de Mendanha et al., 2009, Rocha-Selmi et al., 2013a e b.

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, definidos como a mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de glóbulos. Entretanto, para que possam ser aplicadas às mais diversas áreas como cosmética, farmacêutica e química em geral, as emulsões devem apresentar um período definido e pré-determinado de estabilidade físico-química, sendo este dependente das aplicações pretendidas (MORAIS, 2008).

Emulsões podem ser convenientemente classificadas de acordo com a distribuição espacial relativa das fases. Um sistema que consiste em gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa é chamada de emulsão óleo em água ou emulsão O/A, por exemplo, leite, creme, molhos, maionese, bebidas, sopas, molhos e misturas para “sorvete de massa”. Um sistema que consiste em gotas de água dispersas em uma fase de óleo é chamada de emulsão água em óleo ou emulsão A/O, por exemplo, a margarina e a manteiga (MCCLEMENTS, 1994). Na Figura 2 observa-se a estrutura de uma emulsão simples.

Figura 2. Ilustração de uma emulsão simples.

Emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela adição de agentes tensoativos capazes de diminuir a tensão superficial do sistema e de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna. As principais etapas e/ou mecanismos de processos de instabilidade observados em emulsões podem ser floculação, cremeação, coalescência, maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*) e inversão de fases (MORAIS, 2008).

O termo “estabilidade da emulsão” é muito usado para descrever a habilidade de uma emulsão resistir a mudanças em suas propriedades com o tempo. Todavia, existe uma variedade de mecanismos que podem ser responsáveis por alterações nas propriedades das emulsões. Os mecanismos mais comuns responsáveis pela instabilidade de uma emulsão estão mostrados na Figura 3. Cremeação e sedimentação são formas de separação gravitacional. A cremeação descreve o movimento ascendente das partículas devido o fato de eles possuírem uma densidade menor que o líquido (fase contínua), enquanto que a sedimentação descreve o movimento descendente das partículas, devido o fato de possuírem uma densidade maior que do líquido. Floculação e coalescência são tipos de agregação de partículas. A floculação ocorre quando

duas ou mais partículas se juntam para formar um agregado em que as partículas preservam sua integridade individual, enquanto que a coalescência é o processo em que duas ou mais partículas se juntam para formar uma única partícula maior (MCCLEMENTS, 1994).

Figura 3. Variedades de mecanismos físicos que podem tornar uma emulsão instável.
Fonte: (MCCLEMENTS, 1994)

Por sua vez, as emulsões múltiplas simples, também conhecidas como emulsões duplas, são sistemas ternários compostos por água em óleo em água (A/O/A) ou óleo em água em óleo (O/A/O), ou seja, é uma emulsão na qual a fase dispersa contém gotas de outra fase dispersa em seu interior. Esta segunda fase dispersa está fisicamente separada por uma fase dispersa de composição distinta. As emulsões múltiplas são muito utilizadas na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (JIAO; BURGESS, 2008).

A presença desses dois tipos de interfaces significa que diferentes agentes emulsificantes são requeridos para a obtenção da emulsão dupla, um para

estabilizar a emulsão simples (gotículas internas) e outro para estabilizar a emulsão secundária (gotículas externas) (DICKINSON, 2011).

As emulsões múltiplas podem ser usadas para controlar a liberação de certos ingredientes, reduzir o teor de gordura total de produtos baseados em emulsão, ou para isolar um ingrediente de outro ingrediente que normalmente poderiam interagir (MCCLEMENTS, 1994).

Emulsões duplas do tipo água em óleo em água (A/O/A) podem ser aplicadas na formulação de produtos *light* e ser utilizadas como veículos para encapsulação e liberação controlada de nutrientes durante a ingestão de alimentos. O progresso do desenvolvimento do uso de emulsões duplas estáveis em alimentos é dependente da utilização correta de emulsificantes. Para conferir funcionalidade necessária, podem-se utilizar proteínas e polissacarídeos (DICKINSON, 2011).

Existem duas principais razões para a aplicação de emulsão dupla em alimentos. A primeira consiste em encapsular um ingrediente sensível a condições adversas do meio, tais como nutrientes ou compostos aromáticos e proporcionar liberação controlada dos mesmos durante a alimentação e digestão (MCCLEMENTS; DECKER, 2009; SAGALOWICZ; LESER, 2010; DICKINSON, 2011). A segunda é o estudo de produtos *light* e saudáveis (NORTON; NORTON, 2010; REVEREND et al., 2010; DICKINSON, 2011). O principal desafio para os cientistas é produzir formulações estáveis com emulsificantes de grau alimentício e estabilizantes, ao invés de tensoativos sintéticos e polímeros que têm sido tradicionalmente aplicados na maioria dos produtos farmacêuticos e cosméticos (DICKINSON, 2011).

O interesse da aplicação de emulsões duplas para a encapsulação de ingredientes ativos tem sido demonstrado por muitos pesquisadores incluindo a área farmacêutica, cosmética e biomédica. Uma das primeiras aplicações de emulsões duplas foi feita em 1965 por Herbert, o qual encapsulou ovalbumina na fase aquosa interna de uma emulsão tipo A/O/A (DICKINSON, 2011).

No caso de A/O/A, compostos funcionais podem ser encapsulados dentro da fase interna aquosa ou na fase oleosa (fase intermediária), tornando possível o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada contendo vários compostos funcionais, que podem ser liberados em um local específico, tais como boca, estômago ou intestino (WEISS, TAKHISTOV & MCCLEMENTS, 2006; MURILLO-MARTINEZ et al., 2011).

Com o objetivo de desenvolver um método para melhor aproveitamento das vantagens dos probióticos, Shima et al. (2006) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* utilizando-se de uma emulsão dupla A/O/A.

Jiménez-Alvarado et al. (2009) obtiveram emulsões duplas do tipo A/O/A encapsulando bisglicinato de ferro na fase interna aquosa, sendo estabilizado por um complexo proteico. A emulsão apresentou boa estabilidade, eficiência de encapsulação, proteção contra oxidação e baixa taxa de liberação.

(ii) *Emulsificantes*

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas, ou seja, que possuem porções hidrofílicas e lipofílicas na mesma molécula. A porção lipofílica consiste normalmente em uma cadeia longa de carbonos ou um sistema aromático. O

componente hidrofílico pode consistir em um ácido carbônico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico ou composto de amônia quaternário, ou um aglomerado de grupos hidroxil- ou de éter poliglicol. Além de baixar a tensão superficial entre as fases, os emulsificantes servem como ingredientes ativos, cujas propriedades ativas incluem o controle da umidade, complexação com amidos e proteínas, aeração, formação de barreiras protetoras, formação de filmes, agentes aglutinantes e antiespumantes, controle de cristalização de açúcares e gorduras, crioproteção (garantindo estabilidade gelo/degelo) e resistência a danos resultantes de agitação e cocção (MCCLEMENTS, 1994).

Existem várias famílias de emulsificantes de grau alimentício, os quais podem ser classificados em mono- e diglicerois, monoésteres de propilenoglicol, ésteres lactilados, ésteres de poliglicerol, ésteres de sorbitano, ésteres etoxilados, ésteres succinilatos, ésteres de mono- e diglicerois sacetilados, ésteres de mono- e diglicerois fosfatados e ésteres de sacarose, proteínas e polissacarídeos. Alguns alimentos, como chocolate e manteiga de amendoim, por exemplo, são de fato dispersões de partículas sólidas em uma fase contínua gordurosa ou oleosa. A viscosidade do chocolate é controlada pela adição de lecitina de soja ou ricinoleato de poliglicerol (PGPR) (MCCLEMENTS, 1994; DANISCO, 2012).

(iii) Alguns tipos de emulsificantes

PGPR 90

Poliricinoleato de poliglicerol (PGPR) é utilizado em chocolate, óleos, gorduras e produtos de panificação. Os principais benefícios são o processamento de produtos de confeitaria e conferir estabilidade às emulsões

com baixo teor de gordura. Seu valor HLB é de 1,5. (DANISCO, 2012; MCCLEMENTS, 1994).

Lecitina de soja

A lecitina é um produto rico em fósforo, quimicamente denominado fosfatídeos. Os mesmos estão presentes em quase todas as células animais e vegetais e em função de sua estrutura química, podem ser dispersos em soluções polares e apolares, o que gera uma grande versatilidade de utilização deste ingrediente. Devido sua composição, não é possível definir um exato valor HLB. (PELAEZ & MORTIMER, 2011; MCCLEMENTS, 1994; BAILEY, 1961; CIRCLE, 1951; CONN & STUMPF, 1980; DAUBERT, 1951; STANLEY, 1951).

A lecitina de soja é umas das lecitinas obtidas em escala industrial no Brasil e o interesse pela sua industrialização cresce a cada dia mais devido às suas diversas aplicações, tais como agente emulsificante, de fixação de cor e de sabor nos produtos industrializados (PELAEZ & MORTIMER, 2011; BAILEY, 1961; CIRCLE, 1951; CONN & STUMPF, 1980; DAUBERT, 1951; STANLEY, 1951).

As propriedades físico-químicas, particularmente as emulsificantes, determinam os usos da lecitina. Uma pequena quantidade de lecitina pode ser usada como agente emulsificante, estabilizador e dispersante. Por essa razão, a lecitina tem importante posição no mercado de alimentos. A lecitina de soja contém de 30 a 40% de óleo de soja não refinado. A purificação é feita pelo fracionamento com solventes específicos, como, por exemplo, a acetona. O óleo e ácidos graxos são dissolvidos em acetona, precipitando os fosfolipídeos.

Fosfatídeos podem ser dissolvidos num óleo refinado ou podem ser secos ou granulados. O custo do processo é elevado e, por essa razão, a lecitina pura, isto é, sem óleo, tem uso restrito e bastante específico como, por exemplo, em produtos farmacêuticos (PELAEZ & MORTIMER, 2011; BAILEY, 1961; CIRCLE, 1951; CONN & STUMPF, 1980; DAUBERT, 1951; STANLEY, 1951).

As etapas para obtenção da lecitina de soja podem ser observadas na Figura 4:

Figura 4. Etapas para obtenção da lecitina de soja.

Fonte: (PELAEZ & MORTIMER, 2011; BAILEY, 1961; CIRCLE, 1951; CONN & STUMPF, 1980; DAUBERT, 1951; STANLEY, 1951).

Éster de sorbitan mono/oleato - Span 80

O Span 80 é um emulsificante lipofílico, ou seja, solúvel em óleo, e muito utilizado nas indústrias alimentícias. O ácido graxo presente em sua estrutura é um oleato, e este tensoativo não-iônico apresenta-se como um líquido amarelo claro, de densidade $0,840 \text{ g cm}^{-3}$ e HLB de 4,3 (ANDREANI, 2008; MCCLEMENTS, 1994). Sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 5.

Figura 5. Fórmula estrutural do Span 80. Fonte: (ANDREANI, 2008)

(iv) *Tipos de fase oleosa*

Óleo de milho

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Óleos vegetais refinados, o óleo vegetal comestível é um produto alimentício constituído principalmente por triacilgliceróis, obtido unicamente de matéria-prima vegetal, refinado mediante o emprego de processos tecnológicos adequados. Os mesmos podem conter pequenas quantidades de outros lipídios, tais como fosfolipídeos, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres, naturalmente presentes no óleo vegetal. O óleo de milho é um óleo refinado obtido do germe dos grãos da espécie *Zeamays* L., por meio de processos tecnológicos adequados.

O óleo de milho é considerado como um dos óleos mais saudáveis, pois além de ter sabor agradável, levemente adocicado, contém em sua maioria, ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico, um ácido graxo poliinsaturado da série ω -6 (RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003; HUI, 1996; RODRIGUES; ANTON; GIOIELLI, 2003).

Devido a sua estabilidade inerente, tem longa vida de prateleira e é resistente a transformações sob condições adversas, como as encontradas durante a fritura. O óleo de milho pode ter um papel muito importante na dieta humana, pois é facilmente digerido, oferece ácidos graxos essenciais e vitamina E e representa uma fonte rica de ácidos graxos poli-insaturados, o que ajuda a regular os níveis de colesterol no sangue e a pressão arterial. Uma colher de sopa de óleo de milho satisfaz a necessidade diária de ácidos graxos essenciais para uma criança ou um adulto saudáveis (RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003).

Na Tabela 1 podem ser observadas algumas das características físico-químicas do óleo de milho.

Tabela 1. Características de identidade do óleo de milho.

	Óleo de milho
Matéria Insaponificável (g/100g)	≤ 2,80
Densidade relativa (a 20°C)	≥ 0,917 e ≤ 0,925
Índice de refração (Raia D a 40°C)	≥ 1,465 e ≤ 1,468
Índice de saponificação (mg KOH/g)	≥ 187 e ≤ 195
Índice de iodo (Wijs)	≥ 103 e ≤ 135
C <12	Não detectável
C12:0 (%)	≤ 0,3
C14:0 (%)	≤ 0,3
C16:0 (%)	≥ 8,6 e ≤ 16,5
C16:1 (%)	≤ 0,5
C18:0 (%)	≤ 3,3
C18:1 (%)	≥ 20,0 e ≤ 42,2
C18:2 (%)	≥ 34,0 e ≤ 65,6
C18:3 (%)	≤ 2,0
C20:0 (%)	≥ 0,3 e ≤ 1,0
C20:1 (%)	≥ 0,2 e ≤ 0,6
C22:0 (%)	≤ 0,5
C22:1 (%)	≤ 0,3
C24:0 (%)	≤ 0,5
C24:1 (%)	Não detectável

Fonte: Regulamento Técnico de identidade e qualidade de óleos vegetais refinados da Instrução Normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006 (MAPA).

Gordura de palma

O óleo de palma é extraído a partir da polpa do fruto da palmeira (*Elaeis guineenses*), por métodos físicos (prensagem mecânica) sem a utilização de solventes ou outros produtos químicos. Durante o refino deste óleo, apenas

produtos naturais são usados no processamento (ácido cítrico e terra não ativada). Isto difere de processos químicos convencionais de refinação que utilizam soda cáustica para neutralizar os ácidos graxos livres. Na refinação física de óleo de palma, os ácidos graxos livres são removidos por destilação (AGROPALMA, 2012).

Seu estado semi-sólido à temperatura ambiente ou, em alguns casos, com a separação de fases é devido à sua composição de cerca de 47,2% de ácidos graxos saturados, 42% monoinsaturados e 10% de poli-insaturados (Tabela 2) (GRIMALDI et al., 2005).

Tabela 2. Composição da gordura de palma em ácidos graxos (%).

Ácido Graxo	% (m/m)
C 12:0 – Laurico	1,1
C 14:0 – Mirístico	1,0
C 16:0 – Palmítico	40,7
C 18:1 – Óleico	42,0
C 18:2 – Linoleico	10,2
Saturados	47,2
Insaturados	52,2

Fonte: (GRIMALDI et al., 2005)

1.3.2 Emulsificação pela utilização de dispositivos microfluídicos

A microencapsulação por dispositivos microfluídicos é uma técnica promissora para a fabricação de gotas monodispersas e com propriedades mecânicas uniformes, além de cápsulas multifuncionais com múltiplos compartimentos, superando as limitações da variabilidade na produção, o que permite um maior controle e otimização da eficiência de encapsulação e liberação dos agentes ativos (SUN et al, 2010; ZHAO et al, 2011).

Devido ao excelente controle de fluxo alcançado nos dispositivos microfluídicos, gotas de emulsão são geradas com extrema precisão. Embora seja apenas uma gota de cada vez, isso permite a formação de emulsões extremamente monodispersas. O grau de controle proporcionado pelo dispositivo microfluídico é realçado pela capacidade de gerar emulsões duplas, triplas ou mesmo de ordem superior de maneira controlada, nos quais o tamanho e número de gotículas encapsuladas podem ser de grande precisão (ZHAO et al., 2011).

Usando dispositivos microfluídicos, a formulação escolhida pode variar através da utilização de uma ampla gama de fluidos. A flexibilidade de escolha de material combinado com a diversidade de ordem da emulsão amplia o número de gotas que podem ser produzidas. No entanto, para isso ser verdadeiramente útil, as taxas de produção típicas dos dispositivos devem ser aumentadas e isso requer um significativo escalonamento através da utilização das redes microfluídicas em paralelo (ZHAO et al., 2011).

Os capilares de vidro são uma classe de dispositivo que permite a produção de emulsões monodispersas. Tais dispositivos consistem em conjuntos coaxiais de uma série de capilares de vidro, que têm vantagens tais como sua capacidade de umedecimento que pode ser fácil e precisamente controlada, são rígidos e resistentes a produtos químicos e sua geometria tridimensional permite a fabricação controlada de emulsões múltiplas.

Dispositivos de emulsão simples podem ser construídos inserindo-se um capilar cilíndrico em um capilar quadrado de vidro. Na geometria de co-fluxo, o fluxo das duas fases fluem na mesma direção, sendo o fluxo da fase dispersa no interior do capilar cilíndrico e o fluxo da fase contínua entre o quadrado e o capilar

cilíndrico. Alternativamente, na geometria do "*flow focusing*", os fluxos são vertidos em sentidos opostos, gerando emulsões no tubo de coleta. Emulsões simples podem ser produzidas utilizando os dois tipos de geometria, enquanto que as emulsões duplas são geralmente produzidas utilizando a combinação das duas geometrias (ZHAO et al., 2011; UTADA et al., 2007).

O dispositivo comum usado para produzir emulsões duplas consiste em dois capilares cilíndricos dispostos ponta a ponta, dentro de um capilar quadrado. A fase interna é bombeada através do interior de um dos capilares redondos enquanto que o fluido intermediário, no mesmo sentido através do capilar quadrado. A fase externa flui também através do capilar quadrado, no entanto no sentido oposto aos outros dois fluidos. A emulsão dupla é formada quando os três fluidos se encontram no tubo de coleta (Figura 6) (ZHAO et al., 2011; UTADA et al., 2007).

Figura 6. Ilustração esquemática de como é preparada a emulsão dupla.

Fonte: (UTADA et al., 2007)

1.4 ENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Como já dito anteriormente, o AA é muito sensível à luz, à ação de agentes oxidantes e íons metálicos e ao aquecimento. Além disso, é utilizado para fortificação alimentícia, o que implica em sua adição em uma quantidade tal que pode conferir sabor ácido ao alimento. Para solucionar esses problemas, um grande número de métodos tem sido proposto, entre eles a modificação química do ácido ascórbico, a microencapsulação e complexação. Segundo Lee et al. (2004), é possível estabilizar o AA em emulsão dupla tipo A/O/A. Nesse trabalho, o AA foi dissolvido junto com uma solução de MgSO_4 . A emulsão simples A/O foi preparada com a adição da solução de AA/ MgSO_4 na fase oleosa composta por Puresyn4 e o tensoativo Arlacel P135 com aquecimento e velocidade de emulsificação à 7000 rpm por 5 minutos. Após essa etapa, o sistema aquoso estável foi incorporado na fase aquosa interna da emulsão dupla. Foi possível obter emulsões estáveis em um período de até 8 semanas. Nesse mesmo trabalho, o AA estabilizado foi aplicado em produtos farmacêuticos e cosméticos.

Trindade e Grosso (2000) encapsularam AA por *spray drying* usando goma arábica e amido de arroz como materiais de parede. Neste trabalho, microcápsulas produzidas com goma arábica foram mais estáveis do que as elaboradas com amido de arroz. Pierucci et al. (2006) e Desai, Liu & Park (2006) microencapsularam AA usando concentrado proteico de ervilha e quitosana e tripolifosfato como materiais de parede, respectivamente, também pela técnica de *spray drying*. Para Pierucci et al. (2006) foi obtido um valor de retenção em torno de 84%, tamanho de partícula menor que $8\mu\text{m}$ e maior retenção do AA quando encapsulado do que quando livre, sendo possível a obtenção deste tipo de

microcápsulas. Ainda pela técnica de *spray drying*, Pereira et al. (2009) encapsularam AA utilizando proteína isolada de ervilha, de feijão de corda e maltodextrina como materiais de parede.

Uddin et al. (2001) fizeram uma comparação entre as características de microcápsulas de AA preparadas por diferentes técnicas, entre elas separação térmica de fases, "*melt dispersion*", evaporação de solventes e secagem por atomização. Foi possível obter cápsulas de AA as quais preveniram a mudança de cor do agente ativo, retardaram a taxa de liberação do núcleo e mascararam o sabor ácido.

Lee et al. (2004) microencapsularam AA com monoestearato de poli acilglicerol para a fortificação de leite. Obtiveram alta eficiência de encapsulação, no entanto a estabilidade foi analisada durante apenas o período de 12 dias, o que não é suficiente para a aplicação em alimentos.

Han e colaboradores (2008) encapsularam AA pela técnica de gelificação iônica usando alginato e quitosana como materiais de parede. Já Desai, Liu & Park (2005) encapsularam AA por imobilização em esferas de alginato de sódio. A técnica de extrusão foi utilizada por Chang e colaboradores (2010) para encapsular AA utilizando maltodextrina como material de parede, com rendimento de 96%. Knezevic e colaboradores (1998) encapsularam AA por leito fluidizado utilizando três materiais encapsulantes hidrofóbicos: Eudragit NE 30D, Aqualon NF e Sigert Stearin L2 SM.

1.5 PRODUTOS CÁRNEOS EMULSIONADOS

A emulsão da carne pode ser definida como um sistema composto por glóbulos de gordura (fase dispersa ou descontínua), envolvida por uma matriz formada de água e proteína (fase contínua) (RODRIGUES, 1978). Para que a emulsão cárnea seja estável, é absolutamente necessário que as proteínas se encontrem dissolvidas ou solubilizadas. As proteínas miofibrilares (actina e miosina) são insolúveis em água e em soluções salinas diluídas, mas são solúveis em soluções salinas mais concentradas. Uma das funções mais importantes dos sais e fosfatos nas emulsões de embutidos é solubilizar as proteínas na fase aquosa para que se encontre em condições de recobrir as partículas de gordura (ROÇA, 2000).

A capacidade de emulsificação é definida como a quantidade de gordura emulsificada por unidade de proteína. De acordo com Canhos & Dias (1985), este parâmetro é afetado pelos seguintes fatores: temperatura, tamanho das partículas de gordura, pH, teor de proteína solubilizada e viscosidade da emulsão.

A salsicha é um embutido de carne oriunda de uma emulsão, caracterizada como uma massa fina. Essa emulsão é formada após a mistura de carnes, aditivos e condimentos em um equipamento específico chamado *cutter*, promovendo uma mistura íntima dos glóbulos de gordura com uma matriz de proteína e água. A massa fina incorporada à tripa recebe tratamento térmico, sendo então feita a remoção deste envoltório para seu acabamento. A salsicha pode ser então congelada ou enlatada, sendo esta com esterilização devidamente programada (ODERICH, 2007).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROPALMA.

Disponível em: <http://www.agropalma.com.br>. Acesso em: 10 nov. 2012.

ANDREANI, L. **Desenvolvimento e Caracterização de microesferas de glúten de trigo para utilização em sistemas de liberação controlada**, Florianópolis, SC. 2008. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**.

Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis>>.

Acesso em: 10 abr. 2012.

AUGUSTIN, M.A.; SANGUANSRI, L.; MARGETTS, C.; YOUNG, B.

Microencapsulation of food ingredients. **Food Australia**, v.53, n.6, p. 220-223, 2001.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. New York: John Wiley, v. 3, 1996.

BAILEY, A.E. **Aceites y Grasas Industriales**. Editorial Reverte; S.A., 741 p., 1961.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality**. New York: Kluwer Academic, p. 210-212, 2005.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and BHA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n.1, p. 599-605, 2000.

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. In: **Polymeric delivery systems: properties and applications**, cap. 3, p.42-52, 1993.

BUETTNER, G. R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. Cap. 16, p. 27-40, 1988.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. p. 535-543, 1993.

CANHOS, D. A. L., DIAS, E. L. **Tecnologia de Carne Bovina e Produtos Derivados**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia - FTPT. São Paulo, 1985.

CHANG, D.; ABBAS, S.; HAYAT, K.; XIA, S.; ZHANG, X.; XIE, M.; KIM, J. M. Encapsulation of ascorbic acid in amorphous maltodextrin employing extrusion as affected by matrix/core ratio and water content. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 9, p.1895-1901, 2010.

CIRCLE, S. J. Proteins and others nitrogenous constituents. In: **Soybeans and soybean products**. MARKLEY, K.S., v.1, cap 8, p. 275- 370, 1951.

COMUNIAN, T. A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; PICCONE, P., PITTIA, P.; TRINDADE, C. S. F. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.1259–1265, 2011.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C.C; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v.52, n.1, p.373–379, 2013.

CONN, E.E. & STUMPF. Introdução à Bioquímica. Edgard Blücher Ltda., 525 p., 1980.

DANISCO. Disponível em: <<http://www.danisco.com/>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

DAUBERT, B. F. Chemical composition of Soybeans oil. In **Soybeans and Soybean products**. MARLEY, K.S., v. 1, cap.5, p.157-211, 1951.

DESAI, K. G., LIU, C., & PARK, H. J. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. **Journal of microencapsulation**, v.23, n.1, p.79-90, 2006.

DESAI, K. G. H., LIU, C., & PARK, H. J. Characteristics of vitamin C immobilized particles and sodium alginate beads containing immobilized particles. **Journal of microencapsulation**, v.22, n.4, p.363-376, 2005.

DICKINSON, E. Double emulsions stabilized by Food Biopolymers. Review Article. **Food Biophysics**, v. 6, p.1-11, 2011.

DONG, Y., NG, W. K., SHEN, S., KIM, S. & TAN, R. B. H. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 2, p. 940–5, 2013.

FARIA, E. V., KATUMI, Y. Técnicas de análise sensorial. Campinas: ITAL/LAFISE, v.1, 2002.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4, p. 366-374, 2010.

GAMBOA, O. D., GONÇALVES, L. G. & GROSSO, C. F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1732–1739, 2011.

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

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

HAN, J., GUENIER, A.-S., SALMIERI, S. & LACROIX, M. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n. 7, p. 2528–35, 2008.

HERBERT, W. J. Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant, **Lancet** 2, p. 771, 1965.

HUI, Y. H. **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: Wiley, 5, v.2, p.125-158, v.3, p.1-63, 1996.

JACKSON, L.S., LEE, K. Microencapsulation and Food Industry, **Lebensmittel-Wissenschaftat Technologie**, v. 24, n.4, p. 289-297, 1991.

JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E., HE, Y. H., BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavor and oils during drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816-835, 2008.

JAYASINGHE, C., GOTOH, N., WADA, S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v.141, p.3077-3084, 2013.

JIAO, J., BURGESS, D. J. Multiple Emulsion Stability: Pressure Balance and Interfacial Film Strength. **Multiple Emulsions: technology and applications**. Wiley, United States of America, 2008.

JIMÉNEZ-ALVARADO, R., BERISTAIN, C. I., MEDINA-TORRES, L., ROMÁN-GUERRERO, A. & VERNON-CARTER, E. J. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2425 e 2433, 2009.

KACEM,B., CORNELL, J. A., MARSHALL, M. R., SHIREMAN, R. B., MATTHEWS, R. F. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange juice and orange drinks. Effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen. **Journal of Food Science**. v. 52, p. 1668-1672, 1987.

KALMAN, D. S. Gelatin. Nutritional Ergogenic Aids. **CRC Press LLC**, p.105-113, 2004.

KHAN, M. M.T., MARTELL, A.E. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. II. Cupric and ferric chelate catalyzed oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, p. 4176-4185, p. 7104-7111, 1967.

KEHRER, J. P., SMITH, C. V. In **Natural antioxidants in human health and disease**; Academic Press: San Diego, p. 25, 1992.

KNEZEVIC, Z., GOSAK, D., HRASTE, M., & JALSENJAK, I. Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid. **Journal of microencapsulation**, v. 15, n. 2, p. 237-252, 1998.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. New York, **Nutrition Reviews**, v. 51, p. 33, 1993.

LABUZA, T.P., HEIDELBAUGH, N.D., SILVER, M., KAREL, M. Oxidation at intermediate moisture contents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 86-90, 1972.

LEE, J-B., AHN, J., KWAK, H-S. L-Ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerolmonostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 495-500, 2004.

LEE, J-S., KIM, J-W., HAN, S-H., CHANG, I-S., KANG, H-H., LEE, O-S., OH, S-G., SUH, K-D. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, p.1-12, 2004.

LE REVEREND, B.J.D., NORTON, I.T., COX, P.W., SPYROPOULOS, F. Colloidal aspects of eating. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.15, p.84, 2010.

LIAO, M.-L., SEIB, P. A. Selected reactions of l-ascorbic acid related to foods. **Food Technology**. v.41, p.104-107, 111, 1987.

MAPA. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Anexo I – Regulamento Técnico de identidade e qualidade de óleos vegetais refinados da Instrução Normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006.

MCCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice and techniques**. 2.ed. CRC Press, 1994.

MCCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. In **Designing Functional Foods**, ed. by D.J. McClements, E.A. Decker. Woodhead, Cambridge, p. 502, 2009.

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

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*, 3rd edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 387p, 1999.

MORAIS, J. M. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. 2008. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - USP. Ribeirão Preto.

MURILLO-MARTINEZ, M. M., PEDROZA-ISLAS, R., LOBATO-CALLEROS, C., MARTÍNEZ-FEREZ, A., VERNON-CARTER, E. J. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.577-585, 2011.

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic Study of Reactions. Between Tocopheroxyl Radicals and Fatty Acids. **Lipids**, v.28, p.753, 1993.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273, 1990.

NAWAR, W. W. In **Lipids**; Fennema, O. R., ed.; Marcel Dekker: New York, p. 139, 1985.

NEO, Y. P., RAY, S., JIN, J., GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M., NIEUWOUDT, M. K., LIU, D., & QUEK, S. Y. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein-gallic acid system. **Food chemistry**, v. 136, n.2, p.1013–1021, 2013.

NIHANT, N., GRANDFILS, C., JEROME, R., TEYSSIE, P. J. Microencapsulation by coacervation of PLGA: IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation. **Controlled Release**, v. 35, p.117-125, 1995.

NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., MATIAS DE ALENCAR, S., THOMAZINI, M., DE CAMARGO BALIEIRO, J. C. & CONTRERAS CASTILLO, C. J. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 429–435, 2011.

NORTON, J. E.,NORTON, I. Designer colloids—towards healthy everyday foods. **Soft Matter**, v.6, p. 3735, 2010.

ODERICH, C. A. L. **Tecnologia de alimentos. Industrialização de Carnes: Produção de Salsicha**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PELAEZ, N., MORTIMER, F. Estudo da estabilidade de espuma com aplicação gastronômica elaborada a partir da Lecitina de Soja. **Revista Food Ingredients Brasil**, n.17, p.55-56, 2011.

PIERUCCI, A.P.T.R., ANDRADE, L. R., BAPTISTA, E. B., VOLPATO, N. M., ROCHA-LEÃO, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 6, p. 654-662, 2006.

RAFECAS, M., GUARDIOLA, F., ILLERA, M., CODONY, R., BOATELLA, J. Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. **Journal of Chromatography**, v.822, p. 305, 1998.

REISHE, D. W., LILLIARD, D. A., EITENMILLER, R. R. In **Antioxidants**; Akoh, C. C.; Min, D. B., eds.; Marcel Dekker: New York, p. 423, 1997.

ROCHA-SELMÍ, G.A., THEODORO, A.C., THOMAZINI, M., BOLINI, H.M.A., FAVARO-TRINDADE, C.S. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. **Journal of Food Engineering**, v.119, p.28-32, 2013a.

ROCHA-SELMÍ, G.A., BOZZA, F.T., THOMAZINI, M., BOLINI, H.M.A., FAVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v.139, p.72-78, 2013b.

ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2000.

RODRIGUES, F. A. **Tecnologia dos Produtos Cárneos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos. ITAL/EMBRAPA Campinas, 1978.

RODRIGUES, J. N., GIOIELLI, L. A., ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 226-233, 2003.

RODRIGUES, J. N., ANTON, C., GIOIELLI, L. A. Cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de milho. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n.1, 2003.

SAGALOWICZ, L., LESER, M. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.15, p.61, 2010.

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

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p.94, 1999.

SIES, H., STAHL, W., SSUNDQUIST, A. R. Antioxidants functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids, in **Beyond Deficiency. New Views on the Functions and Health Effects of Vitamins**, N. Y. Academy of Science, v. 669, p. 7-20, 1992.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. In Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; **Food Phytochemicals for Cancer Prevention**: Washington, p. 20, 1994.

SHAY, R. Flavor manufacturing, Part I. In **Source Book of Flavors**, Reineccius, G. Chapman & Hall, New York, cap. 11, p. 538-605, 1994.

SHIMA, M., MORITA, Y., YAMASHITA, M. & ADACHI, S. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 8, p.1164–1169, 2006.

SMALL, E. **Top 100 Exotic Food Plants**. Capítulo 44: Gum Arabic, CRC Press, p. 269-276, 2011.

SOPER, J. C. Utilization of coacervated flavors. In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, Risch, S. J. and Reineccius, G. A. **American Chemical Society**, Washington, DC, cap 10, p. 104-112, 1995.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, 01, 2002.

STANLEY, J. Production and utilization of lecithin. In Soybeans and Soybeans products. MARLEY, K.S., v.2, cap.16, p.593-647, 1951.

SUN, B. J.; SHUM, H. C.; HOLTZE, C.; WEITZ, D.A. Microfluidic melt emulsification for encapsulation and release of actives. **Applied Materials and Interfaces**. v.2, n.12, p. 3411-3416, 2010.

TANNENBAUM, S. R., YOUNG, V. R., ARCHER, M. C. Vitamins and minerals. **Food Chemistry**, 2ed, Revised and Expanded (O.R. Fennema, ed.), Marcel Dekker, New York, p.477-544, 1985.

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

UTADA, A.S., CHU, L.-Y., FERNANDEZ-NIEVES, A., LINK, D.R., HOLTZE, C., WEITZ, D.A. Dripping, Jetting, Drops and Wetting: The magic of microfluidics. **MRS Bulletin**, v.32, p.702-708, 2007.

UDDIN, M. S., HAWLADER, M. N. A., ZHU, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. **Journal of Microencapsulation**, v.18, n.2, p.199-209, 2001.

WEISS, J., TAKHISTOV, P., & MCCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. R107-R116, 2006.

YADAV, S. K.; KHILAR, K. C.; SURESH, A. K. J. Release rates from semi-crystalline polymer microcapsules formed by interfacial polycondensation. **Journal of Membrane Science**, v.125, p. 213-218, 1997.

ZHAO, Y.; SHUM, H.C.; ADAMS, L.L.A.; SUN, B.; HOLTZE, C.; GU, Z; WEITZ, D.A. Enhanced encapsulation of actives in self-sealing microcapsules by precipitation in capsule shells. **American Chemical Society**, n.27, p.13988-13991, 2011.

ZIANI, K., FANG, Y. & MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: vitamin E, vitamin D, and lemon oil. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p.1106–12, 2012.

**Capítulo 2. MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO
ASCÓRBICO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA:
ESTUDO ESTRUTURAL E ESTABILIDADE**

CAPÍTULO 2. MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO ESTRUTURAL E ESTABILIDADE

RESUMO

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados devido aos processos oxidativos, principalmente à oxidação lipídica, a qual é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, mas também a integridade e segurança dos alimentos. O ácido ascórbico é um antioxidante muito eficaz que exibe função vitamínica, no entanto é relativamente instável. A microencapsulação utilizando o método de coacervação complexa foi estudada como alternativa para resolver tais problemas. Assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar microcápsulas de ácido ascórbico através do método de coacervação complexa. As microcápsulas foram elaboradas utilizando-se de uma emulsão simples A/O sendo a fase aquosa composta por solução de ácido ascórbico 30% e a fase oleosa composta por óleo de milho e emulsificante PGPR 90. Para a obtenção da emulsão dupla A/O/A, etapa seguinte à emulsão simples, a segunda fase aquosa foi composta de uma solução de gelatina, com diferentes concentrações (2,5, 5 e 7,5%). Para que ocorresse a coacervação complexa, última etapa do processo, solução de goma arábica foi adicionada, obtendo-se a relação gelatina: goma arábica 1:1. Todos os tratamentos foram secos por liofilização. Essas microcápsulas foram analisadas

com relação à morfologia, por microscopia ótica e eletrônica de varredura, umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade, Potencial Zeta, Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (Ftir), tamanho e distribuição de partículas, cor instrumental, eficiência de encapsulação e estabilidade do material encapsulado. A obtenção das microcápsulas de ácido ascórbico por emulsão dupla seguida por coacervação complexa foram viáveis, uma vez que apresentaram características condizentes com dados encontrados na literatura. O tratamento AA4 (75% de núcleo e solução de polímero de 2,5%) apresentou maior estabilidade do material encapsulado dentre todas as formulações, sendo esta a escolhida para aplicação em salsicha, mostrado no Capítulo 4. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Produtos Funcionais, nas dependências do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

Palavras-chave: vitamina C, encapsulação, antioxidante, estabilidade

2.1 INTRODUÇÃO

Com a função de inibir ou retardar a oxidação lipídica de alimentos, os antioxidantes têm sido muito empregados e estudados (MUKAI, 1993; JAYASINGHE et al., 2013). As reações de oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo (KUBOW, 1993; NAWAR, 1985; SILVA et al, 1999; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O ácido ascórbico (AA) é encontrado naturalmente em frutas e vegetais e, em menor quantidade, em tecidos animais e produtos derivados. Além de sua função de vitamina e nutriente essencial, o AA é muito usado como ingrediente/aditivo de alimentos devido a suas propriedades antioxidante e redutora. No entanto, o ácido ascórbico é muito instável quando em contato com diversos fatores, entre eles, aquecimento, luz, alta concentração de oxigênio e altos valores de atividade de água (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A utilização e aplicação do ácido ascórbico pode ser garantida a partir da microencapsulação do mesmo pela técnica de emulsão dupla seguida por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como agentes encapsulantes como será visto a seguir detalhadamente.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL

Como material ativo utilizou-se ácido ascórbico puro (Synth, Diadema, Brasil). Óleo de milho (Cargill, Mairinque, Brasil) foi empregado para a produção da emulsão simples. Gelatina alimentícia (Gelita South América, Mococa, Brasil) e goma arábica (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil) foram utilizadas como agente encapsulante e PGPR 90 (Danisco, Dinamarca), Span 80 (Sigma, St Louis/ EUA) e lecitina de soja (Pantec, São Paulo, Brasil) foram empregados como emulsificantes.

2.2.2 MÉTODOS

Para a produção das microcápsulas foi utilizado o método adotado por Mendanha e colaboradores (2009), com algumas modificações. A emulsão simples (A/O) foi preparada usando solução de ácido ascórbico 30% (m/m), óleo de milho em duas concentrações (v/m) comparadas com a fase aquosa (2:1 e 3:1) e testados 3 emulsificantes lipofílicos: PGPR 90, Span 80 e lecitina de soja na concentração de 0,3% (m/m) em relação a massa total da emulsão. Foi escolhida a emulsão simples mais estável para a obtenção da emulsão dupla (A/O/A).

A emulsão simples foi emulsionada com solução de gelatina para obter a emulsão dupla do tipo A/O/A. As etapas de emulsificação (emulsão simples e dupla) foram realizadas a 12.000 rpm /4 minutos e 10.000 rpm/ 3 minutos com Ultraturrax (Ika, Alemanha), respectivamente. A solução de goma arábica foi adicionada a essas emulsões por agitação magnética.

Para promover a coacervação complexa, o pH foi ajustado para 4,4 com solução de NaOH 4M á 40°C sob constante agitação magnética e, logo em seguida, a temperatura foi gradualmente abaixada até 10°C em banho de gelo. O material coacervado foi estocado durante 24h a 7°C para promover a decantação. Em seguida, os coacervados foram congelados em um freezer (-18°C) e desidratados por sublimação em um liofilizador da marca Terroni (São Carlos/SP, Brasil).

Nove formulações de microcápsulas de ácido ascórbico contendo gelatina, goma arábica e AA foram preparadas na proporção de 1:1:0.5, 1:1:0.75 e 1:1:1 com concentrações de 0,025, 0,05 e 0,075g/mL de polímeros. Os tratamentos

foram chamados de AA1 a AA9, sendo os três primeiros na proporção de 1:1:0.5, e assim sucessivamente (Tabela 3). A escolha destas concentrações foi baseada no trabalho de Silva e colaboradores (2012).

O fluxograma da metodologia utilizada está demonstrado na figura 7.

Figura 7. Metodologia utilizada para a produção das microcápsulas coacervadas.

As condições operacionais utilizadas durante o processo são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3. Tratamentos obtidos durante a produção das microcápsulas.

Tratamento	Concentração de polímero (%)	Concentração de núcleo (%)
AA1	2,5	50
AA2	5	50
AA3	7,5	50
AA4	2,5	75
AA5	5	75
AA6	7,5	75
AA7	2,5	100
AA8	5	100
AA9	7,5	100

Tabela 4. Resumo das condições operacionais utilizadas durante a coacervação complexa.

Primeira etapa de emulsificação	Ultraturrax - 12000 rpm/ 4 minutos
Segunda etapa de emulsificação	Ultraturrax - 10000 rpm/ 3 minutos
Agitação durante o processo de coacervação	Agitação magnética
Temperatura durante a coacervação	40°C $\pm$ 0,1
Temperatura de resfriamento	10°C $\pm$ 0,1
pH de coacervação	4,4 $\pm$ 0,1
Decantação das micropartículas	7°C – 24horas

2.2.2.1 Estabilidade da emulsão simples

Para a escolha da melhor emulsão simples a ser utilizada no sistema, foi analisada a estabilidade da mesma. Para isso, as emulsões foram observadas visualmente por 60 minutos em uma proveta à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata. A escala de graduação da proveta foi utilizada para conversão em porcentagem de estabilidade. Para as emulsões que apresentaram estabilidade durante 60 minutos, a análise continuou por mais 24 horas.

2.2.2.2 Caracterização dos tratamentos

(i) Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada em função da diferença da massa total de ácido determinada nas cápsulas pela determinada na superfície, após lavagem em papel filtro. Ambas as determinações foram feitas utilizando-se o método da A.O.A.C (1984) modificada por BENASSI & ANTUNES (1988).

A eficiência de microencapsulação foi calculada a partir da Equação 1.

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{(\text{Ácido total} - \text{Ácido superficial}) \times 100}{\text{Ácido total}} \quad (1)$$

(ii) Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização das microcápsulas foi realizada tanto por microscopia ótica no equipamento BIO3 - Bel Photonics (Itália), quanto por microscopia eletrônica de varredura (MEV), através do microscópio Tabletop Microscope Hitachi (Tóquio, Japão) TM 3000, com o programa TM 3000.

(iii) Análise do tamanho e distribuição do tamanho de partícula

Para obtenção do tamanho e distribuição do tamanho das partículas foi utilizado o analisador de partículas por difração à laser SALD- 201V, Shimadzu (Kyoto, Japão).

(iv) Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, EUA).

(v) Higroscopicidade

Para a determinação da higroscopicidade, 0,2 g de amostras foram acondicionadas por uma semana em dessecador contendo solução saturada de Na_2SO_4 , que conferia ao meio uma umidade relativa de 81%. A higroscopicidade foi determinada através da massa de água absorvida por 100g de amostra, após 7 dias de estocagem. Foi adotada a metodologia utilizada por Cai e Corke (2000) com algumas modificações.

(vi) Cor instrumental

A cor dos pós foi determinada em um colorímetro modelo Mini Scan XE, da marca HunterLab (Reston, Virginia, EUA). Para essa análise, foi necessário fazer a calibração do colorímetro com duas placas padrões, preta e branca, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata, nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a encapsulação, com os materiais estocados em potes de vidro, protegidos da luz, na presença de O_2 , umidade controlada (33% - utilizando solução saturada de MgCl_2), nas temperaturas de 20 e 37°C.

(vii) Umidade

A determinação da umidade das microcápsulas foi realizada no analisador de umidade modelo MB 35 da marca Ohaus (Ohio, Estados Unidos), em triplicata.

(viii) Solubilidade

A determinação da solubilidade foi feita pelo método gravimétrico, de acordo com Eastman e Moore (1984), citado por Cano-Chauca et al. (2005). O método consistiu na adição de 0,50 g de amostra em um erlenmeyer contendo 50,00 mL de água destilada. Para a homogeneização, utilizou-se uma mesa agitadora orbital da Tecnal (Piracicaba, Brasil) a 100 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada com auxílio de centrífuga da marca Beckman (Brea, Estados Unidos) a 3500 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 25,00 mL do sobrenadante foi transferida para uma cápsula de porcelana com massa conhecida e mantida na estufa a 105°C até a completa evaporação da água.

(ix) Potencial Zeta

Para determinação do Potencial Zeta foi utilizado o equipamento Zeta Potential Analyzes da marca BIC – Brookhaven Instrument Corporation (Nova York, Estados Unidos). As medidas foram realizadas em dispersões com pH ajustado em 4,4 para todos os tratamentos coacervados.

(x) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de ácido ascórbico puro, ingredientes e microcápsulas foram realizadas na região de 4000 a 600 cm^{-1} utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) com o auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1.

(xi) Estabilidade do material encapsulado

Os níveis de ácido ascórbico nas microcápsulas, em comparação ao ácido na forma livre, foram monitorados utilizando a metodologia da A.O.A.C (1984) modificada por BENASSI & ANTUNES (1988). A extração do ácido ascórbico presente nas microcápsulas foi realizada utilizando-se 0,4g de amostra para 10 mL de solução de extração contendo 5% sal NaCl (m/m) e 1% dodecil sulfato de sódio ultrapuro (SDS) (m/m). As análises foram realizadas em triplicata, nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a encapsulação, com os materiais estocados em potes de vidro, protegidos da luz, na presença de O₂, umidade controlada (33% - utilizando solução saturada de MgCl₂) e à temperatura ambiente (20-22°C). Também foram realizadas análises de estabilidade nas mesmas condições, porém à temperatura de 37°C.

(xii) Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistic Analises System), versão 9.2, por análise de variância ANOVA e ensaio de Tukey, ao nível de 5% de significância.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Estabilidade da emulsão simples

Diferentes emulsões simples foram testadas para a escolha de um sistema estável e viável. Foram preparadas seis emulsões com o objetivo de comparar diferentes emulsificantes e relação fase aquosa: fase oleosa (Tabela 5):

Tabela 5. Relação de emulsões simples testadas.

Emulsão	Emulsificante	Relação fase aquosa: fase oleosa
1	Lecitina de soja	1:2
2	Span 80	1:2
3	PGPR 90	1:2
4	Lecitina de soja	1:3
5	Span 80	1:3
6	PGPR 90	1:3

Conforme se verifica na Figura 9, as emulsões com lecitina de soja e Span 80 mostraram separação de fases, enquanto que emulsões com PGPR 90 foram estáveis durante todo o tempo de análise (1 hora) e por isso, foram avaliadas por mais 24 horas. Como a emulsão 3 apresentou-se estável por 24h, além de possuir relação fase aquosa: fase oleosa 1:2, ou seja, menor proporção de óleo e, consequentemente, maior concentração de ácido ascórbico em comparação com a emulsão total, foi a escolhida para a realização dos ensaios subsequentes. Na Figura 8 são observadas as fotos das emulsões 2 e 3 após 60 minutos de análise.

Figura 8. Emulsões 2 e 3, respectivamente, após 60 minutos de análise.

O ensaio de estabilidade para as emulsões simples e duplas foram realizados da mesma maneira, no entanto, todas as emulsões duplas apresentaram estabilidade durante o período de 24 horas.

Figura 9. Ensaio de estabilidade das emulsões simples (azul escuro: emulsão 1; vermelho: emulsão 2; verde: emulsão 3; roxo: emulsão 4; azul claro: emulsão 5; laranja: emulsão 6).

2.3.2 Caracterização dos tratamentos

(i) Produção das microcápsulas de ácido ascórbico

Foram obtidos nove tratamentos durante a elaboração das microcápsulas por coacervação complexa. As concentrações correspondentes a cada tratamento estão especificadas na Tabela 3.

A fim de se determinar o pH ideal para que ocorresse a coacervação, foram feitos ensaios preliminares onde se obteve o pH final de 4,4 como o escolhido. Nestas condições, foi observada maior formação de precipitado com sobrenadante límpido, condições apropriadas para se promover uma melhor coacervação.

Os tratamentos após liofilização e o ácido ascórbico puro em pó podem ser observados na Figura 10. Analisando-se a Figura 10, verifica-se que o ácido ascórbico apresentou coloração branca mais intensa que as demais formulações, como esperado, visto que este pó era composto exclusivamente de ácido ascórbico. Observa-se também que com o aumento da concentração do agente encapsulante (gelatina e goma arábica) houve uma ligeira alteração da cor, tendendo-se para o amarelo. Por esta razão, pode-se dizer que as variações nas cores das formulações devem-se a concentração do núcleo (ácido ascórbico), a interferência dos agentes encapsulantes e as interações encapsulado/encapsulante.

Figura 10. Amostras obtidas após liofilização e ácido ascórbico puro em pó.

- Tratamentos AA1, AA2 e AA3: proporção de 1:1:0.5 e 0.025, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA4, AA5 e AA6: proporção de 1:1:0.75 e 0.025, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA7, AA8 e AA9: proporção de 1:1:1 e 0.025, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente.

(ii) Eficiência de Encapsulação

Os valores de eficiência de encapsulação para cada tratamento estão apresentados na Tabela 6. Verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, o que indica que diferentes concentrações de núcleo e/ou polímero interferiram na quantidade de massa do material ativo a ser encapsulado, mesmo sendo essa diferença muito pequena.

Tabela 6. Eficiência de encapsulação para cada tratamento.

Tratamentos	Eficiência (%)
AA1	97,33±0,81 ^c
AA2	98,00±0,61 ^{b,c}
AA3	98,44±0,37 ^{a,b,c}
AA4	97,41±1,06 ^c
AA5	98,48±0,51 ^{a,b,c}
AA6	99,57±0,32 ^a
AA7	98,99±0,53 ^{a,b}
AA8	99,57±0,19 ^a
AA9	98,20±1,00 ^{b,c}

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (p<0,05).

Os valores de eficiência de encapsulação obtidos são considerados altos o que indica que a metodologia escolhida foi adequada para o objetivo proposto.

Em comparação com outros resultados encontrados na literatura, os resultados obtidos neste trabalho são considerados altos. Mendanha e colaboradores (2009) encontraram valores de eficiência entre 78 e 91% para microcápsulas de hidrolisado de caseína obtidas por emulsão dupla seguida de coacervação complexa, utilizando isolado protéico de soja e pectina como encapsulantes. Por sua vez, Alvim e Grosso (2010), obtiveram valores de eficiência maiores que 96% quando preparadas microcápsulas de oleoresina de páprica por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como agentes encapsulantes e secas por liofilização ou por spray drying. No caso de Alvim e Grosso (2010), a eficiência foi calculada através da razão entre a massa

de núcleo encapsulada e a massa total de núcleo. Para a determinação da massa de núcleo encapsulada, foi calculada a diferença entre a massa inicial pesada e a massa perdida durante o processo. Ocak (2012) obteve eficiência de encapsulação na faixa de $73,73 \pm 1,10$ a $44,13 \pm 1,39\%$ quando produzidas microcápsulas de óleo de lavanda por coacervação complexa, utilizando-se de colágeno hidrolisado e quitosana como materiais de parede. Já Saravanan e colaboradores (2010) obtiveram uma grande faixa de eficiência de encapsulação (entre 2,92 e 96,3%) devido a diferentes agentes encapsulantes e encapsulados utilizados na produção de microcápsulas de cloridrato de metronidazol, diclofenac de sódio e indometacina através da técnica de coacervação complexa utilizando as combinações pectina/alginato e alginato/gelatina como materiais de parede. Luteína foi microencapsulada pela técnica de coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como material de parede, obtendo-se eficiência de encapsulação de $85,32 \pm 0,63\%$ (JIANG et al., 2011).

Em relação aos trabalhos relacionados à encapsulação de ácido ascórbico, Lee e colaboradores (2004) obtiveram valores de eficiência de encapsulação entre 80,7 e 94,2% quando microencapsularam o ácido ascórbico por *spray drying* utilizando monoestearato de poli acilglicerol. Trindade e Grosso (2000) obtiveram valores de até 100% de eficiência quando o encapsularam por *spray drying* usando goma arábica e amido de arroz como materiais de parede.

(iii) Caracterização morfológica por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura

Por microscopia ótica foi possível confirmar a formação da emulsão e da coacervação e verificar que todos os tratamentos, para a emulsão dupla e para os coacervados, apresentaram características morfológicas semelhantes (Figura 11). As gotículas obtidas nas emulsões duplas mostraram formato arredondado, enquanto que as microcápsulas coacervadas apresentaram-se multinucleadas e com paredes definidas. O mesmo procedimento foi realizado para as microcápsulas sem a presença do ácido ascórbico – chamadas de controle – para verificação de possíveis influências na morfologia devido à presença e/ou ausência do AA. Na Figura 11 (a) e (b), observa-se a microscopia ótica para cada tratamento e para cada controle, respectivamente. Microcápsulas com e sem ácido ascórbico não apresentaram diferença, podendo-se afirmar que a presença de ácido ascórbico não interferiu na estrutura das microcápsulas.

Alvim e Grosso (2010) produziram microcápsulas de oleoresina de páprica por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como agentes encapsulantes e secas por liofilização ou por spray drying, as quais também apresentaram formato esférico e multinucleado. Ocak (2012) também obteve microcápsulas com formato arredondado quando encapsulado óleo de lavanda por coacervação complexa, utilizando-se de colágeno hidrolisado e quitosana como materiais de parede.

Figura 11. a) Microscopia ótica da emulsão dupla (a) e do coacervado (b) para cada tratamento com aumento de 100 vezes.

Figura 11. b) Microscopia ótica da emulsão dupla (a) e do coacervado (b) do controle de cada tratamento com aumento de 100 vezes.

- Tratamentos AA1, AA2 e AA3: proporção de 1:1:0.5 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA4, AA5 e AA6: proporção de 1:1:0.75 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA7, AA8 e AA9: proporção de 1:1:1 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente.

Por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 12 a 16), observam-se “redes” de cápsulas, formadas por pontes sólidas nas superfícies, característica típica de microcápsulas que passaram pelo processo de liofilização. O mesmo foi obtido também por Alvim e Grosso (2010) e por Saravanan e colaboradores (2010). Não foi possível verificar diferença morfológica entre os tratamentos pela técnica empregada.

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos tratamentos AA1 e AA2, respectivamente.

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos tratamentos AA3 e AA4, respectivamente.

Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos tratamentos AA5 e AA6, respectivamente.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado dos tratamentos AA7 e AA8, respectivamente.

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura do coacervado do tratamento AA9.

(iv) Análise do tamanho e distribuição de partículas

Como meio de dispersão para a medida do tamanho de partícula, foi utilizada vaselina para a emulsão simples e água destilada para a emulsão dupla e para os coacervados. O diâmetro médio de tamanho de partícula para a emulsão simples foi de $11,76 \pm 2,38 \mu\text{m}$. O diâmetro médio das partículas referentes às emulsões duplas e os coacervados pode ser observado na Tabela 7. Nota-se que, como esperado, o tamanho médio das gotículas produzidas por emulsão dupla foi menor do que o tamanho médio das microcápsulas coacervadas não desidratadas, uma vez que a emulsão dupla corresponde à segunda etapa do processo e a coacervação à etapa final.

Na Tabela 7 verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que diferentes relações agente encapsulado: agente encapsulante interferem no diâmetro médio das partículas correspondentes às emulsões duplas e aos coacervados.

Segundo Fávaro-Trindade e colaboradores (2008), o diâmetro médio das partículas produzidas por coacervação varia entre 1 e $500 \mu\text{m}$, o que está de acordo com os tamanhos obtidos neste trabalho. Muitos são os fatores que interferem no tamanho e distribuição de tamanho de partícula, entre eles método de encapsulação, diferentes materiais de parede, condições de processo, entre outros. Mendanha e colaboradores (2009) obtiveram valores entre 16 e $24 \mu\text{m}$ (valores bem menores do que os obtidos neste trabalho) para microcápsulas de hidrolisado de caseína produzidas por coacervação complexa, utilizando pectina e isolado proteico de soja como materiais de parede. Tal diferença pode ser

atribuída à massa molecular do material de parede utilizado e a velocidade de agitação empregada, que foram muito distintos do presente trabalho.

Tabela 7. Diâmetros médios das partículas correspondentes às emulsões duplas e aos coacervados.

Tratamentos	Gotículas produzidas por emulsão dupla (µm)	Microcápsulas coacervadas não desidratadas (µm)
AA1	63,11± 4,43 ^a	81,91± 4,99 ^a
AA2	42,25± 4,42 ^b	70,93± 1,07 ^{a,b}
AA3	31,59± 5,61 ^{b,c}	71,21± 0,34 ^{a,b}
AA4	38,82± 4,06 ^{b,c}	79,81± 0,97 ^{a,b}
AA5	37,90± 3,11 ^{b,c}	83,82± 4,14 ^a
AA6	27,42± 1,70 ^c	65,98± 6,46 ^b
AA7	61,86± 3,44 ^a	79,20± 0,68 ^{a,b}
AA8	38,81± 0,16 ^{b,c}	71,10± 4,68 ^{a,b}
AA9	26,59± 2,55 ^c	51,67± 2,77 ^c

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (p<0,05).

- Tratamentos AA1, AA2 e AA3: proporção de 1:1:0.5 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA4, AA5 e AA6: proporção de 1:1:0.75 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA7, AA8 e AA9: proporção de 1:1:1 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente.

Os diâmetros médios variaram de 43,7 a 96,4µm para as amostras obtidas por Alvim & Grosso (2010), que produziram microcápsulas de oleoresina de páprica por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como material de parede e glutaraldeído e transglutaminase, como agentes reticuladores.

Microcápsulas de cloridrato de metronidazol, diclofenaco de sódio e indometacina obtidas através da técnica de coacervação complexa utilizando as combinações pectina/alginato e alginato/gelatina como materiais de parede,

produzidas por Saravanan e colaboradores (2010), mostraram uma grande faixa de variação de tamanho de partícula, sendo essa faixa entre 41,34 e 120,94 μm .

Para a aplicação em alimentos, afirma-se que o ideal é a utilização de partículas com tamanhos médios inferiores a 100 μm . Aferem-se a isso implicações em alterações sensoriais indesejáveis nos alimentos quando há a incorporação de partículas com tamanhos médios superiores ao citado (BERTOLINI, 1999; CHANG et al., 1988; THIES, 1995) . Os tamanhos médios das partículas obtidas neste trabalho para cada tratamento foram menores do que 100 μm , o que indica adequação da aplicação das mesmas em alimentos.

Nas Figuras de 17 a 22 podem ser observadas diferentes comparações entre as distribuições de tamanho de gotículas e partículas na faixa de 14 a 120 μm . Quantidades não significativas de partículas fora dessa faixa não foram apresentadas no gráfico. Foi analisado se houve diferença na distribuição entre os tratamentos com a mesma concentração de núcleo e diferentes concentrações de polímeros e vice-versa.

Observa-se que a concentração de núcleo não interfere na distribuição de tamanho de partícula quando são comparados os tratamentos AA1, AA4 e AA7 (Figura 19), AA2, AA5 e AA8 (Figura 20) e AA3, AA6 e AA9 (Figura 21).

Figura 17. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para a emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados (colunas hachuradas) dos tratamentos AA1, AA2 e AA3 - amarelo: AA1; azul: AA2 e verde: AA3.

- Tratamentos AA1, AA2 e AA3: proporção de 1:1:0.5 e 0.025, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;

Figura 18. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA4, AA5 e AA6 (colunas hachuradas) – amarelo: AA4; azul: AA5 e verde: AA6.

- Tratamentos AA4, AA5 e AA6: proporção de 1:1:0.75 e 0.025, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;

Figura 19. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas obtidas para emulsão dupla (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA7, AA8 e AA9 (colunas hachuradas) – amarelo: AA7; azul: AA8 e verde: AA9.

- Tratamentos AA7, AA8 e AA9: proporção de 1:1:1 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente.

Figura 20. Comparação das distribuições de tamanho das gotículas obtidas para emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA1, AA4 e AA7 (colunas hachuradas) – amarelo: AA1; azul: AA4 e verde: AA7.

Figura 21. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas das emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA2, AA5 e AA8 (colunas hachuradas) – amarelo: AA2; azul: AA5 e verde: AA8.

Figura 22. Comparação das distribuições de tamanho de gotículas das emulsões duplas (colunas cheias) e das partículas dos coacervados dos tratamentos AA3, AA6 e AA9 (colunas hachuradas) – amarelo: AA3; azul: AA6 e verde: AA9.

Quando analisados os comportamentos da distribuição do tamanho de partícula tanto para a emulsão dupla quanto para o coacervado, observa-se que as emulsões duplas apresentaram comportamento bimodal enquanto que as partículas coacervadas, comportamento unimodal e extremamente polidisperso para todos os tratamentos.

(v) Atividade de água, higroscopicidade, umidade, solubilidade e potencial zeta

Os valores obtidos para higroscopicidade, solubilidade, umidade, atividade de água e potencial zeta para todos os tratamentos podem ser observados na Tabela 8.

Observou-se que o ácido ascórbico livre apresentou valores de higroscopicidade e umidade significativamente menor que todos os tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato de que a gelatina e a goma arábica, compostos utilizados para se promover o processo de encapsulação, apresentaram valores maiores de higroscopicidade e umidade que do ácido ascórbico puro, ocasionando valores maiores para os tratamentos, possivelmente em decorrência da exposição de grupamentos polares dos encapsulantes, principalmente da gelatina, que foram capazes de absorver água do ambiente.

Tabela 8. Valores de higroscopicidade, solubilidade, umidade, atividade de água e potencial zeta (pH = 4,4) para cada tratamento.

Tratamentos	Higroscopicidade (g/100g)	Solubilidade (%)	Umidade (%)	Atividade de água	Potencial zeta (mV)
AA1	4,92± 0,21 ^a	13,26± 1,59 ^{b,c}	8,28± 1,42 ^{a,b,c}	0,384± 0,05 ^c	-0,134± 0,14 ^a
AA2	4,00± 0,35 ^a	13,81± 0,53 ^b	9,27± 0,26 ^a	0,509± 0,002 ^a	-0,33± 0,30 ^a
AA3	4,37± 0,26 ^a	16,50± 0,95 ^a	8,76± 0,39 ^{a,b}	0,413± 0,02 ^{b,c}	-0,03± 0,08 ^a
AA4	3,95± 0,27 ^a	11,10± 0,07 ^d	7,51± 1,03 ^{b,c}	0,402± 0,12 ^{b,c}	-3,58± 3,16 ^b
AA5	3,96± 0,64 ^a	10,26± 0,15 ^e	7,11± 0,90 ^{b,c}	0,382± 0,03 ^c	-29,00± 2,31 ^c
AA6	3,83± 0,27 ^a	14,30± 0,38 ^b	8,1± 0,14 ^{b,c}	0,485± 0,004 ^{a,b}	-5,47± 1,23 ^a
AA7	4,12± 0,15 ^a	8,14± 0,51 ^f	6,74± 0,35 ^c	0,371± 0,01 ^c	-0,86± 1,35 ^a
AA8	4,30± 0,32 ^a	11,60± 0,29 ^c	6,69± 0,38 ^c	0,378± 0,01 ^a	-0,27± 0,29 ^a
AA9	4,32± 0,83 ^a	14,16± 0,49 ^b	7,49± 0,38 ^{b,c}	0,484± 0,01 ^{a,b}	-1,37± 2,09 ^{a,b}
Gelatina	27,16± 0,06	31,91± 1,71	11,99± 0,40	0,61± 0,02	13,7± 0,97
Goma Arábica	38,13± 1,73	95,70± 0,62	9,17± 0,32	0,41± 0,01	-21,33± 0,82
Ácido Ascórbico	0,04± 0,02	30,00± 0,00	0,38± 0,02	0,692± 0,01	-----

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (p<0,05).

- Tratamentos AA1, AA2 e AA3: proporção de 1:1:0.5 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA4, AA5 e AA6: proporção de 1:1:0.75 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente;
- Tratamentos AA7, AA8 e AA9: proporção de 1:1:1 e 0.0.25, 0.05 e 0.075g/mL de polímero, respectivamente.

Mesmo apresentando valores de higroscopicidade e umidade maiores que do ácido ascórbico puro, os valores obtidos para as microcápsulas podem ser considerados muito baixos, o que facilita a embalagem, manipulação e aplicação do material. Os valores de higroscopicidade obtidos neste trabalho são menores do que os obtidos por Mendanha e colaboradores (2009) de 20 a 26 g_{H2O}/g amostra quando elaboradas microcápsulas de hidrolisado de caseína por

coacervação complexa, utilizando isolado proteico de soja e pectina como encapsulantes. Nori e colaboradores (2011) encapsularam própolis por coacervação complexa utilizando-se proteína isolada de soja e pectina como encapsulantes e obtiveram valores de higroscopicidade de $33,46 \pm 0,66$ e $34,10 \pm 1,20$ g de água absorvida/ 100g de amostra, valores maiores do que os obtidos neste trabalho. Já os valores de umidade obtidos neste trabalho foram maiores que os obtidos por Mendanha e colaboradores (2009) que estiveram dentro da faixa de 1,96 a 4,50%.

Em relação à solubilidade, houve uma redução significativa nos valores dos tratamentos em relação ao ácido ascórbico puro. Esse resultado é o esperado para microcápsulas obtidas por este método. A baixa solubilidade dos tratamentos é importante para a obtenção de microcápsulas estáveis em meio aquoso, com propriedades favoráveis de liberação controlada. Todavia, Mendanha e colaboradores (2009) obtiveram valores de solubilidade de 3,71 a 7,68%, valores ainda menores do que os obtidos para as microcápsulas de ácido ascórbico.

Na comparação dos valores de atividade de água, observa-se que a microencapsulação acarretou em tratamentos com valores de A_w inferiores a 0,6, portanto, todos estáveis microbiologicamente, pois se considera que em valores de A_w abaixo deste patamar não há possibilidade de multiplicação microbiana (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Em relação aos valores obtidos nas análises de potencial zeta realizado com amostras em pH 4,4, vários tratamentos apresentaram valores zero ou próximo de zero para este parâmetro, o que significa que ocorreu a coacervação. Tratamentos que apresentaram valores negativos indicam que restaram grupos

com carga negativa que não se envolveram em ligações eletrostáticas durante o processo de coacervação. No entanto, o tratamento AA5 apresentou valor negativo muito alto, resultado para o qual não foi encontrada uma explicação plausível, pois este tratamento também apresentou excelente eficiência de encapsulação.

(vi) Cor instrumental

Na análise de cor instrumental foram observados os parâmetros L (Claridade), a^* , que varia do verde (-) ao vermelho (+), e o parâmetro b^* , que varia do azul (-) ao amarelo (+), em função do tempo (0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias) e temperatura de armazenamento (20 e 37°C). Essa análise foi importante para se estabelecer indiretamente a estabilidade do ácido ascórbico encapsulado, pois foi verificado que as amostras armazenadas em ambas as temperaturas apresentavam alteração de cor. Tal alteração pode ser atribuída à degradação do AA, que incorre na produção de pigmentos. Todos os valores obtidos apresentaram diferença significativa.

O parâmetro a^* , que varia do verde (-) ao vermelho (+), indicou que as amostras armazenadas a 37°C sofreram maior alteração de cor do que as armazenadas a 20°C, o que era esperado, já que quanto maior a temperatura, maior a velocidade das reações químicas. Dessa maneira, a temperatura se torna o fator discriminatório para o parâmetro a^* (Figuras 23 a 25)

Para o parâmetro b^* , que varia do azul (-) ao amarelo (+), observa-se nas Figuras 26, 27 e 28, grande alteração dos valores em função da temperatura e do tempo para todas as amostras. Todos os tratamentos apresentaram

comportamento similar, permitindo inferir que as variações na concentração de núcleo e polímero não influenciaram na proteção ao núcleo.

Todas as formulações armazenadas a 37°C foram significativamente mais amarelas do que as armazenadas a 20°C, o que comprova o efeito deletério da temperatura alta sob a estabilidade do núcleo.

A análise estatística realizada para os parâmetros a^* e b^* pode ser observada em Tabela acoplada aos gráficos nas Figuras de 23 a 28.

Figura 23. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 24. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA4, AA5 e AA6 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 25. Comparação dos valores de a^* para os tratamentos AA7, AA8 e AA9 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 26. Comparação dos valores de b^* para os tratamentos AA1, AA2 e AA3 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 27. Comparação dos valores de b^* para os tratamentos AA4, AA5 e AA6 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 28. Comparação dos valores de b^* para os tratamentos AA7, AA8 e AA9 nas temperaturas de 20 e 37°C.

* Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores para L^* (claridade) foram apresentados na Tabela 9. Com relação a este parâmetro, houve pequeno efeito significativo observado em função do tempo e dos tratamentos. Sendo considerada pequena diferença, pode-se afirmar que as temperaturas e diferentes concentrações de núcleo e de agente encapsulante não influenciaram na claridade das amostras.

Os resultados de análise de cor foram relevantes para relacionar a oxidação do ácido ascórbico e sua estabilidade. O escurecimento foi maior para os tratamentos armazenados à temperatura de 37°C. Para esta análise, a composição da microcápsula não interferiu na mudança de cor para os parâmetros a^* e b^* . Portanto, pode-se afirmar que quanto menor a temperatura de armazenamento, menor a taxa de produção de pigmento, que pode ser oriundo

da oxidação do ácido ascórbico, da reação de Maillard, ou de ambas, já que existe profunda correlação entre essas reações.

Todos os tratamentos possuem proteína em sua formulação. Proteínas são polímeros cujas unidades constituintes fundamentais são os aminoácidos. Os aminoácidos, por sua vez, são moléculas orgânicas que possuem ligadas, ao mesmo átomo de carbono, um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral, portanto, as amostras analisadas poderiam ter sofrido Maillard. Todavia, as melanoidinas estão entre os pigmentos que podem ser formados na degradação do ácido ascórbico. Esses compostos possuem nitrogênio em sua molécula, portanto, para sua formação é preciso haver nitrogênio nos reagentes. Esse pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento do parâmetro b^* para todos os tratamentos.

Tabela 9. Valores de L durante o período de 90 dias nas temperaturas de 20 e 37°C.

	Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
20°C	AA1	55,72±1,77 ^{A,a}	55,18±0,03 ^{A,a}	45,91±0,48 ^{B,b}	46,81±0,09 ^{B,c}	46,43±0,57 ^{B,b}	53,16±1,84 ^{A,b}
	AA2	54,46±0,86 ^{B,a}	57,28±0,85 ^{AB,a}	48,37±0,25 ^{C,ab}	60,24±1,30 ^{A,a}	58,36±0,41 ^{A,a}	59,53±2,18 ^{A,a}
	AA3	53,73±3,55 ^{BC,a}	54,27±2,15 ^{BC,a}	51,47±1,09 ^{C,a}	53,05±2,13 ^{BC,b}	55,92±3,47 ^{AB,a}	57,70±0,37 ^{A,a}
	AA4	55,92±0,32 ^{A,a}	46,39±0,45 ^{B,b}	53,38±1,32 ^{A,b}	54,34±1,52 ^{A,a}	55,69±0,02 ^{A,a}	53,91±1,84 ^{A,a}
	AA5	49,39±5,25 ^{D,b}	53,46±2,52 ^{BC,a}	57,73±1,51 ^{A,a}	55,60±2,22 ^{AB,a}	53,98±4,97 ^{BC,ab}	52,23±2,67 ^{CD,a}
	AA6	50,86±0,69 ^{BC,b}	54,61±0,21 ^{A,a}	54,51±0,03 ^{A,b}	47,75±2,07 ^{C,b}	51,77±1,44 ^{AB,b}	43,09±1,69 ^{D,b}
	AA7	53,31±0,23 ^{B,a}	59,82±0,03 ^{A,a}	58,96±0,55 ^{A,a}	52,41±1,08 ^{B,b}	56,95±0,26 ^{A,a}	53,12±3,34 ^{B,a}
	AA8	55,35±0,89 ^{A,a}	55,99±1,23 ^{A,b}	50,20±1,39 ^{B,b}	56,27±0,3 ^{A,a}	54,03±3,14 ^{A,ab}	55,29±3,14 ^{A,a}
	AA9	53,01±0,19 ^{A,a}	49,09±3,65 ^{B,c}	53,26±3,89 ^{A,b}	55,33±0,76 ^{A,ab}	53,56±0,94 ^{A,b}	55,27±0,08 ^{A,a}
37°C	AA1	55,01±0,19 ^{A,a}	54,91±1,10 ^{A,a}	53,90±1,13 ^{A,a}	49,20±1,68 ^{B,b}	49,53±0,59 ^{B,b}	55,83±3,68 ^{A,ab}
	AA2	53,67±1,74 ^{A,a}	50,19±0,27 ^{B,b}	50,08±1,85 ^{B,b}	51,44±2,52 ^{AB,b}	53,52±1,17 ^{A,a}	53,4±2,23 ^{A,b}
	AA3	45,76±0,56 ^{D,b}	50,06±2,53 ^{C,b}	46,89±0,44 ^{D,c}	57,47±2,04 ^{A,a}	53,43±2,17 ^{B,a}	56,72±0,77 ^{A,ab}
	AA4	52,84±3,71 ^{B,a}	41,51±0,03 ^{C,b}	59,14±0,11 ^{A,a}	54,18±2,29 ^{B,a}	54,62±1,38 ^{B,a}	57,73±1,83 ^{A,ab}
	AA5	37,94±0,66 ^{C,b}	53,29±1,44 ^{A,a}	51,65±1,39 ^{A,c}	50,57±1,81 ^{AB,b}	48,51±1,87 ^{B,b}	52,43±0,23 ^{A,b}
	AA6	50,86±0,69 ^{B,a}	55,47±1,53 ^{A,a}	55,99±0,03 ^{A,b}	51,90±2,82 ^{B,ab}	52,52±0,30 ^{B,a}	50,9±1,71 ^{B,b}
	AA7	53,31±0,23 ^{B,a}	56,12±2,77 ^{A,a}	56,28±0,71 ^{A,a}	52,87±0,16 ^{B,a}	48,40±1,18 ^{C,b}	54,99±0,86 ^{AB,a}
	AA8	55,35±0,89 ^{A,a}	53,05±0,71 ^{A,b}	55,06±0,57 ^{A,a}	54,62±0,24 ^{A,a}	55,12±0,99 ^{A,a}	49,22±0,48 ^{B,b}
	AA9	53,01±0,19 ^{B,a}	56,36±4,03 ^{A,a}	47,59±0,25 ^{D,b}	47,21±3,43 ^{D,b}	48,25±0,24 ^{CD, b}	50,63±2,78 ^{BC, b}

Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo, não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

(vii) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Como pode ser observado nos espectros a seguir (Figura 29), as moléculas de gelatina, goma arábica, PGPR 90, óleo de milho e ácido ascórbico possuem interações complexas, ocasionando uma larga faixa nas absorções vibracionais dos grupamentos químicos correspondentes. Segundo Silverstein et al. (2007), a ausência de absorção nas regiões características dos grupos funcionais ou interações com outros grupos fortes o suficiente para anular a absorção do grupo isolado, pode ser usada como evidência da inexistência desses grupos na estrutura molecular. Por esta razão, algumas características estruturais podem apresentar uma banda larga e dificultar seu reconhecimento. Analisando-se os espectros, pode-se afirmar que todos os tratamentos apresentaram estruturas semelhantes, diferenciando-se apenas na intensidade dos picos, o que está relacionado com menor ou maior quantidade do composto utilizado (Figura 30).

Os picos que aparecem por volta de 3300 cm^{-1} na gelatina e na goma arábica são característicos dos grupamentos amino, que aparecem em resíduos de aminoácidos básicos, como arginina, lisina e histidina, e, dependendo do pH, podem estar carregados positivamente. Os picos que aparecem em pequena intensidade na gelatina e na goma arábica, por volta de 2900 cm^{-1} , são característicos de grupamentos carboxílicos, os quais podem apresentar carga negativa e aparecem na gelatina e na parte proteica da goma arábica, em seus resíduos dos aminoácidos ácidos, como o ácido glutâmico e aspártico, e em toda a fração da goma arábica que corresponde a um polissacarídeo ácido. Ao se promover a coacervação espera-se a reação dos

grupos amino com os carboxílicos, ou seja, das cargas positivas com as negativas destes grupamentos, formando amidas. Na maioria dos espectros dos tratamentos, há um pico por volta 1465 cm^{-1} que pode indicar a presença de amida, confirmando a formação do complexo. Além disso, não há pico característico de grupamentos amino (por volta de 3300 cm^{-1}) nos tratamentos, o que sinaliza que os grupos amino que estavam disponíveis nos encapsulantes envolveram-se em uma ligação.

No trabalho de Ocak (2012), microcápsulas de óleo de lavanda obtidas por coacervação complexa, utilizando-se de colágeno hidrolisado e quitosana como materiais de parede foram analisadas através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os resultados obtidos mostraram que não houve interação significativa entre o óleo de lavanda e o complexo colágeno/quitosana e entre os polímeros durante o processo de coacervação complexa. Coacervados de lisozima e heparina foram produzidos por Weert e colaboradores (2004) a fim de caracterizá-los e determinar o efeito de complexação na estrutura da proteína. O efeito de complexação sobre a estrutura da proteína foi determinado usando análise de Ftir obtendo-se sucesso em seus resultados. Saravanan e colaboradores (2010) microencapsularam cloridrato de metronidazol, diclofenaco de sódio e indometacina através da técnica de coacervação complexa utilizando as combinações pectina/alginato e alginato/gelatina como materiais de parede. Resultados de Ftir mostraram que as características dos picos obtidos são correspondentes às ligações dos compostos utilizados, revelando natureza intacta das drogas encapsuladas.

Figura 29. Espectros dos ingredientes gelatina, goma arábica, óleo de milho, PGPR 90 e ácido ascórbico.

Figura 30. Espectros referentes ao FTIR de cada tratamento.

(i) Estabilidade do material encapsulado

A Tabela 10 apresenta as concentrações de ácido ascórbico durante estocagem por 90 dias nas temperaturas de 20 e 37°C para cada tratamento e a Figura 31 para solução pura de ácido ascórbico. No tempo zero a amostra controle, como era pura, apresentou alta concentração de ácido ascórbico. Todavia, durante o restante do período de estocagem, houve intensa degradação do ácido ascórbico, sendo possível a sua quantificação somente durante o intervalo de 30 dias.

Essa instabilidade pode ser explicada devido à suscetibilidade do ácido ascórbico à oxidação, em especial quando em contato com o calor e a luz,

além dos fatores como pH, concentração de oxigênio e atividade da água que influenciam muito na velocidade de reação. Como a hidrólise de DHAA ocorre com muita facilidade, a oxidação de DHAA representa com frequência uma etapa fundamental de limitação de degradação oxidativa da vitamina C (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Outro fator relacionado à estabilidade são as alterações na cor, as quais são mais visíveis com o decorrer do tempo, no qual ocorrem alterações no ácido ascórbico devido a reações formando melanoidinas (polímeros nitrogenados) ou pigmentos não nitrogenados como o caramelo.

Houve diferença significativa durante o decorrer do tempo, no entanto, amostras armazenadas a 37°C sofreram, visivelmente, maior taxa de degradação do que amostras armazenadas a 20°C. Mesmo havendo diferença entre os tratamentos na temperatura de 20°C, observa-se que a concentração de polímero e de núcleo não influenciou na taxa de degradação do ácido ascórbico. Em ambas as temperaturas, especialmente com 60 dias de armazenamento, o tratamento AA4 apresentou a melhor estabilidade.

Mesmo havendo uma taxa de degradação significativa, a encapsulação do ácido ascórbico foi eficiente para protegê-lo, uma vez que o mesmo puro em solução apresentou quase que 100% de degradação em 15 dias nas temperaturas de 20 e 37°C. Encapsulado, o material pode ser estocado por este período a temperatura ambiente, o que implica em baixo custo de estocagem, sem prejuízo de sua qualidade.

Finotelli e colaboradores (2005) produziram microcápsulas de ácido ascórbico através da técnica de *spray drying* utilizando maltodextrina como material de parede. A estabilidade do AA foi estudada em temperatura ambiente e a 45°C, apresentando 100% de retenção no dia zero. As microcápsulas com 20% de ácido ascórbico apresentaram 7% de redução do AA até o período de 60 dias armazenados à temperatura de 28°C.

Rozman e colaboradores (2007) encapsularam o ácido ascórbico através de microemulsões A/O. A estabilidade do AA foi analisada dentro de um período de 30 dias, obtendo retenção de 60% para amostras armazenadas à temperatura ambiente.

Figura 31. Estabilidade do ácido ascórbico puro em solução (coluna azul: AA a 20°C; coluna vermelha: AA a 37°C).

Tabela 10. Estabilidade do AA nas microcápsulas armazenadas por 90 dias, nas temperaturas de 20 e 37°C, expressa em %.

Temperatura em °C	Tratamentos	1 dia		7 dias		15 dias		30 dias		60 dias		90 dias	
20	AA1	97,33±0,81	A;a	88,91±2,40	B;a	75,48±2,51	C;b	70,01±5,44	C;a	52,07±0,79	D;b	36,39±1,73	E;a
	AA2	98±0,61	A;a	94,28±2,92	A;a	83,04±2,56	B;a	67,41±8,29	C;ab	62,18±5,38	C;a	36,88±2,21	D;a
	AA3	98,44±0,37	A;a	78,44±5,18	B;b	67,54±2,71	C;c	61,96±2,69	C;b	36,25±1,70	D;c	21,3±0,42	E;b
	AA4	97,41±1,05	A;a	94,41±3,61	A;a	84,15±2,14	B;a	74,63±5,13	C;a	73,6±2,14	C;a	37,92±3,48	D;a
	AA5	98,48±0,51	A;a	89,95±3,85	B;a	86,18±6,17	B;a	57,41±5,14	C;b	40,57±2,39	D;b	34,16±2,80	E;a
	AA6	99,57±0,32	A;a	90,33±5,85	B;a	61,67±14,30	C;b	59,48±0,98	C;b	40,22±5,72	D;b	34,31±3,38	E;a
	AA7	98,99±0,53	A;a	83,99±2,16	B;b	78,51±3,86	B;a	80,01±5,30	B;a	57,78±2,75	C;a	40,64±1,35	D;a
	AA8	99,56±0,18	A;a	84,52±2,36	B;b	75,91±4,83	C;a	70,88±2,27	C;b	36,19±1,51	D;b	33,26±0,97	D;b
	AA9	98,2±1,00	A;a	94,35±1,92	A;a	80,17±6,83	B;a	68,99±5,44	C;b	36,54±1,26	D;b	34,69±0,74	D;b
37	AA1	97,33±0,81	A;a	70,77±5,29	B;b	61,14±8,38	C;a	32,58±1,81	D;b	20,62±2,61	E;b	14,41±1,36	F;a
	AA2	98±0,61	A;a	78,13±5,42	B;a	56,56±3,31	C;ab	41,28±2,40	D;a	28,32±0,33	E;a	14,99±0,99	F;a
	AA3	98,44±0,37	A;a	66,14±2,38	B;b	52,27±2,14	C;b	38,67±1,35	D;a	18,6±1,31	E;b	11,22±1,03	F;a
	AA4	97,41±1,05	A;a	81,23±2,31	B;a	65,18±3,38	C;a	44,81±1,75	D;a	39,79±4,17	D;a	14,62±1,32	E;a
	AA5	98,48±0,51	A;a	78,01±4,58	B;a	61,57±5,82	C;a	37,14±1,89	D;a	19,58±2,33	E;b	12,94±1,73	F;a
	AA6	99,57±0,32	A;a	77,77±8,61	B;a	62,91±4,18	C;a	44,11±1,86	D;a	19,99±1,84	E;b	11,99±1,41	F;a
	AA7	98,99±0,53	A;a	64,63±3,42	B;c	61,57±5,20	B;a	44,21±3,01	C;a	24,1±0,60	D;a	19,58±1,98	D;a
	AA8	99,56±0,18	A;a	70,27±4,40	B;b	54,82±5,76	C;b	34,87±2,73	D;b	15,02±1,32	E;b	11,89±1,62	E;b
	AA9	98,2±1,00	A;a	81,19±9,50	B;a	53,42±1,55	C;b	32,37±3,55	D;b	15,74±1,50	E;b	12,53±1,07	E;b

Letras maiúsculas na mesma linha e letras minúsculas na mesma coluna, dentro de cada sub-grupo (mesma concentração de núcleo), não diferem entre si estatisticamente pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

2.4 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos, pode-se afirmar que a encapsulação de ácido ascórbico por emulsão dupla seguida por coacervação complexa e liofilização foi viável para a obtenção das microcápsulas. Foi possível a obtenção de emulsões simples e secundárias estáveis.

As microcápsulas coacervadas apresentaram caracterização condizente com dados encontrados na literatura, além de alta eficiência de encapsulação, valores baixos para os parâmetros higroscopicidade, umidade, A_w e solubilidade. Todos os tratamentos, em ambas as condições de armazenamento, apresentaram estabilidade maior do que a solução de ácido ascórbico livre. O tratamento AA4, com condicionamento à temperatura ambiente (20°C - 22°C), conferiu maior estabilidade ao material encapsulado entre todos os tratamentos, sendo essa formulação escolhida para a aplicação em salsicha, como será visto no Capítulo 4.

Portanto, a proteção desse antioxidante foi garantida a partir da microencapsulação do mesmo pela técnica de emulsão dupla seguida por coacervação complexa, sendo esse um trabalho pioneiro e inovador, que conferiu maior estabilidade ao ácido ascórbico durante seu armazenamento.

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, I. D., GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying processo on the release of the core material. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p.1069-1076, 2010.

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of AOAC International, Arlington, 16th ed, v. 2, p. 3–5, 1984.

BENASSI, M.T.; ANTUNES, A.J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1988.

BERTOLINI, A.C. **Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização**. Campinas, 1999. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 82 p.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and Properties of spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p.1248-1252, 2000.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.5, n.4, p.420-428, 2005.

CHANG, Y.I.; SCIRE, J., JACOBS, B. Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil. In: Flavor Encapsulation. Risch, S.J. and Reineccius, G.A. Eds., **American Chemical Society**, Washington, D.C. p 87-102, 1988.

EASTMAN, J. E.; MOORE, C. O. Cold water soluble granular starch for gelled food composition. U.S. Patent 4465702, 1984.

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

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4, p. 366-374, 2010.

FINOTELLI, P. V., ROCHA-LEÃO, M. H. M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **2nd Mercosur Congresso on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congresso in Process Systems Engineering**, 2005.

JIANG, J-G., QV, X-Y., ZENG, Z-P. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, p.1-8, 2011.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. New York, **Nutritions Reviews**, v. 51, p. 33, 1993.

LEE, J-B., AHN, J., LEE, J., KWAK, H-S. L-Ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerolmonostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n.3, p. 495-500, 2004.

MCCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice and techniques**. 2.ed. CRC Press, 1994.

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

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic Study of Reactions. Between Tocopheroxyl Radicals and Fatty Acids. **Lipids**, v.28, p.753, 1993.

NAWAR, W. W. In **Lipids**; Fennema, O. R., ed.; Marcel Dekker: New York, p. 139, 1985.

NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., MATIAS DE ALENCAR, S., THOMAZINI, M., DE CAMARGO BALIEIRO, J. C. & CONTRERAS CASTILLO, C. J. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 429–435, 2011.

OKAC, B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of Environmental Management**, v. 100, p. 22-28, 2012.

ROZMAN, B., GASPERLIN, M. Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. **Drug Delivery**, v.14, p.235-245, 2007.

SARAVANAN, M., PANDURANGA RAO, K. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Unfluence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p.808-816, 2010.

SILVA, F.A.M., BORGES, M.F..M., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n.1, 1999.

SILVA, D. F. FAVARO-TRINDADE, C.S. ROCHA G.A. and THOMAZINI M. Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**., v.36, p.185–190, 2012.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. State University of New York, College of Environmental Science & Forestry. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC. p. 70 – 71, 2007.

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

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.

WEERT, M., ANDERSEN, M. B., FROKJAER, S. Complex coacervation of Lysozyme and Heparin: Complex Characterization and Protein Stability. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 12, 2004.

Capítulo 3. PRODUÇÃO DE MACROCÁPSULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

CAPÍTULO 3. PRODUÇÃO DE MACROCÁPSULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

RESUMO

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados devido aos processos oxidativos, principalmente à oxidação lipídica, a qual é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, mas também a integridade e segurança dos alimentos. O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante muito eficaz que exibe função vitamínica, no entanto é relativamente instável. A encapsulação utilizando dispositivo microfluídico para obtenção de macrocápsulas foi estudada como alternativa para resolver tais problemas. Assim, o objetivo deste trabalho foi elaborar macrocápsulas de AA visando sua proteção. Foi utilizada solução de 10% (m/m) de poli-vinil-álcool como emulsificante (PVA) na fase aquosa externa (ou fase contínua). O PVA utilizado não possuía grau alimentício, no entanto foi possível sua aplicação devido à possibilidade de lavagem das macrocápsulas e eliminação completa do mesmo. Cinco tratamentos foram obtidos diferenciando-se a composição da fase aquosa interna, sendo eles: (1) solução de 20% (m/m) de ácido ascórbico; (2) solução de 20% (m/m) de ácido ascórbico e 1% de Na_2CO_3 ; (3) Solução de 20% (m/m) de ácido ascórbico e 2% de Na_2CO_3 ; (4) Solução de 3% (m/m) de ácido ascórbico + 0,25% (m/m) de quitosana e (5) Solução de 3% (m/m) de ácido ascórbico + 0,25% (m/m) de

quitosana e 1% de Na_2CO_3 . Os tratamentos M2, M3 e M5 foram coletados em soluções com 1, 2 e 1% de CaCl_2 . Essas macrocápsulas foram analisadas com relação à morfologia, por microscopia ótica, eletrônica de varredura e confocal, eficiência de encapsulação, tamanho e distribuição de tamanho de partícula e estabilidade do material encapsulado. A estabilidade do AA foi analisada em duas temperaturas, 4 e 20°C. A obtenção das macrocápsulas de AA com utilização de dispositivo microfluídico foi viável, uma vez que apresentaram estabilidade melhor do que o ácido ascórbico puro. O tratamento com quitosana e 1% de sal na fase aquosa interna apresentou maior retenção do material encapsulado dentre todas as formulações nas duas temperaturas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. A pesquisa foi realizada nos laboratórios do professor David A. Weitz, no Departamento de Engenharia e Ciências Aplicadas de Harvard, da Universidade de Harvard, localizada em Cambridge, estado de Massachusetts, Estados Unidos.

Palavras-chave: encapsulação, vitamina C, estabilidade, microscopia.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lipídios desempenham um importante papel no que diz respeito à qualidade de certos produtos alimentícios, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (*flavor*, cor, textura). Por outro lado, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (ácidos linoleico, linolênico e araquidônico) e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). A oxidação lipídica é

um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial quer dos ácidos graxos, quer de todos os produtos que a partir deles são formulados (alimentos, cosméticos, medicamentos) (ANGELO, 1996; SILVA et al., 1999).

Com o intuito de resolver esse problema, faz-se necessária a utilização de antioxidantes, substâncias que, quando presentes em baixas concentrações quando comparadas a do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES & STAHL, 1995). O ácido ascórbico é um eficaz antioxidante, que faz parte de um grupo de substâncias químicas necessárias para o funcionamento adequado do organismo, pois possui função vitamínica. Ele pode ser encontrado naturalmente em frutas e vegetais e, em menor quantidade, em tecidos e produtos derivados. Todavia, trata-se de um composto muito instável, fortemente influenciado por fatores como reações catalisadas por íons metálicos de transição como Cu^{2+} e Fe^{3+} , calor, luz, pH, concentração de oxigênio e atividade da água, o que limita sua aplicação (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Em vista do exposto, a utilização do AA como antioxidante e para enriquecer os alimentos poderia ser garantida a partir da sua encapsulação. A microencapsulação do AA pelas técnicas de *spray drying*, emulsão dupla seguida de coacervação complexa, gelificação iônica, coprecipitação, extrusão, *fluid-bed*, separação térmica de fases e evaporação de solvente se mostraram eficiente para aumentar a estabilidade do AA (KNEZEVIC et al. 1998; TRINDADE et al. 2000; UDDIN, HAWLADER & ZHU, 2001; ESPOSITO et al. 2002; LEE et al. 2004; DESAI & PARK, 2005; DESAI & PARK, 2006;

PIERUCCI et al. 2006; HAN et al. 2008; PEREIRA et al. 2009; CHANG et al. 2010; COMUNIAN et al. 2013).

A encapsulação utilizando-se dispositivos microfluídicos baseia-se na utilização de dispositivos que permitem a produção de emulsões monodispersas, compostas por uma série de capilares que têm vantagens inerentes, tais como capacidade de umedecimento que pode ser fácil e precisamente controlado, rigidez e resistência a produtos químicos e geometria tridimensional, a qual permite fabricação controlada de emulsões múltiplas. Emulsões duplas podem ser produzidas combinando-se dois tipos de fluxos de sentidos opostos, onde a fase interna é bombeada através do interior de um dos capilares enquanto que o fluido do meio, no mesmo sentido através do capilar principal. A fase externa flui também através do capilar principal, no entanto no sentido oposto aos outros dois fluidos. A emulsão dupla é formada quando os três fluidos se encontram no tubo de coleta (ZHAO et al., 2011). Esta técnica é muito utilizada na área médica e farmacêutica (TAN et al., 2006; CHABERT & VIOVY, 2007; CLAUSELL-TORMOS et al., 2008), no entanto nenhum trabalho sobre encapsulação de ácido ascórbico utilizando esta técnica foi encontrado na literatura, sendo esta, uma iniciativa pioneira e inovadora, onde se espera conferir ao ácido ascórbico maior estabilidade durante seu armazenamento e mascarar seu gosto ácido.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi encapsular AA utilizando dispositivos microfluídicos, avaliar a estrutura das cápsulas obtidas, sua eficiência de encapsulação e a estabilidade do AA encapsulado em comparação ao livre.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL

Como material encapsulado utilizou-se ácido ascórbico puro (PF: 190-194°C, Sigma-Aldrich Co., MO/ USA). Gordura de palma (P.F: 37°C, Agropalma Co., Belém-Pará/ Brasil) foi empregada na fase oleosa e poli-vinil-álcool (PVA; MM: 13000-23000 g/mol, 87-89% hidrolizado, Sigma-Aldrich Co., MO/ USA) foi utilizado como emulsificante na fase aquosa.

3.2.2 MÉTODOS

(i) Encapsulação

O experimento foi realizado utilizando um dispositivo microfluídico de vidro como descrito por Sun et al. (2010) e visto na Figura 32.

A fase contínua constituiu da mistura de água e poli-vinil-álcool (PVA) de concentração de 10% (m/m). A fase aquosa interna foi composta de solução de AA com ou sem a presença de sal e/ou quitosana, como descrito na Tabela 11. As taxas de fluxo usadas para os tratamentos 1, 2 e 3 (Tabela 11) foram de 3000, 2500 e 14000 $\mu\text{L/h}$ para a fase aquosa interna, oleosa e aquosa externa, respectivamente. Já para os tratamentos 4 e 5 (Tabela 11) foram de 1000, 3000 e 12000 $\mu\text{L/h}$. Todos os fluidos foram bombeados pelo dispositivo microfluídico usando bomba de seringas (Harvard PHD 2000 series, Universidade de Harvard). A temperatura de aquecimento da fase oleosa foi controlada com a utilização de uma seringa acoplada a um dispositivo de aquecimento e controle de temperatura. A temperatura do fluido foi mantida dentro do dispositivo microfluídico com a utilização de ar quente por fora. Na

Figura 32 encontra-se o dispositivo utilizado para elaboração das microcápsulas.

Figura 32. Figura de um dispositivo microfluídico para elaboração das cápsulas.

As composições dos tratamentos estudados estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Tratamentos estudados com utilização de gordura de palma.

Tratamentos	Fase aquosa interna			Fase oleosa	Fase aquosa externa
	AA	Na ₂ CO ₃	Quitosana	Óleo	PVA
M1	20%	--	--	Gordura de palma	10%
M2	20%	1%	--	Gordura de palma	10%
M3	20%	2%	--	Gordura de palma	10%
M4	3%	--	0,25%	Gordura de palma	10%
M5	3%	1%	0,25%	Gordura de palma	10%

Os tratamentos M2, M3 e M5 foram coletados em uma solução de 1%, 2% e 1% de CaCl₂, respectivamente.

(ii) Morfologia das cápsulas por microscopia ótica, eletrônica de varredura (MEV) e confocal

O monitoramento das cápsulas durante a produção das mesmas foi possível através do uso de um microscópio ótico invertido (DM-IRB, Leica, Nova York, Estados Unidos) conectado com uma câmera rápida (Phantom 9, Vision Research, Wayne, New Jersey, Estados Unidos). Depois da produção

das amostras, as imagens foram obtidas em um microscópio invertido (TE2000-E, Melville, Nova York, Estados Unidos) equipado com uma câmera digital (Sight DS-U1, Melville, Nova York, Estados Unidos). As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microcápsulas foram obtidas usando o microscópio FESEM Ultra55 (Ultra55 Field Emission Scanning Electron Microscope) (Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha).

Em relação à microscopia confocal, foram preparadas cápsulas com 5% (m/m) dos corantes *Nile Red Nilrot* (Sigma-Aldrich Co., MO/ Estados Unidos) na fase oleosa e 5% (m/m) de sal de Fluoresceína (Sigma-Aldrich Co., MO/ Estados Unidos) na fase aquosa interna. Duas formulações foram obtidas, sendo elas: (1) sem a presença e (2) com 1% de sal na fase interna e no recipiente de coleta. Os fluxos utilizados foram de 1000, 3000 e 14000 $\mu\text{L/h}$ para as fases aquosa interna, oleosa e aquosa externa, respectivamente. As imagens foram obtidas em temperatura ambiente, utilizando um microscópio invertido com fluorescência (Leica, DMIRBE, Nova York, Estados Unidos) equipado com uma câmera digital (QImaging QICAM 12-bit).

(iii) Tamanho e distribuição de tamanho de partícula

As análises de tamanho de partícula foram realizadas através do programa ImageJ. As imagens foram obtidas pelo microscópio ótico invertido (DM-IRB, Leica, Nova York, Estados Unidos).

(iv) Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada após quantificação do total de AA presente na cápsula e o presente livre na superfície, este correspondente ao livre na fase aquosa externa. A eficiência da encapsulação foi calculada a partir da Equação 1.

$$\text{Eficiência de encapsulação} \equiv \left[\frac{AA_{\text{total}} - AA_{\text{livre superfície}}}{AA_{\text{total}}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

(v) Estabilidade do material encapsulado

A estabilidade do AA encapsulado em comparação ao na forma livre -em solução -, foram monitorados de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Farajzadeh & Nagizadeh (2003). Para a medida dos níveis de ácido ascórbico presente nas microcápsulas, uma solução padrão foi preparada contendo sulfato de cobre, cloreto de amônia e hidróxido de amônia. As cápsulas foram fundidas durante 3 min na temperatura de 50°C e 1mL da solução foi diluída em 25mL da solução padrão e medido em 600 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Nanodrop, ND 1000, Wilmington, Estados Unidos). O mesmo procedimento foi feito com 1mL da solução a qual as cápsulas foram lavadas. As análises foram realizadas em duplicata, em 0, 7, 15, 21 e 30 dias depois da encapsulação, com o material estocado em recipientes de vidros, protegidos da luz, na presença de O₂, nas temperaturas de 4 e 20°C °C.

(vi) Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados com duas repetições. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa SAS, versão 9.2, com utilização de delineamento inteiramente casualizado.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

(i) Produção de macrocápsulas lipídicas sólidas

Foram realizados inúmeros ensaios preliminares para se definir as condições operacionais, bem como os ingredientes das formulações. Optou-se por trabalhar com uma gordura fundida (gordura de palma), de forma que, quando as cápsulas obtidas eram resfriadas durante a coleta, a gordura passava para o estado sólido o que impedia a difusão da fase aquosa, obtendo-se cápsulas lipídicas sólidas carregadas de AA.

Para manter a gordura de palma fundida foi utilizado sistema de aquecimento diretamente na seringa na temperatura de 66°C, temperatura esta determinada em ensaios preliminares. Tal sistema, inclusive a coleta das macrocápsulas em banho de gelo, é mostrado na Figura 33.

Figura 33. Imagens de como foi mantido o aquecimento durante a produção e coleta das microcápsulas em banho de gelo.

Os tratamentos avaliados levaram à obtenção de macrocápsulas que apresentavam poros na fase lipídica, fator ao qual se atribui a menor eficiência de encapsulação para o tratamento M1 em relação aos demais tratamentos (Tabela 12) e também menor estabilidade durante o armazenamento (Tabelas 13 e 14), pois possivelmente o AA se difundiu por estes poros, ficando exposto e, portanto mais susceptível a oxidação. Baseando-se nos resultados reportados no trabalho de Zhao et al. (2011), e a fim de minimizar os problemas devido a presença de poros na fase lipídica, se incorporou Na_2CO_3 na fase aquosa interna e CaCl_2 na solução de coleta das macrocápsulas. Ao reagirem, estes sais formam o precipitado de carbonato de cálcio. Desta forma, o objetivo era que estes sais se difundissem pela fase lipídica mais rapidamente que o AA e ao se encontrarem, reagissem, formando o precipitado, como demonstrado na Figura 34. O precipitado de fato deve ter se formado e obstruído os poros da fase lipídica, levando a obtenção de estruturas com maior eficiência de encapsulação (Tabela 12) e maior estabilidade (Tabelas 13 e 14).

Figura 34. Esquema demonstrativo da ação do precipitado na liberação e proteção do AA encapsulado.

Adaptado de: Zhao et al. (2011)

Das concentrações de sais avaliadas - 1 e 2%, na proporção 1:1 de Na_2CO_3 e CaCl_2 –, que correspondem aos tratamentos M2 e M3, o tratamento M3 apresentou maior eficiência de encapsulação devido a maior concentração dos sais, formando uma maior quantidade do precipitado.

Outra medida avaliada para melhorar a eficiência de encapsulação e estabilidade das macrocápsulas lipídicas sólidas foi a utilização de um polímero na fase aquosa interna, no caso a quitosana, com importante valor funcional. A quitosana contém grupos amina que são protonáveis em meios ácidos enquanto que o AA contém hidroxilas de funcionalidade ácida, permitindo a formação de um complexo através da interação iônica. O complexo formado evidentemente é maior que o AA puro, dessa maneira dificultando a passagem do AA pelos poros da gordura solidificada e mantendo-o na fase aquosa interna, o que resultou, para os tratamentos M4 e M5, excelente eficiência de encapsulação (Tabela 12) e alta estabilidade durante armazenamento a 4 e 20°C. Ainda, de acordo Tian et al. (2009), o complexo formado pela quitosana e o AA tem alta capacidade sequestrante de oxigênio singlete, mantendo a atividade antioxidante do AA.

- (v) Morfologia das cápsulas por microscopia ótica, eletrônica de varredura (MEV) e confocal

A formação das cápsulas dentro do dispositivo microfluídico é observada na figura 35 através da microscopia ótica.

Figura 35. Esquema mostrando a formação das macrocápsulas com utilização de gordura de palma.

Pela microscopia ótica foi possível observar que as macrocápsulas apresentaram formato circular e a presença de camadas, além disso, verifica-se homogeneidade no tamanho dentro de cada tratamento e a diferença pronunciada de tamanho entre os tratamentos, que foi confirmada pela análise do tamanho médio e da distribuição das partículas (Tabela 12 e Figura 36). Pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 36b) foi possível confirmar o formato arredondado e a presença de poros nas cápsulas para todas as formulações, além da superfície rugosa em função da cristalização de um lipídeo heterogêneo.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa da Universidade de Harvard, também foram obtidas cápsulas monodispersas e de formato arredondado quando utilizado do mesmo método de encapsulação, no entanto aplicando óleo Suppocire Aim, óleo de parafina, nonadecano, eicosano e Witepsol H15 como fase oleosa e os corantes Fluoresceína, toluidina, rodamina B, Allura red AC e tartrazina na fase aquosa interna (SUN et al., 2010; ZHAO et al., 2011).

Em relação às cápsulas de AA obtidas por outros métodos de encapsulação, Lee e colaboradores (2004) também obtiveram gotículas de formato arredondado quando encapsulado o AA pela técnica de emulsão dupla (A/O/A) utilizando-se de duas etapas de homogeneização, com aplicação de Puresyn4 e Arlacel P135 na fase oleosa.

Em relação à microscopia confocal, foi possível visualizar como ocorreu a liberação do princípio ativo encapsulado resultante da presença ou ausência do precipitado (Figura 36c e 36d). A cor vermelha indica o corante aplicado na camada oleosa, enquanto que a cor verde o corante aplicado na fase aquosa interna. Nota-se na Figura 36c que a cor verde esteve predominantemente presente na fase aquosa interna, fato que comprova a eficiência da presença do precipitado produzido pelos sais adicionados nas fases aquosa interna e externa, que competiu com o ácido ascórbico pela passagem pela fase oleosa, enquanto que na Figura 36d a cor verde esteve predominantemente fora da cápsula, o que indicou a difusão do corante pela fase oleosa. Esse fato pode ser explicado devido à ausência do precipitado na fase oleosa, causando maior taxa de liberação do agente encapsulado, o que também foi confirmado através da eficiência de encapsulação e estabilidade do ácido ascórbico.

Figura 36. (a) Microscopia ótica (100x) do tratamento M2 (20% de ácido ascórbico + 1% de sal); (b) Microscopia eletrônica de varredura do tratamento M5 (3% de ácido ascórbico+ 0,25% de quitosana + 1% de sal); (c) Microscopia confocal (300x) do tratamento contendo corante e 1% de sal; (d) Microscopia confocal (300x) do tratamento contendo somente corante, sem a presença de sal.

(iii) Tamanho e distribuição do tamanho de partícula e eficiência de encapsulação

Na Tabela 12 pode ser verificado o tamanho médio e eficiência de encapsulação para cada tratamento.

Em relação ao tamanho médio das macrocápsulas, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que diferentes composições da fase aquosa interna interferem no diâmetro médio das partículas correspondentes às emulsões duplas. A presença de quitosana aumentou a viscosidade da fase interna, sendo necessária a mudança dos

fluxos de 3000 para 1000 $\mu\text{L/h}$ e de 2500 para 3000 $\mu\text{L/h}$ para as fases interna e oleosa, respectivamente, quando injetadas no dispositivo microfluídico, resultando no aumento do tamanho das macrocápsulas produzidas.

Tabela 12. Tamanho médio de microcápsulas obtidas e eficiência de encapsulação.

Tratamento	Tamanho de partícula (μm)	Eficiência de encapsulação (%)
M1	195,04 $\pm$ 4,58 ^c	73,40 $\pm$ 2,84 ^d
M2	186,11 $\pm$ 7,8 ^d	91,74 $\pm$ 2,83 ^c
M3	170,20 $\pm$ 3,3 ^e	92,13 $\pm$ 1,50 ^{b,c}
M4	299,49 $\pm$ 14,88 ^b	96,64 $\pm$ 0,47 ^a
M5	342,47 $\pm$ 28,40 ^a	95,14 $\pm$ 0,88 ^{a,b}

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

- Tratamento M1: 20% de ácido ascórbico;
- Tratamento M2: 20% de ácido ascórbico + 1% de sal;
- Tratamento M3: 20% de ácido ascórbico + 2% de sal;
- Tratamento M4: 3% de ácido ascórbico + 0,25% de quitosana;
- Tratamento M5: 3% de ácido ascórbico + 0,25% de quitosana + 1% de sal.

Como já dito no Capítulo 2, muitos são os fatores que interferem no tamanho e distribuição de tamanho de partícula, como por exemplo: método de encapsulação, agentes encapsulantes, concentrações e proporção agente encapsulado/encapsulante, entre outros. No entanto, é possível ter um grande controle no caso de cápsulas obtidas por dispositivos microfluídicos, uma vez que apenas uma gota é formada de cada vez. Neste método o tamanho da cápsula pode variar devido ao uso de capilares com diferentes diâmetros de injeção e de coleta e diferentes valores de fluxos para cada fase da emulsão. A distribuição do tamanho de partícula apresentou comportamento unimodal para os tratamentos M1, M2, M3 e M4, com exceção do tratamento M5 a qual não apresentou comportamento uniforme, como visto na Figura 37. Sun e

colaboradores (2010) e Zhao e colaboradores (2011), quando utilizado dispositivo microfluídico e solidificação da fase oleosa, também obtiveram distribuição de tamanho de partícula unimodal.

Figura 37. Distribuição do tamanho de partícula referente às capsulas de todas as formulações (Colunas de cor laranja: M1; vermelha: M2; verde: M3; roxo: M4; azul: M5).

- Tratamento M1: 20% de ácido ascórbico;
- Tratamento M2: 20% de ácido ascórbico +1% de sal;
- Tratamento M3: 20% de ácido ascórbico +2% de sal;
- Tratamento M4: 3% de ácido ascórbico + 0,25% de quitosana;
- Tratamento M5: 3% de ácido ascórbico+ 0,25% de quitosana + 1% de sal.

Em relação à eficiência de encapsulação, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, o que indica que diferentes composições da fase aquosa interna interferiram na quantidade do material ativo efetivamente encapsulado.

Comparando-se os tratamentos verifica-se que a utilização dos sais e principalmente da quitosana resultou em maiores valores de eficiência de encapsulação. Ou seja, de fato houve formação do precipitado entre os sais e o complexo AA-quitosana, que limitaram a difusão do AA e ou de compostos pro-oxidantes. Como não houve diferença entre os tratamentos M4 e M5, é possível inferir que a utilização da quitosana foi suficiente para garantir uma boa eficiência de encapsulação no sistema estudado.

Os valores de eficiência de encapsulação obtidos podem ser considerados altos, o que indica que a metodologia escolhida foi adequada para o objetivo proposto. Em relação aos trabalhos relacionados à encapsulação de AA, Lee et al. (2004) obtiveram valores de eficiência de encapsulação entre 80,7 e 94,2% quando microencapsularam o AA por *spray drying* utilizando monoestearato de poli acilglicerol. Trindade e Grosso (2000) obtiveram valores de até 100% de eficiência quando o encapsularam por *spray drying* usando goma arábica e amido de arroz como materiais de parede. Comunian e colaboradores (2013) encapsularam ácido ascórbico pela técnica de coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais de parede, obtendo-se eficiência de encapsulação na faixa de 97 a 99%.

(vi) Estabilidade do ácido ascórbico livre e encapsulado

A análise de estabilidade do material encapsulado foi realizada em duas temperaturas (4 e 20°C) durante 30 dias. A estabilidade de cada tratamento e da solução controle é apresentada nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Estabilidade da solução controle de ácido ascórbico e de cada tratamento durante 30 dias na temperatura de 4°C.

Tratamentos	Concentração de AA (%)				
	1 dia	7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
M1	100 ±0,01 ^{a,b, A}	102,57±3,40 ^{a,A}	98,96±2,02 ^{a,b,A}	94,89±1,80 ^{b,A}	55,89±5,77 ^{c,C}
M2	100±0,01 ^{a,A}	98,97±1,53 ^{a,A}	98,37±1,95 ^{a,b,A}	97,23±4,96 ^{a,b,A}	94,33±2,02 ^{b,A}
M3	100±0,01 ^{a,A}	96,42±1,08 ^{a,A}	91,35±2,27 ^{b,B}	85,94±4,76 ^{c,B}	86,11±2,18 ^{c,B}
M4	100±0,01 ^{a,A}	98,09±0,53 ^{b,A}	97,28±0,52 ^{b,c,A,B}	95,88±0,60 ^{d,A}	96,40±0,71 ^{c,d,A}
M5	100±0,01 ^{a,A}	99,41±0,72 ^{a,b,A}	99,80±0,66 ^{a,b,A}	97,84±0,88 ^{c,A}	98,58±0,93 ^{b,c,A}
Controle	100±0,05 ^{a,A}	96,24±10,86 ^{a,A}	76,16±2,17 ^{b,C}	23,46±7,84 ^{c,C}	4,64±2,17 ^{d,D}

*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (p<0,05).

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (p<0,05).

Tabela 14. Estabilidade da solução controle de ácido ascórbico e de cada formulação durante 30 dias na temperatura de 20°C.

Tratamentos	Concentração de AA (%)				
	1 dia	7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
M1	100±0,01 ^{a,A}	75,94±2,40 ^{b,C}	49,32±2,63 ^{c,C}	43,73±3,53 ^{d,D}	46,06±1,43 ^{cd,E}
M2	100±0,01 ^{a,A}	94,48±1,48 ^{b,A}	76,46±0,64 ^{c,B}	78,17±2,89 ^{c,B}	76,60±0,60 ^{c,C}
M3	100±0,01 ^{a,A}	89,61±2,34 ^{b,A}	91,00±2,43 ^{b,A}	64,99±1,27 ^{c,C}	64,46±1,22 ^{c,D}
M4	100±0,01 ^{a,A}	97,36±0,48 ^{b,A}	96,92±0,56 ^{b,c,A}	96,18±0,60 ^{c,A}	92,65±0,72 ^{d,B}
M5	100±0,01 ^{a,A}	96,72±0,44 ^{c,A}	97,99±0,85 ^{b,A}	97,54±0,85 ^{b,c,A}	97,62±0,77 ^{b,c,A}
Controle	100±0,01 ^{a,A}	84,32±1,88 ^{b,B}	74,91±3,76 ^{c,B}	14,68±3,76 ^{d,E}	3,38±0,01 ^{d,F}

*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (p<0,05).

*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (p<0,05).

- Tratamento M1: 20% de ácido ascórbico;
- Tratamento M2: 20% de ácido ascórbico +1% de sal;
- Tratamento M3: 20% de ácido ascórbico +2% de sal;
- Tratamento M4: 3% de ácido ascórbico + 0,25% de quitosana;
- Tratamento M5: 3% de ácido ascórbico+ 0,25% de quitosana + 1% de sal.

A instabilidade verificada nas soluções controle pode ser explicada devido à suscetibilidade do ácido ascórbico à oxidação, em especial quando em contato com calor, luz e oxigênio (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Mesmo havendo redução significativa na concentração de AA para todos os tratamentos estudados, em ambas as temperaturas, estes foram significativamente menores do que no controle, que continha o AA livre em solução (Tabelas 13 e 14). Após 30 dias, o controle manteve apenas em torno

de 4,64 e 3,38% da concentração de AA nas temperaturas de 4 e 20°C, respectivamente, enquanto os tratamentos mantiveram de 55 a 98% e 46 a 97% nas temperaturas de 4 e 20°C, respectivamente.

Comparando-se os tratamentos, verifica-se que o M4 e o M5 foram os mais eficientes para proteger o AA, tendo mantido cerca de 97% de sua concentração inicial após 30 dias de armazenamento em ambas as temperaturas, ou seja, como esperado houve formação do complexo entre a quitosana e o AA, e este complexo, em função de seu tamanho molecular, não foi capaz de se difundir pela parede lipídica o que resultou em maior estabilidade para o material encapsulado, mesmo quando armazenado à temperatura ambiente.

Comparando-se os tratamentos M4 e M5 verifica-se que houve diferença em seus desempenhos apenas no último ponto da estabilidade mantido a 20°C, onde o tratamento M5 – que continha os sais e a quitosana – ofereceu maior proteção ao AA que o M4, que continha apenas a quitosana. Todavia, a diferença foi muito pequena para justificar a utilização do sal em conjunto com a quitosana.

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser considerados bastante satisfatórios, inclusive quando comparados aos demais presentes na literatura onde se estudou a encapsulação do AA. Finotelli e colaboradores (2005) produziram microcápsulas de AA através da técnica de *spray drying* utilizando maltodextrina e capsul como materiais de parede. A estabilidade do AA foi estudada em temperatura ambiente e a 45°C, sendo que microcápsulas com 20% de AA apresentaram 7% de redução do AA em 60

dias armazenados à temperatura de 28°C. Já Rozman e colaboradores (2007) encapsularam o AA através de microemulsões A/O. A estabilidade do AA foi analisada dentro de um período de 30 dias, obtendo retenção de 60% para amostras armazenadas à temperatura ambiente.

Trindade e Grosso (2000) encapsularam AA pelo método de *spray drying* usando goma arábica e amido de arroz como agentes encapsulantes e obtiveram de 81 a 100% e de 37 a 59,9% de retenção após 90 dias quando amostras foram armazenadas a 21 e 45°C, respectivamente. Já Lee e colaboradores (2004) encapsularam AA em emulsão dupla água em óleo em água (A/O/A) utilizando Puresyn 4 e Arlacel na fase oleosa e solução de goma xantana na fase contínua, obtendo-se de 80 a 90% de retenção do AA após 10 semanas. Comunian e colaboradores (2013) encapsularam o AA pela técnica de emulsão dupla seguida de coacervação complexa utilizando-se de gelatina e goma arábica como materiais de parede e obtiveram retenção de AA na faixa de 36 a 73% e 15 a 40% para as amostras armazenadas durante 60 dias nas temperaturas de 20 e 37°C, respectivamente.

3.4 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos, pode-se afirmar que a encapsulação de ácido ascórbico com a utilização de dispositivo microfluídico e gordura de palma como fase oleosa é viável para obtenção das macrocápsulas lipídicas sólidas. As macrocápsulas obtidas apresentaram alta eficiência de

encapsulação e excelente desempenho no que diz respeito à proteção do AA durante o armazenamento mesmo a temperatura ambiente.

Das formulações estudadas aquela onde se adicionou a quitosana, pelo conjunto dos resultados, e pela simplicidade da fórmula, pode ser considerada a mais adequada para encapsulação de AA pela técnica de dispositivo microfluídico.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, A. J. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p.175, 1996.

CHABERT, M., & VIOVY, J. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. **PNAS**, v.105, n.9, p.3191-3196, 2007.

CHANG, D., ABBAS, S., HAYAT, K., XIA, S., ZHANG, X., XIE, M., & KIM, J. M. Encapsulation of ascorbic acid in amorphous maltodextrin employing extrusion as affected by matrix/core ratio and water content. **International Journal of Food Science & Technology**, v.45, n.9, p.1895-1901, 2010.

CLAUSELL-TORMOS, J., LIEBER, D., BARET, J., EL-HARRAK, A., MILLER, O. J., DUAN, H., FRENZ, L., ET AL. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. **Chemistry & Biology**, v.15, p. 427–437, 2008.

COMUNIAN, T. A., THOMAZINI, M., ALVES, A. J. G., DE MATOS JUNIOR, F. E., BALIEIRO, J. C.C, & FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 373–379, 2013.

DESAI, K. G., LIU, C., & PARK, H. J. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.1, p. 79-90, 2006.

DESAI, K. G. H., LIU, C., & PARK, H. J. Characteristics of vitamin C immobilized particles and sodium alginate beads containing immobilized particles. **Journal of Microencapsulation**, v.22, n.4, p.363-376, 2005.

ESPOSITO, E., CERVELLATI, F., MENEGATTI, E., NASTRUZZI, C., & CORTESI, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International journal of pharmaceutics**, v.242, n.1-2, p.329-34, 2002.

FARAJZADEH, M.A.; NAGIZADEH, S. A simple and reliable spectrophotometric method for the Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparation. **Journal of Analytical Chemistry**, v.58, n.10, p.927-932, 2003.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 366-374, 2010.

FINOTELLI, P. V., ROCHA-LEÃO, M. H. M. **Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying**. Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2nd Mercosur Congresso on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congresso n Process Systems Engineering, 2005.

HAN, J., GUENIER, A.-S., SALMIERI, S., & LACROIX, M. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.7, p. 2528–35, 2008.

KNEZEVIC, Z., GOSAK, D., HRASTE, M., & JALSENJAK, I. Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid. **Journal of microencapsulation**, v.15, n.2, p.237-52, 1998.

LEE, J-B., AHN, J., KWAK, H-S. L-Ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerolmonostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 495-500, 2004.

PEREIRA, H. V. R., SARAIVA, K. P., CARVALHO, L. M. J., ANDRADE, L. R., PEDROSA, C., & PIERUCCI, A. P. T. R. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. **Food Research International**, v.42, n.1, p.115-121, 2009.

PIERUCCI, A.P.T.R., ANDRADE, L. R., BAPTISTA, E. B., VOLPATO, N. M., ROCHA-LEÃO, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.6, p. 654-662, 2006.

ROZMAN, B., GASPERLIN, M. Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. **Drug Delivery**, v.14, p.235-245, 2007.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p.94, 1999.

SUN, B. J.; SHUM, H. C.; HOLTZE, C.; WEITZ, D.A. Microfluidic melt emulsification for encapsulation and release of actives. **Applied materials and interfaces**. v.2, n.12, p. 3411-3416, 2010.

TAN, Y., HETTIARACHCHI, K., SIU, M., PAN, Y., & LEE, A. P. Controlled Microfluidic Encapsulation of Cells , Proteins , and Microbeads in Lipid Vesicles. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p. 5656–5658, 2006.

TIAN, X. L.; TIAN, D. F.; WANG, Z. Y.; MO F. K. Synthesis and Evaluation of Chitosan-Vitamin C complex. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 4, p. 371–376, 2009.

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.

UDDIN, M. S., HAWLADER, M. N. A., ZHU, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. **Journal of Microencapsulation**, v.18, n.2, p.199-209, 2001.

ZHAO, Y.; SHUM, H.C.; ADAMS, L.L.A.; SUN, B.; HOLTZE, C.; GU, Z; WEITZ, D.A. Enhanced encapsulation of actives in self-sealing microcapsules by precipitation in capsule shells. **American Chemical Society**, n.27, p.13988-13991, 2011.

Capítulo 4. APLICAÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE ÁCIDO ASCORBICO EM PRODUTO CÁRNEO EMULSIONADO

CAPÍTULO 4. APLICAÇÃO DAS MICROCAPSULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM PRODUTO CÁRNEO EMULSIONADO

RESUMO

O ácido ascórbico (AA) é um importante antioxidante com função vitamínica, no entanto muito instável quando em contato com diversos fatores, entre eles, aquecimento, luz, alta concentração de oxigênio e valores de atividade de água, o que limita sua aplicação. A aplicação do AA encapsulado em salsicha pode ser uma ideia inovadora, pois além de incorporar um antioxidante eficaz, estar-se-á obtendo um produto também com função vitamínica. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação das microcápsulas de AA em salsicha e o efeito de sua aplicação nas características físico-químicas e sensoriais do produto durante 40 dias de armazenamento refrigerado. Foram elaboradas salsichas sem antioxidante, com AA livre e encapsulado, com eritorbato de sódio (antioxidante comercial) e com todos os ingredientes utilizados na microencapsulação, totalizando 5 tratamentos. Para a aplicação das microcápsulas, foi utilizada a formulação referente ao tratamento AA4 obtida por coacervação complexa devido sua melhor estabilidade e maior concentração de ácido ascórbico, como mostrado no Capítulo 2. Análises de estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento, umidade, atividade de água, alteração do pH, determinação da cor instrumental, perfil de textura instrumental, estabilidade oxidativa pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aceitação sensorial foram realizadas. Em relação às análises de estabilidade da emulsão

cárnea, atividade de água, umidade, alteração do pH e cor instrumental, não houve diferença significativa dentre os tratamentos, mostrando que a presença das microcápsulas não influenciou na qualidade da salsicha. Em relação à dureza, observa-se que o tratamento com as microcápsulas apresentou valores 30% menores do que os outros tratamentos, correlacionando positivamente com a aceitação global na análise sensorial. Em relação ao TBARS, os tratamentos não mostraram oxidação na mesma velocidade que a amostra sem antioxidante apresentou, ou seja, as microcápsulas liberaram o ácido ascórbico na salsicha, não comprometendo sua estabilidade oxidativa. Desta maneira pode-se afirmar que foi possível a aplicação das microcápsulas de AA sem comprometer a qualidade do produto final, sendo esta uma alternativa promissora para conferir proteção ao AA e para produção de salsicha fortificada.

Palavras-chave: vitamina C, salsicha, TBARS, aceitação sensorial.

4.1 INTRODUÇÃO

Com a função de inibir ou retardar a oxidação lipídica de alimentos, os antioxidantes tem sido muito empregados e estudados (MUKAI, 1993). As reações de oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo (KUBOW, 1993; NAWAR, 1985; SILVA et al, 1999; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

O ácido ascórbico (AA) é encontrado naturalmente em frutas e vegetais e, em menor quantidade, em tecidos animais e produtos derivados. Além de sua função de vitamina e como nutriente essencial, o AA é muito usado como ingrediente/aditivo de alimentos devido a suas propriedades antioxidante e redutora. No entanto, o ácido ascórbico é muito instável quando em contato com diversos fatores, entre eles, aquecimento, luz, alta concentração de oxigênio e altos valores de atividade de água, o que limita sua aplicação (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). A utilização desse antioxidante pode ser garantida a partir da microencapsulação do mesmo pelas técnicas de coacervação complexa e dispositivos microfluídicos como foi já apresentado.

Os elementos iniciadores da oxidação nos pigmentos cárneos são as várias formas de energia (luz e calor) e os íons metálicos. Ambos produzem os radicais livres que interagem com os compostos do grupo heme. Como consequência, ocorre a redução da vida útil desses produtos (ESPINOZA-ATENCIA, 1996; MARCHESI et al., 2006).

A salsicha é um embutido de carne oriunda de uma emulsão, caracterizada como uma massa fina. Essa emulsão é formada após a mistura de carnes, aditivos e condimentos em um equipamento específico chamado *Cutter*, promovendo uma mistura íntima dos glóbulos de gordura com uma matriz de proteína e água. Atualmente produtos cárneos emulsionados são elaborados com a incorporação de eritorbato de sódio como antioxidante, o qual não confere nenhum benefício à saúde do consumidor. Por essa razão, a aplicação de ácido ascórbico encapsulado em produtos cárneos emulsionados

pode se tornar uma ideia inovadora, pois além de incorporar um antioxidante eficaz, estará obtendo-se um produto também com função vitamínica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dos nove tratamentos que foram analisados no Capítulo 2, o tratamento AA4, que resultou em maior estabilidade, foi aplicado em salsicha e foi comparado aos produtos produzidos com ácido ascórbico livre, com ácido ascórbico livre junto com os ingredientes utilizados no processo de encapsulação, com eritorbato de sódio e sem nenhum tipo de antioxidante, o que resultou em cinco tratamentos (T1 a T5).

Formulações

A formulação padrão elaborada seguiu a classificação do tipo “Salsicha de carne de aves”, de acordo com a legislação (BRASIL, 2000). Optou-se por utilizar matéria-prima à base de aves devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados que apresenta, podendo assim evidenciar melhor a funcionalidade dos antioxidantes a serem comparados. Esta mesma legislação estabelece os “Padrões de Identidade e Qualidade de Salsicha”, com limites máximo ou mínimos para os teores de umidade (máx.=65%), gordura (máx.=30%), proteína (mín.=12%), amido (máx.=2%) e proteína não cárnea (máx.=4%), entre outros. As matérias-primas utilizadas foram filé de pernas (coxa e sobre-coxa) e pele.

As formulações utilizadas para cada tratamento são mostradas nas Tabelas 15 e 16 a seguir. A partir da formulação base apresentada na Tabela

15, foram obtidos os tratamentos T1 a T5 apresentados na Tabela 16. O valor de 27g/Kg de microcápsulas de AA apresentado na Tabela 16 é o equivalente a 400 ppm de ácido ascórbico.

Tabela 15. Formulação básica para todos os tratamentos em m/m.

	Quantidade (%)
Filé de coxa e sobrecoxa de frango	80
Pele de frango	10
Água (gelo)	10

Tabela 16. Composição de cada tratamento aplicado nas salsichas.

Composição/ Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
Eritorbato	500 ppm	--	--	--	--
Ácido Ascórbico	--	400 ppm	--	400 ppm	--
Microcápsulas de AA	--	--	27g/ Kg	--	--
Sal de cura	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%
Condimento	1%	1%	1%	1%	1%
Sal (NaCl)	0,75%	0,75%	0,75%	0,75%	0,75%
Gelatina	--	--	--	7,8g/ Kg	--
Goma arábica	--	--	--	7,8g/ Kg	--
Óleo de milho	--	--	--	10g/ Kg	--

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

Processamento

As matérias-primas foram pesadas, separadamente, assim como todos os ingredientes e a água (utilizada na forma de gelo). Foram preparados lotes de 8 Kg de massa total. As massas de salsicha foram cominuídas em homogeneizador rotativo de bacia ("*cutter*"), sendo retiradas deste equipamento com temperaturas inferiores a 14°C. Em seguida, as emulsões foram embutidas em tripas celulósicas (permeáveis) com diâmetro de 22 mm (Viscofan do Brasil, São Paulo) e amarradas manualmente em gomos de 15 cm. O cozimento foi realizado em estufa até temperatura interna de 72°C. As salsichas foram resfriadas por aspersão de água, a tripa foi removida, e então embaladas a vácuo e estocadas em câmara fria a 3°C. Cada etapa do processamento pode ser observada nas Figuras 38 e 39.

Figura 38. Etapas do processamento da salsicha.

Figura 39. Algumas etapas do processo de fabricação da salsicha: (a) pesagem dos ingredientes; (b) massa cominuída no cutter; (c) embutimento das salsichas; (d) separação das salsichas por tratamento; (e) preparação para cozimento; (f) embaladas à vácuo.

Testes realizados

(i) Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento

A avaliação da estabilidade da emulsão cárnea foi realizada de acordo com o método de Parks e Carpenter (1987). Foram retiradas amostras com cerca de 50 g da massa crua, acondicionadas em embalagens termo resistentes, seladas a vácuo, pesadas e submetidas à cocção em banho-maria com água a 70°C por 60 minutos. Ao término do tempo estabelecido, as amostras cozidas foram novamente pesadas para o cálculo da perda de peso.

(ii) Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado

Para avaliação da estabilidade oxidativa durante o armazenamento os produtos foram estocados a 3°C e avaliados com 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias, pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O valor de TBARS foi calculado a partir de uma curva padrão e expresso em mg malonaldeído/kg do produto.

(iii) Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA).

(iv) Umidade

A determinação da umidade das amostras foi realizada no analisador de umidade modelo MB 35 da marca Ohaus (Ohio, Estados Unidos), em triplicata.

(v) Avaliação de alteração do pH

O pH das salsichas foi determinado após 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias de estocagem a 25°C em triplicata utilizando-se de um pHmetro (Hanna Meat pHmeter HI 99163) com eletrodo de perfuração.

(vi) Avaliação do Perfil de Textura Instrumental durante armazenamento refrigerado

A análise de Perfil de textura instrumental foi realizada em um texturômetro (TAXT2i, Stable Micro Systems) previamente calibrado com peso padrão 2 kg. As salsichas foram previamente cortadas em fatias de 23 mm de comprimento e comprimidas em até 70% deste tamanho, utilizando um probe de alumínio (SMS P/20) com velocidade do pré-teste, teste e pós-teste de 2,0 mm/s e distância da plataforma de 16 mm, em 10 salsichas, à temperatura de 25°C. Os produtos foram analisados com 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias de estocagem.

(vii) Determinação da cor instrumental

Esta análise foi realizada em colorímetro (Mini Scan XE Plus), através do Sistema de cores Hunter L a e b nas amostras armazenadas após 5, 12, 19, 26, 33 e 40 dias.

(viii) Avaliação da aceitação sensorial durante o armazenamento refrigerado

Esta análise foi realizada em cabines individuais, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard et al. (1999). Os ensaios foram realizados nas amostras com 5, 20 e 40 dias de armazenamento. As amostras foram avaliadas usando escala hedônica de 9 pontos (1 - "desgostei muitíssimo e 9 – gostei muitíssimo) para os atributos de sabor, textura, cor, aroma e

aceitabilidade geral. Sessenta provadores não treinados, de ambos os sexos e diferentes grupos etários participaram do teste. Os provadores foram selecionados em função de serem consumidores habituais de salsichas e por se disponibilizarem a participar dos ensaios. As amostras foram apresentadas monadicamente, em pratos codificados e de forma aleatória. Antes da análise foram aquecidas por 5 min em água fervente, cortadas em cilindros de 2 cm e mantidas aquecidas a 40°C em estufa, sendo servidas aos consumidores em recipientes plásticos descartáveis, acompanhadas de água e biscoitos de água e sal. A ficha utilizada na análise sensorial e o termo de consentimento livre e esclarecido estão apresentados no Apêndice A e B.

(ix) Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistic Analysis System), versão 9.2, por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

(i) Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento, umidade e atividade de água

Os valores de perda de massa, umidade e atividade de água estão apresentados na Tabela 17. Observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) dentre os tratamentos analisados, mostrando que a aplicação das

microcápsulas de ácido ascórbico não resultou na quebra da emulsão cárnea e na alteração da umidade e da atividade de água da salsicha.

Os resultados obtidos para umidade estão de acordo com os obtidos por Hayes e colaboradores (2011) quando avaliaram os efeitos de plantas nutracêuticas na qualidade e estabilidade de salsichas de carne de porco cru e cozidas. Foram obtidos valores de 60,9 a 62,2% e de 53,01 a 53,23% de umidade para salsichas cru e cozida, respectivamente.

Os valores de umidade obtidos (Tabela 17) atenderam ao Padrão de Identidade e Qualidade (BRASIL, 2000), que estabelece umidade máxima de 65%.

Tabela 17. Estabilidade da emulsão cárnea, umidade e atividade de água para cada tratamento.

Tratamentos	Perda de massa (%)	Umidade (%)	Atividade de água
T1	17,05± 1,39 ^a	54,18± 5,18 ^a	0,975± 0,003 ^a
T2	17,19± 2,02 ^a	54,11± 3,28 ^a	0,975± 0,003 ^a
T3	15,61± 1,89 ^a	52,85± 7,64 ^a	0,970± 0,007 ^a
T4	16,36± 3,88 ^a	53,84± 9,34 ^a	0,974± 0,005 ^a
T5	15,02± 1,40 ^a	55,46± 3,13 ^a	0,964± 0,002 ^a

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

Os valores obtidos para atividade de água foram similares aos obtidos por Filho e colaboradores (2010) para salsicha de Tilápia, obtendo-se atividade de água de 0,98. Fiorda & Siqueira (2009) avaliaram o pH e a atividade de água em produtos cárneos, obtendo-se atividade de água de 0,966 para salsicha. Segundo Badr & Mahmoud (2011), a presença de suco de cenoura na formulação de salsicha não interferiu na atividade de água do produto, obtendo-se valores em torno de 0,98 para salsichas com diferentes concentrações de suco de cenoura.

Segundo Ribeiro & Saravalli (2004), produtos cárneos são alimentos de alta atividade de água, o que favorece o crescimento microbiano. No entanto, além de serem embalados a vácuo, os tratamentos foram estocados a baixa temperatura, adicionados de nitrito de sódio (presente no sal de cura) e consumidos após aquecimento térmico, sendo essas condições necessárias para a segurança do produto.

(ii) Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado

Os valores de TBARS encontrados nos diferentes tratamentos ao longo de 40 dias estocados a 3°C são apresentados na Tabela 18. Os valores de TBARS para todas as amostras no primeiro dia variaram de 1,9 à 3mg malonaldeído/Kg de amostra. Isso pode ser explicado pela oxidação lipídica que ocorreu durante o processamento e cozimento das salsichas. Os valores apresentaram aumento e decaimento no decorrer dos 40 dias devido a possíveis reações com aminoácidos livres, proteínas e peptídeos presentes nas formulações (DILLARD & TAPPEL, 1973). Não houve diferença

significativa ($p < 0,05$) no decorrer do tempo para os tratamentos de T1 a T4 em relação aos valores de TBARS. No entanto, o tratamento referente à salsicha controle (Tratamento T5) – sem antioxidante – mostrou aumento da concentração de malonaldeído/Kg de amostra durante o intervalo de 40 dias, comprovando a importância da aplicação do antioxidante. Dessa maneira, pode-se inferir que o AA encapsulado foi liberado da microcápsula, possivelmente por diferença na força iônica, de pH ou em função do aumento da temperatura - no tratamento térmico – o que propiciou sua atuação como antioxidante no produto. Sendo assim, conclui-se que é possível a aplicação de microcápsulas de AA em salsicha, sem o comprometimento da estabilidade oxidativa do produto durante a estocagem.

Trindade e colaboradores (2008) estudaram a estabilidade oxidativa em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C e obtiveram valores de TBARS de 0,9 à 3,84mg malonaldeído/Kg de amostra após 99 dias de análise. Hayes e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos de derivados de plantas na qualidade e na vida de prateleira de salsichas de carne de porco cru e cozidas e também obtiveram aumento nos valores de TBARS no decorrer de 21 dias para as salsichas controle armazenadas a 4°C (de 0,43 à 1,13 e de 0,81 à 1,39mg malonaldeído/Kg de amostra para a salsicha cru e cozida, respectivamente). Aumento nos valores de TBARS foi obtido por Badr & Mahmoud (2011) quando estudada a atividade antioxidante do suco de cenoura em salsicha irradiada durante estocagem refrigerada e congelada. A concentração de malonaldeído aumentou de 0,23 à 2mg/Kg na amostra

controle no período de 12 dias de estocagem refrigerada. Os demais tratamentos (salsicha com suco de cenoura não concentrado e com 35 e 60% de concentrado) apresentaram ligeiro aumento de TBARS, no entanto não significativo. Amostras congeladas mostraram comportamentos similares. Maqsood, Benjakul & Balange (2012) estudaram o efeito do ácido tânico e do extrato da madeira kiam na oxidação lipídica e propriedades de textura de salsicha de peixe durante estocagem refrigerada. Cinco amostras foram analisadas, sendo elas salsicha controle, com 0,02 e 0,04% de ácido tânico e com 0,04 e 0,08% do extrato da madeira. Todos os tratamentos apresentaram aumento dos valores de TBARS no período de 20 dias, atingindo valores de 7 a 12 mg de malonaldeído/Kg de amostra.

Tabela 18. Valores de TBARS (mg malonaldeído/Kg amostra) para cada tratamento durante 40 dias.

Tratamentos/ dias	5	12	19	26	33	40
T1	2.39±0.12 ^{a,A}	3.31±0.76 ^{a,A}	4.1±0.21 ^{a,A}	3.655±0.81 ^{a,A}	3.60±0.97 ^{a,A}	3.86±0.51 ^{a,A}
T2	2.88±0.37 ^{a,A}	3.26±1.64 ^{a,A}	3.99±0.46 ^{a,A}	3.47±0.04 ^{a,A}	3.52±1.36 ^{a,A}	3.87±0.98 ^{a,A}
T3	3.02±1.61 ^{a,A}	3.91±0.59 ^{a,A}	3.66±0.49 ^{a,A}	3.87±1.08 ^{a,A}	3.62±1.10 ^{a,A}	3.38±1.45 ^{a,A}
T4	2.75±1.34 ^{a,A}	3.61±0.98 ^{a,A}	4.22±0.48 ^{a,A}	4.00±0.91 ^{a,A}	3.93±0.37 ^{a,A}	3.11±2.01 ^{a,A}
T5	1.91±0.71 ^{b,A}	3.6±1.20 ^{ab,A}	5.87±0.96 ^{a,A}	4.04±0.81 ^{ab,A}	4.74±0.25 ^{ab,A}	5.51±0.26 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

(iii) Avaliação de alteração do pH

Os valores de pH obtidos para os diferentes tratamentos durante 40 dias estão apresentados na Tabela 19. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) dentre todos os tratamentos, comprovando que a aplicação das microcápsulas não comprometeu a acidez do produto cárneo. Segundo Beraquet (2000), carnes desossadas manualmente apresentam pH na faixa de 5,8-5,9 para carne de peito e 6,2-6,3 para coxa, ou seja, o pH da carne foi mantido o mesmo após o processamento e ao longo dos 40 dias de análise.

Dessa maneira, com os valores de pH não diminuindo durante os 40 dias, pode-se inferir que não houve crescimento de bactérias lácteas (FRANZ & HOLY, 1996). Além disso, como será visto no item (vi), não houve a percepção de gosto ácido por parte dos provadores na análise sensorial, característica esperada quando ocorre proliferação de bactérias lácticas. Diminuição no pH durante estocagem refrigerada foi apresentado por Raju e colaboradores (2003), Horng e colaboradores (2002) e Candogan & Kolsarici (2003) quando estudada salsicha de peixe, frango e de carne de boi, respectivamente.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por Trindade e colaboradores (2008) quando foi estudada a estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C . Neste caso foram obtidos valores de pH próximos de 6,4 e 6,6 nos diferentes tratamentos ao longo de 99 dias de estocagem. Os valores de pH obtidos por Kulkarni e colaboradores (2011) para salsichas abrangeram a faixa de 6,1 a 6,5 e de 6,2 a 6,4 no tempo zero e depois de 4 meses de estocagem quando estudado o

efeito do extrato de semente de uva na estabilidade oxidativa, sensorial e na cor de salsicha pré-cozida, congelada e reaquecida.

Badr & Mahmoud (2011) analisaram a influência do suco de cenoura na formulação de salsicha. Os valores de pH também foram semelhantes com os obtidos neste trabalho, estando dentro da faixa de 6,15 a 6,22.

Tabela 19. Valores de pH para cada tratamento durante 40 dias.

Tratamentos/ dias	5	12	19	26	33	40
T1	6,03±0,36 ^{a,A}	5,93±0,54 ^{a,A}	6,03±0,15 ^{a,A}	6,04±0,19 ^{a,A}	6,00±0,19 ^{a,A}	5,88±0,27 ^{a,A}
T2	6,20±0,05 ^{a,A}	5,92±0,40 ^{a,A}	5,94±0,12 ^{a,A}	5,97±0,15 ^{a,A}	5,94±0,09 ^{a,A}	5,89±0,29 ^{a,A}
T3	6,08±0,12 ^{a,A}	5,87±0,50 ^{a,A}	5,93±0,21 ^{a,A}	5,85±0,27 ^{a,A}	5,83±0,30 ^{a,A}	5,82±0,37 ^{a,A}
T4	6,10±0,17 ^{a,A}	5,92±0,39 ^{a,A}	6,05±0,21 ^{a,A}	5,91±0,21 ^{a,A}	5,93±0,22 ^{a,A}	5,8±0,23 ^{a,A}
T5	6,20±0,02 ^{a,A}	5,98±0,28 ^{a,A}	6,11±0,24 ^{a,A}	6,03±0,17 ^{a,A}	6,00±0,18 ^{a,A}	6,00±0,20 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

(iv) Avaliação do Perfil de Textura Instrumental durante armazenamento refrigerado

Os valores obtidos para dureza para cada tratamento durante o decorrer de 40 dias estão apresentados na Tabela 20. Observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) dentre os tratamentos em um mesmo intervalo de tempo, no entanto não houve variação para o mesmo tratamento durante todo o

intervalo de tempo analisado. Em relação ao tratamento T3, essa estabilidade pode ser atribuída à liberação gradual do ácido ascórbico durante o processamento e armazenamento.

Os tratamentos T3 e T4 apresentaram menor resistência a deformações externas mostrando valores de dureza quase que 30% menores do que os tratamentos T1, T2 e T5. Segundo Hedrick e colaboradores (1994), a proteína cárnea, representada pelas proteínas miofibrilares (actina e miosina) é o principal componente responsável pela dureza das salsichas. Desta maneira, o fato dos tratamentos T3 e T4 apresentarem menor dureza pode ser explicado pela maior quantidade de ingredientes presente nas formulações e, conseqüentemente, pequena redução na quantidade de proteínas cárneas. A menor dureza foi correlacionada positivamente com a aceitação global da análise sensorial, concluindo-se que quanto menor essa resistência, apresentada pelo tratamento com microcápsulas (T3), melhor é a aceitação do consumidor (Tabela 20 e Figura 40).

Filho e colaboradores (2010) avaliaram a inclusão de CMS de peixe obtida da filetagem de tilápia do Nilo em salsichas. Os valores de dureza obtidos diminuíram de 13.196g (0% de CMS) para 881g (100% de CMS). Maqsood, Benjakul & Balange (2012) avaliaram o efeito da adição do ácido tânico e extrato de madeira kiam em salsicha de peixe durante estocagem refrigerada e obtiveram valores de dureza dentro da faixa de 37,33 a 38,77 N no dia zero e de 28,32 a 34,21 N com 20 dias de armazenamento. Observa-se que os valores de dureza obtidos para salsicha de carne de peixe são menores do que os obtidos para salsicha de frango.

Tabela 20. Valores de dureza (g) para cada tratamento durante 40 dias.

Dias/ Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
5	7108,6±1232,8 ^{a,A}	7005,7±770,5 ^{a,AB}	5200,2±744,9 ^{a,C}	5819,8±792,6 ^{a,BC}	6132,1±942,1 ^{a,ABC}
12	7241,4±683,2 ^{a,A}	6471,8±1137,5 ^{a,A}	4715,6±668,8 ^{a,B}	5059,1±645,2 ^{a,B}	6563,2±725,6 ^{a,A}
19	6229,4±1107,7 ^{a,A}	6743,3±792,9 ^{a,A}	4765,6±713,8 ^{a,B}	5854,2±882,5 ^{a,AB}	6788,8±1123,6 ^{a,A}
26	6835,4±5±877,6 ^{a,,A}	6902,5±771,8 ^{a,A}	4538,3±593,6 ^{a,C}	5469,2±741,4 ^{a,BC}	6108,9±921,2 ^{a,AB}
33	6863,4±1102,6 ^{a,AB}	7343,7±349,1 ^{a,A}	5384,1±796,3 ^{a,C}	5503,8±824,9 ^{a,C}	6063,7±833,1 ^{a,BC}
40	7269,04±689,9 ^{a,A}	6775,7±1041,7 ^{a,A}	5139,8±954,8 ^{a,C}	5534,9±883,2 ^{a,BC}	6338,5±774,9 ^{a,AB}

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

Hayes e colaboradores (2011) avaliaram a adição de luteína, sésamo, ácido elágico e extrato de folha de oliveira em salsichas de carne de porco. Valores de dureza neste caso foram obtidos entre 57,99 e 75,86 N e entre 68,44 e 76,93 N em dois e doze dias de armazenamento refrigerado. O aumento nos valores entre os dois dias analisados pode ser relacionado à desestabilização da emulsão cárnea devido à separação da água e da carne da matriz proteica.

(v) Determinação da cor instrumental

Para a determinação da cor instrumental, valores de L^* , a^* e b^* foram medidos, sendo esses parâmetros correspondentes à luminosidade, variação do verde (-) ao vermelho (+) e variação do azul (-) ao amarelo (+), respectivamente. Os valores de L , a^* e b^* apresentados nas Tabelas 21, 22 e 23 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) dentre os tratamentos e intervalos de tempo analisados. Dessa maneira, a aplicação das microcápsulas não ocasionou alteração na cor da salsicha. Os valores obtidos para a^* e b^* são considerados baixos devido à ausência de corante, além de ter sido utilizada carne de frango, que apresenta menor teor de mioglobina em comparação às carnes vermelhas.

O pequeno valor determinado para cor vermelha (parâmetro a^*) pode ser atribuído à presença de nitrito no condimento utilizado na formulação das salsichas. Segundo Price & Schweigert (1971) e Uyara e colaboradores (2008), uma das reações responsáveis pela coloração vermelha é a oxidação dos pigmentos para metamioglobina, a qual é reduzida e combinada com óxido nítrico, formando o pigmento nitrosomioglonina, que após o cozimento é transformado no pigmento rosado nitrosohemocromo.

Maqsood, Benjakul e Balange (2012) estudaram o efeito do ácido tânico e extrato de madeira kiam na oxidação lipídica e propriedades da textura de salsichas de peixe durante armazenamento refrigerado. Os autores analisaram o efeito na cor da salsicha e observaram que não há diferença significativa dentre os tratamentos. Foram obtidos valores de L^* dentro da faixa de 73,34 a 76,32, valores de a^* na faixa de 4,61 a 4,96 e valores de b^* na faixa de 20,69 a

21,85. Neste caso, por se tratar de salsichas de peixe, os tratamentos obtidos apresentaram maior luminosidade, menor tendência ao vermelho e maior ao amarelo do que as salsichas obtidas neste trabalho.

Tabela 21. Valores de L para cada tratamento durante 40 dias.

Tratamentos/ dias	5	12	19	26	33	40
T1	66,76±1,54 ^{a,A}	66,13±1,8 ^{a,A}	67,27±0,82 ^{a,A}	66,67±2,1 ^{a,A}	67,45±1,44 ^{a,A}	68,22±2,35 ^{a,A}
T2	69,24±1,30 ^{a,A}	66,56±0,86 ^{a,A}	67,02±2,55 ^{a,A}	67,18±0,41 ^{a,A}	67,93±0,38 ^{a,A}	70,08±1,15 ^{a,A}
T3	66,11±2,12 ^{a,A}	65,00±1,87 ^{a,A}	65,06±0,79 ^{a,A}	65,41±0,36 ^{a,A}	65,91±0,57 ^{a,A}	66,23±0,27 ^{a,A}
T4	66,02±0,36 ^{a,A}	63,78±0,18 ^{a,A}	64,55±2,24 ^{a,A}	65,83±0,89 ^{a,A}	64,14±1,82 ^{a,A}	67,38±1,24 ^{a,A}
T5	66,26±1,42 ^{a,A}	65,93±1,24 ^{a,A}	67,47±1,63 ^{a,A}	67,04±0,19 ^{a,A}	66,82±1,50 ^{a,A}	66,64±0,76 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

Os valores de L* e a* obtidos corroboraram com os dados apresentados por Hayes e colaboradores (2011) quando estudado o efeito da adição de luteína, sesamol, ácido elágico e extrato de folha de oliveira em salsichas de carne suína estocadas em embalagem aeróbicas e em atmosfera modificada. Neste caso, foram obtidos valores de L* na faixa de 54,27 a 62,05 durante 21 dias de estocagem, não havendo alterações nesse período. Já os valores de a* abrangeram a faixa de 4,34 a 5,21 no dia zero, no entanto, com diminuição para a faixa de 0,12 a 3,29 em 21 dias de armazenamento. Dessa maneira, as

salsichas mantiveram a claridade, da mesma maneira que as obtidas neste trabalho, diferenciando-se pela perda de cor relacionada à diminuição do teor de vermelho, o que não aconteceu com as salsichas adicionadas de microcápsulas de AA.

Tabela 22. Valores de a^* para cada tratamento durante 40 dias.

Tratamentos/ dias	5	12	19	26	33	40
T1	5,16±0,04 ^{a,A}	4,96±0,28 ^{a,A}	5,20±0,03 ^{a,A}	5,18±0,32 ^{a,A}	5,44±0,08 ^{a,A}	5,10±0,014 ^{a,A B}
T2	5,07±0,34 ^{a,A}	5,17±0,06 ^{a,A}	5,08±0,06 ^{a,A}	5,23±0,79 ^{a,A}	5,45±0,40 ^{a,A}	5,05±0,33 ^{a,A B}
T3	5,63±0,88 ^{a,A}	5,85±1,03 ^{a,A}	5,75±0,64 ^{a,A}	5,63±0,84 ^{a,A}	5,85±0,84 ^{a,A}	5,53±0,05 ^{a,A B}
T4	5,52±0,74 ^{a,A}	5,44±0,97 ^{a,A}	5,67±0,91 ^{a,A}	5,65±0,81 ^{a,A}	5,89±0,77 ^{a,A}	5,58±0,45 ^{a,A}
T5	5,12±0,15 ^{a,A}	4,99±0,29 ^{a,A}	4,88±0,003 ^{a,A}	4,89±0,62 ^{a,A}	5,07±0,92 ^{a,A}	4,29±0,42 ^{a,B}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23. Valores de b^* para cada tratamento durante 40 dias.

Tratamentos/ dias	5	12	19	26	33	40
T1	9,93±0,68 ^{a,A}	10,37±0,96 ^{a,A}	10,10±0,63 ^{a,A}	9,81±0,33 ^{a,A}	10,19±0,5 ^{a,A}	9,98±0,49 ^{a,A}
T2	9,92±1,17 ^{a,A}	9,74±1,20 ^{a,A}	10,11±0,95 ^{a,A}	10,04±0,47 ^{a,A}	10,76±1,61 ^{a,A}	10,23±1,09 ^{a,A}
T3	11,06±1,12 ^{a,A}	11,63±1,53 ^{a,A}	11,03±0,74 ^{a,A}	11,23±1,07 ^{a,A}	11,42±0,91 ^{a,A}	11,36±2,07 ^{a,A}
T4	10,28±0,62 ^{a,A}	10,60±0,81 ^{a,A}	10,47±0,65 ^{a,A}	11,08±0,84 ^{a,A}	10,75±0,74 ^{a,A}	10,83±0,61 ^{a,A}
T5	10,12±1,95 ^{a,A}	10,34±2,31 ^{a,A}	9,97±1,69 ^{a,A}	10,15±0,92 ^{a,A}	10,13±1,45 ^{a,A}	9,72±1,16 ^{a,A}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

(vi) Avaliação da aceitação sensorial durante o armazenamento refrigerado

Os resultados da avaliação sensorial demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) para todos os atributos (aroma, cor, textura, sabor e aceitabilidade geral) quando comparados dentre os tratamentos, sendo o tratamento T3 (com microcápsulas) um dos preferidos pelos consumidores (Figura 40). Não houve diferença significativa no decorrer do armazenamento para nenhum dos tratamentos e atributos avaliados, o que comprova a estabilidade oxidativa dos produtos durante o intervalo de tempo de 40 dias. Mesmo para o tratamento Controle, que apresentou aumento ($p < 0,5$) do índice de TBARS ao longo do tempo, os consumidores não atribuíram notas inferiores ($p > 0,05$) ao final do armazenamento. As notas obtidas a cada atributo no decorrer de 40 dias estão apresentados na Figura 40.

Segundo Counsell & Hornig (1981), odores de ranço podem ser detectados por provadores treinados e não treinados com TBARS na faixa de 0,1 a 1,0 e 0,6 a 2 mg malonaldeído/Kg de amostra, respectivamente. No entanto, mesmo apresentando valores de TBARS acima desses (de 1,91 a 3 e de 3,11 a 5,5 com 5 e 40 dias, respectivamente), os provadores não rejeitaram as amostras durante os 40 dias analisados, atribuindo notas entre “gostei ligeiramente e gostei regularmente” para a maioria dos atributos.

O atributo que recebeu as menores notas foi a *Cor*, devido a ausência de corante na formulação. Uyhara e colaboradores (2008) estudaram a adição dos corantes naturais urucum e carmim de cochonilha em salsichas de tilápia do Nilo. Foi observado que os tratamentos que receberam a adição de pigmentos receberam maiores notas para o atributo cor do que os tratamentos

sem a adição. Segundo Uyhara e colaboradores (2008), ao responderem à questão sobre o que mais gostaram nas salsichas, alguns provadores indicaram que era a coloração, dizendo que os tratamentos sem corante apresentaram coloração acinzentada, escura e com a aparência desagradável. Filho e colaboradores (2010) avaliaram a inclusão de CMS obtida dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo em salsichas. Os resultados obtidos mostraram que as notas referentes ao atributo *Cor* diminuiu conforme o aumento da concentração de CMS na formulação. O tratamento com maior nota possuía 0% de carne enquanto que o tratamento com menor nota possuía 100% de CMS. Isso pode ser explicado devido à escura coloração da salsicha com alta inclusão da CMS de peixe. Dessa maneira, observa-se que a baixa aceitação referente a cor, comumente determinada em salsichas, deve-se a ausência de pigmentação, o que pode ser facilmente solucionado com a adição de corantes em futuras aplicações.

Em relação aos atributos *Aroma* e *Sabor*, pode-se dizer que não houve comentários negativos dos provadores devido à utilização de carne de frango, carne frequentemente consumida pelos brasileiros. Observa-se na Figura 40 que houve diferença nas notas atribuídas para o *Sabor* entre os tratamentos T3/T4 e T5. Isso pode ser explicado devido a maior taxa de oxidação do tratamento T5, influenciando nas notas finais da análise sensorial.

Já em relação ao atributo textura, observou-se diferença significativa dentre os tratamentos. Quanto menor a dureza, como mostrado na Tabela 20 e Figura 40, melhor foi a aceitação dos consumidores. Os tratamentos T3 e T4 (formulação com as microcápsulas e com os ingredientes livres) apresentaram

as melhores notas. Como já citado anteriormente, essa menor dureza pode ser explicada devido o efeito da diluição promovida pela inclusão das microcápsulas e dos ingredientes, sendo menor a concentração das proteínas cárneas.

Em relação à aceitabilidade geral, observou-se que houve diferença significativa dentre os tratamentos no mesmo intervalo de tempo. Verificou-se que o tratamento T3 foi o melhor aceito, seguido pelo tratamento T4. Pode-se dizer que as melhores notas atribuídas para a textura e para o sabor contribuíram para a maior aceitação global desses tratamentos. As salsichas produzidas por Uyhara e colaboradores (2008) quando estudada a adição de corantes em salsichas de tilápia do Nilo, obtiveram valores de média de aceitação global dentro da faixa de 5,63 a 5,83, valores bem menores do que os obtidos para as salsichas de frango adicionadas de microcápsulas de AA.

Filho e colaboradores (2010) obtiveram as melhores notas para o atributo *Aceitação global* para as salsichas adicionadas de 40 e 60% de CMS de peixe, seguidas pelas salsichas adicionadas de 20 e 80%. Neste caso a aceitação global foi positivamente correlacionada com os atributos *Textura* e *Sabor*, o mesmo acontecendo com as salsichas de frango deste estudo. Isso sugere que a textura e o sabor são importantes atributos para a aceitação global das salsichas.

Figura 40. Avaliação sensorial de aroma, cor, textura, sabor e aceitação global dos tratamentos (T1 a T5) em 5, 20 e 40 dias de estocagem (T1: coluna da esquerda e T5: coluna da direita).

- Diferentes letras no mesmo intervalo de tempo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
- T1: Salsicha com eritorbato;
- T2: Salsicha com ácido ascórbico livre;
- T3: Salsicha com ácido ascórbico microencapsulado;
- T4: Salsicha com ácido ascórbico livre + ingredientes utilizados na encapsulação;
- T5: Salsicha sem antioxidante – controle.

4.4 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos, foi possível a obtenção de salsicha de frango adicionada de microcápsulas de ácido ascórbico sem comprometer as qualidades físico-químicas e tecnológicas do produto final. Todos os tratamentos obtiveram valores de umidade e atividade de água condizentes com os normalmente encontrados para salsichas e não apresentaram alteração nos valores de pH e cor instrumental no decorrer de 40 dias em armazenamento refrigerado. Os valores de TBARS mostraram que foi possível a liberação do AA encapsulado, pela desintegração das microcápsulas durante o processamento e/ou armazenamento, isto devido à estabilidade oxidativa apresentada na salsicha. Pode-se afirmar que os resultados obtidos para a textura (dureza) e análise sensorial estão relacionados, mostrando que quanto menor o valor da dureza, melhor a aceitação global, sendo a salsicha com adição das microcápsulas melhor aceita pelos consumidores.

Desta forma, a encapsulação demonstra ser uma alternativa promissora para proteção do AA em produtos cárneos emulsionados e para produção de salsichas enriquecidas com a vitamina.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADR, H.M., MAHMOUD, K.A. Antioxidant activity of carrot juice in gamma irradiated beef sausage during refrigerated and frozen storage. **Food Chemistry**, v.127, p.1119-1130, 2011.

BERAQUET, N. J.; GALVÃO, M. T. E. L.; DA SILVA, R. Z. M. Influence of using mechanically separated chicken meat from different parts and levels on the chemical, physical and sensory properties of bologna type product. **38th International Congress of Meat Science and Technology**, Clermont-Ferrand, France, 1992.

BLOUKAS, J. G.; ARVANITOYANNIS, I. S.; SIOPI, A. A. Effect of natural colourants and nitrites on colour attribute of frankfurters. **Meat Science**, v. 52, n. 3, p. 257-265, 1999.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 4 de 31 de mar.2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Diário Oficial, Brasília, 05 abr. 2000, Seção 1, p.6-10.

CANDOGAN, K.; KOLSARICI, N. Storage stability of low-fat beef frankfurters formulated with carrageenan or carrageenan with pectin. **Meat Science**, v. 64, p.207-214, 2003.

CIRIANO, M.G-I., LAREQUI, E., REHECHO, S., CALVO, M.I., CAVERO, R.Y., NAVARRO-BLASCO, I., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D. Selenium, iodine, ω -3 PUFA and natural antioxidante from *Melissa officinallis* L.: A combination of

componentes from healthier dry fermented sausages formulation. **Meat Science**, v.85, p.274-279, 2010.

COUNSELL, J. N.; HORNIG, D. H. Vitamin C (ascorbic acid). England: **Applied Science**, 1981. Cap. 7.

DAROS, F. G.; MASSON, M. L.; AMICO, S. C. The influence of the addition of mechanically deboned poultry meat on the rheological properties of sausage. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 185-189, 2005.

DILLARD, C. J., & TAPPEL, A. L. Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phosphatidylalanine. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 8, p.183–189, 1973.

ESPINOZA-ATENCIA, E. **Fotoxidação de óleos de soja e de milho acondicionados em embalagens plásticas**. Campinas,1996, 150p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4, p. 366-374, 2010.

FILHO, P.R.C.O., FAVARO-TRINDADE, C.S., TRINDADE, M.A., BALIEIRO, J.C.C., VIEGAS, E.M.M. Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v.67, n.2, p.183-190, 2010.

FILHO, P. R. C. O., NETTO, F. M., RAMOS, K. K., TRINDADE, M.A., VIEGAS, E.M.M. Elaboration of Sausage using minced fish of Nile Tilapia filleting waste. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.6, p.1383-1391, 2010.

FIORDA, F. A.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação do pH e atividade de água em produtos cárneos. **Estudos**, v.36, n.5/6, p.817-826, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Proteínas do peixe: Propriedades funcionais das proteínas do peixe. **Revista Food Ingredients Brasil**, n.8, 2009.

FRANCO, C. F. O.; SILVA, F. C. P.; CAZÉ-FILHO, J.; BARREIRONETO, M.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; FONTINÉLLI, I. S. C. **Urucuzeiro: Agronegócio de Corantes Naturais**. João Pessoa: Emepa, SAIA, 2002. 120p.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLY, A.V. Bacterial populations associated with pasteurized vacuum-packed Vienna sausages. **Food Microbiology**, v. 13, p.165-174, 1996.

HAYES, J.E., STEPANYAN, V., ALLEN, P., O'GRADY, M.N., KERRY, J.P. Evaluation of the effects of selected plant-derived nutraceuticals on the quality and shelf-life stability of raw and cooked pork sausages. **Food Science and Technology**, v.44, p.164-172, 2011.

HEDRICK, H. B.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; LUDGE, M. D.; MERKEL, R. A. **Principles of Meat Science**. 3º ed. Kendal/Hunt, Dubuque, 1994.

HORNG, L.J.; HUI, L.Y.; CHIN, K.C. Effect of dietary fish oil on fatty acid composition, lipid oxidation and sensory property of chicken frankfurters during storage. **Meat Science**, v. 60, p.161-167, 2002.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. New York, **Nutrition Reviews**, v. 51, p. 33, 1993.

KULKARNI, S., DeSANTOS, F.A., KATTAMURI, S., ROSSI, S.J., BREWER, M.S. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked frozen, re-heated beef sausage model system. **Meat Science**, v.88, p.139-144, 2011.

MAQSOOD, S., BENJAKUL, S., BALANGE, A.K. Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.130, p.408-416, 2012.

MARCHESI, C. M., CICHOSKI, A. J., ZANOELO, E. F., DARIVA, C. Influência das Condições de Armazenamento sobre os Pigmentos Cárneos e a cor do salame Italiano Fatiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 697-704, 2006.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3rd ed. Boca Raton: **CRC**, 1999. 390p.

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; OKAUCHI, Y.; NAGAOKA, S. Kinetic Study of Reactions. Between Tocopheroxyl Radicals and Fatty Acids. **Lipids**, v.28, p.753, 1993.

NAWAR, W. W. In **Lipids**; Fennema, O. R., ed.; Marcel Dekker: New York, p. 139, 1985.

PARKS, L.L.; CARPENTER, J.A. Functionality of six non meat proteins in meat emulsion systems. **Journal of Food Science**, v.52, n.2, p.271-274, 1987.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **The Science of Meat and Meat Products**. 2. ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1971.

RAJU, C.V.; SHAMASUNDAR, B.A.; UDUPA, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and refrigerated ($6 \pm 2^{\circ}\text{C}$) temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.171-185, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p.94, 1999.

TRINDADE, M. A.; CONTRERAS, C. C.; FELÍCIO, P. E. Mortadella sausage formulations with partial and total replacement of beef and pork backfat with mechanically separated meat from spent layer hens. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 236-241, 2005.

TRINDADE, M.A., NUNES, T.P., CONTRERAS-CASTILLO, C.J., FELÍCIO, P.E. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente

separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p.160-168, 2008.

UYHARA, C.N.S., FILHO, P.R.C.O., TRINDADE, M.A., VIEGAS, E.M.M. Adição de corantes em salsichas de tilápia do Nilo: efeito sobre a aceitação sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.4, p.271-278, 2008.

Capítulo 5. CONCLUSÃO GERAL

CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO GERAL

Como já citado, o AA é muito instável quando em contato com luz, aquecimento, oxigênio, entre outros fatores. Diante do exposto, no decorrer dos resultados apresentados, pode-se inferir que sua encapsulação foi uma alternativa para a minimização dos problemas causados pela sua instabilidade.

Dois métodos de encapsulação foram discutidos neste trabalho: coacervação complexa e dispositivos microfluídicos. A encapsulação do AA foi viável em ambos os métodos, uma vez que foi conferida alta eficiência de encapsulação e maior estabilidade ao material encapsulado do que a solução de AA livre. O melhor tratamento obtido pelo método de coacervação complexa foi o tratamento AA4 (proporção gelatina, goma arábica e AA de 1:1:0,75 e 0,25g/mL de polímero), com condicionamento a temperatura ambiente (20 a 22°C). Já para o método por dispositivos microfluídicos, o tratamento onde se adicionou a quitosana, pelo conjunto dos resultados e simplicidade da fórmula, pode ser considerado o tratamento mais adequado para a encapsulação do AA. Ou seja, as condições aplicadas foram suficientes para obtenção de um excelente desempenho no que diz respeito à proteção do AA durante o armazenamento mesmo a temperatura ambiente.

Para a escolha do melhor tratamento a ser aplicado na salsicha, foi levado em consideração a concentração e estabilidade do AA, além da quantidade de material necessário a ser produzido para a obtenção da concentração final de AA desejada na salsicha e o local e tempo disponíveis para a realização do processo. Dessa maneira foi aplicado o tratamento AA4

(proporção gelatina, gomara arábica e AA de 1:1:0,75 e 0,25g/mL de polímero) obtido pelo método de coacervação complexa.

Em relação à aplicação, pode-se afirmar que a obtenção de salsicha de frango adicionada de microcápsulas de ácido ascórbico foi possível sem comprometer as qualidades físico-químicas e tecnológicas do produto final durante 40 dias de armazenamento refrigerado. O tratamento T3 (com adição das microcápsulas) foi o melhor aceito pelos consumidores, sendo necessária, para um trabalho futuro ou aplicação comercial, a adição de corante na formulação.

APENDICE A – FICHA UTILIZADA NA ANÁLISE SENSORIAL

Nome: _____ Data: _____ **Ficha** _____

Você está recebendo uma amostra de **SALSICHA DE FRANGO**. Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

Número da amostra _____

		Nota	
ESCALA 1-Desgostei muitíssimo 2-Desgostei muito 3-Desgostei moderadamente 4-Desgostei ligeiramente 5-Nem gostei/nem desgostei 6-Gostei ligeiramente 7-Gostei regulamente 8-Gostei muito 9-Gostei muitíssimo	AROMA		Comentários:
	COR		Comentários:
	TEXTURA		Comentários:
	SABOR		Comentários:
	ACEITABILIDADE GERAL		Comentários:

APENDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa:

"Avaliação sensorial de salsicha de carne de ave adicionada de
microcápsulas de ácido ascórbico".

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: A emulsão cárnea pode ser definida como um sistema composto por glóbulos de gordura envolvida por uma matriz formada de água e proteína. Sendo um produto rico em gordura, o mesmo está susceptível a oxidação lipídica, a qual é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo. Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes. O ácido

ascórbico é um eficaz antioxidante, que faz parte de um grupo de substâncias químicas necessárias para o funcionamento adequado do organismo, além de possuir função vitamínica, no entanto é muito instável. Este trabalho tem o objetivo de produzir microcápsulas de ácido ascórbico, visando proteção da vitamina C e minimizando este problema.

Objetivos do projeto: O objetivo deste projeto é a encapsulação do ácido ascórbico utilizando a técnica de emulsão dupla seguida por coacervação complexa, visando proteção e liberação controlada. Essas cápsulas serão aplicadas em produtos cárneos emulsionados, com a finalidade de avaliar sua funcionalidade e o perfil sensorial do consumidor.

Procedimentos:

A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de ANÁLISE SENSORIAL. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Sessenta provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas formulações salsichas com diferentes composições.
- O provador deverá avaliar (olhar, provar) os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da participação nesta pesquisa.**
- **Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconto** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.**
- Os testes para avaliação sensorial das salsichas, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela aluna proponente (Talita Aline Comunian).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Avaliação sensorial de salsicha de carne de ave adicionada de microcápsulas de ácido ascórbico".

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário.

Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Aluna de Pós Graduação responsável: Talita Aline Comunian - Eng. de Alimentos – FZEA – USP. Contato: talita.comunian@usp.br Cel: 14 99614 1400

Pirassununga, ____ de _____ de _____.

Assinatura: _____

APENDICE C: LISTA DE PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

1) Artigos completos publicados em periódicos:

- COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v.52, p.373-379, 2013 (versão completa apresentada no APENDICE D).

2) Resumos publicados em anais de congressos:

- COMUNIAN, T.; THOMAZINI, M.; MATOS JR, F. E.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Characterization of ascorbic acid microcapsules obtained by the double emulsion technique followed by complex coacervation. South-American Symposium on Microencapsulation, Limeira, Brasil, 2012.
- COMUNIAN, T.A.; THOMAZINI, M.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; OKURO, P.K.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Evaluation of double emulsion followed by complex coacervation methods to microencapsulate ascorbic acid. IFT 2012: IFT Annual Meeting & Food Expo, Las Vegas, Estados Unidos.
- COMUNIAN, T.A.; ABBASPOURRAD, A.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; WEITZ, D.A. Caracterização de macrocápsulas de ácido ascórbico obtidas por dispositivos microfluídicos. III Workshop em Microfluídica, Campinas, São Paulo, 2013.

- COMUNIAN, T.A., MATOS JUNIOR, F.E., ALVES, A.J.G., THOMAZINI, M., FAVARO-TRINDADE, C.S. Assessment of stability and Fourier transform infrared spectroscopy of ascorbic acid microcapsules. International Symposium on the Properties of Water: ISOPOW 2013, Fiskebäckskil, Suécia.
- COMUNIAN, T.A., ABBASPOURRAS, A., FAVARO-TRINDADE, C.S., WEITZ, D.A. Evaluation of ascorbic acid microcapsules obtained by microfluidic devices. XXI International Conference on Bioencapsulation, Berlim, Alemanha, 2013.

3) Prêmios obtidos durante a execução do trabalho:

- Certificado de Mérito recebido no IFT Annual Meeting & Food Expo, na cidade de Las Vegas, Estados Unidos pelo trabalho “*Evaluation of double emulsion followed by complex coacervation methods to microencapsulate ascorbic acid*” ter sido escolhido entre os 6 melhores trabalhos dentro da área de Engenharia de Alimentos.

APENDICE D – ARTIGO COMPLETO PUBLICADO

Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release

Talita A. Comunian, Marcelo Thomazini, Ana Julia Gouvêa Alves, Fernando Eustáquio de Matos Junior, Júlio C. de Carvalho Balieiro, Carmen S. Favaro-Trindade*

Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CP 23, CEP 13535 900, Pirassununga, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2013
Accepted 16 March 2013
Available online 2 April 2013

Keywords:

Vitamin C
Stability
Encapsulation efficiency
Encapsulation
Double emulsion
Gelatin
Gum arabic

ABSTRACT

Ascorbic acid (AA) is an efficient antioxidant that exhibits vitamin function but is naturally unstable. To overcome this problem, the objective of the present study was to improve AA microencapsulation by complex coacervation using both gelatin and gum arabic as encapsulating agents. To make the coacervation of a hydrophilic core material viable, a water-in-oil emulsion was first prepared using corn oil, a 30% solution of AA and polyglycerol polyricinoleate (PGPR 90), as the surfactant. Nine microcapsule formulations were prepared containing gelatin, gum arabic and AA at ratios of 1:1:0.5, 1:1:0.75 and 1:1:1, with 0.025, 0.05 and 0.075 g/mL of the polymer, respectively. The morphology of the freeze-dried microcapsules was analyzed by optical microscopy and scanning electronic microscopy. The water activity, hygroscopicity, solubility, particle size, encapsulation efficiency, Fourier transform infrared spectroscopy and stability of the encapsulated material were also examined. All of the microcapsule formulations were spherical, multinucleate and only slightly soluble and hygroscopic. The encapsulation efficiency was high (approximately 98%); therefore, it was possible to efficiently encapsulate AA using the double emulsion method followed by complex coacervation. The ascorbic acid was protected and more stable in the microcapsule than in solution, which suggests the possibility of controlled release under specific conditions and masking the acidic taste of AA.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antioxidants are compounds that can either inhibit or reduce the lipid oxidation of fats, oils and fatty foods, as well as having functional mechanisms that have been widely studied (Mukai, Morimoto, Okauchi, & Nagaoka, 1993). Ascorbic acid (AA) is an important antioxidant found naturally in fruits and vegetables. It is used as an ingredient or additive in foods as well as to fortify foods due to its antioxidant function. It is, however, a very unstable compound and easily degraded.

AA degradation is strongly influenced by reactions catalyzed by transition metal ions, such as Cu^{2+} and Fe^{3+} , heat, light, pH (in alkaline media), high oxygen concentration and high water activity, all of which results in the increase of both the solubility of the ascorbic acid and the oxygen dissolution. AA degradation is also associated with a loss of color both in the presence and absence of amines (Buettner, 1988a, 1993b; Fennema, Damodaran, & Parkin, 2010; Khan & Martell, 1967; Liao & Seib, 1987; Tannenbaum, Young, & Archer, 1985; Ukhun & Dibia, 1991). Microencapsulation could be used as an alternative to minimize the factors that interfere with the stability of AA, allow for controlled release and mask its acidic taste, which can be unappetizing.

According to Shahidi and Han (1993), microencapsulation can be defined as a process by which a membrane surrounds small particles of solids, liquids or gases with the objective of protecting the material from the adverse conditions of the environment, such as light, moisture, oxygen and interactions with other compounds. Microencapsulation can also stabilize the product, increase its shelf life and promote controlled release from the capsule under pre-established conditions. Coacervation is a chemical colloidal phenomenon that can be defined as “the partial immiscibility of two or more isotropic liquids, at least one being in the colloidal state” (Soper, 1995). This technique can be used to encapsulate lipophilic materials, and because AA is a hydrophilic compound, this study proposed an adaptation for applying this technique in practice. Thus, before coacervation, a primary W/O emulsion was prepared, followed by a double W/O/W emulsion.

The encapsulation of AA represents a promising alternative to overcome problems related to its application and its instability. There have been multiple studies in the literature that have addressed this topic, but they used different methods and encapsulating agents. For example, Trindade and Grosso (2000) encapsulated AA by spray drying using gum arabic and rice starch as the wall materials. Pierucci, Andrade, Baptista, Volpato, and Rocha-Leão (2006) also microencapsulated AA by spray drying using a concentrated pea protein as the wall material. Uddin, Hawlader, and Zhu (2001) compared the characteristics of AA microcapsules prepared by different techniques,

* Corresponding author.

E-mail address: carmenft@usp.br (C.S. Favaro-Trindade).

including melt dispersion, solvent dispersion and spray drying, whereas Lee, Ahn, and Kwak (2004) microencapsulated AA by spray drying with polyacylglycerol monostearate for use in milk fortification. Farhang, Kakuda, and Corredig (2012) studied the stability of AA encapsulated in liposomes stored at 4 °C at two pH values (pH 3 and pH 7), and Rozman and Gasperlin (2007) encapsulated AA by W/O micro-emulsions. In general, all of these studies showed an effective increase in the stability of AA compared to the material in its free form in solution. Currently, however, there are no reports in the literature concerning the microencapsulation of AA using complex coacervation. Thus, the objective of this study was to microencapsulate AA by complex coacervation, structurally and physicochemically characterize the capsules obtained, and determine the stability of the encapsulated material.

2. Material & methods

2.1. Material

Pure ascorbic acid (AA) (Synth, Diadema/SP, Brazil) was used as the active material, and corn oil (Cargill, Brazil) was used to prepare the simple emulsion. Food grade gelatin (Gelita South America, Brazil) and gum arabic (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brazil) were used as the wall materials for the preparation of the double emulsion, and polyglycerol polyricinoleate (PGPR 90) (Danisco, Denmark) was used as the emulsifier.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of microcapsules

The microcapsules were formed according to the method described by Mendenha et al. (2009), with some modifications. The primary (W/O) emulsion was prepared using a 30% (w/w) solution of AA and corn oil at a ratio of 1:2 (w:w) plus 0.5% (w/w) of the lipophilic emulsifier PGPR 90 (Danisco, Denmark). The formulation for the primary emulsion was defined based on preliminary trials, which contained some varying factors, such as the AA:oil proportion and mixing speed. The stability of the primary emulsions was determined by visual evaluation of the phase separation and the occurrence of creaming.

The primary W/O emulsions were emulsified with the gelatin solutions to obtain the double W/O/W emulsions. The emulsions (both the simple and the double emulsions) were prepared at 12,000 rpm for 4 min and 10,000 rpm for 3 min, respectively, in an Ultraturrax. The gum arabic solutions were added to the double emulsions at 40 °C with the aid of magnetic stirring.

To promote complex coacervation, the pH value was adjusted to 4.4 at 40 °C with hydrochloric acid solution (1 mol/L) with constant magnetic stirring, and the temperature was gradually lowered to 10 °C. The coacervated material was stored at 7 °C for 24 h to allow for decantation, and the coacervates were then frozen (−18 °C) and dehydrated by sublimation in a Terroni (Brazil) freeze dryer. The operation conditions were as follows: process time of 12 h, pressure of 1–0.1 kPa, condenser temperature of −20 °C and final temperature of 30 °C.

Nine ascorbic acid microcapsule formulations were prepared containing the following: gelatin, gum arabic and AA at ratios of 1:1:0.5, 1:1:0.75 and 1:1:1, respectively, and 0.025, 0.05 or 0.075 g/mL of the polymer. The formulations were denoted as AA1 to AA9; the first three were at the ratio of 1:1:0.5, and so on (Table 1). The selection of these concentrations was based on the study by Silva, Favaro-Trindade, Rocha, and Thomazini (2012).

2.2.2. Characterization of the microcapsules

2.2.2.1. Encapsulation efficiency. The encapsulation efficiency was determined after washing as a function of the difference in total mass of AA detected in the capsules and that detected at the surface. Both AA measurements were carried out using the A.O.A.C. (1984, chap.

Table 1

Composition of the various treatments developed during the production of the microcapsules.

Treatment	Polymer solution concentration (%)	Core solution concentration in relation of total polymer concentration (%)
1	2.5	50
2	5	50
3	7.5	50
4	2.5	75
5	5	75
6	7.5	75
7	2.5	100
8	5	100
9	7.5	100

Polymer concentration/core concentration: w/w.

39) method, as modified by Benassi and Antunes (1988). A 1% oxalic acid (w/w) solution containing 0.025% 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) (w/v) was used to measure the ascorbic acid levels by titration. Approximately 50 mg of DCPIP was dissolved in 100 mL of hot water (40–50 °C) containing 42 mg of NaHCO₃. This solution was diluted with 200 mL of water after cooling. Treatments were titrated in a solution of 1% oxalic acid (w/w). The ascorbic acid concentration in the samples was calculated according to the amount of depleted solution in the titration compared with the standardized solution of DCPIP.

The microencapsulation efficiency was calculated using Eq. (1).

$$\text{Encapsulation efficiency} = \frac{(\text{total acid} - \text{surface acid}) \times 100}{\text{total acid}} \quad (1)$$

2.2.2.2. Morphological characterization of the microcapsules by optical and scanning electronic (SEM) microscopy. The microcapsules were characterized using both the Bel Photonics BIO3 optical microscope (Italy) and the Hitachi Tabletop TM 3000 scanning electronic microscope (Tokyo, Japan) equipped with the TM 3000 program. The samples did not receive any treatment and were not sputtered prior to scanning electronic microscopy.

2.2.2.3. Particle size analysis. The Shimadzu SALD-201V laser diffraction particle analyzer (Kyoto, Japan) was used to determine the particle size and size distribution using Vaseline as the sedimentation medium for the simple emulsions and distilled water for the double emulsions and coacervates, according to the technique published by Comunian et al. (2011).

2.2.2.4. Water activity. The water activity was determined using AQUALAB equipment (Decagon Devices, Pullman, WA, USA).

2.2.2.5. Hygroscopicity. The methodology described by Cai and Corke (2000) was adopted to determine the hygroscopicity, with some modifications. Approximately 0.2 g of the sample was placed in a desiccator containing a saturated solution of Na₂SO₄ for one week to confer a relative humidity of 81%. The hygroscopicity was determined by measuring the mass of water absorbed per 100 g of sample after 7 days of storage.

2.2.2.6. Solubility. The solubility of the microcapsules was determined by a gravimetric method published by Eastman and Moore (1984) and cited by Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, and Cal-Vidal (2005). The method consisted of adding 0.5 g of the sample to a conical flask containing 50 mL of distilled water and homogenizing the mixture using an orbital shaker (Tecnal, Piracicaba, Brazil) at 100 rpm for 30 min at room temperature. The solution was then centrifuged at 3500 rpm for 5 min in a Beckman centrifuge (Brea, USA), and a

25 mL aliquot of the supernatant was transferred to a previously weighed porcelain dish and maintained in an oven at 105 °C until complete evaporation of the water.

The solubility was calculated as based on Eq. (2).

$$S = [(final\ weight \times 2)/(initial\ weight)] \times 100 \quad (2)$$

2.2.2.7. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The spectra of both the ingredients and the microcapsules were obtained in the range from 4000 to 600 cm^{-1} using a Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts, USA) with the aid of the Spectrum One version 5.3.1 software.

2.2.2.8. Stability of the encapsulated material. The levels of AA in the microcapsules were monitored using the A.O.A.C. (1984, chap. 39) method as modified by Benassi and Antunes (1988) and compared with the free AA levels in solution. The AA present in the microcapsules was extracted using 0.4 g of the sample into 10 mL of extraction solution containing 5% NaCl and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). A 1% oxalic acid solution (w/w) containing 0.025% 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) (w/v) was used to measure the ascorbic acid levels by titration as previously described above. The analyses were carried out in triplicate at 0, 7, 15, 30 and 60 days after encapsulation, and the materials were stored in glass jars and protected from light and the presence of oxygen, with a relative humidity controlled at 33% and a room temperature of 20 ± 2 °C. Stability analyses were also carried out under the same conditions at a temperature of 37 ± 2 °C.

2.2.2.9. Statistical analysis. The analyses were performed by a completely randomized design, and the process was repeated twice. The data obtained were analyzed statistically by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests using version 9.1.3 of the SAS (Statistical

Analysis System) statistical program (SAS, 1995). The results were considered to be statistically significant when $\alpha \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Morphological characterization of the microcapsules by optical and scanning electronic microscopy

Fig. 1A, B and C shows optical microscopy images of the production of both simple and double emulsions as well as of the coacervated microcapsules. An evaluation of the images obtained showed that the different concentrations of core and wall materials presented similar morphological characteristics and caused no modifications in the morphology of the microcapsules obtained.

The microcapsules were shown to be in the form of a reservoir in which the core was perfectly surrounded by the wall material. Optical microscopy also showed that the microcapsules obtained were rounded, which facilitated their flow, and multinucleated with defined walls, which should confer greater protection of the core. Such morphological characteristics were also observed by Alvim and Grosso (2010) when these authors produced microcapsules of paprika oleoresin by complex coacervation using gelatin and gum arabic as the encapsulating agents.

The coacervates obtained were freeze-dried, with the objective of making their application easier and conferring greater stability on the microcapsules. Fig. 1D shows the aspect of the microcapsules obtained by coacervation and freeze-drying. Agglomerates of the microcapsules can be observed connecting by solid bridges, which is typical of coacervated microcapsules that were subsequently freeze-dried. This same phenomenon was described by Alvim and Grosso (2010) and by Saravanan and Panduranga Rao (2010), both of whom also produced coacervated microcapsules. The solid bridges were also obtained by Rocha-Selmi, Bozza, Thomazini, Bolini, and Favaro-Trindade (2013)

Fig. 1. A) Micrograph of the simple emulsion obtained by optical microscopy (100×). B) Micrograph of the double emulsion of treatment AA7 obtained by optical microscopy (100×). C) Micrograph of the coacervated microcapsule (prior to freeze-drying) of treatment AA7 obtained by optical microscopy (100×). D) Micrograph of freeze-dried coacervated microcapsules from treatment AA7 obtained by scanning electron microscopy (100×).

when aspartame was microencapsulated by double emulsion followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic.

Although bonding was observed between the freeze-dried microcapsules, they rehydrated easily in an aqueous medium and rapidly reassumed the aspect, as shown in Fig. 1C.

3.2. Water activity, encapsulation efficiency, hygroscopicity and solubility

Table 2 shows the values obtained for the water activity, encapsulation efficiency, hygroscopicity and solubility for all the treatment combinations. The values obtained for the encapsulation efficiency were high, varying between 97.33 ± 0.81 and 99.57 ± 0.32 . Though there was a significant difference between the treatments, the differences can be considered as small, indicating that neither different proportions of core material nor the encapsulating agent interfered with the mass of active material to be encapsulated. The high values obtained for the encapsulation efficiency indicated that the methodology chosen to encapsulate AA was adequate for the proposed objective and was highly effective because a significant amount of AA was found on the inside of the microcapsule, but only a small amount was found on the surface.

Mendanha et al. (2009) observed encapsulation efficiency values between 78 and 91% for microcapsules of casein hydrolysate obtained by double emulsion followed by complex coacervation using soy protein isolate and pectin as the encapsulating agents. Okac (2012) obtained encapsulating efficiencies ranging from 44.13 ± 1.39 to $73.73 \pm 1.10\%$ from the production of lavender oil microcapsules by complex coacervation using hydrolyzed collagen and chitosan as the encapsulating agents. However, Saravanan and Panduranga Rao (2010) obtained a wide range of encapsulation efficiencies (between 2.92 and 96.3%) due to the use of different encapsulating agents in the production of metronidazole hydrochloride, diclofenac sodium and indomethacin microcapsules by complex coacervation using combinations of pectin/alginate and alginate/gelatin as the wall materials. Lutein was microencapsulated by complex coacervation using gelatin and gum arabic as the wall materials, which resulted in an encapsulation efficiency of $85.32 \pm 0.63\%$ (Qv, Zeng, & Jiang, 2011). Jun-xia, Hai-yan, and Jian (2011) microencapsulated sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate and gum arabic and obtained a range of encapsulation efficiency from approximately 75 to 90%, which was dependent on the core, macromolecule species and sucrose/SPI ratio. The ratio of encapsulation efficiency obtained by Rocha-Selmi et al. (2013) ranged from 45.15 ± 1.86 to 71.70 ± 0.58 . They microencapsulated aspartame by double emulsion followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic. Silva et al. (2012)

studied the microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation and obtained encapsulation efficiency percentages ranging from 89.5 ± 1.1 to 93.2 ± 2.1 . Lee et al. (2004) obtained encapsulation efficiencies between 80.7 and 94.2% when encapsulating AA by spray drying using polyacrylglycerol.

A comparison of the values obtained for the water activity (A_w) showed that the different microencapsulation combinations had activities below 0.6. Because there is no possibility of microbial growth below an A_w value of 0.6, all of the microencapsulations were microbiologically stable, (Fennema et al., 2010; Roberts, 1995).

Regarding the hygroscopicity, the free AA showed a significantly lower value than all of the AA microcapsule treatments. This result could be explained by the fact that the gelatin and gum arabic used as encapsulating agents showed higher values than the pure AA, resulting in higher values for the treatments. These values are most likely due to exposure of the polar groups of the encapsulating agents, which were able to absorb water from the environment. The values obtained for hygroscopicity in the present study were lower than the 33.46 ± 0.66 and 34.10 ± 1.20 g of water absorbed/100 g of powder, which were values obtained by Nori et al. (2011) when producing propolis microcapsules by complex coacervation using soy protein isolate and pectin as the encapsulating agents. Rocha-Selmi et al. (2013) obtained hygroscopicity values between 10.73 ± 0.25 and 13.43 ± 0.94 g water absorbed/100 g of sample for aspartame microcapsules that used gelatin and gum arabic as the encapsulating agents. However, lycopene microcapsules obtained by gelatin–pectin complex coacervation showed hygroscopicity values between 33.4 ± 0.8 and 36.8 ± 1.4 (Silva et al., 2012), which means that the results obtained in this work were better than the results found in the literature. Although the hygroscopicity values were higher than those of pure AA, they were still low, which makes packing, handling and application of the materials easier.

For the solubility parameter, there was a significant reduction in the values obtained for the treatments compared to both the pure AA and the encapsulating agents alone. This result was expected because microcapsules obtained by complex coacervation characteristically show reduced solubility in water, which confers the possibility of controlled release to the medium and alterations in ionic strength. The values from this study were similar to those obtained by Rocha-Selmi et al. (2013), which obtained solubility values between 9.46 and 21.37% for aspartame that was microencapsulated by double-emulsion followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic.

3.3. Analysis of particle size

The mean drop size obtained from the simple emulsion was $11.76 \pm 2.38 \mu\text{m}$. Table 3 shows the values obtained for the drop sizes from the double emulsions and of the particles in the coacervates prior to freeze drying. As expected, the mean drop sizes produced by double emulsion were smaller than the mean sizes of the non-dehydrated coacervated microcapsules because the double emulsion corresponds to the second step in the process and coacervation corresponds to the final step, in which gum arabic is added as a coating, which should confer greater protection of the AA. There was a significant difference among the treatments, indicating that different core/encapsulating agent ratios affected the mean diameter of the particles corresponding to the double emulsions and coacervates.

There are many factors that interfere with the particle size produced by complex coacervation, such as the velocity and time of homogenization. Mendanha et al. (2009) obtained values between 16 and $24 \mu\text{m}$ for casein hydrolysate microcapsules produced by complex coacervation using a double emulsion and pectin and soy protein isolates as the wall materials, which were much lower values than those obtained in the present study. This difference could be attributed to the mixing velocity and the polymers used, which were both different

Table 2
Measurement of water activity, hygroscopicity, solubility and encapsulation efficiency of the various microcapsule formulations.

Treatments	Water activity	Hygroscopicity (g/100 g of powder)	Solubility (%)	Encapsulation efficiency (%)
AA1	0.38 ± 0.05^c	4.92 ± 0.21^a	$13.26 \pm 1.59^{b,c}$	97.33 ± 0.81^c
AA2	0.51 ± 0.002^a	4.00 ± 0.35^a	13.81 ± 0.53^b	$98.00 \pm 0.61^{b,c}$
AA3	$0.41 \pm 0.02^{b,c}$	4.37 ± 0.26^a	16.50 ± 0.95^a	$98.44 \pm 0.37^{a,b,c}$
AA4	$0.40 \pm 0.12^{b,c}$	3.95 ± 0.27^a	11.10 ± 0.07^d	97.41 ± 1.06^c
AA5	0.38 ± 0.03^c	3.96 ± 0.64^a	10.26 ± 0.15^c	$98.48 \pm 0.51^{a,b,c}$
AA6	$0.48 \pm 0.004^{a,b}$	3.83 ± 0.27^a	14.30 ± 0.38^b	99.57 ± 0.32^a
AA7	0.37 ± 0.01^c	4.12 ± 0.15^a	8.14 ± 0.51^f	$98.99 \pm 0.53^{a,b}$
AA8	0.38 ± 0.01^c	4.30 ± 0.32^a	11.60 ± 0.29^c	99.57 ± 0.19^a
AA9	$0.48 \pm 0.01^{a,b}$	4.32 ± 0.83^a	14.16 ± 0.49^b	$98.20 \pm 1.00^{b,c}$
Gelatin	0.61 ± 0.02	27.16 ± 0.06	31.91 ± 1.71	–
Gum arabic	0.41 ± 0.01	38.13 ± 1.73	95.70 ± 0.62	–
AA in powder	0.69 ± 0.01	0.04 ± 0.02	30.00 ± 0.00	–

There were no significant differences among the samples with the same letters in the same column ($p < 0.05$).

Table 3

Average diameters of the droplets and capsules corresponding to the double emulsions and the coacervates, respectively.

Treatments	Droplets corresponding to the double emulsion (μm)	Coacervated microcapsules before freeze drying (μm)
AA1	63.11 ± 4.43^a	81.91 ± 4.99^a
AA2	42.25 ± 4.42^b	$70.93 \pm 1.07^{a,b}$
AA3	$31.59 \pm 5.61^{b,c}$	$71.21 \pm 0.34^{a,b}$
AA4	$38.82 \pm 4.06^{b,c}$	$79.81 \pm 0.97^{a,b}$
AA5	$37.90 \pm 3.11^{b,c}$	83.82 ± 4.14^a
AA6	27.42 ± 1.70^c	65.98 ± 6.46^b
AA7	61.86 ± 3.44^a	$79.20 \pm 0.68^{a,b}$
AA8	$38.81 \pm 0.16^{b,c}$	$71.10 \pm 4.68^{a,b}$
AA9	26.59 ± 2.55^c	51.67 ± 2.77^c

There were no significant differences among the samples with the same letters in the same column ($p < 0.05$).

from those used in the present study. However, the mean diameters obtained by Alvim and Grosso (2010) varied from 43.7 to 96.4 μm when producing paprika oleoresin microcapsules by complex coacervation using gelatin and gum arabic as the encapsulating agents. Saravanan and Panduranga Rao (2010) obtained a very wide variation in values ranging from 41.34 to 120.94 μm due to the use of different encapsulating agents in the production of metronidazole hydrochloride, diclofenac sodium and indomethacin microcapsules by complex coacervation using combinations of pectin/alginate and alginate/gelatin as the wall materials.

3.4. Fourier transform infrared spectroscopy

As observed in the spectra (Fig. 2), the molecules of gelatin and gum arabic showed complex interactions causing a wide range of vibrational absorptions of the corresponding chemical groups. According to Silverstein, Webster, and Kiemle (2007), the lack of absorption in the characteristic regions of the functional groups can be used as evidence of the absence of these groups in the molecular structure. However, some structural characteristics could present a wide band, making their recognition difficult.

An analysis of the spectra showed that the samples were similar, with the only differences observed in the intensity of the peaks, which is related to either a smaller or greater amount of the component used in the formulation of the microcapsule. Because of this, the authors opted to present only the spectra of treatment AA4 in comparison with those of the ingredients used to produce the microcapsules.

The peaks appearing at approximately 3300 cm^{-1} for the gelatin and gum arabic were characteristic of the amine groups that appear in the residues of basic amino acids such as arginine, lysine and histidine, which (depending on the pH) can be positively charged. The peaks that appear with low intensity at approximately 2900 cm^{-1} for the gum arabic are characteristic of carboxylic groups that are negatively charged. The binding of positive and negative charges (i.e., amino and carboxyl groups) is expected to promote the process of coacervation and the formation of amides. A peak can be observed at approximately 1465 cm^{-1} on the spectra of treatment AA4, which could indicate the presence of an amide, confirming the formation of

Fig. 2. FT-IR spectra of the gelatin, gum arabic and the coacervated microcapsule of treatment AA4.

Fig. 3. Stability of pure ascorbic acid in solution (expressed as percentages).

this complex. Additionally, there is no characteristic peak for the amine group (at 3300 cm^{-1}) in the treatments, suggesting that the available amino groups on the encapsulating agents had become involved in bonding.

3.5. Stability of the encapsulated material

As shown in Fig. 3, AA in its free form in solution was completely degraded after 15 and 30 days of storage at the temperatures of 37 °C and 20 °C, respectively. These results highlight the instability of this compound in solution during storage. According to Fennema et al. (2010), AA is highly susceptible to oxidation, and the process is accelerated by the presence of oxygen, high A_w and neutral pH values.

Degradation of the encapsulated AA was also observed, but at a slower rate (Table 4). After 30 days at 20 °C, the microcapsules still maintained 57 to 80% of the initial concentration of AA. At the higher temperature of 37 °C, the microcapsules maintained 32 to 44% of the initial concentration of AA, thus proving the deleterious effect of temperature on the encapsulated material.

The AA4 combination (ratio of 1:1:0.75 with 0.025 g/mL of polymer) was the treatment that generated the most effective microcapsules with respect to the protection of AA at both temperatures. The microcapsules produced by treatment AA4 maintained 73% of the

initial concentration of AA after 60 day storage at 20 °C. This result was superior to those obtained by Farhang et al. (2012) and by Rozman and Gasperlin (2007). Farhang et al. (2012) studied the stability of AA encapsulated in liposomes stored at both pH 3 and pH 7 at 4 °C and observed approximately 67% retention of the original AA after 7 weeks of storage. Rozman and Gasperlin (2007) encapsulated AA by way of W/O microemulsions, obtaining 60% retention of the AA after 30 days at room temperature.

In general, an increase in the concentration of the encapsulating material did not result in a significant increase in the protection of AA. To the contrary, samples produced with 2.5% of the encapsulating agent resulted in microcapsules that offered greater protection to AA. This result can be explained by the fact that the samples produced with 2.5% of the encapsulating agent showed slightly larger mean diameters than the higher polymer percentages (Table 3). When evaluating the system as a whole (the powders from each treatment), the greater the size of the microcapsule, the smaller the exposed surface of AA, which could explain the greater efficiency in protecting the AA.

4. Conclusions

According to the proposed objectives and the results obtained, this study showed that the use of the double emulsion technique prior to complex coacervation made it possible to obtain microcapsules with a hydrophilic core. The high values obtained for the encapsulation efficiency of AA proved the effectiveness of this technique for encapsulation.

The low hygroscopicity values obtained proved that the powder could be easily stored and handled. The spherical structure of the non-dehydrated microcapsules also facilitated their application and flow. The reduced values observed for the solubility were also important for guaranteeing AA release under controlled conditions.

All of the treatment combinations conferred protection of AA compared to the free form in solution. The conditions that conferred the greatest stability of AA were conditioning at room temperature (20 °C) and treatment AA4 (ratio of 1:1:0.75 of gelatin, gum arabic and AA with 0.025 g/mL of polymer).

Acknowledgments

The authors thank FAPESP for the scholarship conceded (Process 2011/03882-9).

Table 4
Stability of AA in the microcapsules stored for 60 days at temperatures of 20 and 37 °C, expressed as percentages.

Temperature (°C)	Treatments	1 day		7 days		15 days		30 days		60 days	
20	AA1	97.33 ± 0.81	A;a	88.91 ± 2.40	B;a	75.48 ± 2.51	C;b	70.01 ± 5.44	C;a	52.07 ± 0.79	D;b
	AA2	98 ± 0.61	A;a	94.28 ± 2.92	A;a	83.04 ± 2.56	B;a	67.41 ± 8.29	C;ab	62.18 ± 5.38	C;a
	AA3	98.44 ± 0.37	A;a	78.44 ± 5.18	B;b	67.54 ± 2.71	C;c	61.96 ± 2.69	C;b	36.25 ± 1.70	D;c
	AA4	97.41 ± 1.05	A;a	94.41 ± 3.61	A;a	84.15 ± 2.14	B;a	74.63 ± 5.13	C;a	73.6 ± 2.14	C;a
	AA5	98.48 ± 0.51	A;a	89.95 ± 3.85	B;a	86.18 ± 6.17	B;a	57.41 ± 5.14	C;b	40.57 ± 2.39	D;b
	AA6	99.57 ± 0.32	A;a	90.33 ± 5.85	B;a	61.67 ± 14.30	C;b	59.48 ± 0.98	C;b	40.22 ± 5.72	D;b
	AA7	98.99 ± 0.53	A;a	83.99 ± 2.16	B;b	78.51 ± 3.86	B;a	80.01 ± 5.30	B;a	57.78 ± 2.75	C;a
	AA8	99.56 ± 0.18	A;a	84.52 ± 2.36	B;b	75.91 ± 4.83	C;a	70.88 ± 2.27	C;b	36.19 ± 1.51	D;b
	AA9	98.2 ± 1.00	A;a	94.35 ± 1.92	A;a	80.17 ± 6.83	B;a	68.99 ± 5.44	C;b	36.54 ± 1.26	D;b
37	AA1	97.33 ± 0.81	A;a	70.77 ± 5.29	B;b	61.14 ± 8.38	C;a	32.58 ± 1.81	D;b	20.62 ± 2.61	E;b
	AA2	98 ± 0.61	A;a	78.13 ± 5.42	B;a	56.56 ± 3.31	C;ab	41.28 ± 2.40	D;a	28.32 ± 0.33	E;a
	AA3	98.44 ± 0.37	A;a	66.14 ± 2.38	B;b	52.27 ± 2.14	C;b	38.67 ± 1.35	D;a	18.6 ± 1.31	E;b
	AA4	97.41 ± 1.05	A;a	81.23 ± 2.31	B;a	65.18 ± 3.38	C;a	44.81 ± 1.75	D;a	39.79 ± 4.17	D;a
	AA5	98.48 ± 0.51	A;a	78.01 ± 4.58	B;a	61.57 ± 5.82	C;a	37.14 ± 1.89	D;a	19.58 ± 2.33	E;b
	AA6	99.57 ± 0.32	A;a	77.77 ± 8.61	B;a	62.91 ± 4.18	C;a	44.11 ± 1.86	D;a	19.99 ± 1.84	E;b
	AA7	98.99 ± 0.53	A;a	64.63 ± 3.42	B;c	61.57 ± 5.20	B;a	44.21 ± 3.01	C;a	24.1 ± 0.60	D;a
	AA8	99.56 ± 0.18	A;a	70.27 ± 4.40	B;b	54.82 ± 5.76	C;b	34.87 ± 2.73	D;b	15.02 ± 1.32	E;b
	AA9	98.2 ± 1.00	A;a	81.19 ± 9.50	B;a	53.42 ± 1.55	C;b	32.37 ± 3.55	D;b	15.74 ± 1.50	E;b

Capital letters in the same row and small letters in the same column within each sub-group do not differ statistically by Tukey's test, where $\alpha = 0.05$.

References

- A.O.A.C. (1984). (16th ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Vol. 2. (pp. 3–5). 3–5 (Arlington).
- Alvim, I. D., & Grosso, C. R. F. (2010). Microparticles obtained by complex coacervation: Influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1069–1076.
- Benassi, M. T., & Antunes, A. J. (1988). A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 31(4), 507–513.
- Buettner, G. R. (1988). In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: Ascorbate as a test for catalytic metals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 27–40 (Chapter 16).
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 535–543.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science*, 65(6), 1248–1252.
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(4), 420–428.
- Comunian, T. A., Monterrey-Quintero, E. S., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., Piccone, P., Pittia, P., et al. (2011). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1259–1265.
- Eastman, J. E., Moore, C. O. (1984). Cold water soluble granular starch for gelled food composition. U.S. Patent 4465702.
- Farhang, B., Kakuda, Y., & Corredig, M. (2012). Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Dairy Science & Technology*, 92(4), 353–366.
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2010). *Química de Alimentos de Fennema* (4th ed.). Porto Alegre: Artmed, 366–374.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum arabic. *Food Chemistry*, 125, 1267–1272.
- Khan, M. M. T., & Martell, A. E. (1967). Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. II. Cupric and ferric chelate catalyzed oxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 89, 4176–4185.
- Lee, J. -B., Ahn, J., & Kwak, H. -S. (2004). L-Ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 495–500.
- Liao, M. -L., & Seib, P. A. (1987). Selected reactions of L-ascorbic acid related to foods. *Food Technology*, 41, 104–107.
- Mendanha, D. V., Molina Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42, 1099–1104.
- Mukai, K., Morimoto, H., Okauchi, Y., & Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of reactions. Between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipids*, 28, 753–756 (14 (4)).
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Alencar, S. M., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., & Castillo, C. J. C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 429–435.
- Okac, B. (2012). Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*, 100, 22–28.
- Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M., & Rocha-Leão, M. H. M. (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23(6), 654–662.
- Qv, X. -Y., Zeng, Z. -P., & Jiang, J. -G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 1–8.
- Roberts, T. A. (1995). Microbial growth and survival: Developments in predictive modeling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 297–309.
- Rocha-Selmi, G. A., Bozza, F. T., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. *Food Chemistry*, 139, 72–78.
- Rozman, B., & Gasperlin, M. (2007). Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. *Drug Delivery*, 14, 235–245.
- Saravanan, M., & Panduranga Rao, K. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 80, 808–816.
- SAS (1995). *User's guide: Basic and statistic*. 1.686 pp. Cary, NC: SAS.
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501–547.
- Silva, D. F., Favaro-Trindade, C. S., Rocha, G. A., & Thomazini, M. (2012). Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 185–190.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2007). *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. (7th ed.). New York: State University of New York, College of Environmental Science & Forestry. Translation: Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 70–71.
- Soper, J. C. (1995). Utilization of coacervated flavors. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (pp. 104–112). Washington, DC: American Chemical Society (Chapter 10).
- Tannenbaum, S. R., Young, V. R., & Archer, M. C. (1985). Vitamins and minerals. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry. Revised and expanded* (pp. 477–544) (2nd ed.). New York: Marcell Dekker.
- Trindade, M. A., & Grosso, C. R. F. (2000). The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *Journal of Microencapsulation*, 17, 169–176.
- Uddin, M. S., Hawlader, M. N. A., & Zhu, H. J. (2001). Microencapsulation of ascorbic acid: Effect of process variables on product characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 18(2), 199–209.
- Ukhun, M. E., & Dibie, E. N. (1991). The ascorbic acid contents of selected marketed foods and influence of water activity (A_w) during storage. *Food Chemistry*, 41, 277–283.