UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDO EUSTÁQUIO DE MATOS JUNIOR

Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por *spray chilling*

Pirassununga

2013

FERNANDO EUSTÁQUIO DE MATOS JUNIOR

Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por *spray chilling*

"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 da Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Pirassununga

2013

MATOS JUNIOR, F. E. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por *spray chilling*.** (2013). 153 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade **Instituição:** Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. **Instituição:**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. **Instituição:**

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

M433d

Matos Junior, Fernando Eustáquio de
Desenvolvimento, caracterização e aplicação de micro-cápsulas de ácido ascórbico obtida por spray-chilling / Fernando Eustáquio de Matos Junior. -- Pirassununga, 2013.
153 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos
Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.

1. Microencapsulação 2. Vitamina C 3. Estabilidade 4. Oxidação 5. Salsicha. I. Título.

Dedico esse trabalho à minha mãe e amiga, Sandra,

por seu amor e por me fazer acreditar que tudo é possível.

Agradecimentos

A Deus por permitir a realização de mais um sonho, por estar comigo nessa trajetória guiando os meus passos e dando força em todos os momentos, tenham sido eles bons ou ruins;

À Prof.ª Dr.ª Carmen Sílvia Fávaro Trindade pelas oportunidades, confiança e todo apoio dado ao longo dessa jornada. Muito obrigado pelo seu compromisso, respeito e preocupação durante esses anos, nossa convivência muito me ensinou.

Ao Marcelo Thomazini por todos os ensinamentos e colaborações indispensáveis para realização deste trabalho;

À Ana Julia, Ana Beatriz, Débora Abreu e Débora Anielli por toda disponibilidade e ajuda na execução das análises;

Aos meus companheiros de laboratório, Adja Cristina, Julio Pelissari, Milla Gabriela, Mariana Salvim, Paula Okuro, Talita Comunian, Volnei Brito, agradeço pela agradável convivência e a constante troca de conhecimento e experiência;

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Trindade pela orientação e apoio na parte de aplicação das micropartículas em salsicha;

À Ana Mônica Bittante, Carla Monaco, Ednelí Quintero, Guilherme Silva e Nilson Ferreira pelo auxílio e cortesia prestados sempre que precisei usar seus laboratórios;

Ao Elso Carlos do Matadouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga, meu muito obrigado por sua atenção e por tudo que me ensinou nos dois dias que estive no matadouro;

Aos funcionários do Serviço de Pós-Graduação, por toda ajuda e esclarecimentos ao longo desses quase três anos no que se refere à parte burocrática de um programa de mestrado;

À Prof.ª Dr.ª Beatrice Albertini e ao Dr. Marcello Di Sabatino da Facoltà di Farmacia da Università di Bologna pela oportunidade e por todos os ensinamentos que tanto contribuíram com este trabalho e para minha vida pessoal;

Aos meus amigos de Pirassununga, Ernesto Benedetto e Eneida Benedetto por toda ajuda e carinho que vocês tiveram comigo nos últimos dois anos, sou muito grato a vocês;

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de cursar o mestrado e pelos conhecimentos adquiridos;

À Vigor pelas doações da gordura utilizada nesse trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelos auxílios financeiros concedidos para realização do mestrado (2010/13117-5) e do estágio (2012/01907-7) na Università di Bologna na Itália que muito contribuiu para o enriquecimento desse trabalho.

Por muito tempo eu pensei que a minha vida fosse se tornar uma vida de verdade. Mas sempre havia um obstáculo no caminho, algo a ser ultrapassado antes de começar a viver, um trabalho não terminado, uma conta a ser paga. Aí sim, a vida de verdade começaria. Por fim, cheguei à conclusão de que esses obstáculos eram a minha vida de verdade. Essa perspectiva tem me ajudado a ver que não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho! - *Henrique de Souza Filho (Henfil)*

RESUMO GERAL

MATOS JUNIOR, F. E. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de microcápsulas de ácido ascórbico obtidas por *spray chilling*.** (2013). 153 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O aumento da conscientização por parte da população em relação ao impacto da alimentação no estado de saúde tem imposto à indústria de alimentos uma série de novos desafios, entre eles a necessidade de desenvolver alimentos com maior apelo de "saudabilidade" e que promovam bem-estar físico e mental. Em função das recentes exigências do consumidor, os compostos bioativos, aqueles capazes de otimizar funções fisiológicas atuando na promoção e prevenção da saúde têm sido alvos de inúmeras pesquisas. Incorporar compostos bioativos em alimentos é um difícil tarefa, pois muitos compostos bioativos são altamente susceptíveis à degradação quando incorporado à matriz alimentícia. Entre esses compostos está o ácido ascórbico, considerado um composto bioativo por ser um potente antioxidante, que além do seu papel no organismo humano, inclusive vitamínico, também exerce função de aditivo alimentar atuando como um antioxidante natural capaz de evitar ou retardar a oxidação de componentes da matriz alimentícia, evitando assim, alterações de cor e/ou odor desagradáveis. Uma alternativa viável e promissora de incorporar ácido ascórbico à matriz alimentícia evitando sua degradação seria o uso da tecnologia de microencapsulação. Das numerosas técnicas de microencapsulação disponíveis, *spray chilling,* também conhecida como *spray congealing* ou *spray cooling*, vem recebendo especial atenção nos últimos anos em função do seu baixo custo e facilidade de execução. Neste sentido, este trabalho objetivou-se estudar a microencapsulação do ácido ascórbico pela técnica de *spray chilling* e aplicar as micropartículas carregadas em um produto cárneo emulsionado, não apenas para desenvolvimento de um alimento contendo composto funcional, mas também para substituir o antioxidante

até então utilizado na indústria de alimentos para o produto cárneo em questão. O estudo foi dividido em 3 etapas, duas delas compreenderam o desenvolvimento e caracterização das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com ácido ascórbico e a terceira à aplicação do ácido ascórbico encapsulado em salsicha produzida com carne de frango. A estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado foi consideravelmente melhorada em comparação com sua forma livre. A tecnologia de *spray chilling* revelou-se como uma técnica eficaz de microencapsulação para atender o objetivo proposto. A aplicação do ácido ascórbico encapsulado em salsicha foi bem sucedida, foi produzido um alimento com características similares ao convencional, inclusive, com aceitação sensorial favorável. Foi atendido o objetivo de microencapsular o ácido ascórbico e promover sua aplicação em uma matriz alimentícia. Os resultados desse trabalho poderão subsidiar novos estudos com intuito de microencapsular outros compostos bioativos e de aplicar o ácido ascórbico microencapsulado em outras matrizes alimentícias seja com objetivo de desenvolver alimentos funcionais e/ou de substituir aditivos alimentares atualmente utilizados que não oferecem nenhum benefício adicional à saúde do consumidor por um composto que além de atuar como antioxidante na matriz alimentícia, tem função vitamínica e de composto bioativo no organismo favorecendo a manutenção da saúde do consumidor, e assim, atendendo as novas tendências de busca por alimentos mais saudáveis.

Palavras chave: microencapsulação, vitamina C, estabilidade, oxidação, salsicha.

ABSTRACT

JUNIOR MATOS, F. E. **Development, characterization and application of ascorbic acid microcapsules obtained by spray chilling.** (2013). 153 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The increased awareness on the part of the population in relation to the impact of food on health has imposed the food industry a series of new challenges, among them the need to develop foods with greater appeal of healthfulness and that promote well-being. Due to recents demands consumer, the bioactive compounds, those able to optimize physiological functions working in health promotion and disease prevention have been the targets of numerous studies. Incorporate bioactive compounds in foods is a difficult task because many bioactive compounds are highly susceptible to degradation when incorporated into the food matrix. Among these compounds is ascorbic acid, considered as a bioactive compound to be a potent antioxidant in addition to its role in the human body, including vitamin, also exerts a function as a food additive acting as a natural antioxidant can prevent or retard oxidation Component the food matrix, thus avoiding color change and/or unpleasant odor. A viable and promising alternative to incorporating ascorbic acid to the food matrix preventing their degradation would be the use of microencapsulation technology. Of the numerous techniques available microencapsulation, spray chilling, also known as spray congealing or spray cooling, has received special attention in recent years due to their low cost and ease of implementation. Thus, this work aimed to study the microencapsulation of ascorbic acid by spray chilling technique and apply the loaded microparticles in a emulsified meat product, not only for the development of a food containing functional compound, but also to replace the hitherto used antioxidant in the food industry for meat product in question. The study was divided into three stages, two of which comprised the development and characterization of solid lipid

microparticles loaded with ascorbic acid and third application of ascorbic acid produced sausage with encapsulated in chicken. The stability of the microencapsulated ascorbic acid has been considerably improved compared to the free form. The spray chilling technology proved to be an effective technique of microencapsulation to meet the objective. The application of ascorbic acid encapsulated in sausage was successful food was produced with characteristics similar to conventional inclusive, with favorable sensory acceptability. Was served the purpose of microencapsulate ascorbic acid and promote its application in a food matrix. The results of this study may support further studies aiming to microencapsulate other bioactive compounds and apply ascorbic acid microencapsulated other food matrix is aiming to develop functional foods and/or replace currently used food additives that offer no additional benefit to health consumer for a compound that in addition to acting as an antioxidant in food matrix has vitamin function and bioactive compound in the body favoring the maintenance of the health of the consumer, and thus, given the new trends search for healthier foods.

Keywords: Microencapsulation , vitamin C , stability , oxidation , sausage.

SUMÁRIO

Lista de Figuras 14

Lista de Tabelas 17

Introdução 19

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23

1 Introdução 24

2 Microencapsulação 26

2.1 Spray chilling 29

3 Microencapsulação de ácido ascórbico 27

Referências bibliográficas 36

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR SPRAY CHILLING 48

1 Introdução 50

2 Material e métodos 53

2.1 Material 53

2.2 Tratamentos 53

2.3 Métodos 55

2.3.1 Produção das microcápsulas 55

2.3.2 Caracterização das micropartículas 56

2.3.2.1 Análise morfológica 56

2.3.2.2 Tamanho de partícula 56

2.3.2.3 Eficiência de microencapsulação 57

2.3.2.4 Atividade de7água 57

2.3.2.5 Comportamento térmico 58

2.3.2.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – FTIR 58

2.3.2.7 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado 58

2.2.3.10 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico livre 59

2.2.4 Análise estatística 59

3 Resultados e discussão 60

3.1 Análise morfológica 60

3.2 Tamanho de partícula 61

3.3 Eficiência de microencapsulação 63

3.4 Atividade de água e umidade 67

3.5 Comportamento térmico 68

3.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – FTIR 70

3.7 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado 71

4 Conclusão 76

Referências bibliográficas 70

CAPÍTULO III - DESENOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ALTAMENTE CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR *SPRAY CONGEALING* 84

1 Introdução 85

2 Material e métodos 87

2.1 Material 87

2.2 Métodos 87

2.2.1 Produção das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com ácido ascórbico 87

2.2.2 Caracterização das micropartículas 91

2.2.2.1 Rendimento de processo 91

2.2.2.2 Eficiência de encapsulação 91

2.2.2.3 Tamanho de partícula 92

2.2.2.4 Análise morfológica 92

2.2.2.5 Análise térmica 93

2.2.3 Estudo da estabilidade do ácido ascórbico encapsulado 93

2.4 Análise estatística 93

3 Resultados e discussão 94

3.1 Caracterização das micropartículas 94

3.1.1 Rendimento de processo 94

3.1.2 Eficiência de encapsulação 95

3.1.3 Tamanho de partícula 97

3.1.4 Análise morfológica 98

3.1.5 Análise térmica 100

3.2 Estudo da estabilidade do ácido ascórbico encapsulado 104

4 Conclusão 106

Referências bibliográficas 107

CAPÍTULO IV - APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO EM SALSICHA DE CARNE DE FRANGO 113

1 Introdução 115

2 Material e métodos 118

2.1 Matéria prima 118

2.2 Formulações 118

2.3 Métodos 119

2.3.2 Processamento 119

2.3.3 Caracterização físico-química 120

2.3.3.1 Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento 120

2.3.3.2 Atividade de água e umidade 121

2.3.3.3 Análise de pH 122

2.3.3.4 Análise de cor instrumental 122

2.3.3.5 Avaliação do perfil de textura instrumental 122

2.3.3 Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado 122

2.3.4 Análise de aceitação sensorial 123

2.3.5 Análise estatística 124

3 Resultados e discussão 124

3.1 Caracterização físico-química 124

3.1.1 Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento 124

3.1.2 Atividade de água e umidade 126

3.1.3Análise de pH 126

3.1.5 Avaliação do perfil de textura instrumental 130

3.2 Avaliação da estabilidade oxidativa 131

3.3 Análise de aceitação sensorial 133

4 Conclusão 134

Referências bibliográficas 135

Conclusão geral 140

Apêndices 142

Apêndice A - Ficha utilizada na análise sensorial 143

Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido 143

Apêndice C - Lista de publicações resultantes do trabalho 146

Apêndice D - Artigo de revisão publicado 149

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura do ácido L-ascórbico 24

Figura 2 – Representação gráfica de micropartícula e microcápsula 27

Figura 3 – Esquema do processo de obtenção de micropartículas por s*pray chilling* ...32

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR SPRAY CHILLING

Figura 1 - *Spray-chiller* utilizado para produção das micropartículas 56

Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de: (A, B e C) micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas a partir de emulsão e observadas com diferentes magnificações (100x, 500X e 3000x, respectivamente); (D, E e F) micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas a partir de suspensão e observadas com diferentes magnificações (500x, 2000X e 3000x, respectivamente) 61

Figura 3 – Esquemas de estruturas das partículas. A) Partícula do tipo matriz produzida a partir de uma suspensão. B) Partícula do tipo matriz produzida a partir de uma emulsão. C) Partícula do tipo reservatório 65

Figura 4 - Termogramas dos ingredientes e micropartículas 69

Figura 5. Espectros dos ingredientes e micropartículas 72

Figura 6 – Estabilidade do ácido ascórbico em solução estocado a 7, 24 e 37°C e avaliado por 30 dias 73

Figura 7 – Estabilidade do ácido ascórbico em solução estocado a 7°C (A), 24°C(B) e 37°C(C) e avaliada por 60 dias 74

Figura 8. Evolução da aparência dos tratamentos imediatamente após o preparo (A) e armazenados a 7°C (B), 24°C (C) e 37°C (D) após 56 dias 75

CAPÍTULO III - DESENOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR *SPRAY CONGEALING*

Figura 1 – (A e B) Bico de atomização duplo fluido utilizado para produção de micropartículas lipídicas sólidas pela técnica de *spray congealing* 88

Figura 2 – (A) Ácido ascórbico em pilão de porcelana para maceração; (B) Ácido ascórbico macerado sendo peneirado utilizando peneira de 100 µm para obtenção de um pó fino 88

Figura 3 – (A) Lipídio puro fundindo; (B) Lipídio puro fundido; (C) Suspensão de lipídio e AA aquecida sendo agitada para posterior atomização 89

Figura 4 – (A) Câmara de atomização montada e bico de atomização posicionado para iniciar o processo; (B) Partículas sendo coletadas com auxílio de um pincel após o termino da atomização; (C) Partículas coletadas com auxílio de uma folha de papel ..89

Figura 5 – Verificação da presença e remoção de sujidades nas micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas por *spray congealing* 90

Figura 6 – Micropartículas acondicionadas em frasco de vidro âmbar adequadamente tampado e identificado 90

Figura 7 – Distribuição de tamanho das partículas lipídicas sólidas carregadas com AA 98

Figura 8 – Micrografias eletrônicas do AA anidro e das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA 99

Figura 9 – Termograma do ácido ascórbico e das micropartículas preparadas com óleo de palma hidrogenado em 3 concentrações de AA (15, 25 e 40%) 102

Figura 10 – Termograma do ácido ascórbico e das micropartículas preparadas com glicerol monoestearato vegetal em 3 concentrações de AA (15, 25 e 40%) 103

Figura 11 – Gráficos de estabilidade do AA encapsulado ao longo de 56 dias. (A e B) micropartículas produzidas com óleo de palma armazenadas a 22 e 37°C; (C e D)

micropartículas produzidas com glicerol monoestearato vegetal armazenadas a 22 e 37°C 107

CAPÍTULO IV - APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO EM SALSICHA DE CARNE DE FRANGO

Figura 1 – Fotos de etapas de produção da salsicha. A) Moagem do filé de coxa e sobrecoxa; B) Pesagem; C) Cominuição e homogeneização em cutter; D) Amarração de gomos após embutimento 121

Figura 2 - Valores de pH de salsichas analisados ao longo de 42 dias de estocagem refrigerada 128

Figura 3 - Mensuração dos valores de TBARS (mg malonaldeído/Kg amostra) para cada tratamento durante 42 dias de estocagem refrigerada 132

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR SPRAY CHILLING

Tabela 1 –Tratamentos 54
Tabela 2 - Formulações das emulsões e suspensões 54
Tabela 3 - Eficiência de encapsulação e diâmetro médio de volume das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA produzidas por *spray chilling* 62
Tabela 4 - Atividade de água (Aw) e umidade mensuradas após preparo das micropartículas 67

CAPÍTULO III - DESENOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR *SPRAY CONGEALING*

Tabela 1 - Composição das formulações utilizadas para produção das MLS carregadas com AA 91
Tabela 2 - Rendimento, ácido ascórbico superficial, eficiência de encapsulação (EE) e diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA produzidas por *spray congealing* 95

CAPÍTULO IV - APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO EM SALSICHA DE CARNE DE FRANGO

Tabela 1 - Formulação padrão para obtenção das salsichas elaborada com carne de frango 118
Tabela 2 - Composição de cada tratamento aplicado nas salsichas 119
Tabela 3 - Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento .125
Tabela 4 - Valores de L* para cada tratamento durante 42 dias 129
Tabela 5 - Valores de a* para cada tratamento durante 42 dias 129
Tabela 6 - Valores de b* para cada tratamento durante 42 dias 129
Tabela 7 - Valores de dureza (g) durante o período de estocagem refrigerada 130

Tabela 8 - Médias dos valores obtidos para cada atributo (aroma, cor, sabor, textura e aceitação global) da avaliação sensorial de salsicha de frango com ou sem ácido ascórbico 134

INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem vivenciado importantes mudanças impulsionadas pelo considerável aumento da demanda por alimentos com maior apelo a “saudabilidade”. A conscientização por parte da população sobre o impacto dos alimentos industrializados na saúde tem tornado os consumidores mais exigentes em relação à qualidade nutricional dos produtos alimentícios. Com esse novo comportamento do consumidor, o mercado de alimentos funcionais tem recebido atenção especial. Embora o número de produtos alimentícios funcionais e/ou orgânicos tenha tido um enorme crescimento nas últimas duas décadas, sua produção ainda representa um importante desafio para indústria.

Alimentos funcionais são aqueles que apresentam em sua composição um composto bioativo capaz de proporcionar benefícios ao organismo além da nutrição básica. Entre eles estão compostos químicos como isoflavonas, ômega 3, carotenoides como licopeno, luteína e zeaxantina, fibras alimentares, fitoesteróis, polióis, prebióticos e micro-organismos probióticos. Esses compostos são de naturezas diversas e responsáveis por diferentes benefícios fisiológicos, mas apresentam uma característica em comum, em maior ou menor grau, todos são susceptíveis a degradação durante o processamento ou estocagem do produto alimentício, tal fato faz com que a produção de alimentos contendo esses compostos seja um verdadeiro desafio. Como resultado para tal entrave, alguns compostos bioativos podem ser adicionados a um número limitado de matrizes alimentícias.

Uma alternativa viável para expandir a aplicação dos compostos bioativos, e assim, disponibilizar uma maior variedade de alimentos funcionais, seria a tecnologia de microencapsulação. Por intermédio desta tecnologia o composto bioativo é recoberto por outro material, designado como material de parede ou carreador, que funciona como uma barreira entre o composto bioativo e o meio ao qual este está inserido. A

microencapsulação é vantajosa, sobretudo, para evitar que fatores ambientais como, presença de oxigênio, pH, luminosidade, temperatura, presença de outros componentes, entre outros, possa comprometer a estabilidade e função do composto bioativo. Existem diversas técnicas de microencapsulação que se dividem em métodos físicos, químicos e físico-químicos. Não há uma técnica universalmente ideal, a escolha da técnica, assim como do material de parede, é feita levando-se em consideração diversos fatores como as características físico-químicas dos compostos bioativos, sua aplicação e custo da técnica, materiais de parede.

Entre as técnicas disponíveis, *spray chilling*, também designada com *spray cooling* ou *spray congealing*, tem se destacado por suas vantagens em relação às demais. É um método físico em que o composto bioativo é envolto por um material, quase sempre de natureza lipídica, pela formação de micropartículas lipídicas sólidas através da atomização da mistura do composto bioativo com o carreador fundido. É um método recente que se destaca pelo seu reduzido custo, facilidade de execução e por ser uma técnica considera ambientalmente limpa e que não gera resíduos, pois exclui a necessidade de utilização de solventes orgânicos e/ou água, bem como evaporação destes durante o processo.

Ácido ascórbico, que no organismo exerce função vitamínica, sendo por isso conhecido como vitamina C, é um dos compostos bioativos que poderia ter sua estabilidade favorecida pelo processo de microencapsulação. O ácido ascórbico que é adicionado ao alimento como um antioxidante para evitar a oxidação dos componentes da matriz alimentícia e assim preservar suas características físico-químicas, em especial a cor e o odor, é considerado um composto bioativo pela sua capacidade de contribuir para o sistema antioxidante do organismo, combatendo os radicais livres, que dependendo do estado de saúde do indivíduo, podem ser responsáveis pelo surgimento ou agravamento de doenças crônicas não transmissíveis. Por ser muito susceptível a diversos fatores ambientais, em especial à presença de oxigênio, luz e íons metálicos, a aplicação do ácido ascórbico é limitada para determinados alimentos, ou quando

presente pode limitar a vida de prateleira de alguns produtos, uma vez que sua degradação pode alterar as características sensoriais do alimento, em especial a cor.

A possibilidade de microencapsular o ácido ascórbico e adicioná-lo ao alimento permitiria não apenas conferir ao alimento propriedade funcional, mas também pode permitir a substituição de compostos artificiais utilizados como antioxidantes que não oferecem benefício algum à saúde do consumir. Um exemplo é a substituição do eritorbato de sódio adicionado como antioxidante em produtos cárneos emulsionados por ácido ascórbico, que além de atuar como antioxidante poderá propiciar apelo à "saudabilidade" do alimento.

Entre os produtos cárneos emulsionados, a salsicha é o mais consumido, inclusive, com forte apelo de consumo pelo público infantil. Teoricamente, a incorporação do ácido ascórbico livre poderia comprometer o processamento do produto e ter sua estabilidade reduzida, visto que a salsicha é um produto com alto teor de água e é submetida à tratamento térmico. Nesse sentido a microencapsulação do ácido ascórbico em gordura pela técnica de *spray chilling* pode ser uma importante alternativa para protegê-lo. Como o ácido ascórbico está encapsulado, não haveria contato com a massa da salsicha, assim, o ácido não reduziria o pH podendo comprometer o processamento do produto, ao mesmo tempo, não seria solubilizado, o que poderia reduzir drasticamente sua estabilidade. Durante o aquecimento da salsicha o carreador lipídico que envolve o ácido ascórbico é derretido e este é então liberado podendo exercer sua função antioxidante durante a vida de prateleira da salsicha. Esse é um exemplo de como o ácido ascórbico pode ser preservado durante o processamento do produto pelo emprego da tecnologia de microencapsulação, permitindo a produção de um alimento com maior apelo de "saudabilidade".

Considerando o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo microencapsular o ácido ascórbico através da técnica de *spray chilling*/*spray*

congealing, caracterizar as micropartículas obtidas, avaliar a estabilidade do ácido ascórbico encapsulado e aplicar essas micropartículas como ingrediente em salsichas produzidas com carne de aves, caracterizando e avaliando a estabilidade físico-química das salsichas produzidas.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (Figura 1) é um composto considerado como carboidrato cujas propriedades redutoras e de acidez são dadas pela porção 2,3-enediol (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Usado como sinônimo, o termo vitamina C refere-se a compostos que exibem total ou parcial atividade biológica do ácido L-ascórbico. Estes incluem os ésteres de ácido ascórbico, tais como palmitato de ascorbilo e formas sintéticas, tais como 6-desoxi-ácido L-ascórbico (YE et al., 2007). A oxidação de dois elétrons e a dissociação do hidrogênio convertem o ácido L-ascórbico para ácido L-deidroascórbico que exibe aproximadamente a mesma atividade biológica do ácido ascórbico, pois é reduzido a ácido ascórbico no organismo quase que por completo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

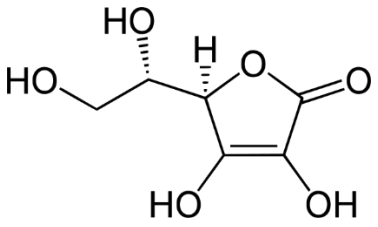

Figura 1 – Estrutura do ácido L-ascórbico

O ácido ascórbico é sintetizado em todas as plantas que contêm clorofila, no fígado e nos rins da maioria dos mamíferos, anfíbios, répteis e aves. O homem não é capaz de sintetizá-lo devido a ausência da enzima gulonolactona oxidase envolvida na biossíntese a partir de D-glicose.

O fornecimento orgânico da vitamina deve ser feito através da ingestão dietética. As principais fontes da vitamina são os alimentos de origem vegetal, incluindo frutas e verduras. Produtos de origem animal apresentam pouca vitamina C e os grãos não a possuem. De acordo com Silva e Cozzolino (2009) as recomendações de ingestão

dietética para vitamina C foram definidas como 75 mg para homens e 60 mg para mulheres adultos, aumentando 35 mg para indivíduos fumantes de ambos os sexos.

Embora o ácido ascórbico tenha sido isolado e identificado apenas por volta de 1933, relatos dos danos fisiológicos decorrentes de sua deficiência remontam à Idade Média. O escorbuto era comum entre os marinheiros durante as longas expedições marítimas dos séculos XV e XVI. Os marinheiros sofriam de sintomas do escorbuto como hemorragias capilares, sangramento gengival e amolecimento dos dentes, taxa reduzida de cicatrização de feridas, depressão e fadiga (NYYSSONEN et al., 2000). Nessa época os estudos do médico James Lind demonstram que o escorbuto era curado através do consumo de frutas cítricas, entre elas a laranja e o limão, mesmo sem o conhecimento da existência de vitaminas na época, o ácido ascórbico foi o primeiro nutriente cuja a deficiência foi reconhecida como causadora de doença (YE et al., 2007). Hoje o escorbuto é considerado uma doença rara, as frutas fazem parte da dieta de praticamente todos os povos e o fornecimento de vitamina C através de alimentos industrializados se tornou muito comum. Ao longo de todos esses anos o homem acumulou muitas informações científicas em relação as funções fisiológicas desta vitamina. Sabe-se que o ácido ascórbico participa de diversos processos metabólicos e fisiológicos, dentre atuação no sistema imunológico e nervoso, na formação do colágeno e síntese de ácidos biliares, corticoesteróides e epinefrina. Além de sua atuação como cofator enzimático, participa dos processos de óxido-redução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres, sendo considerado um dos mais importantes antioxidantes orgânicos (ARANHA et al., 2002).

Na indústria de alimentos o ácido ascórbico é amplamente utilizado devido a suas atividades redutoras e antioxidantes, por exemplo, na cura de carne e na inibição do escurecimento enzimático de frutas e vegetais. Pode ser adicionado ao alimento por meio de ácidos não dissociados ou neutralizados como o sal de sódio (ascorbato de sódio). A oxidação pode ocorrer pelos processos de transferência de elétrons simples ou dupla, sem detecção do intermediário semideidroascorbato (DAMODARAN, PARKIN

e FENNEMA, 2010). Além do seu papel na cura de carne e inibição do escurecimento enzimático de frutas e vegetais, o ácido ascórbico adicionado ao alimento tem como funções: ação redutora em massas acondicionadas, proteção de alguns compostos oxidáveis (por exemplo, folato) por efeitos redutores da desativação de radicais livres e de oxigênio, inibição da formação de nitrosaminas em carnes curadas e redução de íons metálicos (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

O grande problema do ácido ascórbico na indústria de alimentos está relacionado com a sua instabilidade frente aos fatores inerentes ao processamento de alimentos, tais como temperatura, oxigênio, pH e presença de outros componentes como os íons metálicos. O mecanismo de degradação do ácido ascórbico pode diferir dependendo da natureza do alimento ou do meio de reação, porém, independente do mecanismo a abertura do anel lactona destrói a atividade de vitamina C de maneira irreversível. Mais de 50 produtos de degradação já foram identificados. Os tipos e as concentrações são fortemente influenciados por fatores que promovem a degradação do ácido ascórbico. Embora esses compostos não apresentem relevância nutricional, promover alteração de cor e sabor (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

2 MICROENCAPSULAÇÃO

Em seu conceito clássico, a microencapsulação é considerada um processo de formação de partículas onde um ingrediente ativo é recoberto por uma fina camada de outro material, o que proporciona ao ingrediente proteção, liberação controlada e conveniência (HEGENBART, 1993). Essa tecnologia é aplicável a materiais líquidos, sólidos ou gasosos, sendo o material a ser encapsulado denominado como recheio, núcleo ou material ativo, e aquele utilizado para a cobertura é comumente chamado de material de parede, agente encapsulante, matriz ou carreador (GIBBS et al, 1999).

O material obtido pela microencapsulação pode ser designado como microcápsulas ou micropartículas, sendo essa classificação dependente da distribuição do material encapsulado na matriz (SPARKS, 1981). Nas microcápsulas o material ativo é envolto pelo agente encapsulante e encontra-se localizado na porção central, caracterizando-se assim, o tipo reservatório. Podem apresentar mais de um núcleo e/ou várias paredes para um mesmo núcleo. Já no caso das micropartículas o material encapsulado distribui-se por todo volume da partícula, podendo inclusive, permanecer uma parte na superfície da matriz (SCHROOYEN et al., 2001). Na Figura 2 são apresentados esquemas representando uma microcápsula e uma micropartícula.

As cápsulas ou partículas obtidas pela microencapsulação podem ser classificadas em relação ao seu tamanho em macro, micro e nanocápsulas, não havendo consenso entre os autores dos limites que diferenciam cada categoria. Sabe-se que o tamanho, assim como a forma, é dependente do agente encapsulante e da técnica de encapsulação utilizados (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA 2008).

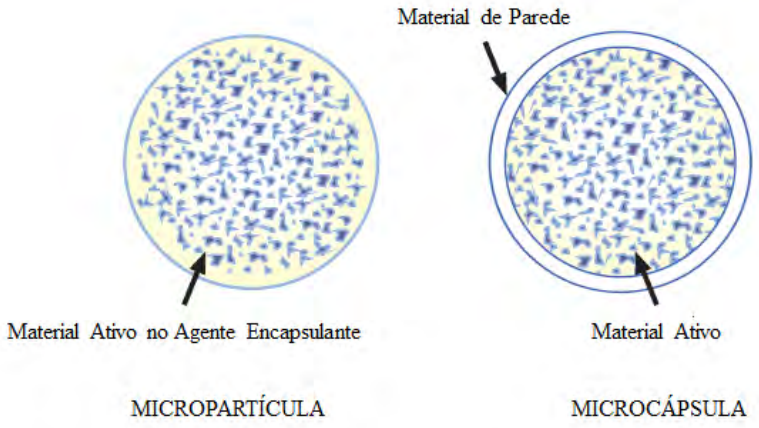

Figura 2 – Representação gráfica de micropartícula e microcápsula

Fonte: SUAVE, et al. (2007)

Vários são os materiais utilizados como agente encapsulante, dentre eles carboidratos (amidos, amidos modificados, goma arábica, ágar, alginato, maltodextrinas, quitosana,

ciclodextrinas, xarope de milho, celulose e derivados), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina e peptídeos) e lipídios (ácidos graxos, álcoois graxos, ceras, parafinas, óleos e gorduras hidrogenadas) (JACKSON e LEE, 1991; PASSERINI et al, 2003). Na escolha do agente encapsulante deve-se atentar principalmente a fatores como a técnica que será empregada para obtenção das microcápsulas/micropartículas, o tamanho de partículas e mecanismos de liberação desejados, as propriedades físico-químicas do material, aplicação do produto final, escala de produção e custo (RÉ, 2000).

Os mecanismos de liberação do material ativo encapsulado variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a fenômenos como: variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BAKAN, 1973; BRANNON-PEPPAS, 1993).

Existem vários métodos para microencapsulação, sendo que a escolha do método ideal depende de alguns fatores, entre eles o tipo de material que se deseja encapsular e o objetivo da encapsulação. Os métodos disponíveis podem ser agrupados em métodos físicos (extrusão estacionária, bocal submerso, extrusão centrífuga, bocal vibrante, *spray drying*, *spray chilling*/*spray cooling*/*spray congealing*, disco rotativo, *pan coating*, suspensão por ar, leito fluidizado, co-cristalização e liofilização) métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular e polimerização *in situ*) e físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, lipoesferas e evaporação de solvente) (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

Quanto aos objetivos da microencapsulação a lista é extensa e está diretamente relacionada com a área para qual se destina o componente encapsulado. Sabe-se que a microencapsulação representa interesse em diferentes áreas, tais como a cosmética,

farmacêutica, agrícola, veterinária e mais recentemente a de alimentos. Na indústria de alimentos a encapsulação de componentes alimentícios tem como principais objetivos: redução da reatividade do material ativo com o ambiente, diminuição da volatilidade ou de transferência do material ativo para o meio, facilitação da manipulação do material encapsulado, promoção de liberação controlada, mascaramento de sabor e/ou odor desagradáveis e proteção ao material ativo contra condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (SHAHIDI e HAN, 1993).

Embora alguns autores como Desai e Park (2005) relatem que a microencapsulação de ingrediente alimentícios vem sendo utilizada pela indústria há mais 60 anos, deve-se reconhecer que quando se estabelece comparação com as indústrias de fármacos e cosméticos, a microencapsulação na área de alimentos ainda pode ser vista como um campo recente, que tem recebido maior atenção nos últimos anos graças aos compostos bioativos, entre outros motivos. Estes são compostos que quando ingeridos são capazes de desempenhar funções benéficas ao organismo humano além das funções nutricionais básicas. Nas duas últimas décadas cresceu consideravelmente o interesse pelo desenvolvimento de alimentos contendo compostos bioativos, porém, muitas vezes a incorporação desses ingredientes à matriz alimentícia enfrenta alguns inconvenientes como alteração de sabor e/ou odor, baixa estabilidade do composto ativo em decorrência de fatores ambientais, interação negativa com outros componentes do alimento etc., que podem ser resolvidos com uso da encapsulação (KUANG, OLIVEIRA e CREAN, 2010).

2.1 *Spray chilling*

Entre as diversas técnicas utilizadas para microencapsulação, *spray chilling*, também designado como *spray colling* ou *spray congealing*, vem recebendo especial atenção em decorrência de suas vantagens em relação às demais técnicas. Baixo custo e alto

desempenho são alguns dos atrativos associados ao processo de obtenção de micropartículas lipídicas sólidas por *spray chilling* que despertam o interesse por novos estudos (ALBERTINI et al., 2008). Considerado um processo físico rápido, seguro e reprodutível, a técnica dispensa o uso de água ou solventes orgânicos para sua execução, excluindo assim, a necessidade de eliminação de solventes residuais. Vantagem esta, que além de satisfazer o viés ambiental, é particularmente interessante para área de alimentos que necessita atender legislações rigorosas no que se refere a inocuidade do alimento (ALBETINI et al., 2009). A elaboração de partículas por este método tem sido aplicada em diversos segmentos, como o farmacêutico, de cosméticos, agrícola, veterinário e alimentício (CHAMBI et al., 2008).

A compreensão do processo de obtenção das micropartículas por *spray chilling* é bem simples, sua explicação pode ser acompanhada através do esquema proposto na Figura 3. A princípio, o carreador, quase sempre de natureza lipídica, é fundido geralmente a 10 °C acima do seu ponto de fusão. O material ativo é incorporado ao agente carreador fundido, essa incorporação pode se dar através de dissolução ou mecanicamente (dispersão). A mistura resultante entre carreador e material ativo é então atomizada. Uma mangueira promove a alimentação conectando o recipiente contendo o material a ser atomizado ao bico de atomização, uma bomba peristáltica é utilizada facilitando a infusão e o controle da vazão. Dependendo do dispositivo utilizado, o material a ser atomizado pode ser vertido diretamente ao bico de atomização excluindo a necessidade de equipamentos adicionais, como é o caso do dispositivo elaborado e descrito por Albertini et al., (2008). O bico atomizador que tem ligação com interior da câmara resfriamento é responsável pela pulverização da gordura formando pequenas gotas que se solidificam rapidamente ao entrar em contato com o ar frio ou N_2. Algumas micropartículas são coletadas em um recipiente por baixo da câmara de resfriamento, enquanto que partículas muito finas são transportadas pelo ar para um ciclone, onde são coletadas em outro recipiente (CHAMBI et al., 2008).

Spray chilling é um processo muito similar ao *spray drying*, inclusive, é possível promover adaptações que tornam o equipamento versátil aos dois processos. A principal diferença está relacionada ao fluxo de energia envolvido. Em *spray drying* a energia é aplicada à gotícula forçando a evaporação do solvente, o que resulta na secagem do material atomizado, utilizando para isso altas temperaturas. Já para *spray chilling*, a energia é removida da gotícula forçando a solidificação do encapsulante, utilizando para temperaturas inferiores ao ponto de fusão do material utilizado como matriz (KILLEEN, 1993).

Para enquadrar-se no princípio da técnica de *spray chilling* o carreador quase sempre é de natureza lipídica, o que de certa forma é algo vantajoso, visto que os lipídios apresentam alta biocompatibilidade o que minimiza a possibilidade toxicidade (LEONEL, 2008). Dentre os requisitos para escolha de um lipídio como carreador, deve-se atentar principalmente quanto a sua estabilidade frente às condições típicas do processo, facilidade de atomização e temperatura de fusão. Está última em especial, deve visar à minimização da degradação do componente do recheio, principalmente tratando-se de materiais ativos termolábeis (ACHANTA et al., 1997).

Os encapsulantes utilizados na técnica podem ser divididos em hidrofílicos e hidrofóbicos. Polyoxylglycerides, poloxamer, polietileno glicol (PEG) e ésteres de polietilenoglicol são exemplos de encapsulantes hidrofílicos. Enquanto os hidrofóbicos podem ser exemplificados pelas ceras de abelha e de carnaúba, óleo de rícino hidrogenado, cera microcristalina, cera de parafina, ácido esteárico e álcool esteárico (HENG e WONG, 2007). As características hidrofílicas e hidrofóbicas do carreador são interessantes principalmente para indústria farmacêutica, uma vez que essas características interferem no objetivo da microencapsulação do fármaco, como por exemplo, na modulação de liberação do material ativo (HENG e WONG, 2007).

Com relação a estrutura física, partículas produzidas pelo processo de *spray chilling* são do tipo matriz, onde o material ativo está dissolvido ou disperso no carreador solidificado, ou seja, o material ativo está presente em todo o volume da partícula, não apenas em seu centro. É oportuno ressaltar que embora seja corriqueiro encontrar em publicações científicas o emprego errôneo do termo microcápsulas, o material obtido por *spray chilling* deve ser denominado como microesferas, ou preferencialmente, micropartículas pelos motivos expostos acima. O termo microcápsulas é errado uma vez que o sistema gerado pela técnica não é um sistema tipo reservatório, onde o material ativo está perfeitamente recoberto pelo carreador. De maneira geral as partículas produzidas apresentam forma esférica, tamanho em escala micrométrica e são impermeáveis à água, porém não resistentes à ela (ILIC et al., 2009). Pelo fato do processo não envolver evaporação de solventes, comumente observado em outras técnicas como *spray drying*, as partículas produzidas são usualmente densas e não porosas, além de resistentes mecanicamente, permanecendo intactas sob agitação. O aspecto da superfície, liso ou rugoso, é dependente do tipo de carreador e material ativo utilizado (GHERBRE-SELLASIE, 1989 apud LAKKIS, 2007).

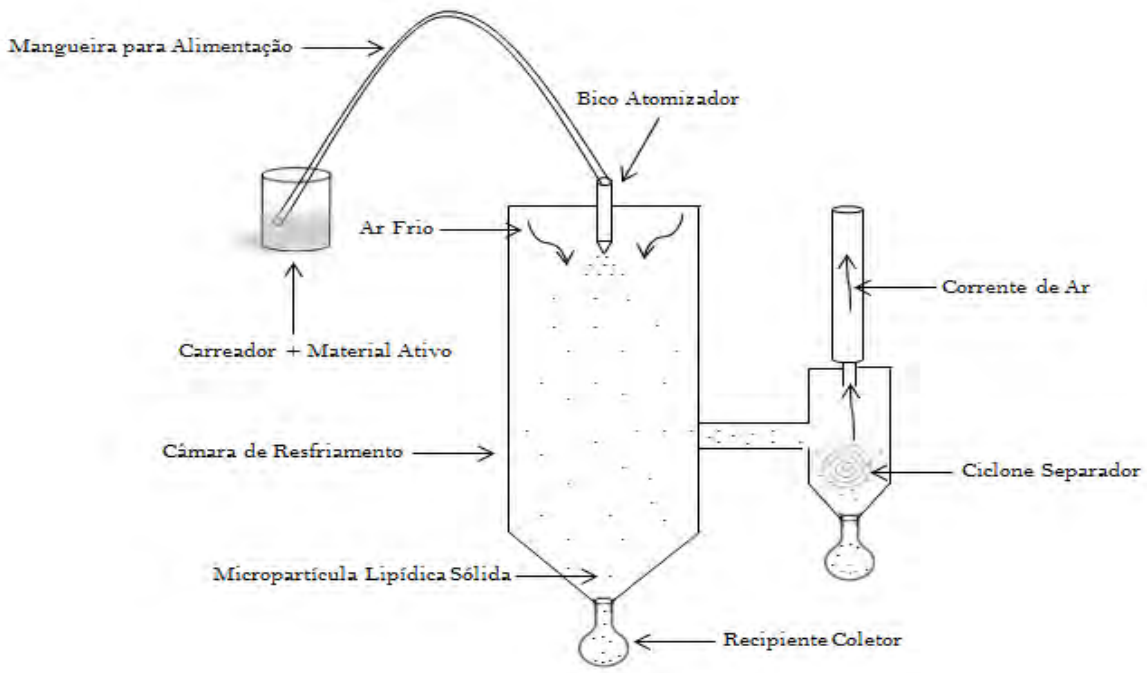

Figura 3 – Esquema do processo de obtenção de micropartículas por s*pray chilling*

Partículas em nanoescala, ditas nanopartículas, também podem ser preparadas utilizando a tecnologia spray chilling (ELDEM et al., 1991), porém, não existem relatos de produção das mesmas. Além disso, embora não muito comum encontrar em estudos, é possível aplicar um revestimento adicional às micropartículas para garantir completa cobertura e/ou eliminar interações indesejáveis circundantes às mesmas durante o armazenamento e incorporação (LAKKIS, 2007). O tamanho da partícula depende do material de ativo, da viscosidade da mistura fundida, da configuração do disco e velocidade rotacional, em geral, o tamanho varia entre 20-200 µm (ZUIDAM e SHIMONI, 2010).

Quanto ao mecanismo de liberação do recheio, no caso de micropartículas lipídicas solidas a liberação pode ocorrer por força osmótica, difusão (ainda que sutil), rupturas mecânicas e principalmente por fusão dos lipídios constituintes da matriz (GOUIN, 2004). Outro importante mecanismo de liberação é a digestão do carreador lipídico por ação das enzimas digestivas gastrointestinais, promovendo assim, liberação no intestino. Este mecanismo tem sido muito empregado quando a microencapsulação envolve microrganismos probióticos, que necessitam chegar vivos ao intestino para prover suas ações benéficas ao homem e animais (OLIVEIRA, 2011).

Ao realizar uma busca na literatura científica por estudos que envolvem o uso da técnica de *spray chilling* é possível constatar que a maioria das pesquisas já desenvolvidas ainda concentra-se na área farmacêutica, onde a técnica é usualmente designada como *spray congealing*. Nesta área a obtenção de micropartículas por *spray chilling* tem atendido diferentes finalidades permitindo contornar limitações encontradas pela indústria farmacêutica na produção de fármacos e gerar novas aplicações. Como o material lipídico utilizado como carreador apresenta boa biocompatibilidade e não há necessidade do uso de solventes orgânicos, minimizam-se os riscos de toxicidade aguda e crônica, uma das principais preocupações no desenvolvimento de medicamentos (FINI et al., 2011). Além disso, a temperatura utilizada é considerada uma vantagem, uma vez que não se emprega altas

temperaturas, ainda que haja limitações quanto às drogas altamente termolábeis. Entre os objetivos da microencapsulação de fármacos por *spray chilling* encontra-se na literatura: melhoria do perfil de dissolução de drogas pouco solúveis (FINI et al., 2002; CAVALLARI et al., 2007; ILIC et al. 2009), desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (RODRIGUEZ et al., 1999; PASSERINI et al., 2003; ALBERTINI et al., 2004), proteção de fármacos contra condições ambientais adversas (ALBERTINI et al. 2009), mascaramento de sabor (YAJIMA et al.1996) e mais recentemente, encapsulação de proteínas e peptídeos com potencial terapêutico (MASCHKE et al., 2007).

Já na área de alimentos, embora o alto potencial da técnica para contornar limitações e criar novas aplicações na indústria alimentícia, os estudos envolvendo a microencapsulação por *spray chilling* ainda são escassos, principalmente comparando com outras técnicas como *spray drying* e até mesmo coacervação. As micropartículas obtidas por *spray chilling* são insolúveis em água e liberam o material ativo ao redor do ponto de fusão do carreador ou durante sua digestão, consequentemente, esta técnica é ideal para encapsular recheios solúveis em água, como vitaminas, minerais, enzimas, acidulantes, algumas essências e sais orgânicos e inorgânicos que podem encontrar aplicações em misturas de sopas, alimentos com alto teor de gordura, produtos de panificação, entre outros (DZIEZAK, 1988).

Nos últimos cinco anos cresceu consideravelmente o número de publicações com relatos de estudos que avaliaram a encapsulação de ingredientes alimentícios através da técnica de *spray chilling*, sendo oportuno ressaltar que grande parte desses estudos é de autoria de grupos de pesquisa brasileiros (CHAMBI et al., 2008; LEONEL et al., GAMBOA, GONÇALVES e GROSSO, 2011; MORSELLI et al., 2012; PEDROSA et al., 2012; ALVIM et al., 2013; OKURO et al., 2013).

Entre os poucos estudos já desenvolvidos para microencapsulação de ingredientes alimentícios por *spray chilling* é válido citar alguns.

Com objetivo desenvolver um sal estável e eficaz para fortificação de iodo, ferro e vitamina A, Zimmermann et al., (2004) recorreram à técnica de *spray chilling* para obter micropartículas lipídicas sólidas contendo iodato de potássio, pirofosfato férrico micronizado e palmitato de retinol, usando como carreador óleo de palma hidrogenado. A microencapsulação teve como finalidade assegurar a biodisponibilidade do ferro evitando alterações de cor no sal e garantir a estabilidade do iodo e da vitamina A. As micropartículas obtidas foram utilizadas para um estudo clínico onde se avaliou a biodisponibilidade desses nutrientes e a redução das deficiências dos respectivos nutrientes na população estudada. Os resultados apontaram boa estabilidade dos nutrientes e redução das deficiências após seis meses de uso do sal fortificado.

A isoflavona foi outro composto hidrossolúvel microencapsulado pela técnica de *spray chilling* por Jeon et al., (2005). Utilizando triglicerídeos de cadeia média como carreador, as micropartículas lipídicas obtidas foram utilizadas para aplicação em um leite destinado ao estudo dos possíveis efeitos hipercolesterolêmico em ratos. Nesse caso a isoflavona foi microencapsulada na tentativa de mascarar seu sabor e impedir que alterasse a cor do leite, uma vez que apresenta gosto amargo similar ao feijão cru e coloração marrom. Os autores relataram eficiência de microencapsulação foi de 70,2% quando a relação (peso/peso) de carreador e material ativo foi 15:1, respectivamente. O perfil de liberação da isoflavona foi considerado satisfatório, inclusive, em ensaios *in vitro* simulando as condições intestinais. Na análise sensorial, as pontuações de amargura e adstringência do leite com isoflavona encapsulada foram ligeiramente, mas não significativamente, diferentes daqueles encontrados para o leite com isoflavona livre.

Considerando a importância nutricional da vitamina E, seu enriquecimento em alimentos tem representado uma interessante estratégia de assegurar a ingestão diária. Entretanto, sua introdução em alimentos pode ser complicada devido ao fato de ser uma vitamina muito instável, que sofre oxidação lentamente pelo oxigênio

atmosférico através de uma reação catalisada pela luz e calor na presença de metais como prata e ferro. Pensando nisso, Gamboa, Gonçalves e Grosso (2011), microencapsularam α-tocoferol por *spray chilling* empregando matrizes lipídicas compostas por lipídios interesterificados sem isômeros *trans* com óleo de soja totalmente hidrogenado. Os resultados encontrados pelos autores mostraram valores de eficiência de encapsulação acima de 90% e altos níveis de retenção do material altivo, concluindo que a encapsulação de α-tocoferol por *spray chilling* foi bem sucedida para o objetivo proposto.

Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, o uso da técnica de *spray chilling* favoreceu a microencapsulação de bactérias principalmente por não empregar altas temperaturas ou solventes tóxicos ao microrganismo. Oliveira (2011) produziu e avaliou micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* utilizando gorduras com baixo ponto de fusão, tais como gordura interesterificada de palma e palmiste e manteiga de cacau como agentes carreadores. A encapsulação promoveu proteção ao microrganismo quando estocado a 18 °C e estabilidade variável quanto ao agente encapsulante quando estocadas em temperaturas de 7, 20 ou 37 °C e em ensaio de resistência aos fluidos intestinais. Cecchini et al. (2010) também relataram a encapsulação de microrganismo por *spray chilling*. Nesse caso os microrganismos encapsulados foram *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® e *Lactobacillus paracasei* IMC 502® em gordura vegetal visando aumento da viabilidade em alimentos funcionais. Segundo os autores os resultados foram satisfatórios quanto a estabilidade dos microrganismos.

3 MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Diante da importância do ácido ascórbico para indústria de alimentos, várias tentativas já foram realizadas com intuito de reduzir os inconvenientes de sua aplicação em produtos alimentícios, seja essa inconveniência por conta de sua baixa estabilidade

que compromete principalmente sua atividade antioxidante e/ou vitamínica ou por conta de sua alta reatividade que pode ocasionar problemas sensoriais no produto como alteração de cor e/ou sabor. Nesse sentido vários autores vêm propondo a microencapsulação do ácido ascórbico como uma alternativa viável para contornar os inconvenientes e limitações de sua aplicação (UDDIN et al, 2001). Porém, a encapsulação de ingredientes solúveis em água é um verdadeiro desafio, sendo muitas vezes difícil de garantir apenas com ingredientes de grau alimentício a constituição de uma barreira capaz de proteger o ingrediente e ao mesmo tempo evitar que devido sua solubilidade em água, seja perdido por lixiviação, por exemplo (SCHROOYEN et al., 2001).

É provável que o primeiro estudo envolvendo a encapsulação do ácido ascórbico date de 1991. Na ocasião, Kirby et al., avaliaram a capacidade de lipossomas em encapsular e proteger eficazmente o ácido ascórbico de condições adversas durante armazenamento. Esses autores verificaram que a encapsulação por lipossomas foi capaz de promover melhoras significativas ao longo da estocagem do ácido, tanto em solução aquosa simples, quanto na presença de componentes alimentares comuns que conduzem normalmente a rápida degradação da vitamina. Porém, o efeito protetor não foi muito eficiente contra íons metálicos capazes de acelerar a oxidação do ácido ascórbico, uma vez que esses íons podem penetrar muito lentamente através da membrana do lipossoma. Embora os achados de Kirby et al. (1991) tenha sido promissores, a utilização de lipossomas na indústria de alimentos muitas vezes é limitada pela marcante alteração de sabor causada pela lecitina de soja, o emulsificante utilizado na produção de lipossomas, fazendo com essa técnica fique mais restrita à indústria farmacêutica e de cosméticos.

Mais tarde, com estudo realizado em 1996, porém, só publicado em 1998, Knezevict et al., relataram a microencapsulação do ácido ascórbico através da técnica de leito fluidizado. A escolha do ácido ascórbico como material ativo se deu pela relação positiva de suas características com a técnica de microencapsulação, e porque na

época havia um grande interesse em desenvolver ração para peixes contendo a vitamina imobilizada. As limitações que incentivaram o estudo foram a alta temperatura empregada para produção da ração, na maioria das vezes utilizando extrusão, a condição inadequada de armazenagem da ração, muitas vezes em silos destampados expostos ao sol e ao livre, e principalmente por conta da possibilidade de lixiviação da vitamina hidrossolúvel devido ao fato da mesma ser jogada na água para alimentação dos peixes. Os resultados foram satisfatórios, o método de encapsulação empregado permitiu uma melhor manutenção da estabilidade do ácido ascórbico com bom perfil de liberação. Todavia, embora os resultados tenham sido promissores, havia um grande inconveniente, a utilização de solvente orgânico no processo de encapsulação.

Já em 1998, com a ascensão da técnica de *spray drying*, Trindade e Grosso (2000) foram um dos pioneiros na microencapsulação do ácido ascórbico utilizando a técnica. Mais tarde surgiram vários outros estudos que variaram o agente encapsulante utilizado para avaliar a eficiência da técnica em aumentar a estabilidade da vitamina C. Trindade e Grosso microencapsularam o ácido ascórbico utilizando aglomerado poroso de amido de arroz e goma arábica. Em seus resultados relatam que embora a encapsulação tenha sido bem sucedida, a estabilidade do ácido ascórbico encapsulado em amido de arroz foi inferior à encontrada para o ácido puro, principalmente com temperaturas e umidade elevadas. Esses autores aplicaram o ácido ascórbico encapsulado em um produto cárneo curado para avaliação da estabilidade da cor e verificaram que o ácido, quando encapsulado, não promovia manutenção significativa da estabilidade de cor.

Outros estudos relatando a microencapsulação de ácido ascórbico por *spray drying* constam na literatura científica. O estudo de Finotelli e Rocha-Leão (2005) e o estudo de Pierucci et al. (2006). O primeiro propôs a microencapsulação do ácido utilizando maltodextrina e Capsul como carreadores, enquanto o segundo utilizou concentrado protéico de ervilha. Finotelli e Rocha-Leão (2005) verificaram que ao longo de 60 dias

apenas 7% do ácido ascórbico encapsulado armazenado em temperatura ambiente foi perdido. Porém, essas autoras consideram 100% de ácido ascórbico após o processo de encapsulação, não avaliaram as possíveis perdas durante a secagem do material. No estudo de Pierucci et al. (2006), relatam resultados satisfatórios quando ao rendimento do produto e estabilidade do ácido durante estocagem. As microcápsulas contendo ácido ascórbico foram utilizadas para fortificação de um produto dietético para atletas.

Lee et al. (2003) também desenvolveram cápsulas de ácido ascórbico e aplicaram em uma matriz alimentícia. Nesse caso a encapsulação do ácido foi realizada por revestimento com monoestearato de poliglicerol. Os autores encontram altos valores de eficiência de encapsulação e bom rendimento. A vitamina encapsulada foi aplicada na fortificação do leite, isolada ou em conjunto do ferro. Realizou-se estudos do perfil de liberação da vitamina nas duas condições e foram encontrados resultados satisfatórios. Para esse estudo em especial cabe estabelecer algumas críticas e questionamentos. Provavelmente a combinação de ferro e vitamina C foi pensando levando-se em consideração o favorecimento da absorção intestinal do ferro devido a presença da vitamina C, uma vez que essa é capaz de reduzir o ferro da forma férrica para ferrosa aumentado a sua biodisponibilidade. Porém, deve-se considerar que o ferro pode atuar como um pró-oxidante para o ácido ascórbico, incorrendo na possibilidade de causar subtração na qualidade do alimento no que refere-se a sua estabilidade oxidativa. Ademais, a matriz alimentícia escolhida, leite, talvez não seja a mais adequada em termos nutricionais, uma vez que a incorporação do ferro em grandes quantidades no leite poderia interferir na biodisponibilidade do cálcio, o micronutriente mais importe desse alimento.

Utilizando outra técnica, encapsulação com alginato de sódio, Desai, Liu e Park (2005) também avaliaram a eficiência da encapsulação na manutenção da estabilidade do ácido ascórbico destinado a incorporação em produtos cosméticos, assim, diferente dos estudos que visam à aplicação em alimentos, esses autores focaram em testes que

avaliaram a manutenção da atividade biológica da vitamina. Os resultados foram favoráveis a encapsulação, uma vez que mostraram que a atividade foi mantida, tomando como base estudos envolvendo a eliminação de radicas livres e ensaios enzimáticos.

Mais recentemente dois estudos foram publicados abordando a encapsulação de ácido ascórbico. Um em 2010 por Chang et al. e outro em 2011 por Wijaia. No estudo de Chang et al. (2010) a microencapsulação do ácido ascórbico foi realizada pela técnica de extrusão utilizando maltodextrina amorfa como carreador. Os autores ativeram em estudar apenas possíveis variáveis como teor de ácido ascórbico e água no rendimento e qualidade dos produtos extrudidos. Não foram realizados estudos envolvendo a estabilidade do ácido ascórbico, nem mesmo considerando o fato de que o processo de extrusão exige temperaturas elevadas. Wijaia (2011) microencapsulou o ácido ascórbico por *spray drying* utilizando 6 agentes encapsulantes isolados ou combinados. O objetivo era desenvolver partículas capazes de proteger o ácido ascórbico contra altas temperaturas de processamentos de alimentos e durante longos períodos. O autor relata um bom rendimento de processo e manutenção de estabilidade durante 15 meses em quatro diferentes temperaturas, 20, 30, 37 e 48 °C.

Apesar da grande quantidade de estudos envolvendo a microencapsulação do ácido ascórbico, e ainda, do reconhecimento de autores como Schrooyen et al. (2001) de que a técnica de *spray chilling* seria uma das mais apropriadas para a encapsulação da vitamina, não há na literatura nenhum trabalho que tenha investigado a microencapsulação do ácido ascórbico por essa técnica. Assim, o objetivo desse projeto foi desenvolver micropartículas contendo ácido ascórbico pela técnica de *spray chilling*, caracterizar essas micropartículas utilizando as análises frequentemente utilizadas para o estudo de micropartículas lipídicas sólidas, e em um terceiro momento aplicar essas micropartículas de ácido ascórbico em um produto cárneo, substituindo o antioxidante eritorbato de sódio, um ingrediente que embora tenha

sido extensivamente utilizado pela indústria de alimentos, não apresenta nenhum benefício adicional à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, A.S.et al. Development of hot melt coating methods. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, p. 441-449, 1997.

ALBERTINI, N. et al. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p.348–357, 2008.

ALVIM, I.D. et al. Utilização do método de spray chilling para veiculação de componentes hidrofóbicos: caracterização física das micropartículas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.33, suppl.1, p. 34-39, 2013.

ARANHA, F. Q. et al . O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 2, Aug. 2000.

BAKAN, J. A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**, Chicago, v. 27, n. 11, p. 34-44, 1973.

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

CAVALLARI, C. et al. Thermal and fractal analysis of diclofenac/Gelucire 50/13 microparticles obtained by ultrasound-assisted atomization. **Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 94, p. 1124-1134, 2007.

CECCHINI, C. et al. Evaluation of microgranulation of Lactobacillus rhamnosus IMC 501® and Lactobacillus paracasei IMC 502® with vegetable fats as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 325, 2010.

CHAMBI, H.N.M.; ALVIM, I.D.; BARREA-ARELLANO, D.; GROSSO C.R.F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterization and release profiles. **Food Research International**, v. 41, p. 229-236, 2008.

CHANG, D. et al. Original article: 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.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**, (4th ed.) CRC Press, Boca Baton, FL, USA, 2008.

DESAI, K. G.H.; PARK, H.J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate crosslinked chitosan microspheres by spray dr ying. **Journal of Microencapsulation**, v.22, n.2, p. 179, 2005.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food Technology**, n.42, p. 136-151, 1988.

ELDEM, T. et al. Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 178-184, 1991.

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

FINI A. et al. Ultrasound-compacted and spray-congealed indomethacin polyethyleneglycol systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 247, n. 1–2, p. 11-22, 2002.

FINI, A. et al. Theophylline-loaded compritol microspheres prepared by ultrasoundassisted atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 743-757, 2011.

FINOTELLI, P. V. e ROCHA-LEAO, M. H. . Microencapsulation of Ascorbic Acid in Maltodextrin and Capsul using Spray-Drying. In: **2º Congresso Mercosul de Engenharia Química/4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos**, 2005, Angra dos reis. 2º Congresso Mercosul de Engenharia Química/4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos, 2005.

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.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **Int. J. Food Sci. Nutr**., v. 50, n. 3, p. 213-24, 1999.

HEGENBART, S. Encapsulated ingredients keep problems conversed. **Food Product Design**, v. 3, p. 28–34, 1993.

HENG, P. W. S e WOMG, T. W. Melt processes for oral solid dosage forms J. Swarbrick (Ed.), **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 3 ed., v. 4, Informa Healthcare, New York, p. 2257–2261, 2007.

ILIC, I. et al. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 2, p. 176–183, 2009.

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

JEON, B.J. Application of microencapsulated isoflavone into milk. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 7, p. 859-865. 2005.

KILLEEN, M. J. The process of spray drying and spray congealing. **Pharm. Eng.**, v. 13, p. 56–64, 1993.

KIRBY, C.J.; WHITTLE, C. J.; RIGBY, N.; COXON, D. T.; LAW, B. A. Stabilisation of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, n.5, p. 437-449, 1991.

KNEZEVICT, Z. et al. Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 2, 1998.

KUANG, S. S., OLIVEIRA, J. C., CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 951-961, 2010.

LAKKIS, J.M. Marketing perspective of encapsulation technologies. In: LAKKIS, J.M. (Ed.) **Encapsulation and controlled release technologies in food systems**, Blackwell Publishing, Iowa, p. 217-218, 2007.

LEE, J. B., et al. L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3 p. 495-500, 2004.

LEONEL, A.J. **Produção e Caracterização de Partículas Lipídicas Constituídas por Ácidos Graxos, Gordura Vegetal Hidrogenada e Lecitina na Encapsulação de um Composto Hidrofílico de Baixa Massa Molar.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de

Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MASCHKE, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 175–187, 2007.

NYYSSONEN, K. et al. **Modern Chromatographic Analysis Of Vitamins**. Editado por Willy E. Lambert , Andre P. De Leenheer and Jan F. Van Bocxlaer. CRC Press 2000.

OKURO, P.K. et al. Co-encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, p. 96-103, 2013.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção de micropartículas lipídicas contendo Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium lactis produzidas por spray chilling.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

PASSERINI, N. et al. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v. 88, n. 2, p. 263-275, 2003.

PIERUCCI, A.P.T.R, et al. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 6, p. 654–662, 2006.

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

RODRIGUEZ, L. et al. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomiser for spray congealing processes. **International Journal of Pharmacy**, v. 183,

p. 133-143, 1999.

SCHROOYEN, P.M.M.et al. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.

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

SILVA, V. L.; COZZOLINO, S. M. F. Vitamina C (ácido ascórbico). In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. cap. 12, p. 301-320.

SPARKS, R.E. Microencapsulation. In: Kirk-Othmer. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3ed. John Willey and Sons, New York, v. 15, p. 470. 1981.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, 2006.

TRINDADE, M. A. e 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.

YAJIMA, T. et al. Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of clarithromycin in wax matrix. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 220-225, 1999.

YE, L. et al. **Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences**, Second Edition CRC Press, 2007.

ZIMMERMANN, M. B. et al. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A for use in food fortification. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 181-187, 2004.

ZUIDAM, N. J. e SHIMONI, E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: ZUIDAM, N.J.; NEDOVIĆ, V.A. (Eds.) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. **Springer Science+Business Media**, LLC. 2010.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR *SPRAY CHILLING*

Resumo

A tecnologia de encapsulação embora não seja recente, ainda representa uma inovadora alternativa para promover proteção de ingredientes susceptíveis à degradação quanto incorporados à matriz alimentícia. O ácido ascórbico, um potente aditivo alimentício e composto com atividade vitamínica, é um desses ingredientes. Sua sensibilidade à altas temperaturas, pH alcalino e presença de oxigênio e íons metálicos compromete a aplicação em determinados alimentos. Várias técnicas já foram utilizadas com intuito de encapsular o ácido ascórbico e promover melhoria de sua manutenção. *Spray chilling*, uma técnica pouco explorada, porém com diversas vantagens em relação às demais, até o presente momento não foi utilizada para tal finalidade. Nesse trabalho, utilizou-se a técnica de *spray chilling* para produzir micropartículas lipídicas sólidas carregadas com ácido ascórbico utilizando óleo de palma e palmiste interesterificadas. As micropartículas foram produzidas a partir de emulsões de solução aquosa de ácido ascórbico, gordura e lecitina de soja ou suspensões de ácido ascórbico anidro em gordura. Micropartículas de gordura pura e mistura de gordura e lecitina de soja também foram produzidas. Especificamente para as micropartículas produzidas a partir de emulsão, estabeleceu-se como variáveis de processo a concentração material ativo:carreador (1:10 e 1:7) e a velocidade de rotação do ultra-turrax (5000 e 10000 rpm). As micropartículas obtidas foram submetidas à análises de morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, DSC e FTIR. Análise de cor instrumental nas micropartículas lipídicas e estabilidade do ácido ascórbico foi realizada ao longo de 60 dias com as amostras estocadas a 7, 24 e 37°C. Os resultados obtidos das análises de caracterização demonstraram que não houve diferenças entre as partículas obtidas a partir de emulsão em função das variáveis estudadas. As diferenças foram observadas entre as partículas preparas com emulsão e suspensão. Ambas apresentaram formato esférico, porém a característica da superfície variou. Micropartículas produzidas com suspensão apresentaram superfície enrugada em com poucos poros, já as produzidas com emulsão apresentaram superfície lisa com quantidade significativa de poros. As partículas preparadas com suspensão apresentaram eficiência de encapsulação menor

que as demais. Ao longo do período de estocagem houve marcante alteração de cor nas micropartículas preparadas com emulsão, o que não ocorreu com aquelas preparadas com suspensão. A alteração de cor foi intensificada com aumento da concentração de ácido ascórbico e teve relação direta com a estabilidade do ácido. A estabilidade do AA sofreu influência da temperatura de estocagem e da forma de preparo das micropartículas. A elevação da temperatura, como esperado, acelerou a degradação da vitamina. Micropartículas preparadas com suspensão tiveram melhor estabilidade em comparação com as preparadas com emulsão. Quando estocadas a 7 e 24°C, valores que superam 60% de estabilidade foram verificados após 60 dias. Porém, quando a temperatura de estocagem foi de 37 °C, a estabilidade reduziu para 40%. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a técnica de a técnica de encapsulação representa uma promissora alternativa para promover manutenção da estabilidade do ácido ascórbico, entretanto, mais estudos se fazem necessários. Em um estudo futuro, a produção de micropartículas apenas utilizando suspensão pode permitir que os resultados obtidos sejam aperfeiçoados e que a manutenção da estabilidade do ácido ascórbico aumente consideravelmente.

Palavras chave: Encapsulação, vitamina C, estabilidade, spray congealing.

1 INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) tem sido amplamente utilizado pela indústria de alimentos para atender duas finalidades distintas, atuar como antioxidante e reforçar a ingestão dietética de vitamina C. Como antioxidante o AA atua principalmente na inibição da auto-oxidação lipídica e do escurecimento enzimático. Entre os mecanismos de ação envolvidos em sua atividade antioxidante estão: desativação do oxigênio singlete; redução dos radicais de oxigênio e carbono centradas com a formação de um radical semideidroascorbato menos reativo ou de um ácido L-deidroascórbico; oxidação preferencial do ascorbato, concomitante à depleção de oxigênio; e regeneração de

outros antioxidantes, por exemplo, por meio da redução do radical tocoferol (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Contrário à sua eficácia na preservação da cor natural e sabor/odor dos alimentos, o AA apresenta como principal desvantagem sua alta instabilidade. Fatores ambientais como alta temperatura, pH alcalino, presença de oxigênio, de íons metálicos, de UV e raio-x podem afetar sua estabilidade fazendo com que suas atividades vitamínicas e seu poder redutor sejam perdidos durante o processamento e/ou armazenamento dos produtos onde está contido. Além disso, por ser muito reativo, o AA ao ser adicionado ao alimento pode reagir com outros ingredientes e provocar alterações indesejáveis de cor e sabor (UDDIN et al., 2001).

Uma estratégia promissora para melhorar a estabilidade do AA é o emprego da tecnologia de encapsulação. Definida por Favaro-Trindade et al (2008) como um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas que podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas, a tecnologia de encapsulação cresceu consideravelmente na indústria de alimentos devido ao interesse em adicionar à matriz alimentícia ingredientes bioativos, que por conta da sensibilidade a fatores ambientais como presença de luz, oxigênio e pH extremos, não podem ser adicionados em suas formas livres (ABBAS et al., 2012). A encapsulação do AA pode favorecer não apenas a redução de sua degradação durante o processamento e armazenamento do alimento, mas também evitar sua interação com outros componentes da matriz alimentícia o que acarreta subtração de qualidade do produto, bem como pode minimizar seu gosto ácido e propiciar sua liberação controlada, durante o tratamento térmico, por exemplo.

Várias técnicas de microencapsulação já foram estudadas com objetivo de melhorar a estabilidade do ácido ascórbico, entre elas *spray drying* (TRINDATE e GROSSO, 2000; UDDIN et al., 2001; ESPOSITO ET AL., 2002; DESAI e PARK, 2005; PIERUCCI et al., 2006; RIGHETTO e NETTO, 2006), coacervação complexa (COMUNIAN et al., 2013);

lipossomas (KIRBY et al., 1991; SHARMA e LAL, 2005; WECHTERSBACH et al., 2012), *fluidized bed coating* (KNEZEVIC et al., 1998), *melt extrusion* (LEUSNER et al., 2002; BOUQUERAND, 2007; CHANG et al., 2010), melt dispersion (UDDIN et al., 2001) evaporação de solvente (UDDIN et al., 2001), co-cristalização (KIM et al., 2001; FANG e BHANDARI, 2010), e imobilização (DESAI e PARK et al., 2005).

Entre as diversas técnicas utilizadas para microencapsulação *spray congealing* (também denominada *spray chilling* e *spray cooling*) vem recebendo especial atenção em decorrência de suas vantagens em relação às demais técnicas. Baixo custo e alto desempenho são alguns dos atrativos associadas ao processo de obtenção de micropartículas lipídicas sólidas por spray congealing que despertam o interesse por novos estudos (ALBERTINI et al., 2008). Considerado um processo físico rápido, seguro e reprodutível, a técnica dispensa o uso de água ou solventes orgânicos para sua execução, excluindo assim, a necessidade de eliminação de solventes residuais. Vantagem esta, que além de satisfazer o viés ambiental, é particularmente interessante para área de alimentos que necessita atender legislações rigorosas no que se refere à inocuidade do alimento (ILIC et al., 2009). A elaboração de partículas por este método tem sido aplicada em diversos segmentos, como o farmacêutico, de cosméticos, agrícola, veterinário e no alimentício (CHAMBI et al., 2008).

Em *spray congealing*, o material a ser encapsulado é misturado ao carreador fundido e atomizado por bicos dentro de uma câmara, onde as micropartículas se solidificam rapidamente ao entrar em contato com ar frio ou N_2 (CHAMBI et al, 2008). As micropartículas obtidas são insolúveis em água e liberam o material ativo ao redor do ponto de fusão do carreador. Consequentemente, esta técnica é ideal para encapsular recheios solúveis em água, como vitaminas, minerais, enzimas, acidulantes, algumas essências e sais orgânicos e inorgânicos (DZIEZAK, 1988). As finalidades são vastas, sendo as principais: melhoraria da estabilidade térmica, liberação controlada, conversão de líquidos em pós e mascaramento de sabor e/ou odor (GOUIN, 2004). Os ingredientes encapsulados por este método podem encontrar aplicações em misturas

de sopas, alimentos com alto teor de gordura, produtos de panificação entre outros (DZIEZAK, 1988).

Neste estudo, com objetivo de avaliar o efeito da encapsulação na manutenção da estabilidade de ácido ascórbico utilizou-se a técnica de *spray chilling* para produção de micropartículas lipídicas carregadas com ácido ascórbico. Procedeu-se com a caracterização das micropartículas e com avaliação da estabilidade do ácido ascórbico encapsulado comparando-se com sua forma livre.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Ácido ascórbico (AA) P.A (Synth, SP/Brasil) foi utilizado como material ativo, gordura interesterificada de palma totalmente hidrogenada e palmiste (Vigor, SP/Brasil) como carreador e lecitina de soja em pó (Pantec, SP/Brasil) como agente emulsificante. Clorofórmio (Synth, SP/Brasil); Tween 80 (Synth, SP/Brasil); álcool etílico (Synth, SP/Brasil); bicarbonato de sódio (Synth, SP/Brasil); 2,6-diclorofenol-indofenol (Vetec, SP/Brasil); e ácido oxálico (Synth, SP/Brasil) foram utilizados para realização das análises. Todos os reagentes apresentavam grau analítico.

2.2 Tratamentos

Os tratamentos estabelecidos estão sumarizados na Tabela 1. Quatro tratamentos (T1-T4) envolveram o preparo de emulsão entre o carreador lipídico, solução aquosa de AA e lecitina de soja. Esses tratamentos variaram em função da quantidade de material ativo em relação a quantidade de carreador lipídico, ou seja, a proporção material

ativo:carreador (1:7 e 1:10), e em função da velocidade de rotação do ultra-turrax durante o preparo da emulsão (5000 e 10000 rpm). O quinto tratamento (T5) envolveu o preparo de uma suspensão entre ácido ascórbico anidro e o carreador lipídico na proporção de 1:10. Os tratamentos T6 e T7 compreenderam a produção de micropartículas utilizando o carreador lipídico puro e a mistura de carreador lipídico e lecitina de soja, respectivamente. As formulações da emulsão ou suspensão de cada tratamento podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 1.

Tratamentos

Tratamento	Forma de Preparo	Material Ativo:Carreador	Rotação em Ultra-Turrax
1	Emulsão (E)	1:7	5000 rpm
2	Emulsão (E)	1:10	5000 rpm
3	Emulsão (E)	1:7	10000 rpm
4	Emulsão (E)	1:10	10000 rpm
5	Suspensão (S)	1:10	-
6	Gordura pura	-	-
7	Gordura + Lecitina de Soja	-	5000

Tabela 2.

Formulações das emulsões e suspensões

Tratamento	Solução de ácido ascórbico			Lecitina de soja	Gordura
	AA	Água	Concentração		
1	5g	20g	25,0%	0,3g	35g
2	3,5g	20g	17,5%	0,3g	35g
3	5g	20g	25,0%	0,3g	35g
4	3,5g	20g	17,5%	0,3g	35g
5	3,5g	-	-	-	35g
6	-	-	-	-	35g
7	-	-	-	0,3g	35g

2.3 Métodos

2.3.1 Produção das microcápsulas

As micropartículas lipídicas foram produzidas através da técnica de *spray chilling* seguindo metodologia descrita por Chambi et al. (2008), com algumas modificações. Para o preparo das emulsões a gordura foi pesada e fundida a 58°C (15°C acima do ponto de fusão), adicionou-se a lecitina de soja em pó, solução aquosa de AA e prosseguiu-se com homogeneização em Ultra-Turrax IKA®T25 (Staufen/Alemanha) por 3 minutos na rotação correspondente ao tratamento. Para o preparo da suspensão a gordura foi pesada, fundida a 58°C, adicionou-se posteriormente o AA anidro previamente moído em pilão de porcelana a um pó fino, sendo a mistura física realizada utilizando agitador mecânico modelo 713 da Fisatom (São Paulo/Brasil). Para produção das micropartículas constituídas apenas do carreador, a gordura foi fundida a 58°C e posteriormente atomizada. A produção das micropartículas compostas pela mistura do carreador lipídico e lecitina de soja, foi realizada de maneira semelhante, acrescentando apenas a etapa de homogeneização da mistura que ocorreu em ultra-turrax a 5000 rpm.

Para obtenção das micropartículas lipídicas, tanto as emulsões como a suspensão, mistura de carreador lipídico e lecitina de soja e gordura pura foram atomizadas em câmara fria por volta de 13 °C, utilizando atomizador duplo fluido (Ø=1,2 mm), com pressão de ar de 2,2 kgf/cm² em um *spray dryer* da Labmaq do Brasil (São Paulo/Brasil) adaptado para operar como *spray chiller* (Figura 1). A vazão foi controlada através de uma bomba peristáltica em 50 mL/min Masterflex (Illinois/EUA). Os pós obtidos foram armazenados em fracos de vidro tampados, protegidos da luz, na presença de O_2 e estocados a 7, 22, 37°C.

Figura 1 - *Spray-chiller* utilizado para produção das micropartículas

2.3.2 Caracterização das micropartículas

2.3.2.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas obtidas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas no suporte de amostras com fita de dupla face adesiva, revestida por borrifamento com Au/Pd sob atmosfera de argônio através de um evaporador de alto vácuo (Edwards, Crawley/Reino Unido) e examinadas por meio de um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM- 6500F (Welwyn Garden City/Reino Unido) em 5 kV de tensão de aceleração.

2.3.2.2 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi determinado por difração de raio laser através do analisador de partículas Shimadzu Sald-2-1V (Tokyo /Japão). As micropartículas foram

suspensas em solução aquosa de Tween 80 (1% peso/peso) e estabilizadas por 5 minutos antes da análise para evitar aglomeração. A análise foi realizada em triplicata.

2.3.2.3 Eficiência de microencapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada pela diferença entre a quantidade de AA total e a quantidade de AA presente na superfície das micropartículas conforme descrito por Comunian et al. (2013). Para extração do AA das micropartículas lipídicas adotou-se o método proposto por Maschike et al. (2007) com algumas modificações. A lavagem das micropartículas para determinação do AA superficial foi realizada como descrito por Leonel et al., (2010) com algumas modificações. Para quantificação do AA, tanto o conteúdo total como conteúdo na superfície das partículas, foi usado utilizado o método de titulação de Tillmans descrito pela Association of Official Analytical Chemists (1997). O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado conforme a Equação I.

$$\text{Eficiência de encapsulação } (\%) = \frac{(AA_{total} - AA_{superficial})}{AA_{total}} \, x \, 100 \qquad Equação\ I$$

2.3.2.4 Atividade de água

Considerando a correlação entre atividade de água e velocidade das reações químicas, neste caso, com a degradação do AA, julgou-se oportuno avaliar a atividade de água dos pós logo após atomização. A mensuração foi realizada utilizando analisador de atividade de água Aqualab (Decagon Devices, Pullman, WA, USA) imediatamente após o preparo das micropartículas.

2.3.2.5 Comportamento térmico

O comportamento térmico das micropartículas carregadas com AA foi avaliado através de um analisador térmico DSC TA Instruments (New Castle/EUA). Para análise cerca de 10 mg da amostra foi adicionada em cápsula de alumínio e aquecida a 10°C/min, entre -20 e 220 °C sob atmosfera inerte (45 mL/min de N_2). Uma cápsula vazia foi utilizada como referência e o nitrogênio líquido usado para a refrigeração de amostra antes de cada corrida. O carreador lipídico, ácido ascórbico e lecitina de soja também foram submetidos à análise térmica.

2.3.2.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – FTIR

A caracterização das micropartículas carregadas com ácido ascórbico e dos ingredientes puros através de espectroscopia de infravermelho na região de 4000 a 600 cm-1 foi realizada utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts/EUA) com o auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1.

2.3.2.9 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado

Para avaliação da estabilidade do AA microencapsulado e livre foram estabelecidas três condições de temperatura de armazenamento: 7, 22 e 37°C. As amostras foram estocadas ao abrigo da luz em frascos de vidro fechados recobertos por papel alumínio. Os pontos de estabilidade ocorreram ao longo de 60 dias com análises nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias.

Para extração do AA das micropartículas para quantificação utilizou-se clorofórmio e água destilada. Pesou-se 250 mg de amostra em um tubo de ensaio, seguida da adição

de 5 mL de clorofórmio. Após homogeneização acrescentou-se 5 mL de água destilada prosseguindo com nova homogeneização. A parte aquosa foi coletada e repetiu-se o processo de adição de água por mais duas vezes a fim de garantir que a extração do ácido ascórbico fosse a máxima possível. A determinação foi realizada por titulação pelo método de Tillmans descrito pela Association of Official Analytical Chemists (1997). Todas as análises foram realizadas em triplicatas, exceto no tempo zero onde se optou por realizar sextuplicata com objetivo de reduzir a possibilidade de erros na determinação da concentração inicial onde o valor encontrado foi considerado como 100% de estabilidade para realização dos cálculos nos tempos sequentes.

2.3.2.10 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico livre

Estabeleceu-se como pontos para avaliação da estabilidade do AA livre anidro e em solução (10%) os tempos 0, 1, 3, 5, 7, 15, 30 dias, tendo estes sido armazenados em condições semelhantes às micropartículas. Ambos foram determinados por titulação com realização das análises em triplicata.

2.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usando a versão 9.1.3 do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS, 1995). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $\alpha \leq 0.05$. O processo foi repetido por duas vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise morfológica

Após a atomização foram obtidos pós brancos e fluidos. As micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA, como exposto na Figura 2, apresentaram formato esférico independente da formulação. Tal característica corrobora aos achados de diversos autores que utilizaram a técnica de spray chilling para encapsular materiais ativos variados (CHAMBI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; DI SABATINO et al., 2012; OKURO et al., 2013). As micropartículas preparadas através de emulsão (T1 – 4) não apresentam diferenças em relação às suas características morfológicas. Essas partículas apresentaram superfície lisa, porém, com presença marcante de poros e imperfeições. Embora as partículas nem sempre apresentem superfície lisa (ALBERTINI et al., 2004; PASSERINI et al., 2006; CHAMBI et al., 2008), a presença de poros, que é indesejada, não é relatada com frequência. Em contrapartida, as micropartículas produzidas a partir de suspensão (T5) não apresentaram poros. A superfície dessas micropartículas apresentou aspecto de escama e adesão de partículas muito pequenas e material lipídico em formato levemente filamentoso.

As características morfológicas das partículas produzidas por *spray chilling* sofrem variações em função do carreador lipídico e material ativo utilizados e da interação entre estes dois. Tal afirmação é reforçada comparando as características morfológicas observadas neste trabalho com características reladas por Okuro et al. (2013) que também utilizaram gordura interesterificada produzida com óleo de palma totalmente hidrogenado e palmiste para co-encapsular micro-organismos probióticos e compostos prebióticos. Esses autores relataram a obtenção de partículas com superfície lisa e ausência de poros ou fissuras.

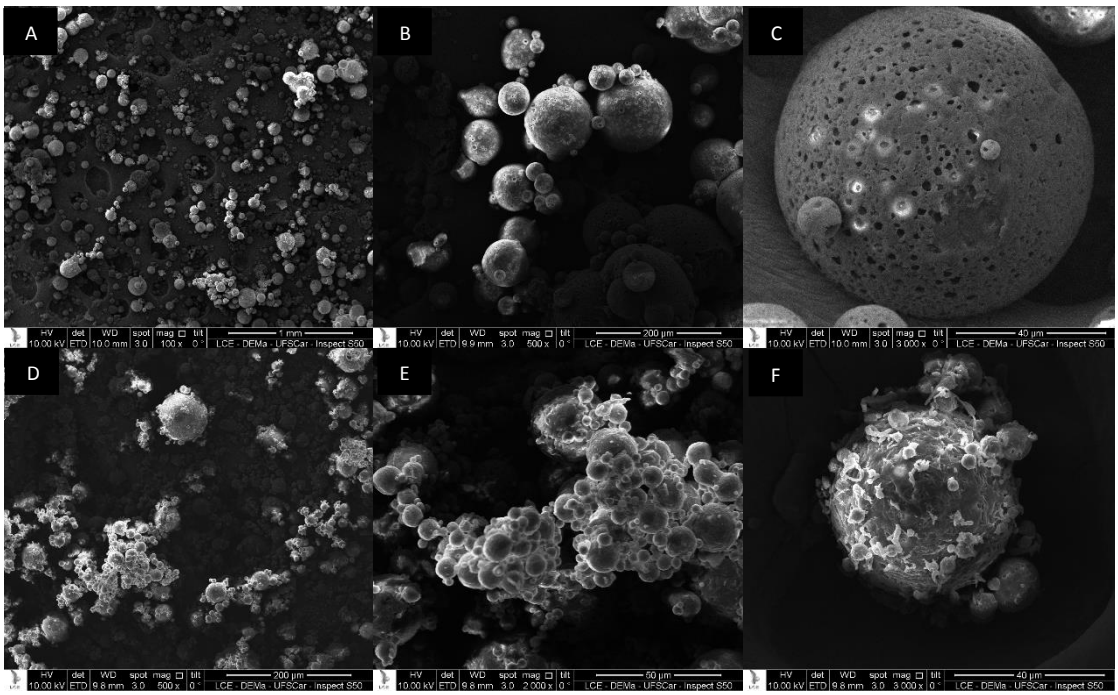

Figura 2 – Imagens de microscopia eletrônica de: (A, B e C) micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas a partir de emulsão e observadas com diferentes magnificações (100x, 500X e 3000x, respectivamente); (D, E e F) micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas a partir de suspensão e observadas com diferentes magnificações (500x, 2000X e 3000x, respectivamente).

3.2 Tamanho de partícula

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios de diâmetro das partículas. Verifica-se que houve diferenças entre os tratamentos em razão de influências de diversos fatores que merecem análise detalhada.

Entre os tratamentos envolvendo emulsão (T1-T4) observou-se que o aumento da concentração de AA, ou seja, a proporção material ativo:carreador, não influenciou no tamanho de partícula. Resultados semelhantes foram relatados por Leonel et al. (2010) que produziram micropartículas sólidas carregadas com solução de glicose utilizando misturas de ácidos graxos líquidos e sólidos (ácido esteárico e oléico) e gordura vegetal

hidrogenada como carreador e lecitina de soja como surfactante. Tal comportamento pode ser justificado pela influência da viscosidade no tamanho de partícula como sugerido por Albertini et al. (2008). Uma vez que o AA foi incorporado à gordura totalmente solubilizado, a variação de viscosidade entre os tratamentos tende a ser mínima, visto que a quantidade de solução na emulsão não foi alterada entre os tratamentos. Em contrapartida, o aumento da velocidade do ultra-turrax durante o preparo da emulsão poderia ter alterado a viscosidade da emulsão ao ponto de provocar variações nos tamanho das partículas entre os tratamentos. Embora não tenha sido realizada análise da viscosidade, a avaliação visual da emulsão demostrou que aquelas preparadas com velocidade de 10000 rpm apresentaram aspecto menos viscoso. Em suma, pode-se inferir que ao contrário do esperado e proposto por diversos autores (MASCHKE et al. 2007; ALBERTINI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012), neste trabalho, a viscosidade não influenciou no tamanho médio das partículas entre os tratamentos que envolveram o preparo de emulsão.

Tabela 3.

Eficiência de encapsulação (EE) e diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA produzidas por *spray chilling*

Formulação	EE (%)	DMV (µm)
T1	68,2 ± 3,45 a	73,86 ± 2,13 a
T2	71,0 ± 2,67 a	74,69 ± 1,91 a
T3	69,9 ± 4,01 a	76,78 ± 1,14 a
T4	72,5 ± 3,11 a	72,87 ± 3,84 a
T5	59,2 ± 4,21 b	91,62 ± 1,54 b
T6	-	44,92 ± 3,10 c
T7	-	33,82 ± 2,42 d

T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10; T6: gordura pura; T7: gordura + lecitina de soja.

Ao estabelecer comparação entre os tratamentos que envolveram emulsão (T1-T4) com os demais tratamento (T5-T7), a influência da viscosidade no tamanho de

partícula torna-se cabível. Partículas produzidas apenas com gordura foram menores que aquelas produzidas com a mistura de gordura com lecitina de soja, estas por sua vez, foram menores que aquelas preparadas com a mistura de gordura e ácido ascórbico anidro. A pequena variação determinada par este parâmetro, entre as partículas de gordura pura e as partículas da mistura de gordura com lecitina deve-se ao fato da lecitina ser um pó fino adicionado em pequena quantidade. Já o ácido ascórbico adicionado à suspensão, embora macerado e peneirado com peneira de 100 µm não era um pó tão fino quanto a lecitina. Em todos os casos a distribuição de tamanho foi unimodal e polidispersa.

Os parâmetros de processo, com destaque para pressão de atomização e temperatura, influenciam no tamanho das partículas (ROSSAN, 2011). Mas além dos parâmetros de processo, o tipo de material ativo e carreador lipídico, bem como o design do atomizador, também podem provocar variações consideráveis no tamanho. Essa série de fatores influenciando tal característica dificulta comparações entre trabalhos. Tanto é, que na literatura constam relatos da obtenção de micropartículas com tamanho médio na faixa de 13-50 µm (CHAMBI et al., 2008; LEONEL et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; ALVIM et al., 2013) e 50-300 µm (RODRIGUEZ et al, 2003; MASCHKE et al. 2007; ALBERTINI et al., 2008; ILIĆ et al., 2009; DI SABATINO et al, 2012; OLIVEIRA et al., 2012; OKURO et al., 2013). Assim, os valores encontrados neste trabalho para tamanho de partícula permanecem dentro da faixa de tamanho citada na literatura para micropartículas produzidas por *spray chilling*.

3.3 Eficiência de microencapsulação

Os valores de eficiência de encapsulação estão apresentados na Tabela 3. Não foram constatadas diferenças estatísticas entre os resultados obtidos para EE de micropartículas produzidas por meio de atomização de emulsão. Isso implica que a proporção material ativo:carreador e a velocidade de rotação do ultra-turrax não

provocaram influência na quantidade de AA que permaneceu na superfície da micropartícula em relação a quantidade que foi efetivamente recoberta pelo carreador. Esses resultados tornam-se coerentes ao estabelecer relação com os resultados de tamanho de partícula. Assim como a EE, o tamanho de partícula não sofreu influência das variáveis citadas há pouco. Se não houve diferença em relação ao tamanho, a área superficial das partículas não foi alterada, o que poderia possibilitar uma menor ou maior presença de AA na superfície. O aumento da concentração de lipídico em relação ao material ativo sugestiona, ainda que teoricamente, uma maior possibilidade de obter micropartículas com maior quantidade de material ativo efetivamente encapsulado, entretanto, os resultados obtidos não corroboraram tal teoria. Ribeiro et al. (2012), encapsulando solução de glicose em mistura de ácido esteárico e ácido oléico pela técnica de *spray chilling* observaram resultados distintos. O aumento da concentração de ácido oléico em relação ao material ativo influenciou positivamente na EE. Cabe a ressalva de que esses autores utilizaram a mesma metodologia para determinação de EE utilizada neste trabalho.

Comparando o tratamento que envolveu o preparo de uma suspensão (T5) com os demais (T1-T4) verifica-se diferença estatística. A quantidade de AA superficial foi maior no T5, o que consequentemente, resultou em um valor de EE menor. Nesse caso, a ideia do tamanho de partícula influenciando a EE pela área superficial perde a coerência, visto que as partículas do T5 foram maiores que as demais, consequentemente, apresentaram área superficial menor. A justificativa para tais resultados pode estar na presença de água no sistema e forma com que o AA foi incorporado a este sistema, em uma emulsão. O AA é um composto altamente hidrofílico, desta forma, ficou em maior concentração na fase dispersa (água) da emulsão A/O.

Partículas produzidas por *spray chilling* não são do tipo reservatório em que o material ativo fica perfeitamente na porção central recoberto pelo material de parede (Figura 10 C), mas como havia quantidade considerável de água no sistema, a ocorrência de tal

fato pode ter sido favorecida. Na suspensão, ainda que macerado a um pó fino (<100 µm) o ácido ascórbico permaneceu como cristais consideravelmente grandes se levar em conta o tamanho das partícula obtidas. Durante a lavagem das partículas, todo conteúdo de AA que não está perfeitamente encapsulado é arrastado pela água de lavagem. Sendo ele um composto altamente hidrofílico, esse "arraste" é consideravelmente favorecido.

Comparando os resultados obtidos com os poucos trabalhos que avaliaram a EE com metodologia semelhante ou que determinaram o conteúdo de material ativo presente na superfície da partícula, pode-se afirmar que os valores estão na faixa daqueles relatados por outros autores. Leonel et al. (2010) encapsulando solução de glicose em misturas de ácidos graxos líquidos e sólidos (ácido esteárico e oléico) e gordura vegetal hidrogenada verificaram valores de glicose na superfície com variando de 2,3 a 19,7%, sendo que a quantidade teórica na micropartícula não influenciou tanto a EE quanto a concentração da glicose na solução. Ribeiro et al. (2012) que também encapsularam solução de glicose relataram valores de material ativo na superfície variando entre 2,6 e 23,7%

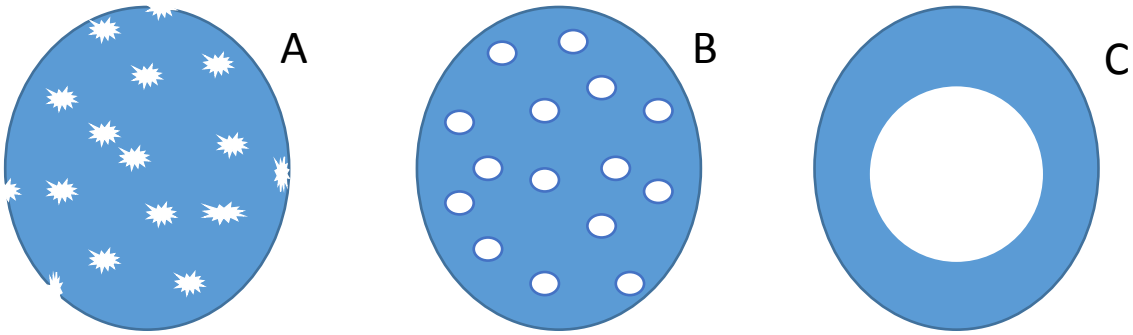

Figura 3 – Esquemas de estruturas das partículas. A) Partícula do tipo matriz produzida a partir de uma suspensão. B) Partícula do tipo matriz produzida a partir de uma emulsão. C) Partícula do tipo reservatório.

Entre as análises de caracterização de micropartículas obtidas por *spray chilling*, a eficiência de encapsulação é a que exige maior criticidade na interpretação e discussão dos resultados. O motivo disso encontra-se na falta de consenso na definição do termo *eficiência de encapsulação*. Neste trabalho admitiu-se que o termo refere-se a quantidade de material ativo efetivamente encapsulado. Para determinação da EE considerou-se a diferença entre o conteúdo total de ácido ascórbico na micropartícula e o conteúdo presente na superfície da partícula. Na literatura é comum encontrar valores de EE determinados pela diferença entre a quantidade teórica de material ativo atomizado e a quantidade de material ativo presente nas micropartículas. Tal análise se faz muito útil para verificar se o processo de atomização provoca degradação/perda do material ativo, porém, não permite afirmar se o material ativo está no interior ou na superfície da micropartícula. Se não houver critério na discussão dos resultados, incorre-se na possibilidade de equívocos em relação aos valores próximos de 100% relatados na literatura e atribuídos como EE. Partindo da consideração que a técnica de spray chilling produz micropartículas, e não microcápsulas onde o material ativo está perfeitamente acondicionado no interior da mesma, muito dificilmente será possível garantir ausência de material ativo sobre a superfície da partícula. Por fim, não considerar a diferença entre a quantidade de material ativo encapsulado e material ativo presente na superfície da micropartícula pode comprometer consideravelmente a função da microencapsulação, em especial quando esta destina-se à proteção do material ativo e mascaramento de sabor e/ou odor, por exemplo. Os resultados de EE, quando considerados como no presente trabalho, permitem avaliar a necessidade de ajustes no processo, por exemplo, alteração da quantidade de material ativo na formulação e/ou manipulação do tamanho de partícula, esta última com a finalidade de diminuir a área de superfície da partícula.

3.4 Atividade de água e umidade

Os valores médios de atividade de água e umidade foram reunidos na Tabela 4. Coerentemente, tratamentos que envolveram o preparo de emulsão apresentaram valores de Aw e umidade maiores em relação aos demais.

Tabela 4

Atividade de água (Aw) e umidade mensuradas após preparo das micropartículas

Tratamento	Aw	Umidade (%)
T1	0,963 ± 0,009 a	27,71 ± 0,34 a
T2	0,965 ± 0,017 a	30,41 ± 0,28 a
T3	0,966 ± 0,021 a	29,78 ± 0,41 a
T4	0,969 ± 0,005 a	28,46 ± 1,24 a
T5	0,631 ± 0,014 b	1,43 ± 0,21 b
T6	0,690 ± 0,011 c	1,38 ± 0,18 b
T7	0,632 ± 0,008 b	1,74 ± 0,39 b

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

T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10; T6: gordura pura; T7: gordura + lecitina de soja.

A atividade de água nas partículas é relevante ao considerar que a cinética de degradação do material ativo pode ser influenciada pela presença de água. Se o material ativo for micro-organismos como nos estudos de Oliveira et al. (2012) e Okuro et al. (2013), a atividade de água requer ainda mais cuidado, uma vez que existe necessidade de manter o metabolismo microbiano reduzido a fim de garantir sua viabilidade. No caso do AA, os resultados de estabilidade foram fortemente influenciados pela Aw, tendo esse comportamento sido evidenciado até mesmo pela alteração de cor instrumental.

A ideia original da técnica de *spray chilling* menciona a produção de micropartículas a partir da atomização da mistura entre carreador e material ativo, ressaltando inclusive, que não há nenhum tipo de solvente envolvido no processo. Entretanto, recentemente tem surgido na literatura trabalhos Chambi et al., 2008; Leonel, 2010; Ribeiro et al., 2013, que como o presente, atomizaram emulsões, ou seja, o material ativo foi misturado ao carreador lipídico em solução aquosa. Avaliando os resultados influenciados pela Aw, impactando sobretudo na função da microencapsulação, nesse caso, manutenção da estabilidade do AA, faz-se conveniente julgar se essas adaptações da técnica não contrariam as vantagens associadas à ela. Antecipando as conclusões, neste trabalho verificou-se que a adaptação da técnica, atomização de emulsão ao invés de suspensão, não favoreceu, e sim, prejudicou o objetivo da microencapsulação por ter elevado a Aw das partículas. Tendo esses resultados motivado a realização de um novo estudo envolvendo apenas o preparo de suspensão (T5).

3.5 Comportamento térmico

Os termogramas obtidos por DSC foram reunidos na Figura 4. Para lecitina de soja e AA nenhum pico foi verificado. A ausência de pico deve-se ao fato que os pontos de fusão destes ingredientes são superiores a 100°C, limite máximo da faixa estudada.

A gordura utilizada como carreador apresentou um pico de fusão por volta de 43°C. Na análise das micropartículas tal comportamento se repetiu, ou seja, foi verificado o mesmo pico de fusão, independente do tratamento, porém, para os tratamentos T1 a T4, foi observado ligeiro estreitamento no pico, que pode ser atribuído à interação da gordura com a lecitina. Pela semelhança entre as amostras e a gordura com relação a este pico, verifica-se que não houve interação da gordura com o material lipofílico, o que levaria a depressão do ponto de fusão da gordura, e poderia acarretar alteração em seu comportamento polimórfico.

Nos tratamentos que foram preparados a partir da emulsão (T1-4) verificou-se a presença de um pico anterior ao da gordura, por volta de 0°C, o qual está relacionado com o processo de fusão da água. No tratamento 5, aquele proveniente do preparo de suspensão, não foi verificado tal pico, uma vez que não havia água na formulação.

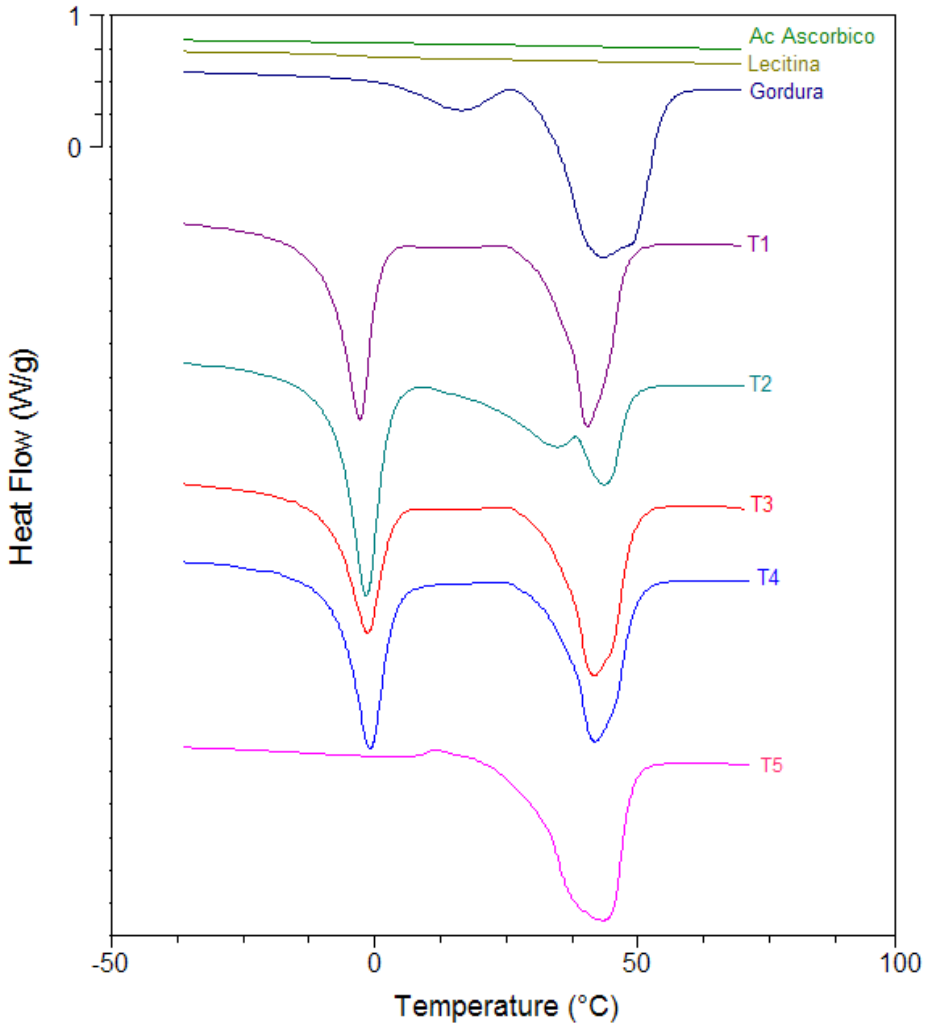

Figura 4. Termogramas dos ingredientes e micropartículas

T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10.

3.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – FTIR

Análise espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier foi realizada para detectar as possíveis modificações das propriedades físico-químicas do material ativo e/ou identificar possíveis interações entre o carreador e os componentes das formulações. Os espectros obtidos dos ingredientes utilizados e das micropartículas são apresentados na Figura 5. Como os espectros das micropartículas advindas de emulsão (T1-4) foram semelhantes, optou-se por apresentar apenas um.

Os espectros obtidos para os três ingredientes puros foram similares aos relatados na literatura. Para o AA os picos característicos foram obtidos em 1021, 1109, 1310, 1650, 1750, 3400 e 3520 cm^{-1}. Os picos em 1109, 1310 e 1650 cm^{-1} são atribuídos às ligações de (C=O) e aos grupos (OH) presentes na molécula de vitamina C (DESAI e PARK, 2005). Para a lecitina de soja os picos característicos 1042, 2851 e 2919 cm^{-1}, sendo o primeiro correspondente às ligações com compostos de fósforo (P-O) (SILVERSTEIN et al., 2000). Por fim, os picos característicos para gordura pura foram 1738, 2851 e 2919 cm^{-1}, o primeiro com intensidade de banda moderada e os dois últimos com intensidade de banda forte, que estão relacionados com a presença de compostos carbonilados, mais precisamente, aos ácidos carboxílicos. Outro pico característico na gordura foi 1170 cm^{-1} que está relacionada com a presença de ésteres (SILVERSTEIN et al., 2000).

Nas micropartículas os espectros foram bem coerentes, em todos os tratamentos apareceram picos característicos do AA, gordura e lecitina de soja, está última quando presente. Essas características similares confirmam que o material ativo estava presente nas micropartículas, ou seja, não foi perdido no processo de encapsulação empregado. O que há de diferente entre os tratamentos é um pico de banda larga e intensa que apareceu nas amostras provenientes dos tratamentos 1, 2, 3 e 4, e esteve ausente no tratamento 5. Esse pico que apareceu nessas amostras próximo de 3350

cm^{-1} está relaciona com a deformação axial de (O-H), em ligação de hidrogênio intermolecular indicando a presença de água (SILVERSTEIN et al., 2000). Isso é facilmente justificado, visto que nos tratamentos de 1 a 4, advindos de emulsão há água no sistema, diferente do tratamento 5 que, uma suspensão de AA anidro e gordura.

3.7 Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado

A estabilidade do ácido ascórbico livre em solução é apresentada na Figura 6. A influência da temperatura de estocagem na estabilidade do ácido ascórbico é nítida. Como esperado, quanto mais elevada a temperatura de estocagem, maior a velocidade de degradação do ácido. Com 15 dias de estocagem, 100% do AA estocado a 37°C já havia sido degradado. Quando a estocagem aconteceu a 24°C o ácido ascórbico se manteve a níveis abaixo de 30%, porém atingiu 15 dias de estocam. Quando a estocagem aconteceu em baixa temperatura o AA atingiu 30 dias, mas em níveis inferiores a 10%. Esses resultados são muito próximos aos relatados por autores que estudaram a estabilidade o AA em solução aquosa, entre eles Comunian at el (2013).

A estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado é apresentada na Figura 7. A temperatura de estocagem influenciou significativamente na estabilidade do AA encapsulado. Os tratamento que envolveram o preparo de emulsão se comportaram de maneira semelhante. Embora pela análise de cor os tratamento que continham maior concentração de ácido ascórbico apresentaram maior alteração, o estudo de estabilidade demostrou que a cinética de degradação não apresentou diferenças. Já o tratamento que envolveu o preparo de suspensão (T5) apresentou resultados de estabilidade de AA distintos em todas temperaturas de estocagem. A manutenção da estabilidade foi muito maior, tal diferença já podia ser notada pela alteração de cor,

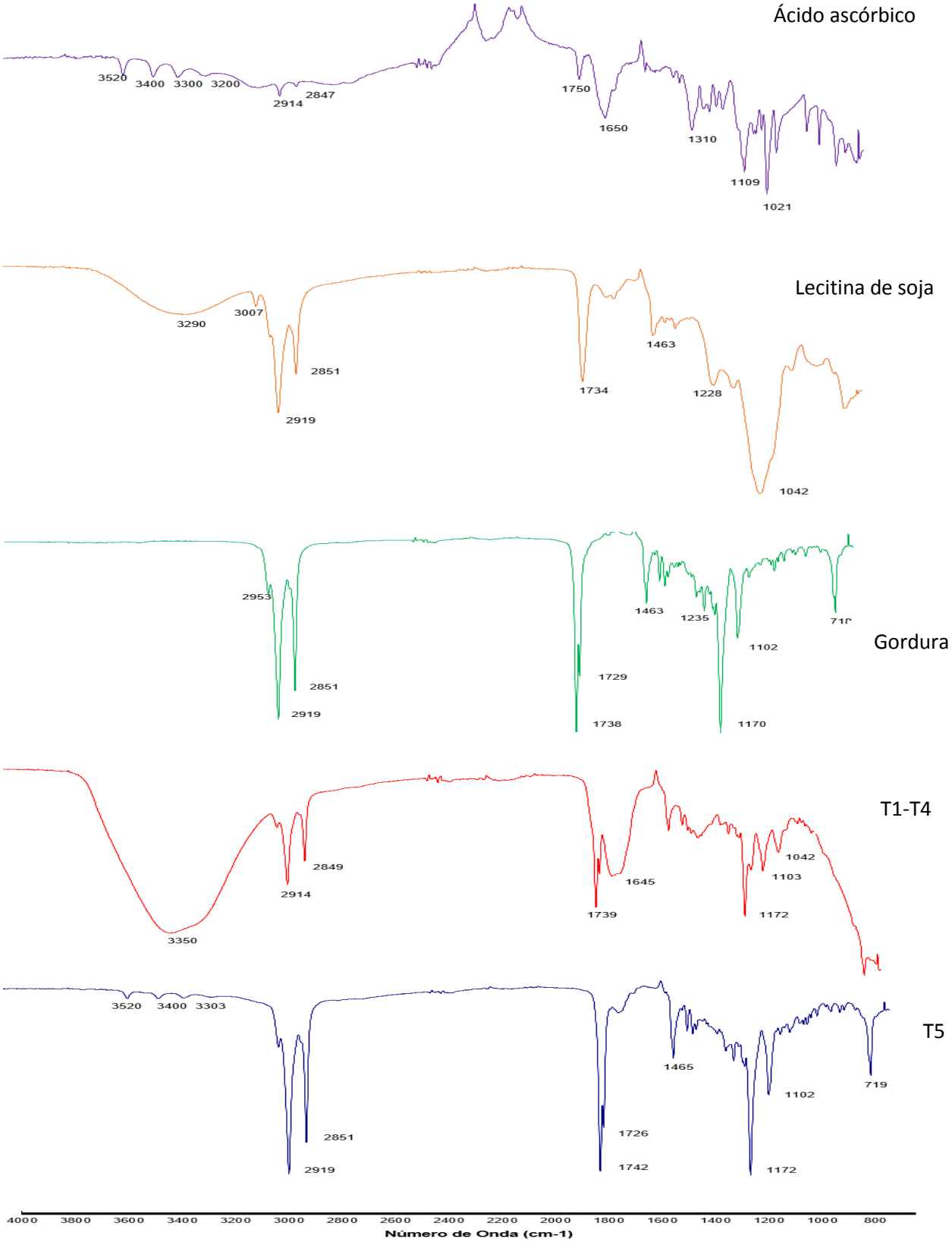

Figura 5. Espectros dos ingredientes e micropartículas. Onde T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10; T6: gordura pura; T7: gordura + lecitina de soja.

esse foi o tratamento que menos teve sua coloração alterada. A presença de água no sistema certamente é um fator determinante na explicação desses resultados.

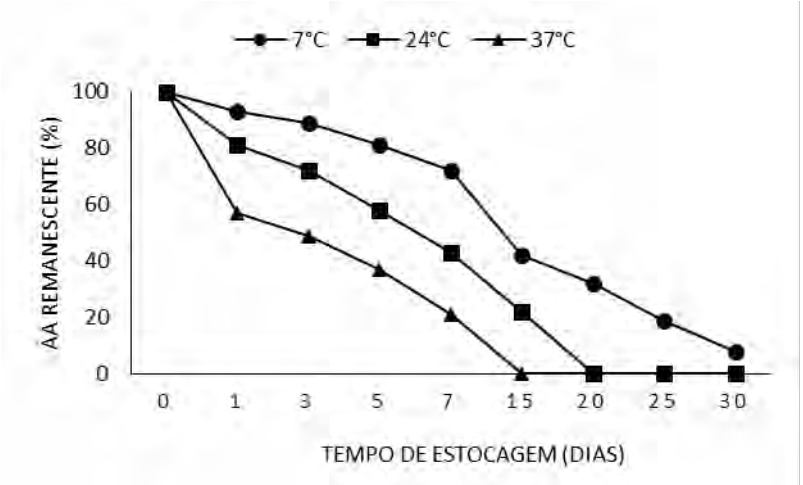

Figura 6 – Estabilidade do ácido ascórbico em solução estocado a 7, 24 e 37°C e avaliado por 30 dias.

Comparando os resultados com autores que encapsularam e avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico, entre eles aqueles que trabalharam com spray drying (TRINDADE e GROSSO, 2000; PIERUCCI et al., 2006; RIGHETTO e NETTO, 2006; PEREIRA et al., 2009), coacervação complexa (COMUNIAN et al., 2013) e fluidized bed coating (KNEZEVIC et al., 1998), a estabilidade proporcionada ao AA pelas micropartículas produzidas por spray chilling preparadas a partir de emulsão foi baixa, Já as partículas produzidas a partir de suspensão apresentaram resultado satisfatório. A 7 e 24°C o ácido ascórbico presente nessas partículas manteve estabilidade superior a 80% até 60 dias de estocagem. A 37°C a estabilidade após 60 dias foi mantida acima de 60%. Esses resultados mostram que se houver aperfeiçoamento no preparo dessas partículas, melhorando sua eficiência de encapsulação, por exemplo, maiores valores de estabilidade podem ser obtidos.

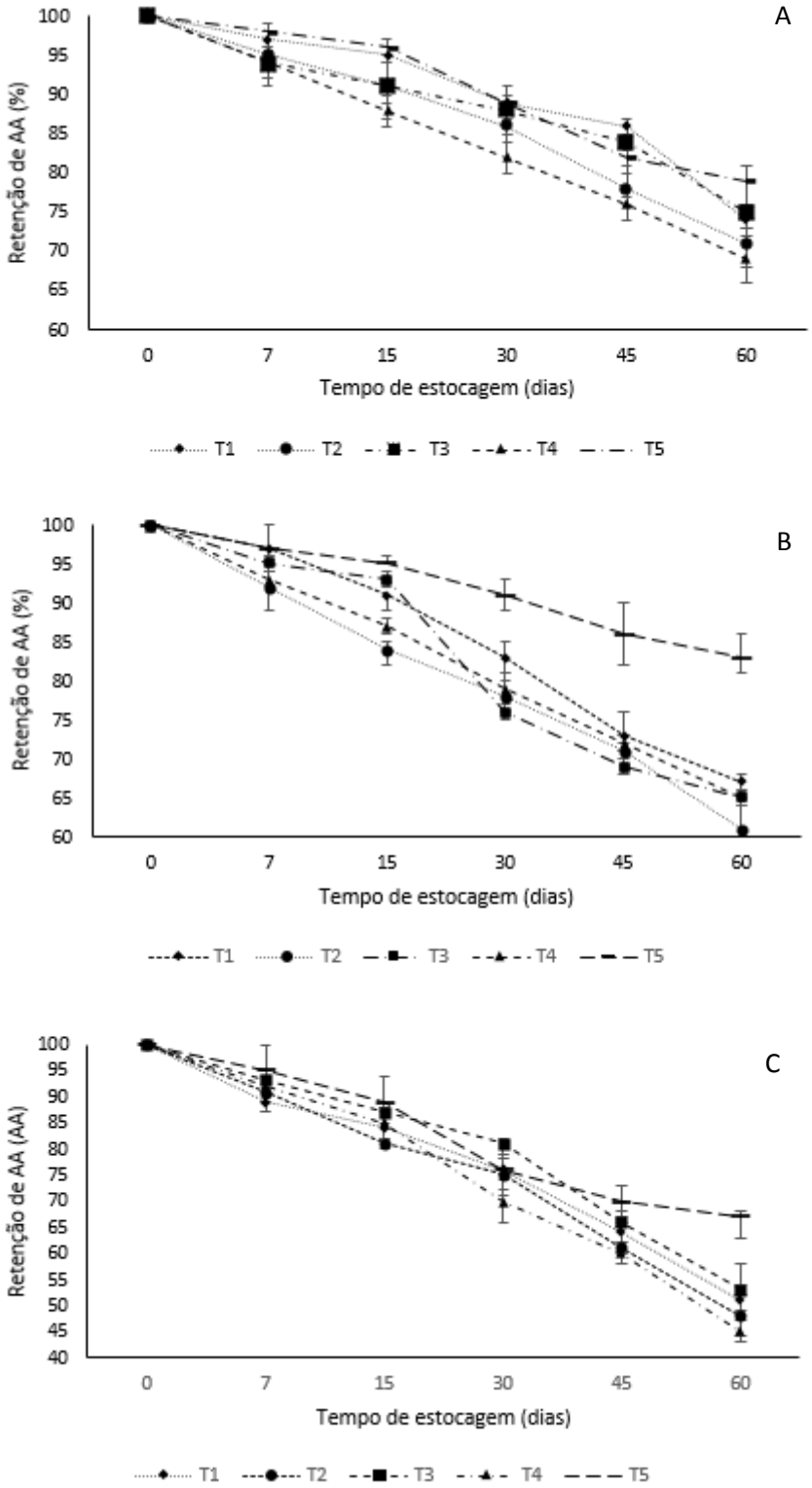

Figura 7 – Estabilidade do ácido ascórbico em solução estocado a 7°C (A), 24°C(B) e 37°C(C) e avaliada por 60 dias. Onde, T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10; T6: gordura pura; T7: gordura + lecitina de soja.

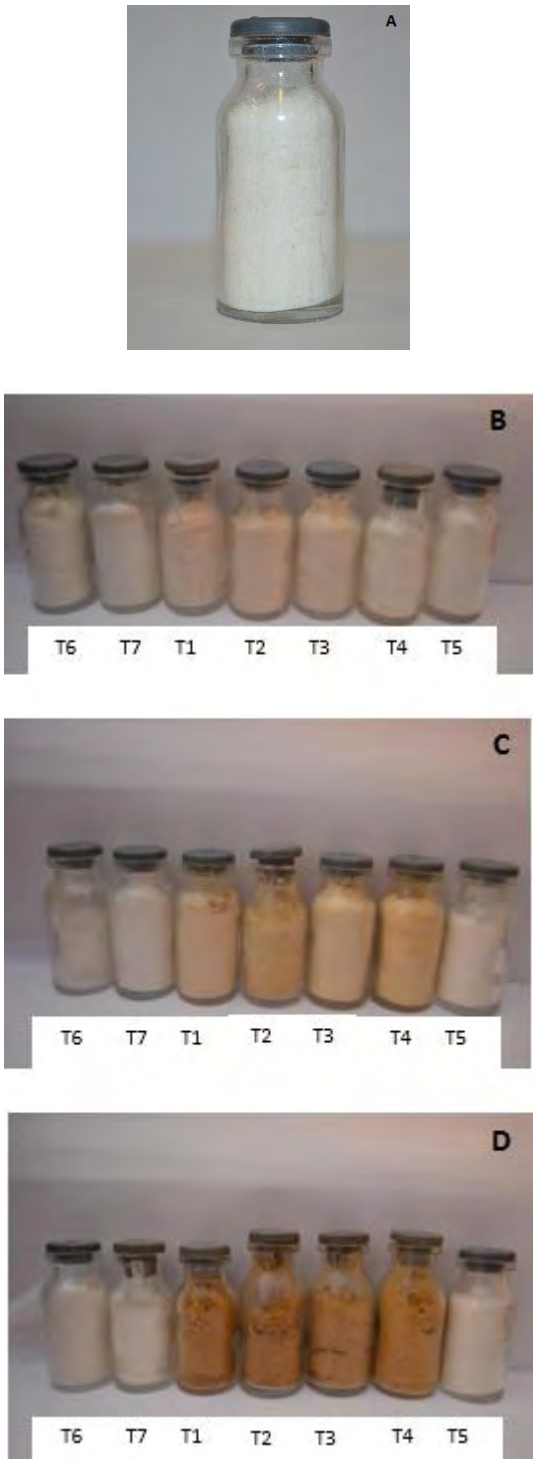

Figura 8. Evolução da aparência dos tratamentos imediatamente após o preparo (A) e armazenados a 7°C (B), 24°C (C) e 37°C (D) após 56 dias. Onde, T1: emulsão 1:7, 5000 rpm; T2: emulsão 1:10, 5000 rpm; T3 emulsão 1:7, 10000 rpm; T4: emulsão 1:10, 10000 rpm; T5: suspensão 1:10; T6: gordura pura; T7: gordura + lecitina de soja.

CONCLUSÃO

Entre as variáveis testadas em relação aso tratamento o tipo de preparo (emulsão ou suspensão) foi o que e mais influenciou nas diferenças nas características das micropartículas como na estabilidade do ácido ascórbico. A estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado por spray chilling comparando com ácido ascórbico livre foi consideravelmente maior, porém, comparando com outras técnicas proporcionou estabilidade menor quando as micropartículas foram produzidas a partir de emulsão. Os resultados de estabilidade das micropartículas obtidos a partir de suspensão foram satisfatórios, demonstrando que a técnica é uma alternativa promissora para manutenção da estabilidade do AA. Novos estudos devem ser realizados com o objetivo de estudar a influência dos parâmetros de processo nas características das partículas e essas últimas na estabilidade do AA.

REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

ABBAS, S. et al. Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends - A Review. **Food Reviews International**, v. 28, n. 4, p. 343-374, 2012.

ALVIM, I.D. et al. Utilização do método de spray chilling para veiculação de componentes hidrofóbicos: caracterização física das micropartículas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.33, suppl.1, p. 34-39, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the AOAC**. Washington, v. 2, p. 16-17, 1997.

BOUQUERAND, P.E. Extruded glassy vitamin C particles. **European Patent 1836902**, 2007.

CHAMBI, H.N.M.; ALVIM, I.D.; BARREA-ARELLANO, D.; GROSSO C.R.F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterization and release profiles. **Food Research International**, v. 41, p. 229-236, 2008.

CHANG, D. et al. Encapsulation of ascorbic acid in amorphous maltodextrin employing extrusion as affected by matrix/core ratio and water content. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.45, p.1895–1901, 2010.

COMUNIAN T.A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v.52, p.373–379, 2013.

DESAI, K. G.H.; PARK, H.J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate crosslinked chitosan microspheres by spray dr ying. **Journal of Microencapsulation**, v.22, n.2, p. 179, 2005.

DI SABATINO, M. et al. Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.5, p.346-356, 2012.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. **Food Technology**, n.42, p. 136-151, 1988.

ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **Int. J. Pharm**., v.242: p.329–334, 2002.

FANG, Z. e BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols—A review. **Trends Food Sci.**

Technol., v.21, p.510–523, 2010.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G..A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, 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. e ROCHA-LEAO, M. H. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. In: 2º Congresso Mercosul de Engenharia Química/4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos, 2005, Angra dos reis. **2º Congresso Mercosul de Engenharia Química/4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos**, 2005.

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

ILIĆ, I. et al. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spraycongealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v.381, n.2, p. 176–183, 2009.

KIM, S.S., et al. Microencapsulation of ascorbic acid in sucrose and lactose by cocrystallization. **Food Sci. Biotechnol.**, v.10, p.101–107, 2001.

KIRBY, C.J. et al. (1991), Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, p.437-449, 1991.

KNEZEVICT, Z. et al. Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n.2, 1998.

LEONEL, A.J. **Produção e Caracterização de Partículas Lipídicas Constituídas por Ácidos Graxos, Gordura Vegetal Hidrogenada e Lecitina na Encapsulação de um Composto Hidrofílico de Baixa Massa Molar**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

LEUSNER, S. et al. Oligosaccharide encapsulated mineral and vitamin ingredients. **U.S. Patent (**6468568), 2002.

WECHTERSBACH, L. et al. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. **LWT - Food Science and Technology**, v.45, n.1, p.43-49, 2012.

MASCHKE, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.65, n.2, p.175–187, 2007.

Novel multifunctional platforms for potential treatment of cutaneous wounds: Development and in vitro characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.440, n.2, p.238-249, 2012.

OKURO, P.K. et al. Co- encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, p. 96-103, 2013.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção de micropartículas lipídicas contendo Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium lactis produzidas por spray chilling.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de

Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

PASSERINI, N. et al. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v.88, n.2, p.263-275, 2003

PIERUCCI, A.P.T.R, et al. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v.23, n.6, p.654–662, 2006.

RIGHETTO, A.M. e NETTO, F.M. Vitamin C stability in encapsulated green west indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.1202–1208, 2006.

RODRIGUEZ, L. et al. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomiser for spray congealing processes. **International Journal of Pharmacy**, v.183, p.133-143, 1999.

SHARMA, R. e LAL, D. Fortification of milk with microencapsulated vitamin C and its thermal stability. **J. Food Sci. Technol**. V.42, p.191–194.

SILVERSTEIN, R.M. et al. **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.

RIBEIRO, M.D.M. et al. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. **Food Research International,** v,47, n.1, p.38-44, 2012.

TRINDADE, M.A. e 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.

WECHTERSBACH, L. et al. Stability and transformation of products formed from dimeric dehydroascorbic acid at low pH. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.65-973, 2011.

CAPÍTULO III

DESENOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO OBTIDAS POR *SPRAY CONGEALING*

Resumo

O ácido ascórbico é amplamente utilizando na indústria de alimentos como um antioxidante hidrossolúvel e para fortificar alimentos em razão de sua função vitamínica. Embora seja um aditivo eficaz, sua baixa estabilidade frente a diversos fatores ambientais leva a sua degradação durante o processamento e armazenamento do produto. Neste trabalho, com o objetivo de melhorar estabilidade do ácido ascórbico, empregou-se a tecnologia de microencapsulação. Foram produzidas micropartículas lipídicas sólidas através da técnica de spray congealing com carregamento teórico de ácido ascórbico de 15, 25 e 40% (peso/peso). Óleo de palma totalmente hidrogenado e glicerol monoestearato vegetal foram utilizados como carreadores lipídicos. As micropartículas obtidas foram caracterizadas quanto ao rendimento, morfologia (MEV), tamanho médio, distribuição de tamanho, comportamento térmico (DSC) e eficiência de encapsulação. A estabilidade do AA encapsulado armazenado em duas condições de temperatura, 22 e 37°C, foi investigada por 56 dias. As micropartículas analisadas apresentaram formato esférico com diferença nas características da superfície em função do tipo de gordura utilizado. O rendimento do processo foi superior 81% e a eficiência de encapsulação variou entre 74 e 84%, tendo sido influenciada pela concentração de ácido ascórbico presente na formulação. Em relação ao comportamento térmico, verificou-se que houve ligeira redução do ponto de fusão dos carreadores lipídicos na micropartícula em comparação com a forma pura. A estabilidade do ácido ascórbico encapsulado manteve-se em níveis superiores a 75% para todos os tratamentos. O tipo de lipídio, concentração de ácido ascórbico ou temperatura de estocagem não influenciaram na estabilidade do material ativo. Pelos resultados obtidos conclui-se que a microencapsulação por spray congealing pode representar uma importante alternativa para garantir a estabilidade do ácido ascórbico mesmo em condições de temperatura de estocagem superiores as usuais.

Palavras chaves: spray chilling, spray cooling, microencapsulação, vitamina C, estabilidade.

1 INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel amplamente distribuída na natureza, encontrado principalmente em frutas cítricas. Considerado como um carboidrato cujas propriedades redutoras e de acidez são dadas pela porção 2,3-enediol, apresenta estável como um pó, mas altamente instável quando em solução, podendo ser afetado por fatores ambientais como altas temperatura, pH alcalino, oxigênio, íons metálicos, UV e raios-x (UDDIN et al., 2001).

Este ingrediente é adicionado extensivamente em vários tipos de produtos alimentícios para dois propósitos muito distintos, como um suplemento vitamínico para reforçar a ingestão dietética de vitamina C, e como um antioxidante, para proteger a qualidade sensorial e nutricional do alimento em si (KIRBY et al., 1991). Como antioxidante no alimento o ácido ascórbico atua como um removedor de oxigênio e sinergista na regeneração de antioxidantes primários como a vitamina E. Enquanto vitamina, está envolvido em diversas funções vitais no organismo humano. Atua na síntese de proteica, nos funcionamento dos sistemas imunológico e nervoso, na cicatrização de feridas e o um dos principais antioxidantes naturais do organismo (CERQUEIRA et al., 2007).

Devido suas funções tanto no alimento quanto na saúde, o ácido ascórbico representa uma excelente alternativa em substituição aos antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos que não oferecem nenhum benéfico adicional à saúde do consumidor. Além disso, é particularmente interessante em relação à tendência mundial que estimula as pesquisas que visam substituir os aditivos convencionais por substâncias que garantam

não apenas a estabilidade e qualidade do alimento, mas que sejam seguras para o consumo. Todavia, a adição de ácido ascórbico em determinados alimentos é limitada, não só pela sua instabilidade em solução, mas também pela sua alta reatividade o que pode conferir alterações de cor e sabor ao alimento ao interagir com outros componentes da matriz alimentícia (UDDIN et al., 2001). Uma alternativa para contornar essa limitação, aumentando a estabilidade do ácido ascórbico e reduzindo a possibilidade de reações indesejáveis com outros componentes é a utilização da microencapsulação.

Em seu conceito clássico, a microencapsulação é considerada um processo de formação de partículas onde um ingrediente ativo é recoberto por uma fina camada de outro material, o que proporciona ao ingrediente proteção, liberação controlada e conveniência (HEGENBART, 1993). A microencapsulação é aplicável a materiais sólidos, líquidos ou gasosos. O material obtido do processo pode ser denominado de microcápsulas ou micropartículas, dependendo da distribuição do material ativo no agente encapsulante após encapsulação (SPARKS, 1981). Entre os objetivos da microencapsulação encontra-se registrados na literatura, redução da reatividade do material ativo com o ambiente, diminuição da velocidade de evaporação ou de transferência do material ativo para o meio, facilitação da manipulação do material encapsulado, promoção de liberação controlada, mascaramento de sabor e/ou odor desagradáveis e proteção ao material ativo contra condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (SHAHIDI e HAN, 1993).

Vários métodos têm sido utilizados para promover a microencapsulação nas mais variadas áreas da indústria. Sendo que a seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON e LEE, 1991). Os métodos podem ser agrupados em físicos (spray drying, spray congealing, leito fluidizado, liofilização etc.), químicos (polimerização interfacial, polimerização in situ, inclusão molecular etc.) e físico-

químicos (coacervação complexa, lipossomas, evaporação do solvente etc.) (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

Para este trabalho foi adotada a técnica de *spray congealing* para a encapsulação do AA, por se tratar de uma técnica de encapsulação ainda pouco explorada na área de alimentos que pode contornar as limitações e desvantagens de outras técnicas de encapsulação. Esta técnica tem como sinônimos os termos *spray chilling* e *spray colling*, todavia, neste capítulo foi adotado o termo *spray congealing* porque é desta forma que o grupo coordenado pelas Profas. Dras. Beatrice Albertini e Nadia Passerini, da Universidade de Bolonha, onde o trabalho foi realizado, denomina o método.

Trata-se de um processo físico para obtenção de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) que dispensa o uso de altas temperaturas, água ou solventes orgânicos, excluindo assim, a necessidade de eliminação de solventes residuais, o que é positivo do ponto de vista ambiental (OKURO et al., 2013). A técnica consiste da atomização de uma mistura, solução ou suspensão de material ativo e carreador fundido, dentro de um ambiente mantido à temperatura abaixo do ponto de fusão do carreador. A atomização produz gotículas que se solidificam rapidamente ao entrar em contato com o ar frio ou N_2 formando as micropartículas (KILLEEN, 1996).

A técnica de *spray congealing* representa uma importante alternativa para encapsulação do AA. Além de não utilizar altas temperaturas que podem degradar a vitamina, não há utilização de água, a qual reduz drasticamente a estabilidade do AA, acelerando sua degradação. Embora seja uma técnica promissora para encapsulação de AA, não foi encontrado na literatura trabalho com tal propósito. Assim, esse estudo objetivou produzir e caracterizar micropartículas lipídicas carregadas com AA pela técnica de *spray congealing* e avaliar a estabilidade do ácido ascórbico encapsulado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Ácido ascórbico, clorofórmio, sulfato de cobre anidro, cloreto de amônio, hidróxido de amônio concentrado e Tween 80 foram comprados da Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Alemanha). Glicerol monoestearato vegetal 90 (Prabo SRL, Spino d'Adda, Itália) (Ponto de fusão: 79,51°C) e óleo de palma totalmente hidrogenado (Polichimica, Bologna, Itália) (Ponto de fusão: 64,02°C) foram utilizados como carreadores na produção de micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA. Todos esses reagentes apresentavam grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Produção das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com ácido ascórbico

As micropartículas lipídicas sólidas com carregamento teórico de 15, 25 e 40% (peso/peso) de AA foram produzidas utilizando um aparato de *spray congealing* equipado com atomizador duplo fluido (Figura 1), o qual foi detalhadamente descrito por Albertini et al. (2008).

Inicialmente, o carreador lipídico foi fundido a temperatura de 10°C acima do seu ponto de fusão (72°C para glicerol monoestearato vegetal e 61°C para óleo de palma totalmente hidrogenado), previamente definido através de análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC). O AA foi suavemente moído para se tornar um pó fino (inferior a 100 µm) utilizando um pistilo e um pilão de porcelana (Figura 2), sendo em

seguida adicionado ao carreador fundido, mantendo a mistura sob aquecimento e agitação com uma barra magnética a fim de obter-se uma suspensão (Figura 3).

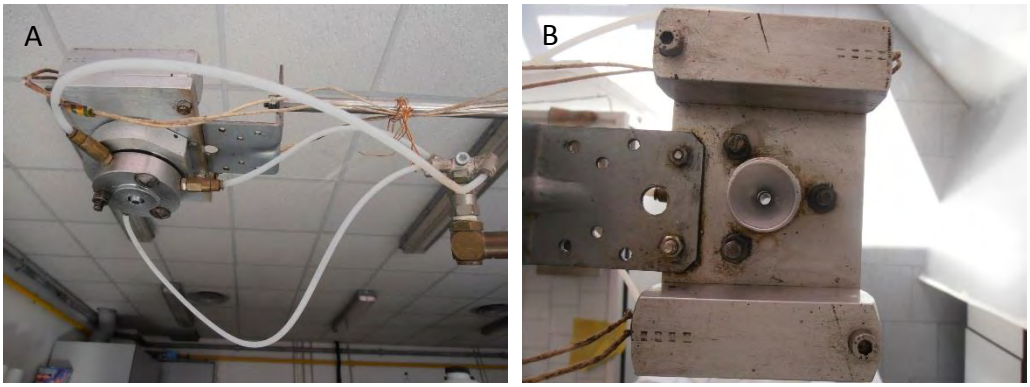

Figura 1 – (A e B) Bico de atomização duplo fluido utilizado para produção de micropartículas lipídicas sólidas pela técnica de *spray congealing*.

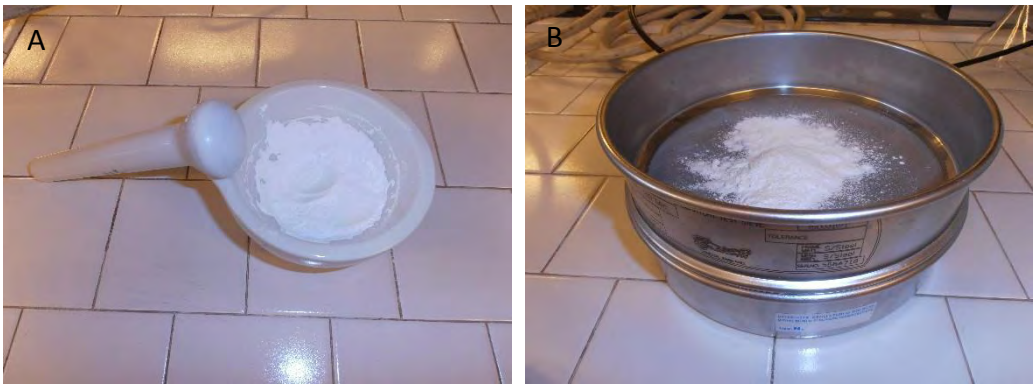

Figura 2 – (A) Ácido ascórbico em pilão de porcelana para maceração; (B) Ácido ascórbico macerado sendo peneirado utilizando peneira de 100 µm para obtenção de um pó fino.

Figura 3 – (A) Lipídio puro fundindo; (B) Lipídio puro fundido; (C) Suspensão de lipídio e AA aquecida sendo agitada para posterior atomização.

A atomização da suspensão fundida foi realizada sob pressão de 4 bar e temperatura do bico a 100°C. A solidificação das gotículas provenientes da atomização ocorreu dentro de uma câmara plástica mantida à temperatura ambiente (±13°C) de onde as micropartículas obtidas foram coletadas (Figura 4). Por fim, as micropartículas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar devidamente fechados e armazenados a 22 e 37°C para posteriores análises (Figura 6).

Figura 4 – (A) Câmara de atomização montada e bico de atomização posicionado para iniciar o processo; (B) Partículas sendo coletadas com auxílio de um pincel após o termino da atomização; (C) Partículas coletadas com auxílio de uma folha de papel.

Figura 5 – Verificação da presença e remoção de sujidades nas micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA obtidas por *spray congealing*.

Figura 6 – Micropartículas acondicionadas em frasco de vidro âmbar adequadamente tampado e identificado.

Tabela 1.

Composição das formulações utilizadas para produção das MLS carregadas com AA

Formulação	Composição (% peso/peso)	
	Carreador	Ácido Ascórbico
	Óleo de palma hidrogenado	
OP15	85	15
OP25	75	25
OP40	60	40
	Glicerol monoestearato vegetal 90	
GMV15	85	15
GMV25	75	25
GMV40	60	40

2.2.2 Caracterização das micropartículas

2.2.2.1 Rendimento de processo

O rendimento do produto foi determinado dividindo a quantidade obtida de micropartículas pelo valor resultante da soma do ácido ascórbico e carreador utilizados no preparo da suspensão. O valor do rendimento de processo foi expresso em porcentagem conforme a Equação I.

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Quantidade\ de\ microparticulas\ obtidas\ (g)}{Quantidade\ de\ carreador(g) + Quantidade\ de\ AA\ (g)}\ x\ 100 \qquad Equação\ I$$

2.2.2.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada pela diferença entre a quantidade de AA total e a quantidade de AA presente na superfície das micropartículas conforme

descrito por Comunian et al. (2013). Para extração do AA das micropartículas lipídicas adotou-se o método proposto por Maschike et al. (2007), com algumas modificações. A lavagem das micropartículas para determinação do ácido ascórbico superficial foi realizada como descrito por Leonel et al., (2010), com adaptações. Para quantificação do AA, tanto total como superficial, foi usado o método espectrofotométrico desenvolvido por Farajzadeh e Nagizadeh (2003). Esse método é baseado na reação entre o ácido ascórbico e o complexo de cobre(II)-amônia. Durante a reação o ácido ascórbico é oxidado e o complexo de cobre(II)-amônia reduzido para o complexo de cobre(I)-amônia, ocorrendo decréscimo da absorbância a 600 nm, o que permite quantificar a concentração de ácido ascórbico na amostra a partir da construção de uma curva padrão. O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado conforme a Equação II.

$$Eficiência\ de\ encapsulação\ (\%) = \frac{(AA_{total} - AA_{superficial})}{AA_{total}}\ x\ 100 \qquad Equação\ II$$

2.2.2.3 Tamanho de partícula

O analisador de partículas por difração a laser Shimadzu SALD-201V (Shimadzu, Tóquio, Japão) foi utilizado para determinação do tamanho de partícula e distribuição de tamanho. As micropartículas foram suspensas em solução aquosa de Tween 80 (1% peso/peso) e estabilizadas por 5 minutos antes da análise para evitar aglomeração.

2.2.2.4 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas no suporte de amostras com fita de dupla face adesiva, revestida por borrifamento com Au/Pd sob atmosfera de argônio através de um evaporador de alto vácuo (Edwards, Crawley/Reino Unido) e examinadas por meio

de um microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL JSM- 6500F (Welwyn Garden City/Reino Unido), em 5 kV de tensão de aceleração.

2.2.2.5 Análise térmica

Para realização da análise de calorimetria diferencial de varredura foi utilizado o analisador térmico Perkin-Elmer DSC 6 (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK). Cerca de 10 mg de amostra foi acondicionada em cápsula de alumínio e aquecida a 10°C/min, entre 25 e 240 °C sob atmosfera inerte (25 mL/min de N_2). Uma cápsula vazia foi utilizada como referência e o nitrogênio líquido para a refrigeração da amostra antes de cada corrida. As micropartículas foram analisadas após a produção e após 56 dias de estocagem. Cada análise foi realizada em duplicata. Para comparação, os carreadores lipídicos e o AA puros também foram analisados.

2.2.3 Estudo da estabilidade do ácido ascórbico encapsulado

A estabilidade do AA microencapsulado foi avaliada durante 56 dias em intervalos de 7 dias com as amostradas estocadas à temperatura de 24±1 °C e 37±1 °C. Para extração do AA das micropartículas lipídicas foi utilizado o método descrito por Maschike et al. (2007) com algumas modificações. Já a determinação do conteúdo de AA foi realizada pelo método desenvolvido por Farajzadeh e Nagizadeh (2003). As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por um design completamente randomizado e o processo foi repetido por duas vezes. Os dados obtidos foram analisados

estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usando a versão 9.1.3 do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS, 1995). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $\alpha \leq 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das micropartículas

3.1.1 Rendimento de processo

Na Tabela 2 foram apresentados os resultados obtidos para rendimento, eficiência de encapsulação (EE) e diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA produzidas por *spray congealing*.

Alto rendimento de processo é uma das principais vantagens associadas à técnica de *spray congealing*. Os valores relatados na literatura geralmente superam 75% (MASCHKE et al., 2007; ILIĆ et al., 2009; PASSERINI et al., 2012) e sofrem variações em função de parâmetros do processo como a pressão de atomização e temperatura do bico de atomização, propriedades do carreador lipídico e material ativo (MASCHKE et al., 2007) e design do equipamento utilizado para produção das partículas. Neste trabalho, como apresentado na Tabela 2, os valores de rendimento observados corroboraram com os da literatura, pois foram superiores a 81% para todas as formulações, variando entre 81,4 e 84,4%.

Dois fatores podem ter influenciado na subtração do rendimento final: i) uma pequena quantidade da alimentação (mistura de lipídio e material ativo) pode ter permanecido aderida no recipiente e/ou barra magnética utilizados para o preparo da suspensão,

bem como no bico de atomização; ii) durante a nebulização, partículas muito pequenas permanecem suspensas no ar e não são contabilizadas na determinação da massa de partículas obtidas, dado este, que compõe o cálculo do rendimento do processo. De acordo com Maschke et al. (2007), a segunda possibilidade para redução do rendimento pode ser evitada fazendo-se ajustes nos valores de pressão de atomização, que propiciariam aumentar consideravelmente o tamanho médio das partículas, consequentemente evitando-se ou reduzindo-se a perda de micropartículas muito pequenas que permanecem suspensas no ar e não entram efetivamente na câmara de atomização. Porém, partículas grandes podem ser notadas na boca, o que afetaria a textura dos alimentos, desta forma, dependendo da aplicação que será dada à partícula, aumentar seu tamanho não é uma boa alternativa.

Tabela 2.

Rendimento, ácido ascórbico superficial, eficiência de encapsulação (EE) e diâmetro médio de volume (DMV) das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA produzidas por *spray congealing*

Formulação	Rendimento (%)	AA superficial (%)	EE (%)*	VMD (µm)
OP15	82,1±2,3	25,34 ± 3,30	74,66±3,30	146,74±4,01
OP25	81,4±1,4	19,76 ± 0,95	80,24±0,95	158,28±5,14
OP40	84.4±3,6	18,73 ± 0,93	81,27±0,93	167,21±1,40
GMV15	81,6±2,2	22,87 ± 1,32	77,13±1,32	89,24±2,95
GMV25	84,2±3,9	20,44 ± 0,23	79,56±0,23	96,15±2,77
GMV40	83,0±1,4	15,50 ± 0,43	84,5±0,43	102,21±3,14

3.1.2 Eficiência de encapsulação

Os resultados de eficiência de encapsulação são apresentados na Tabela 2. Constatou-se que os valores encontrados tiveram relação com o tamanho de partícula e com a concentração de AA presente na formulação independentemente do tipo de lipídio

utilizado. Quanto maior a concentração de material ativo e menor o tamanho das partículas, menor foi o valor de eficiência encapsulação encontrado. Esses resultados podem ser justificados pelo tipo de partícula produzida pela técnica de *spray congealing*, partículas do tipo matriz, as quais, diferentemente das microcápsulas que representam o tipo reservatório, o material ativo está disperso no carreador solidificado, ou seja, presente em todo o volume da partícula e não apenas em seu centro (OKURO et al., 2013). Quanto menor a partícula, maior é sua área superficial, consequentemente, maior a possibilidade de presença de material ativo na superfície.

Não há consenso na literatura em relação à definição do termo "eficiência de encapsulação", o que gera, como consequência, resultados determinados por diferentes equações e métodos, dificultando as comparações. Neste trabalho considerou-se como EE a diferença entre o conteúdo de AA total presente nas micropartículas e o conteúdo de AA presente ou adsorvido na superfície das micropartículas. A proposta é avaliar a quantidade de material ativo efetivamente encapsulada e a quantidade de material ativo que ficou retida na superfície das partículas desprovido da função desejada com a encapsulação, neste caso, proteção do ácido ascórbico. Leonel et al. (2010) que utilizaram metodologia semelhante para determinar a EE na produção de micropartículas lipídicas sólidas carregadas glicose em solução por *spray chilling*, relataram que a quantidade de material ativo efetivamente encapsulado variou entre 78,3 e 97,8%. Segundo esses autores, quanto maior a concentração de glicose na solução, menor foram os valores de EE encontrados. Fato este que também foi observado no presente trabalho. No entanto, diferentemente do que foi encontrado para as micropartículas carregadas com AA, Chambi et al. (2008) relataram que o tamanho de partícula não influenciou nos valores de eficiência de encapsulação.

Como objetivo da encapsulação do AA foi a manutenção da sua estabilidade, se faz necessária especial atenção quanto ao valor de eficiência de encapsulação na interpretação dos resultados da curva de estabilidade. Se as micropartículas

apresentam elevada quantidade de material ativo na superfície, ou seja, desprovido de proteção, espera-se que os valores de degradação nos pontos iniciais do estudo de estabilidade sejam mais acentuados, podendo ser verificada em seguida uma redução da cinética de degradação. Alto valor de material ativo na superfície deve motivar uma reavaliação dos parâmetros de processo utilizados, concentração de material ativo e tipo de carreador.

3.1.3 Tamanho de partícula

As amostras apresentaram partículas polidispersas (com tamanhos muito variados) e distribuição unimodal. Os valores médios de diâmetro (Tabela 2) corroborados pela distribuição do tamanho de partículas representada na Figura 7, demonstram que a concentração de AA presente na formulação e o tipo de lipídio utilizado influenciaram no tamanho da partícula. Tal comportamento pode ser correlacionado pela influência da viscosidade da suspensão atomizada no tamanho de partícula como sugerido por Maschke et al. (2007) e Albertini et al (2008). A concentração de AA interferindo no aumento da viscosidade da suspensão foi verificada em todos os tratamentos, independentemente do lipídio utilizado, o que ocasionou aumento do aumento do tamanho de partícula. Resultados semelhantes foram relatados por diversos autores que trabalharam a técnica de *spray congealing*, entre eles Maschke et al. (2007) que microencapsularam insulina humana e Di Sabatino et al (2012) que microencapsularam albumina de soro bovino. Além disso, micropartículas preparadas com glicerol monoestearato vegetal foram significativamente menores em comparação aquelas preparadas com óleo de palma hidrogenado. Deve-se considerar que glicerol monoestearato vegetal apresenta ponto de fusão que supera uma diferença de 15°C em relação ao óleo de palma hidrogenado. Enquanto o ponto de fusão constatado do primeiro foi de 79°C, do segundo foi de 64°C. A influência que a temperatura exerce na viscosidade do fluido, consequentemente, no tamanho de partícula, pode ser a justificativa para tal diferença entre partículas produzidas com óleo de palma hidrogenado e glicerol monoestearato vegetal.

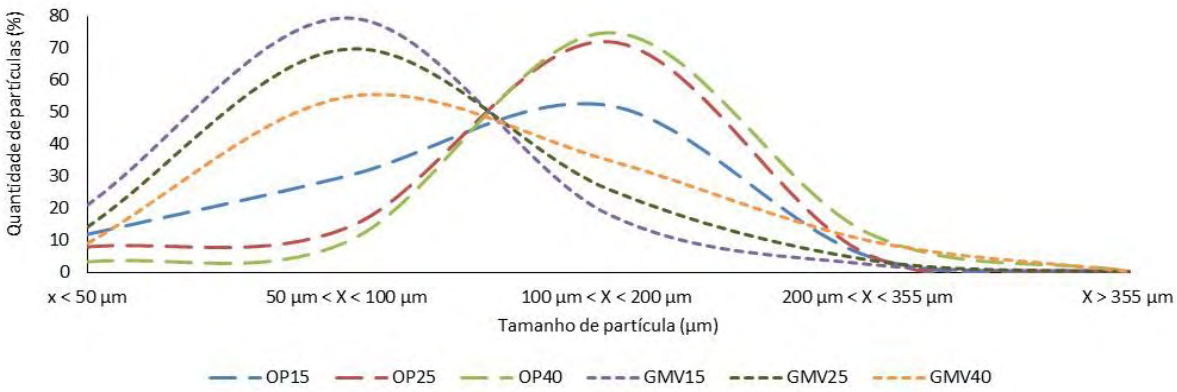

Figura 7 – Distribuição de tamanho das partículas lipídicas sólidas carregadas com AA.

3.1.4 Análise morfológica

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas e do AA foram reunidas na Figura 8. O AA apresentou-se como cristais quebrados resultado da maceração e peneiramento com peneira de 100 µm. As micropartículas apresentaram formato esférico, característica típica de micropartículas preparadas por *spray congealing* (DI SABATINO et al., 2012; GAVORY et al., 2013; ALVIM et al., 2013; OKURO et al., 2013). Como oportuno, Oliveira et al. (2008) que microencapsulou bactérias probióticas e fez relato da constatação de micropartículas com formato esférico, bem ressaltou que tal formato facilita o fluxo de material, embora o formato não seja o único fator que determina a capacidade de fluidez. Além de esféricas, as partículas devem ser densas, característica esperada por partículas obtidas por *spray congealing*, onde não há evaporação de solvente, diferente das partículas produzidas por *spray drying*, por exemplo, que podem apresentar interior oco, em virtude da evaporação do solvente.

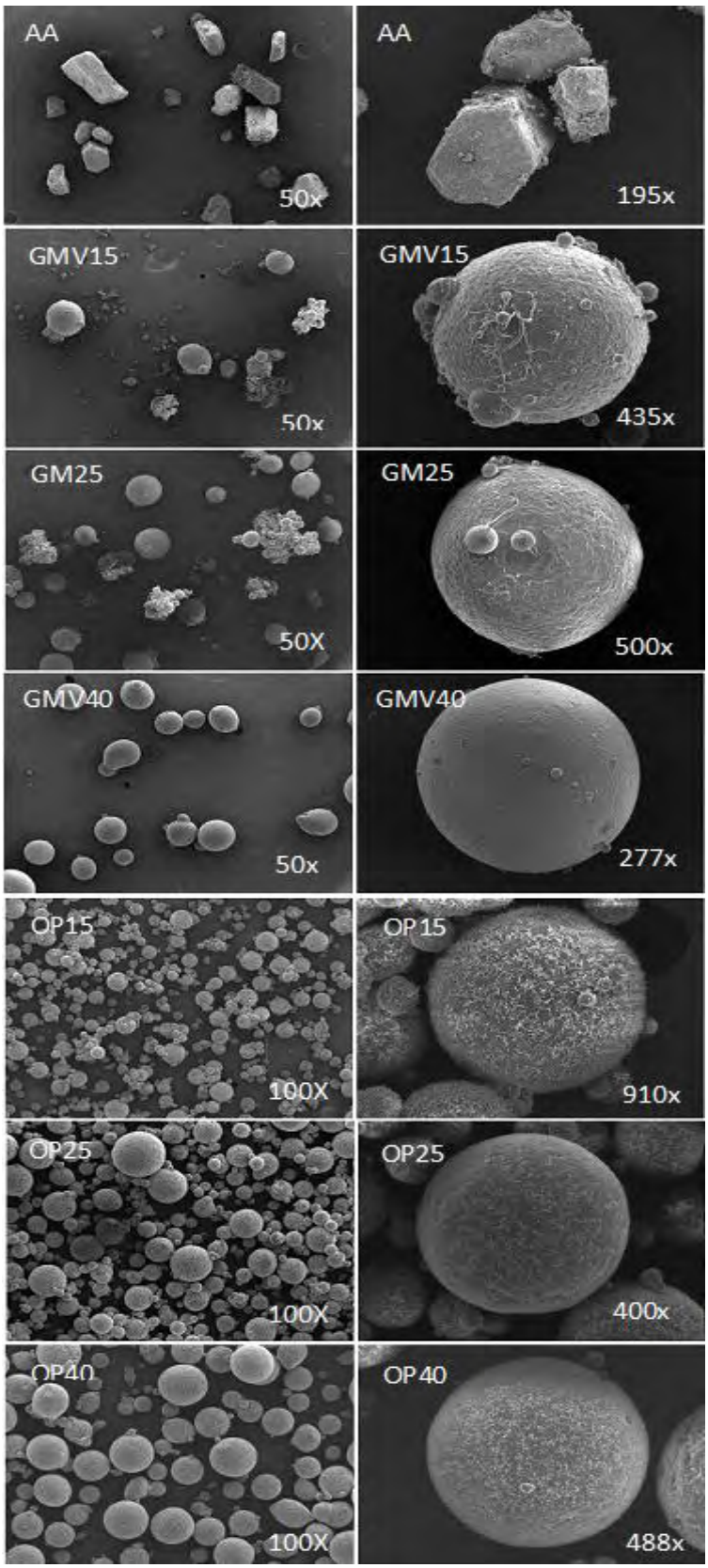

Figura 8 – Micrografias eletrônicas do AA anidro e das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA.

Em relação à superfície, as micropartículas apresentaram diferenças em função do tipo de lipídio e da concentração de AA. Nas micropartículas produzidas com glicerol monoestearato vegetal, verificou-se superfície lisa e sem rachaduras. A concentração de AA não influenciou no aspecto morfológico das partículas. Já aquelas produzidas com óleo de palma hidrogenado apresentaram superfície áspera/rugosa, sendo tal característica atenuada pelo aumento da concentração de material ativo, ou seja, micropartículas com carregamento teórico de com 40% de AA mostraram-se menos ásperas/rugosas do que micropartículas com carregamento teórico de 15 e 25%. Tal característica pode ser atribuída ao fato de óleo de palma hidrogenado ser uma gordura heterogênea, composta por diferentes triacilgliceróis, que produzem cristais de diferentes tamanhos. Maschke et al. (2007) que também utilizaram a técnica de *spray congealing* para encapsular insulina humana em tripalmitato de glicerol, um glicerídeo encontrado no óleo de palma, relataram características semelhantes em relação a superfície das micropartículas. Assim como nos resultados encontrados neste trabalho, esses autores verificaram que o aumento da quantidade de material ativo, no caso a insulina, reduziu a rugosidade/aspereza consideravelmente.

3.1.5 Análise térmica

O comportamento térmico dos ingredientes puros e das micropartículas recém preparadas é apresentado nas Figuras 9 e 10. Não houve alteração no comportamento térmico após 56 dias de estocam, motivo pelo qual estão sendo apresentados apenas gráficos das micropartículas recém preparadas. Essa análise foi realizada com intuito de detectar possíveis alterações das propriedades físico-químicas do material ativo e/ou carreador lipídico e possíveis interações entre ambos. Inicialmente, ao avaliar os ingredientes puros, verificou-se que os pontos de fusão assemelham-se aos valores informados pelos fabricantes dos respectivos produtos, tendo sido observadas pequenas variações de ±3°C.

Interações semelhantes como resultado da interação carreador/material ativo foram relatadas por diversos autores que trabalharam com *spray congealing* para encapsular

diferentes ingredientes utilizando diferentes carreadores. Albertini et al. (2009), por exemplo, microencapsulando nitrato de econazol, um fármaco antifúngico, em poloxâmeros, também verificou redução do ponto de fusão do carreador lipídico na micropartículas.

Os resultados de DSC são importantes, pois como a solidificação do material fundido é muito rápida, uma possível consequência é ocorrência de modificações do estado sólido do carreador lipídico e/ou do bioativo, por exemplo, a transformação da forma cristalina original num polimorfo diferente ou um estado amorfo (PASSERINI et al., 2003). Sendo a maior desvantagem disto, a possibilidade de expulsão do material ativo (LEONEL et al., 2010). Neste trabalho, pelos termogramas obtidos não se verificou alterações que pudessem sugerir alterações anormais do comportamento térmico, como por exemplo, aparecimento de outros picos, tal como relatado por Maschke et al. (2007) que encapsularam insulina utilizando tripalmitato de glicerol.

Alterações de comportamento térmico também não foram verificadas quando estabelecida comparação entre as micropartículas com 56 dias de estocagem e aquelas recém-preparadas. A temperatura de estocagem, 22 ou 37°C, também não foi capaz de provocar alterações no comportamento térmico do carreador e/ou AA presente nas partículas, tal resultado permite inferir que as partículas são fisicamente estáveis à temperatura ambiente e também em temperatura abusiva.

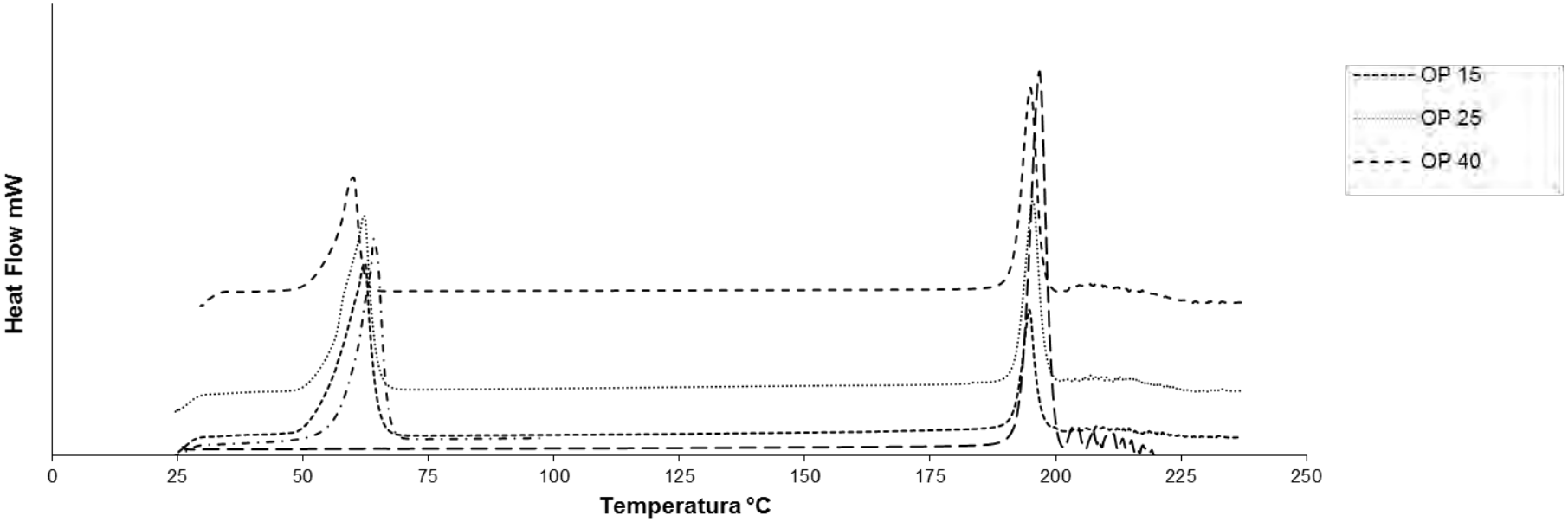

Figura 9 – Termograma do ácido ascórbico e das micropartículas preparadas com óleo de palma hidrogenado em 3 concentrações de AA (15, 25 e 40%).

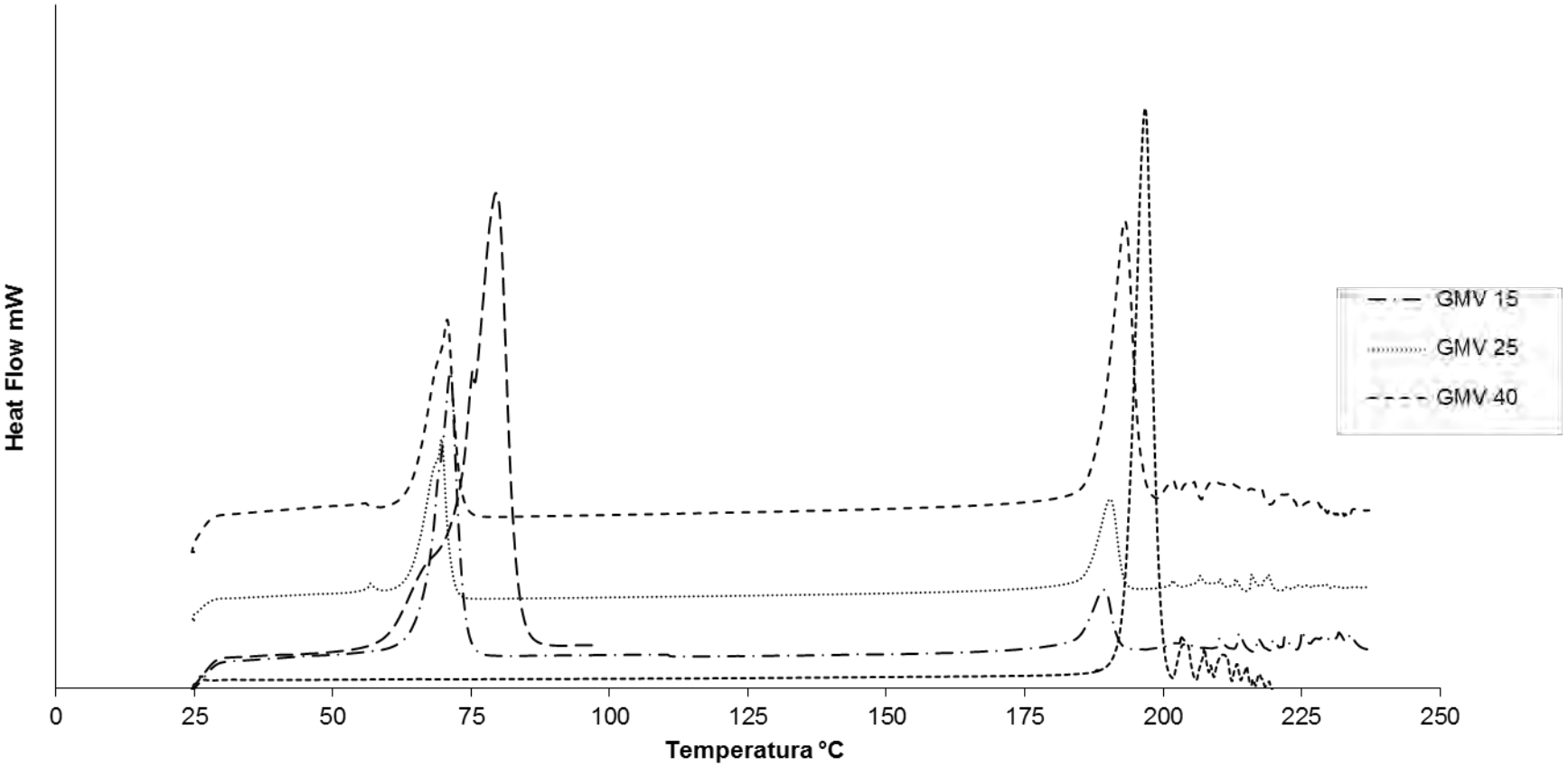

Figura 10 – Termograma do ácido ascórbico e das micropartículas preparadas com glicerol monoestearato vegetal em 3 concentrações de AA (15, 25 e 40%)

3.2 Estudo da estabilidade do ácido ascórbico encapsulado

Na Figura 11 são apresentados os estudos de estabilidade do AA encapsulados. Em análise geral contatou-se que no mínimo 70% do AA em comparação a determinação inicial (tempo zero) foi mantido estável após 56 dias de estocagem. Para as micropartículas preparadas com óleo de palma não foi verificada diferença estatística entre os valores de estabilidade em função da temperatura de estocagem das micropartículas. As micropartículas com carregamento teórico de 15% de AA apresentaram maior de estabilidade, seguidas pelas partículas com carregamento de 25 e 40%. Tal comportamento foi verificado independente da temperatura de estocagem. Em suma, o aumento da degradação de AA foi influenciado pela concentração de AA presente nas partículas, quanto maior essa concentração, menor foi a concentração de AA remanescente. Ao contrário do que se esperava, considerando a influência da temperatura na velocidade das reações, a estocagem das partículas a 37°C não provocou maior degradação do AA.

Para micropartículas preparadas com glicerol monoestearato vegetal os resultados de estabilidade das partículas estocadas a 37°C não apresentaram diferença significativa em função da concentração de AA. Após 56 dias de estocagem, não foi constatada alteração de cor visível ou aglomeração de partículas, como verificado em estudos anteriores, ainda não publicados. Resultado favorável, visto que a alteração de cor está relacionada com a degradação do AA.

Wechtersbach et al. (2013) avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado em lipossomas em sistema modelo e em matriz alimentícia variando o pH do meio. Em sistema modelo com menos de 35 dias todo AA já havia sido consumido em todas as condições de pH testadas. Na matriz alimentícia, suco de maça e leite fermentando, especificamente, já com 20 das foi verificado um considerável decrescimento na estabilidade do ácido. Rozman et al. (2007) encapsularam o ácido

ascórbico através de microemulsões Água/Óleo e verificaram estabilidade de apenas 60% durante 30 dias de estocagem das amostras a temperatura ambiente.

Lee et al. (2004) que encapsulou o AA em emulsão dupla água em óleo em água e Comunian et al. (2013) que utilizaram a técnica de coacervação encontraram altos valores de estabilidade. Lee et al, relataram valores que superam 80% de retenção após 10 semana. Comunian et al., obtiveram valores superiores a 73% de estabilidade durante 60 dias de estocagem. Embora esses resultados sejam satisfatórios, as técnicas utilizadas pelos autores apresentam como desvantagem em relação a técnica de *spray congealing*, a limitação da quantidade a material ativo encapsulado. Extrapolando esses resultados para aplicação em uma matriz alimentícia, a quantidade de material a ser adicionado é muito alta para que se obtenha considerável quantidade de AA. Dependendo da matriz, o material utilizado para encapsulação pode causar interferência na qualidade do produto final.

Outra técnica que já foi utilizada por diversos autores para microencapsulação do AA é *spray drying* (TRINDADE e GROSSO, 2000; UDDIN et al., 2001; ESPOSITO et al., 2002; DESAI e PARK, 2005; PIERUCCI et al., 2006; RIGHETTO e NETTO, 2006). Em geral esses autores relatam a obtenção de elevados valores de estabilidade. Entretanto, *spray drying* é uma técnica onde há o emprego de elevadas temperaturas e o AA encontra-se solubilizado em algum solvente antes da atomização. Embora esses autores relatem satisfatórios valores de estabilidade, não são feitos estudos para avaliar a estabilidade do AA frente ao processo de microencapsulação, em geral, estabelece que o valor obtido após a encapsulação é considerado como 100% para efeito de avaliação da estabilidade durante estocagem. Wijaya et al. (2011), por exemplo, relatam valores de estabilidade que superam 90% com período de estocagem de 6 meses com as amostras estocadas a 48°C.

Os resultados de estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado por spray congealing foram satisfatórios considerando a quantidade teórica de ácido ascórbico presente nas micropartículas, o tempo e temperatura de estocagem. Como a técnica é rápida, não utiliza altas temperaturas e solventes, como spray drying, por exemplo, a possibilidade de degradação do AA é consideravelmente reduzida.

CONCLUSÃO

A técnica de *spray congealing* mostrou-se uma alternativa promissora para encapsulação do AA e manutenção de sua estabilidade em níveis satisfatórios. Por ser uma técnica que exclui a necessidade de utilização de solventes orgânicos e apresenta baixo custo, pode ser considerada alternativa viável para indústria de alimentos, não somente para aplicação do AA como aditivo alimentar, mas também como um componente de suplementação dietética. Em estudos futuros faz-se necessário avaliar a aplicação das micropartículas lipídicas sólidas carregadas com AA em alguma matriz alimentícia, visando avaliar tanto a estabilidade do AA, como a sua liberação.

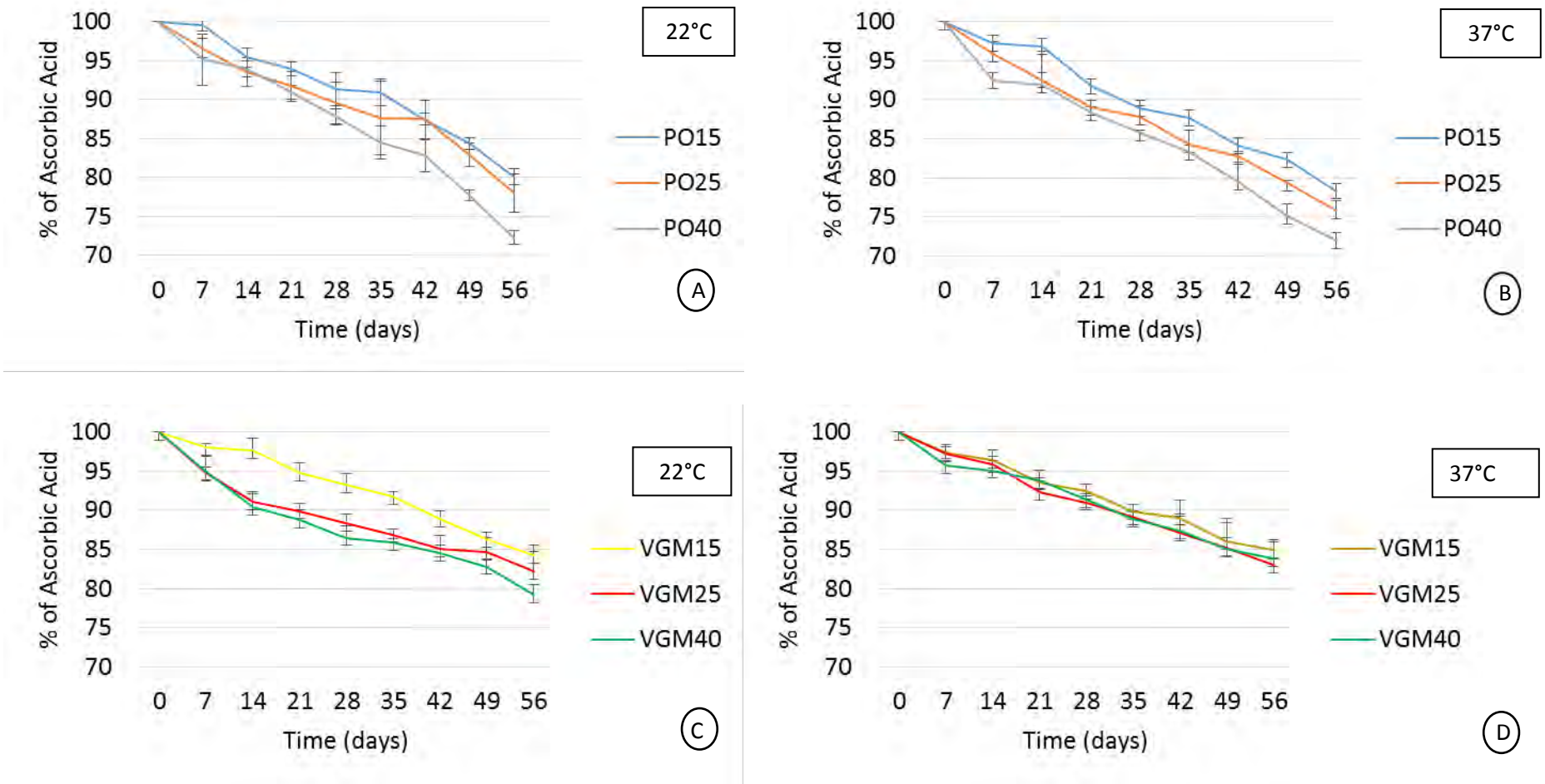

Figura 11 – Gráficos de estabilidade do ácido ascórbico encapsulado ao longo de 56 dias. (A e B) micropartículas produzidas com óleo de palma armazenadas a 22 e 37°C; (C e D) micropartículas produzidas com llicerol monoestearato vegetal armazenadas a 22 e 37°C.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, N. et al. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p.348–357, 2008.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 441-449, 2007.

COMUNIAN T.A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation:
Protection and controlled release. **Food Research International**, v.52, p.373–379, 2013.

DESAI, K. G.H.; PARK, H.J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate crosslinked chitosan microspheres by spray dr ying. **Journal of Microencapsulation**, v.22, n.2, p. 179, 2005.

DI SABATINO, M. et al. Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.5, p.346-356, 2012.

ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **Int. J. Pharm**., v.242: p.329–334, 2002.

FARAJZADEH, M. A. e NAGIZADEH, S. A simple and reliable spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations, **Z. Anal. Chem.**, v.58, p.1037.19, 2003.

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

GAVORY, C. et al. : C. Gavory et al., Encapsulation of a pressure sensitive adhesive by spray-cooling: Optimum formulation and processing conditions, **Advanced Powder Technology,** 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2013.05.004

HEGENBART, S. Encapsulated ingredients keep problems conversed. **Food Product Design**, v.3, p.28–34, 1993.

ILIĆ, I. et al. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spraycongealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v.381, n.2, p. 176–183, 2009.

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

KILLEEN, M. J. The process of spray drying and spray congealing. **Pharm. Eng.**, v.13, p.56–64, 1993.

KIRBY, C.J.; WHITTLE, C. J.; RIGBY, N.; COXON, D. T.; LAW, B. A. Stabilisation of

ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, n.5, p.437-449, 1991.

LEE, J. B., et al. L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. **Bioscience, Biotechnology**, and Biochemistry, v.68, n.3 p.495-500, 2004.

LEONEL, A.J. **Produção e Caracterização de Partículas Lipídicas Constituídas por Ácidos Graxos, Gordura Vegetal Hidrogenada e Lecitina na Encapsulação de um Composto Hidrofílico de Baixa Massa Molar**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MASCHKE, A. et al. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.65, n.2, p.175–187, 2007.

OKURO, P.K. et al. Co- encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, p. 96-103, 2013.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção de micropartículas lipídicas contendo Lactobacillus Acidophilus e Bifidobacterium lactis produzidas por spray chilling.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

PASSERINI, N. et al. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v.88, n.2, p.263-275, 2003

PIERUCCI, A.P.T.R, et al. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v.23, n.6, p.654–662, 2006.

RIGHETTO, A.M. e NETTO, F.M. Vitamin C stability in encapsulated green west indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.1202–1208, 2006.

ROZMAN, B, et al., Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. **Drug Deliv**, v.14, p.235-45, 2007.

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

SPARKS, R.E. Microencapsulation. In: Kirk-Othmer. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3ed. John Willey and Sons, New York, v.15, p.470. 1981.

TRINDADE, M.A. e 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.

WECHTERSBACH, L. et al. Stability and transformation of products formed from dimeric dehydroascorbic acid at low pH. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.65-973, 2011.

WIJAYA, M. **Microencapsulation of ascorbic acid for enhanced long-term retention during storage.** Tese (Doutorado) - Defence Science and Technology Organisation, Human Protection and Performance Division, 2011.

CAPÍTULO IV

APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO EM SALSICHA DE CARNE DE FRANGO

Resumo

O desenvolvimento de produtos cárneos que atenda a demando do consumidor por produtos mais saudáveis ainda representa um desafio para indústria. Diversas estratégias têm sido utilizadas para atender tal objetivo, entre elas, alterações nas formulações com redução e/ou substituição de gorduras e aditivos artificiais e incorporação de compostos bioativos capazes de proporcionar benefícios à saúde do consumidor. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da adição de ácido ascórbico em salsichas preparadas com carne de frango, com objetivo de substituição do antioxidante artificial (eritorbato de sódio) e suplementação dietética de vitamina C. Três formulações foram testadas, as quais variaram em função da presença ou ausência do ácido ascórbico e sua forma de adição, livre ou encapsulado em micropartículas lipídicas. As salsichas elaboradas foram submetidas às análises de pH, atividade de água, umidade, análise do perfil de textura e estabilidade oxidativa durante 42 dias de estocagem refrigerada a 4°C. Análise de aceitação sensorial também foi realizada 5 dias após o preparo das salsichas. Os resultados mostraram que a adição de ácido ascórbico livre ou encapsulado não provocou alterações nos valores de atividade de água e umidade em relação a salsicha com ausência do ácido, embora o pH tenha sido afetado. O perfil de textura e a cor instrumental não apresentaram diferenças entre os tratamentos e nem em função do tempo de estocagem. A estabilidade oxidativa dos tratamentos, como esperado, apresentou diferença. No tratamento em que não houve adição de ácido ascórbico contatou-se acentuada oxidação. No entanto, não verificou-se diferença na estabilidade oxidativa em função da forma em que o ácido ascórbico foi adicionado, livre ou encapsulado. Os tratamentos acrescidos de AA não oxidaram durante a estocagem, indicando que o AA, independente da forma como foi adicionado, exerceu sua função antioxidante. A análise sensorial apresentou resultado satisfatório demonstrando que a adição de ácido ascórbico não provocou alterações perceptíveis em relação a nenhum atributo

avaliado. Concluiu-se que a adição de ácido ascórbico representa uma alternativa satisfatória para agregar “saudabilidade” à salsicha sem comprometer as características tecnológicas do produto, sendo a forma de adição do ácido ascórbico, livre ou encapsulado, indiferente para tal finalidade, embora a encapsulação possa garantir maior estabilidade para o aditivo durante sua estocagem e aplicação.

Palavras chave: salsicha de frango, antioxidante, vitamina C, suplementação.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência das doenças crônicas não transmissíveis correlacionadas com o estilo de vida do homem contemporâneo e o aumento dos custos médico-hospitalares têm obrigado a sociedade rever seus hábitos de vida. A alimentação, embora não seja o único fator capaz de comprometer o estado de saúde, é sem dúvida um dos mais importantes (JIMÉNEZ-COLMENER, et al., 2001).

Com a crescente conscientização do impacto direto da alimentação no surgimento ou agravo de doenças, uma série de novos comportamentos por parte do consumidor já pode ser constatada (OLMEDILLA-ALONSO et al., 2013). Os consumidores estão buscando por alimentos que além de serem seguros, nutritivos, práticos e agradáveis ao paladar, também sejam capazes de promover bem-estar e prevenir doenças. Para atender essa demanda várias estratégias têm sido adotadas pela indústria de alimentos, entre elas a redução e/ou exclusão de conservantes e corantes artificiais, redução da concentração de sódio, substituição de ingredientes em que a alta ingestão pode estar associada com o surgimento de patologias, e a incorporação de compostos bioativos naturais capazes de promover benefícios fisiológicos à saúde do consumidor. Essa última estratégia em especial, tem apresentado um elevado crescimento, e os

alimentos que contêm esses compostos bioativos são chamados de alimentos funcionais (KHAN et al., 2011).

O desenvolvimento de alimentos funcionais tem crescido em todos os setores da indústria de alimentos, em especial em produtos lácteos e cereais com a incorporação de fibras, vitaminas antioxidantes, ácidos graxos funcionais e bactérias probióticas. Em consequência da boa aceitação destes produtos no mercado, os pesquisadores têm multiplicado esforços para superar as dificuldades nos desenvolvimentos desses alimentos, entre elas, a baixa estabilidade de grande parte dos compostos bioativos. Em todos os setores o desenvolvimento de alimentos funcionais representa uma difícil tarefa que exige sistemática cooperação dos diversos segmentos da indústria, porém, em nenhum outro setor o desenvolvimento destes produtos é tão desafiador quanto no setor de produtos cárneos. Isso porque a relação dos consumidores com os produtos cárneos tem sido cada vez mais crítica por conta da segurança nutricional desses produtos. Embora sejam alimentos altamente nutritivos e com elevada aceitação sensorial, o perfil de ácidos graxos, elevado teor de sódio e presença de ingredientes como sais de nitrito e nitrato de sódio fazem com que o consumo de produtos cárneos seja associado com prejuízos à saúde, principalmente com o desencadeamento e/ou agravo de doenças cardiovasculares (JIMÉNEZ-COLMENERO et al., 2006; MICHA et al., 2012). Dessa forma, estratégias que visam aumentar o apelo de "saudabilidade" dos produtos cárneos, seja pela incorporação de compostos bioativos e/ou alteração da composição, são indispensáveis para a desconstrução da imagem negativa relacionadas a esses alimentos.

Diversos trabalhos já vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de incorporar compostos bioativos em produtos cárneos processados. Probióticos (DE VUYST et al., 2008; RADULOVIĆ et al., 2011; RUBIO et al., 2013), prebióticos (JIMÉNEZ-COLMENERO e DELGADO-PANDO, 2013; SANTOS et al., 2013), vitaminas (CÁCERES et al., 2008; JIMÉNEZ-COLMENERO et al., 2010), minerais (NAVAS-CARRETERO et al., 2009; GARCÍA-IÑIGUEZ et al., 2010) e antioxidantes com atividade funcional (SCHÖENFELDT e

GIBSON, 2008; ZHANG et al., 2010) são exemplos de compostos bioativos que já foram incorporados em produtos cárneos com apelo de “saudabilidade”.

O ácido ascórbico está entre os compostos bioativos que apresenta alto potencial para aplicação em produtos cárneos. Sua função antioxidante contribuiu para prevenção da cor natural do produto ao evitar a oxidação de componentes das matriz alimentícia, em especial a oxidação lipídica, permitindo assim, a substituição de antioxidantes artificiais. Além de sua função como aditivo no alimento, o ácido ascórbico ao ser ingerido apresenta função vitamínica, exercendo diversos papeis no organismo humano. É um importante componente do sistema antioxidante orgânico, atua como cofator de várias enzimas relacionadas com a síntese do colágeno, participa da conversão do neurotransmissor dopamina a norepinefrina, está envolvido no metabolismo da tirosina, na biossíntese de carnitina. Além disso, é capaz de promover o aumento da absorção intestinal do ferro dietético, por reduzir a forma férrica (Fe^{3+}) a ferrosa (Fe^{2+}), sendo os produtos cárneos uma importante fonte de ferro (SILVA e COZZOLINO, 2009).

Apesar das diversas vantagens, devido às propriedades químicas do ácido ascórbico, sua aplicação em determinados produtos cárneos, como os cárneos emulsionados, pode acarretar prejuízo da qualidade final em função de alterações causadas durante o processamento do produto, por exemplo, comprometimento da estabilidade da emulsão por conta de redução excessiva do pH da massa cárnea. Acredita-se que esse problema poderia ser contornado com o uso da tecnologia de microencapsulação pela técnica de *spray chilling*, a qual isolaria o ácido ascórbico durante o preparo da emulsão cárnea em micropartículas lipídicas que seriam derretidas durante o cozimento da salsicha liberando o ácido ascórbico para exercer sua função antioxidante.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver salsichas com carne de frango suplementadas com ácido ascórbico livre ou encapsulado e avaliar as características físico-químicas, estabilidade oxidativa e aceitação sensorial comparando com salsichas produzidas sem ácido ascórbico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria prima

Para produção das salsichas utilizou-se filé de coxa, sobrecoxa e pele de frango, sal de cura, sal (NaCl), pimenta branca em pó, cebola *in natura* e alho desidrato adquiridos no comercio local da cidade de Pirassununga/SP. O ácido ascórbico utilizado foi adicionado à massa cárnea livre ou encapsulado em micropartículas lipídicas sólidas obtidas pela técnica de *spray chilling*. Essas micropartículas foram produzidas utilizando gordura produzida pela interesterificação de gordura de palma totalmente hidrogenada e de palmiste. A produção das micropartículas é apresentada no Capítulo I, a escolha das micropartículas utilizadas para aplicação na salsicha foi feita considerando-se os resultados de estabilidade do ácido ascórbico.

2.2 Formulações

A formulação padrão utilizada na elaboração das salsichas está apresentada na Tabela 1. Os três tipos de salsichas avaliados foram obtidos através desta mesma formulação padrão, sendo que as diferenças entre elas deram-se em função da presença de ácido ascórbico livre ou encapsulado ou sua ausência, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1.

Formulação padrão para obtenção das salsichas elaborada com carne de frango

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

As formulações foram planejadas considerando os Padrões de Identidade e Qualidade de Salsicha determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Tabela 2.

Composição de cada tratamento aplicado nas salsichas

Ingrediente	Tratamentos		
	T1	T2	T3
Ácido ascórbico livre	1000 ppm	-	-
Ácido ascórbico encapsulado	-	1000 ppm	-
Sal (NaCl)	1,0%	1,0%	1,0%
Sal de cura	0,5%	0,5%	0,5%
Pimenta branca em pó	0,2%	0,2%	0,2%
Cebola	2,0%	2,0%	2,0%
Alho desidratado	0,5%	0,5%	0,5%

T1: Salsicha preparada com ácido ascórbico encapsulado; T2: Salsicha preparada com ácido ascórbico livre; T3: Salsicha preparada sem ácido ascórbico.

2.3 Métodos

2.3.2 Processamento

O processamento da salsicha foi realizado no Matadouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Inicialmente, o filé de coxa e sobrecoxa e a pele foram moídos separadamente. Após pesagem, foram cominuídas e homogeneizadas em homogeneizador rotativo de bacia (cutter), juntamente com os demais ingredientes até completa mistura. Retirada do cutter, a massa foi embutida em tripas celulósicas permeáveis com diâmetro de 22 mm, gentilmente doadas pela Viscofan do Brasil (São Paulo/SP). Os gomos foram amarrados manualmente, mantendo o padrão de tamanho em torno de 15 cm. Após embutidas, as salsichas foram acondicionadas adequadamente em carrinho tipo H e encaminhada à estufa para a etapa de cozimento. O cozimento ocorreu até a temperatura de 72 °C ser atingida no interior da salsicha. Concluído o cozimento, as salsichas foram resfriadas por aspersão de água, embaladas a vácuo e estocadas em câmara fria a 4 °C.

2.3.3 Caracterização físico-química

2.3.3.1 Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento

Após retirar a massa cárnea do cutter, aproximadamente 50g de amostra foi reservada para análise de estabilidade da emulsão cárnea realizada de acordo com a metodologia proposta por Parks e Carpenter (1987). As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas termorresistentes e seladas a vácuo. Após serem submetidas à pesagem, as embalagens contendo a massa cárnea crua foram coccionadas em banho-maria a 70°C por 60 minutos. Findando o tempo de cocção as amostras foram novamente submetidas à pesagem para verificação de alteração de peso.

Figura 1 – Fotos de etapas de produção da salsicha. A) Moagem do filé de coxa e sobrecoxa; B) Pesagem; C) Cominuição e homogeneização em cutter; D) Amarração de gomos após embutimento.

2.3.3.2 Atividade de água e umidade

A atividade de água foi determinada por meio do analisador de atividade de água Aqualab (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). A salsicha foi cortada em pequenos pedaços e imediatamente introduzidas na cubeta plástica para realização da análise. Já a umidade foi mensurada através do analisador de umidade (MB35 Ohaus, Pine Brook, NJ, USA). Assim como para análise de atividade de água, a salsicha foi cortada em pequenos pedaços e imediatamente introduzida ao medidor de umidade. Ambas as análises foram realizadas após 24 horas após a produção das salsichas.

2.3.3.3 Análise de pH

O pH das salsichas foi avaliado com intuito de verificar a variação dos valores de pH ao longo do período de estocagem refrigerado, desta forma realizou-se a análises nos tempos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dias.

2.3.3.4 Análise de cor instrumental

A alteração de cor das salsichas durante o período de estocagem foi investigada utilizando um colorímetro (Mini Scan XE Plus, Reston, VA, USA), por meio do sistema Hunter Lab. As análises foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dias de estocagem refrigerada.

2.3.3.5 Avaliação do perfil de textura instrumental

O perfil de textura instrumental das amostras foi determinando por meio do texturômetro (TA XT2i, Stable Micro Systems Cidade País) previamente calibrado com peso padrão de 2 kg. Para realização da análise a salsicha foi cortada em cilindros de tamanhos homogêneos, os quais foram comprimidos em até 70% do tamanho por 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. As análises foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dias de estocagem refrigerada.

2.3.3 Avaliação da estabilidade oxidativa durante armazenamento refrigerado

A estabilidade oxidativa das amostras de salsicha foi determinada utilizando-se o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conhecido como TBARS. As

análises foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dias. O valor de TBARS foi calculado a partir de uma curva padrão e expresso em mg malonaldeído/kg do produto.

2.3.4 Análise de aceitação sensorial

A análise de aceitação sensorial foi realizada 5 dias após a produção da salsicha. Sessenta consumidores não treinados de ambos os sexos e diferentes faixas etárias participaram voluntariamente do teste. Todos os participantes foram inicialmente questionados se eram consumidores habituais de salsicha, sendo a negativa um critério de exclusão.

Os ensaios foram realizados em um laboratório de análise sensorial, em cabines individuais e conforme metodologia descrita por Meilgaard et al. (1999). As salsichas foram previamente aquecidas por 5 minutos em água fervente e cortadas em cilindros de 2 cm que foram mantidos submersos em água sob aquecimento em estufa a 40°C. As amostras foram apresentadas monadicamente, em recipiente de plástico codificados e de forma aleatória. Juntamente com as amostras, foi entregue ao participante um copo com água e biscoito água e sal.

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 global. O projeto foi previamente submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre, o qual, assim como a ficha utilizada para avaliação, encontra-se como apêndice.

2.3.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, com o auxílio do programa estatístico SAS (Statistic Analisy System), versão 9.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química

3.1.1 Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento

Na Tabela 3 são apresentados os valores de perda massa obtidos após cozimento para avaliar a estabilidade da emulsão durante o processamento. Constatou-se que a adição de ácido ascórbico microencapsulado ou livre, ou sua ausência, não provocou alterações significativas nos valores de perda massa. Na produção de salsicha suplementada com ácido ascórbico, a principal preocupação em relação à estabilidade da emulsão, e consequentemente, com a qualidade final do produto, dar-se em função da redução de pH da massa provocada pelo ácido ascórbico. A encapsulação deste último pode ser uma importante alternativa para evitar essa acidificação da massa. Entretanto, pelos resultados obtidos, verifica-se que a adição do ácido ascórbico livre não influenciou a perda de massa após o cozimento, ou seja, a encapsulação para este parâmetro não proporcionou vantagem.

Tabela 3

Avaliação da estabilidade da emulsão cárnea durante o processamento

Tratamento	Perda de massa (%)	Atividade de água	Umidade (%)
Tratamento 1	19,14 ± 1,24 a	0.966 ± 0,004 a	55,36 ± 3,73 a
Tratamento 2	18,27 ± 0,64 a	0.964 ± 0,001 a	56,04 ± 1,46 a
Tratamento 3	19,74 ± 2,01 a	0.964 ± 0,003 a	58,67 ± 1,12 a

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
Tratamento 1: com adição de AA livre
Tratamento 2: com adição de AA encapsulado
Tratamento 3: sem adição de AA

Quando uma emulsão cárnea estável é obtida, não há, por ocasião do seu processamento térmico, separação da gordura dispersa ou água. A estabilidade da emulsão é um fator determinante na qualidade dos produtos cárneos emulsionados, a coesividade do produto que está diretamente relacionado com a capacidade de manter a emulsão estável influencia a textura firme ao fatiamento e à mastigação (BORTOLUZZI, 2009). Diversos fatores podem influenciar na estabilidade da emulsão, como equipamentos utilizados, temperatura, pH da massa, tamanho das partículas de gordura, concentração e momento de adição de sal e quantidade e tipo de proteína podem (BARRETTO, 2007).

Em trabalhos relatados na literatura envolvendo a produção de salsicha, os valores de perda de massa sofreram variação em função das modificações nas formulações propostas pelos autores. Eswarapragada et al. (2010) avaliando o desenvolvimento de salsichas com carne de porco com baixo teor de gordura e encontraram valores de estabilidade da emulsão que superaram 92%. Grizotto et al. (2012) produziram salsichas do tipo Frankfurter com adição de farinha de okara, um subproduto do extrato aquoso de soja, relataram valores de estabilidade de emulsão variando entre 62,11 e 89,24%. Choe et al. (2013) também avaliaram a produção de salsicha com

adição de fibras de trigo como substitutos de gordura e encontraram valores de estabilidade entre 93,5 e 96,5%. Por fim, Comunian (2013) que também aplicou ácido ascórbico em salsichas produzidas com carne de frango como alternativa de substituição do eritorbato de sódio, relatou valores de estabilidade variando entre 82,81 e 84,99%, valores estes que são muito próximos aos encontrados no presente trabalho, que constatou variação entre 80,26 e 81,73%.

3.1.2 Atividade de água e umidade

Os valores de atividade de água e umidade obtidos um dia após a produção das salsichas não apresentaram diferenças em função das formulações testadas. Todos os valores encontrados corroboram valores citados na literatura, mantida a coerência em função das proporções utilizadas de cada ingrediente nas formulações (ANDRÉS et al., 2006; COMUNIAN, 2013; MENEGAS et al., 2013). Os valores de atividade de água confirmam o quão perecível é a salsicha, representando um importante meio para proliferação de microrganismos indesejáveis quando o processamento e armazenamento não ocorrem de maneira adequada. Já os valores de umidade são importantes, sobretudo, para avaliar se o produto atende o padrão de identidade e qualidade exigido pela legislação. No Brasil esse padrão é regulamentado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento que determina que a salsicha não apresente umidade superior a 65%. Assim, as salsichas produzidas neste trabalho atenderiam a legislação vigente (BRASIL, 2000).

3.1.3Análise de pH

Os dados referentes aos pH das amostras ao longo do período de estocagem refrigerada foram apresentando na Figura 2. Nota-se que os valores de pH mantiveram-se constantes em todos os tratamentos durante os 42 dias. A

manutenção do pH é satisfatória visto que a redução do mesmo durante a estocagem pode predizer proliferação de bactérias láticas, que não apenas causa subtração da qualidade sensorial do produto pelo gosto ácido que torna-se mais acentuado com aumento da atividade bacteriana, mas pela a própria deterioração do produto.

A variação dos valores de pH pode ter uma correlação com a forma com a qual o ácido ascórbico foi adicionado à massa cárnea. O Tratamento 3, aquele em que o ácido ascórbico está ausente, apresentou pH médio próximo de 6,3 durante toda estocagem.

Nos tratamentos 2 e 3, contendo ácido ascóbico livre e encapsulado, constatou-se valores de pH de 5,8 e 5,3, respectivamente, durante todo o armazenamento refrigerado dos produtos. Considerando que foi adicionada a mesma concentração de AA em ambos os tratamentos e que as análises foram realizadas no produto final, ou seja, após o cozimento das salsichas, onde se esperava a liberação do AA em vista do derretimento da gordura que constituia o material de parede da partícula, a diferença nos valores obtidos pode ser atribuída ao fato do AA ter sido protegido durante sua aplicação na massa, enquanto que no tratamento 2 o AA livre esteve sujeito às condições deletérias do meio, como alta atividade de água e presença de oxigênio, o que deve ter promovido sua degradação parcial e, consequentemente, elevação no pH do produto. Assim sendo, embora o AA encapsulado tenha estado sujeito à ação da temperatura de cozimento, provavelmente não sofreu solubilização ao ser incorporado à massa, ao contrário do AA na forma livre.

A salsicha que não continha ácido ascórbico, coerentemente apresentou maior valor de pH em relação às demais. Embora tenha havido diferenças entre os tratamentos, os valores de pH determinados encontram-se dentro da faixa relatada por diversos autores que trabalharam com salsihca (ALESÓN-CARBONELL et al., 2003; SPAZIANI et al., 2009; RUIZ-MOYANO et al., 2011; SAYAS-BARBERÁ et al., 2012).

O fato da salsicha que foi produzida com ácido ascórbico encapsulado ter apresentado o menor pH durante todo o período de estocagem pode ser um indicativo de que na forma encapsulada o ácido estava mais protegido e manteve-se mais estável até o momento em que foi liberado, possivelmente durante o cozimento, que deve ter promovido o derretimento da gordura que constituia a partícula.

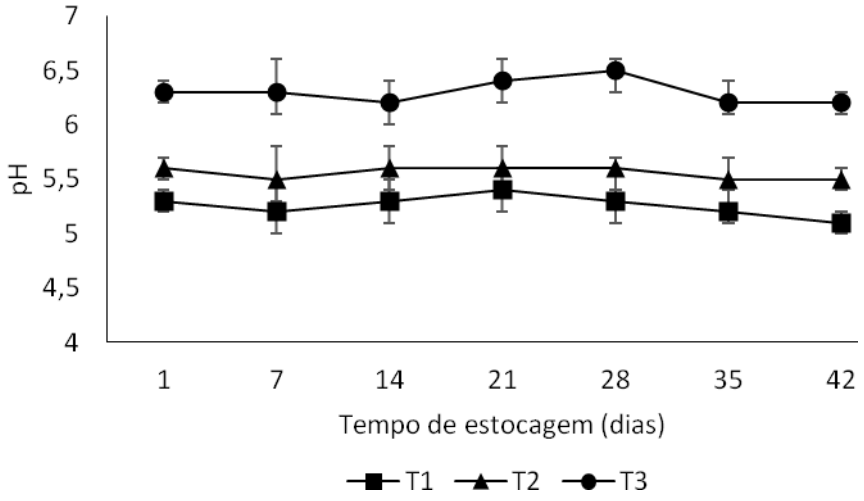

Figura 2 - Valores de pH de salsichas analisados ao longo de 42 dias de estocagem refrigerada. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

3.1.4 Análise de cor instrumental

Os resultados da análise de cor instrumental de acordo com os parâmetros L*, a*, b*, são apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças entre os tratamentos e nem sofreram alterações significativas durante o período de estocagem. Esses resultados confirmam que as formulações não apresentaram nenhuma alteração em termos de composição.

Tabela 4.
Valores de L* para cada tratamento durante 42 dias

Tratamentos	Tempo de estocagem refrigerada (dias)						
	1	7	14	21	28	35	42
T1	67,47 ± 1,24 aA	68,87 ± 2,04 aA	68,41 ± 0,91 aA	68,03 ± 1,19 aA	68,83 ± 0,98 aA	69,14 ± 1,07 aA	69,99 ± 1,81 aA
T2	69,33 ± 1,87 aA	70,73 ± 1,02 aA	70,24 ± 0,94 aA	71,74 ± 1,13 aA	71,05 ± 1,24 aA	71,5 ± 1,67 aA	71,79 ± 1,47 aA
T3	69,57 ± 1,56 aA	71,57 ± 0,80 aA	71,48 ± 2,01 aA	71,25 ± 1,24 aA	70,59 ± 1,44 aA	70,98 ± 0,76 aA	70,21 ± 0,56 aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma coluna e letras maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

Tabela 5.
Valores de a* para cada tratamento durante 42 dias

Tratamentos	Tempo de estocagem refrigerada (dias)						
	1	7	14	21	28	35	42
T1	3,78 ± 1,01 aA	3,50 ± 1,22 aA	3,71 ± 2,02 aA	3,95 ± 1,87 aA	4,02 ± 2,42 aA	4,16 ± 1,52 aA	4,20 ± 1,94 aA
T2	3,84 ± 1,64 aA	3,86 ± 0,86 aA	3,79 ± 1,74 aA	3,76 ± 1,69 aA	3,83 ± 1,97 aA	4,06 ± 0,83 aA	4,18 ± 1,67 aA
T3	3,61 ± 1,42 aA	3,73 ± 1,81 Aa	3,91 ± 0,94 aA	3,67 ± 1,05 aA	3,41 ± 1,56 aA	3,69 ± 1,64 aA	3,75 ± 1,32 aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma coluna e letras maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

Tabela 6.
Valores de b* para cada tratamento durante 42 dias

Tratamentos	Tempo de estocagem refrigerada (dias)						
	1	7	14	21	28	35	42
T1	11,24 ± 0,84 aA	12,05 ± 1,37 aA	12,08 ± 0,69 aA	12,65 ± 1,28 aA	10,91 ± 1,52 aA	11,69 ± 1,11 aA	11,15 ± 0,96 aA
T2	12,91 ± 1,15 aA	13,65 ± 0,91 aA	12,25 ± 1,68 aA	11,41 ± 0,94 aA	11,34 ± 2,61aA	12,51 ± 1,67 aA	11,28 ± 1,37 aA
T3	11,40 ± 1,67 aA	12,57 ± 1,23 aA	11,94 ± 1,92 aA	12,18 ± 1,67aA	11,10 ± 1,81 aA	12,61 ± 1,84 aA	12,22 ± 0,72 aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma coluna e letras maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

Valores muito semelhantes para os três parâmetros, L*, a*, b*, foram relatados por Andrés et al, (2006) que avaliaram a estabilidade de salsichas de frango com baixo teor de gordura durante o armazenamento. Comunian (2013) que também avaliou a adição de ácido ascórbico em salsicha de frango encontrou valores próximos, com discreta elevação do parâmetro b*, o qual avalia a variação do azul (-) ao amarelo (+). No tratamento (T3) que sofreu acentuada oxidação, confirmada pela análise de TBARS, poderia ter sido constada alteração de cor, em especial nos valores de L*, porém, essa alteração não foi verificada.

3.1.5 Avaliação do perfil de textura instrumental

Como apresentado na Tabela 7, a adição do ácido ascórbico (livre ou encapsulado) não alterou o perfil de textura da salsicha. Além disso, durante o período de estocagem não foi constatada alteração da textura em nenhum tratamento.

Tabela 7.

Valores de dureza (g) durante o período de estocagem refrigerada

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
1	4347,20 ± 614,21aA	4447,24 ± 542,01aA	4452,512 ± 128,45aA
7	4411,34 ± 479,11aA	4365,83 ± 671,24aA	4459,742 ± 217,21aA
14	4449,74 ± 371,55aA	4278,08 ± 248,54aA	4407,349 ± 514,30aA
21	4298,11 ± 1241,25aA	4377,64 ± 954,01aA	4384,544 ± 421.02aA
28	4426,09 ± 475,32aA	4417,44 ± 174,28aA	4459,675 ± 646,52aA
35	4287,84 ± ,074,36aA	4409,34 ± 254,37aA	4285,844 ± 516,58aA
42	4293,38 ± 924,07aA	4311,17 ± 484,25aA	4452,682 ±184,24aA

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma coluna e letras maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

A dureza é um fator de relevante importância na aceitação sensorial de um produto, visto que esta representa a força necessária para produzir certa deformação no alimento, o que em termo prático significa a força requerida para a compressão de um alimento entre os dentes do consumidor (FILHO, 2009). A dureza sofre variação em função do teor de carne da formulação (HEDRICK et al., 1994) e adição de outros ingredientes, por exemplo, fibras (PEREIRA et al., 2011). A dureza é importante para consistência do produto, entretanto, quando excessiva pode prejudicar causar subtração na qualidade final da salsicha. Os principais fatores que podem contribuir para dureza excessiva são teor muito elevado de carnes magras ou tecido conjuntivo e adição insuficiente de gelo (GUERREIRO, 2006).

3.2 Avaliação da estabilidade oxidativa

As concentrações de malonaldeído determinadas durante o período de estocagem refrigerada são apresentadas na Figura 3. Não foi constatada diferença significativa entre as amostras que receberam o ácido ascórbico livre ou encapsulado em cada tempo e ao longo do período de estocagem. Este resultado permite inferir que, independente da forma como aditivo foi incorporado à massa, mostrou-se efetivo no controle à oxidação do produto. Na amostra controle – sem adição de AA - a concentração de malonaldeído foi maior em relação às demais já com sete dias de estocagem e foi aumentando durante a estocagem, indicando que o produto estava sofrendo o processo de oxidação.

A oxidação lipídica das salsichas pode ser relacionada com a quantidade de lipídios e ácidos graxos presentes nos produtos (MURPHY et al., 2004). A carne de aves, em especial, devido seu o elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados, é altamente susceptível à oxidação. Na salsicha em que o ácido ascórbico não foi adicionado, após 42 dias de estocagem refrigerada foi possível sentir o odor característico de ranço. Segundo Liu et al. (2006) valores abaixo de 1,36 mg de TBARS MDA/kg não promove

off-flavors detectável em produtos cárneos processados, todavia, os valores de MDA/kg da salsicha sem antioxidante superaram esse valor.

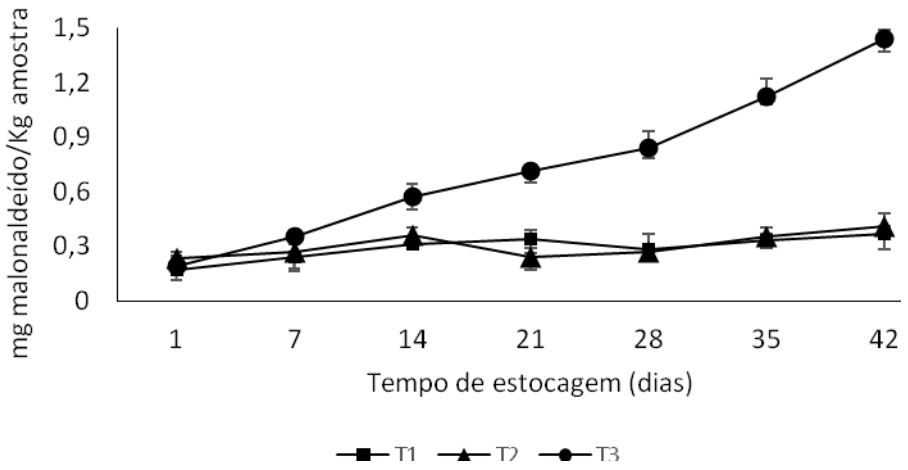

Figura 3 - Mensuração dos valores de TBARS (mg malonaldeído/Kg amostra) para cada tratamento durante 42 dias de estocagem refrigerada. Onde T1 é o Tratamento com adição de AA livre, T2 é o tratamento com adição de AA encapsulado e T3 é o tratamento sem adição de AA.

Mercadante et al. (2006) estudando o feito de pigmentos naturais na estabilidade oxidativa de salsichas armazenadas sob refrigeração encontraram valores muito próximo em relação ao quantitativo de malonaldeído/Kg amostra. Esses autores adicionaram norbixina, zeaxantina, licopeno ou β-caroteno e encontraram valores < 0,38 mg de malonaldeído/Kg amostra e consideraram os resultados satisfatórios.

Os valores de TBARS encontrados neste trabalho são menores em relação aos valores relatados por Alina et al. (2012) e Comunian (2013), uma possível justificativa pode ser a utilização de alho, o qual apresenta atividade antioxidante. Embora a presença do alho possa dificultar a comparação entre resultados obtidos por outros autores, não houve comprometimento na análise dos resultados obtidos para os diferentes

tratamentos deste trabalho, uma vez que a quantidade de alho nas formulações foi mantida.

3.3 Análise de aceitação sensorial

As médias das notas atribuídas aos atributos avaliados na análise sensorial da salsicha são apresentadas na Tabela 8. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos atributos avaliados, isso significa que a adição do ácido ascórbico não provocou alterações sensoriais na salsicha. Entre os atributos, a cor, foi o que recebeu as menores notas. Esses resultados são coerentes ao considerar que não houve adição de corante nas formulações estudadas. Os participantes da análise eram consumidores de salsicha, sendo assim, utilizaram suas experiências prévias como parâmetro para avaliação, sendo que salsichas comercializadas no Brasil normalmente apresentam corante em sua formulação. Resultados semelhantes já foram descritos por outros autores como Uyhara et al. (2008) e Moreira et al. (2005) que desenvolveram salsichas com filé de tilápia com e sem corante. A textura foi outro atributo que a avaliação pode ter sido influenciada por experiências prévias. A quantidade de carne presente na formulação é um dos fatores que mais influenciam a textura do produto final. A quantidade de carne presente nas formulações avaliadas é superior em relação às formulações das salsichas comercializadas no Brasil, fazendo com que a textura realmente seja diferente.

Como não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos para o atributo sabor, é possível concluir que a diferença de pH detectada (Figura 2) não alterou significativamente este atributo e portanto não comprometeu a aceitação sensorial dos produtos elaborados com o AA nas formas livre ou encapsulada.

Tabela 8.

Médias dos valores obtidos para cada atributo (aroma, cor, sabor, textura e aceitação global) da avaliação sensorial de salsicha de frango com ou sem ácido ascórbico.

Tratamento	Aroma	Cor	Sabor	Textura	AG
T1	7,21 ± 1,31a	4,61 ± 1,45a	6,73 ± 1,22ª	5,27 ± 1,36a	6,72 ± 1,63a
T2	7,43 ± 1,15a	4,68 ± 1,84a	6,67 ± 1,54ª	5,46 ± 1,41a	6,61 ± 1,24a
T3	7,17 ± 1,57a	4,97 ±1,61a	6,84 ± 1,09ª	5,64 ± 1,29a	6,85 ± 1,73a

AG= Avaliação global. Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os atributos aroma e sabor receberam avaliações de “gostei regularmente” e “gostei ligeiramente”, respectivamente. A utilização de cebola *in natura* e alho desidratado conferiram ao produto aroma e sabor marcantes, o que certamente favoreceu as notas para ambos os atributos. A aceitação global para todos os tratamentos ficou com média 6 (gostei ligeiramente), resultado semelhante ao encontrado por Vogel et al. (2011) e Comunian (2013). A incorporação de um corante natural pode melhorar as notas para o atributo de cor, consequentemente, pode melhorar os resultados de aceitação geral.

CONCLUSÃO

A adição de ácido ascórbico em salsicha de frango com objetivo de promover suplementação dietética deste nutriente e ao mesmo tempo utilizá-lo com agente antioxidante preservando a cor e estabilidade oxidativa foi bem sucedida no presente trabalho. Os resultados demonstraram que a presença do ácido ascórbico em altas concentrações não provocou prejuízo durante o processamento do produto e não alterou suas características físico-químicas ou sensoriais. A adição de ácido ascórbico encapsulado não demonstrou vantagem em relação ao ácido ascórbico adicionado em sua forma livre. Pelo duplo papel esperado do ácido ascórbico, em estudos futuros faz-

se conveniente avaliar quantitativamente na salsicha o ácido ascórbico disponível para atuação como vitamina no organismo. Avaliando assim, a diferença entre o conteúdo de ácido ascórbico adicionado à salsicha, o conteúdo consumido como antioxidante na matriz alimentícia e o conteúdo remanescente que será consumido. Este trabalho constitui um exemplo de desenvolvimento de um produto cárneo funcional, onde não apenas ocorreu adição de uma vitamina antioxidante, mas também a substituição do eritorbato de sódio, um antioxidante artificial comumente utilizado em salsicha que não promove nenhum benefício adicional à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. et al. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. **Meat Science**, v.59, n.1, p. 5–13, 2001.

OLMEDILLA-ALONSO, B. et al. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v.95, n.1, p. 919–930, 2013.

KHAN, M.I. et al. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**, v.44, p.3125–3133, 2011.

Jiménez-Colmenero, F. et al. New approaches for the development of functional meat products. In: L.M.L. Nollet, F. Toldrá (Eds.), **Advanced technologies for meat processing**, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p.275–308, 2006.

MICHA, P. et al. A method to estimate a person or group health risks and benefits

from additive and multiplicative factors. **Trends in Food Science & Technology**, v.28, n.1, p.44-51, 2011.

DE VUYST, L. et al. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v.80, n.1, p.75-78, 2008.

RADULOVIĆ, Z. et al. Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages. **Procedia Food Science**, v.1, p.1516–1522, 2011.

RUBIO, R. et al. Probiotic strains Lactobacillus plantarum 299V and Lactobacillus rhamnosus GG as starter cultures for fermented sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, n.1, p.51-56, 2013.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. e DELGADO-PANDO, G. Fibre-enriched meat products

J.A. Delcour, K. Poutanen (Eds.), In: **Fibre-rich and wholegrain foods**, Woodhead Publishing Limited, Oxford (2013), pp. 329–347

SANTOS, B.A. et al. Ultra-flash profile and projective mapping for describing sensory attributes of prebiotic mortadelas. Food Research International, v.54, n.2, p.1705–1711, 2013.

CÁCERES, E. et al. Conventional and reduced-fat cooked meat sausages enriched with folic acid. **Fleischwirtschaft**, v.23, n.1, p.58-60, 2008.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. et l. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. **Food Chemistry**,

v.123, p.959-967, 2010.

NAVAS-CARRETERO, S. et al. Iron absorption from meat pâté fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. **Nutrition**, v.25, p.20-24, 2009.

GARCÍA-IÑIGUEZ, C. et al. Selenium, iodine, ω-3 PUFA and natural antioxidant form Melissa officialis L: A combination of components for healthier dry fermented sausage formulation. **Meat Science**, n.85, p.274–279, 2010.

SCHÖENFELDT, H.C. e GIBSON, N. Changes in the nutrient quality of meat in an obesity contexto. **Meat Science**, v.80, p.20-27, 2008.

ZHANG, W. et al. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v.86, p.15–31, 2010.

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.

PARKS, L.L. e 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.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**, 3rd

edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 387p, 1999.

ESWARAPRAGADA, N.M. et al. Quality of low fat pork sausage containing milk-co-precipitate. **J Food Sci Technol.**, v.47, n.5, p.571-578, 2010.

GRIZOTTO, R.K. et al. Physical, chemical, technological and sensory characteristics of Frankfurter type sausage containing okara flour. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**,v.32, n.3, p.538-546, 2012.

CHOE, J.H. et al., Quality of frankfurter-type sausages with added pig skin and wheat fiber mixture as fat replacers. **Meat Science**, v.9, n.4, p.849-854, 2013.

ANDRÉS, S.C. et al. Storage stability of low-fat chicken sausages. **Journal of Food Engineering**, v.72, n.4, p.311-319, 2006.

MENEGAS, L.Z. et al. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. **Meat Science**, v.93, n.3, 9.501-506, 2013.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, L.M. et al. Application of functional citrus by-products to meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.3–4, p.176-185, 2004.

SPAZIANI, M. et al. Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile, **Meat Science**, v.81, n.1, p.77-85, 2009.

RUIZ-MOYANO, S. et al. Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.839-847, 2011.

CONCLUSÃO GERAL

Com presente trabalho obteve-se as seguintes conclusões gerais:

- Os resultados demonstram que a técnica de spray chilling pode ser considerada uma importante alternativa para encapsulação do ácido ascórbico visando melhoria de sua estabilidade;

- A escolha do sistema a ser atomizado, suspensão ou emulsão, para o preparo das micropartículas tem considerável influência na eficiência de encapsulação e na estabilidade do ácido ascórbico durante o período de estocagem. Enquanto micropartículas produzidas com suspensão promovem uma melhor proteção ao ácido ascórbico ao longo do tempo, a eficiência de encapsulação é maior em partículas produzidas com emulsão;

- A concentração de ácido ascórbico presente da suspensão atomizada influenciou consideravelmente o tamanho da partícula, quanto maior a concentração de material ativo, maior foi o tamanho de partícula verificado. O tamanho de partícula, por sua vez, influenciou os valores de eficiência de encapsulação. Partículas menores apresentam valores de eficiência de encapsulação menores;

- O rendimento de processo superou 80%, podendo ser considerado satisfatório, sendo o baixo rendimento uma das desvantagens associada à técnica de spray congealing/spray chilling frequentemente citada na literatura especializadas;

- A estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado em todas as condições estudas nesse trabalho superou a estabilidade do ácido em solução, sendo que a diferença constada da estabilidade das duas formas (livre e encapsulado) superou 100%;

- A aplicação do ácido ascórbico em altas concentrações na salsicha não promoveu alterações físico-químicas ou sensoriais na mesma. Contrariando o esperado, nem mesmo durante o processamento da massa cárnea foram verificadas alterações na estabilidade da massa;

- A adição de ácido ascórbico foi eficaz na estabilidade oxidativa da salsicha, independente da forma adicionada do ácido ascórbico (livre ou encapsulado), após o período avaliado (60 dias) a qualidade do produto em termos de oxidação foi satisfatório;

- A avaliação físico-química e sensorial da salsicha demonstrou que a adição e ácido ascórbico em altas concentração não ocasiona subtração na qualidade do produto, sendo esta uma interessante alternativa para o desenvolvimento de um produto cárneo com propriedade funcional e ao mesmo tempo substituir o antioxidante convencionalmente usando, que embora seja eficaz, não promove nenhum benefício adicional à saúde do consumidor.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha utilizada na análise sensorial

ANÁLISE SENSORIAL DE SALSICHA DE FRANGO

Nome: _____ Idade: _____ Data: _____

Instruções: Você está recebendo uma amostra codificada de salsicha. Por favor, utilize a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da amostra em relação aos atributos indicados.

Escala	**Código da amostra: _____**
9 – Gostei muitíssimo	**- Aparência: _____**
8 – Gostei muito	**- Aroma: _____**
7 – Gostei moderadamente	**- Textura: _____**
6 – Gostei regularmente	**- Sabor: _____**
5 – Nem gostei nem desgostei	**- Cor: _____**
4 – Desgostei regularmente	**- Avaliação global: _____**
3 – Desgostei moderadamente	**Comentários: _____**
2 – Desgostei muito	**_____**
1 – Desgostei muitíssimo	**_____**

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa "Avaliação sensorial de salsicha suplementada com ácido ascórbico".

Nome: _____

Endereço:_____

Cidade: _____ CEP:_____ Fone:_____

Justificativa: Nos últimos anos vem crescendo de maneira significativa o interesse na produção de alimentos mais saudáveis, seja através da redução ou substituição de ingredientes que quando consumidos em excesso podem causar danos à saúde. Essas substituições eu reduções algumas vezes podem esbarrar em problemas tecnológicos ou resultar em alimentos de baixa aceitação por parte do consumidor. O estudo da aceitação através da análise sensorial se torna de suma importância para o sucesso na produção de novos produtos ou novas formulações. A salsicha, produto resultante do cozimento de uma emulsão cárnea de formulação específica é um alimento amplamente consumido por indivíduos de todas as idades e sexos, que por conta de sua composição química, exige a adição de um antioxidante a fim de prolongar a vida de prateleira do produto. Atualmente, o principal antioxidante utilizado é o eritorbato de sódio, que embora cumpra seu papel enquanto aditivo, não fornece nenhum beneficio adicional a saúde do consumidor. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C é uma interessante alternativa ao eritorbato de sódio, pois além de atuar como antioxidante, quando adicionado no alimento pode reforçar a ingestão dietética de vitamina C.

Objetivos do projeto: O objetivo do projeto é avaliar a aceitação sensorial de salsichas adicionadas de ácido ascórbico microencapsulado em gordura de palma através da técnica de *spray chilling*.

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 de salsichas de diferentes composições;
- O provador deverá avaliar 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 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, boa qualidade e procedência. O processo de fabricação das salsichas foi 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 pelo aluno preponente (Fernando Eustáquio de Matos Junior);
- 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 suplementada com 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 a identidade da 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.

Aluno de pós Graduação responsável: Fernando Eustáquio de Matos Junior – Nutricionista – FZEA – USP. Contatos: fernandoeustaquio@usp.br / (19) 82999219.

Pirassununga, _____ de _____ de _____. Assinatura: _____

APÊNDICE C – Lista de publicações resultantes do trabalho

- Artigos publicados

OKURO, P. K.; **MATOS Jr, F. E.**; FÁVARO-TRINDADE, C. S. F. Technological Challenges for Spray-Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 171-182, 2013.

COMUNIAN, TALITA A.; THOMAZINI, MARCELO; ALVES, ANA JULIA GOUVÊA; **DE MATOS JUNIOR, FERNANDO EUSTÁQUIO;** DE CARVALHO BALIEIRO, JÚLIO C.; FAVARO-TRINDADE, CARMEN S.. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p.373-379, 2013.

- Capítulo de livro aceito para publicação

Carmen S. Fávaro-Trindade, **Fernando E. Matos Junior** e Paula Kiyomi Okuro. Encapsulação de fármacos por spray cooling. In: Vetores lipídicos para uso tópico, dérmico e transdérmico: Da produção às aplicações em dermofarmácia e cosmética. Organizado por Eliana B. Souto, Patrícia Severino e Maria Helena Santana. (Livro em fase de edição).

- Resumos publicados em anais de congresso

COMUNIAN, T. A.; Thomazini, M; **MATOS Jr, F. E.**; FÁVARO-TRINDADE, C. S. F.. Characterization of ascorbic acid microcapsules obtained by the double emulsion

technique followed by complex coacervation. In: South-American Symposium on Microencapsulation, 2012, Limeira. Proceedings of South-American Symposium on Microencapsulation, 2012. v. 1. p. 248-248.

MATOS Jr, F. E.; ALAVES, A. J. G.; COMUNIAN, T. A.; Thomazini, M; FÁVARO-TRINDADE, C. S. F.. Ascorbic acid-loaded microparticles: physicochemical characterization and encapsulation efficiency. In: South-American Symposium on Microencapsulation, 2012, Limeira. Proceedings of South-American Symposium on Microencapsulation, 2012. v. 1. p. 266-266.

MATOS Jr, F. E.; ALAVES, A. J. G.; Thomazini, M; COMUNIAN, T. A.; OKURO, P. K.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. F.. Development and Characterization of Lipid Microparticles of Ascorbic Acid Obtained by Spray Chilling. In: 2012 IFT Annual Meeting & Food Expo, 2012, Las Vegas. 2012 IFT Annual Meeting & Food Expo, 2012. v. 1. p. 54-54.

KANASHIRO, A.; PAULA, E.; CATUNDA, F.; FREIRE, M. T.; **MATOS Jr, F. E.**; TRINDADE, M.. Stability of lamb loins vacuum packaged with or without oxigen scavenger/carbon dioxide sachets and stored under refrigeration. In: IFT Annual Meeting & Food Expo, 2012, Las Vegas. eBook of Abstracts, 2012. v. 1. p. 20-21.

Junior, F.E.M.; Albertini, B.; SABATINO, M.; Favaro-Trindade, C.S.. Ácido ascórbico microencapsulado por spray congealing: caracterização das partículas e avaliação da estabilidade. In: Innova 2013 (Sixth International Symposium on Food Development and Innovation), 2013, Montevidéu. Anais do Innova 2013 (Sixth International Symposium on Food Development and Innovation), 2013. v. 1. p. 53.

Matos-Jr, F.E.; Favaro-Trindade, C.S.; Di Sabatino, M.; Albertini, B.. Avaliação da estabilidade do ácido ascórbico microencapsulado pela técnica de spray congealing. In: 10º SLACA, 2013, Campinas. Anais do 10º SLACA, 2013, p.1707.

- *Apresentação oral de trabalho em congresso*

Junior, F.E.M.; Albertini, B.; SABATINO, M.; Favaro-Trindade, C.S.. Ácido ascórbico microencapsulado por spray congealing: caracterização das partículas e avaliação da estabilidade. In: Innova 2013 (Sixth International Symposium on Food Development and Innovation), 2013, Montevidéu. Anais do Innova 2013 (Sixth International Symposium on Food Development and Innovation), 2013. v. 1. p. 53.

- *Prêmio recebido em congresso*

Certificado de mérito pelo trabalho "*Development and Characterization of Lipid Microparticles of Ascorbic Acid Obtained by Spray Chilling*" que ficou entre os 6 finalistas na competição para estudantes graduados, divisão Eng. de Alimentos, do IFT 2012, Institute of Food Technologists.

APÊNDICE D – Artigo de revisão publicado

ISSN 1330-9862
(FTB-3167)

minireview

Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients

*Paula Kiyomi Okuro, Fernando Eustáquio de Matos Junior and Carmen Sílvia Favaro-Trindade**

University of São Paulo, College of Animal Science and Food Engineering, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635 900 Pirassununga, SP, Brazil

Received: August 16, 2012
Accepted: March 29, 2013

Summary

Spray chilling technology (also known as spray cooling and spray congealing technology) has been widely studied and used in the pharmaceutical field. In the food industry, this technique is gaining interest and can become useful because functional food formulations can be developed. Spray chilling is a fat-based system, which involves the addition of the component of interest to a molten lipid carrier, and the resulting mixture is fed through an atomiser nozzle. When the nebulised material is put into contact with the environment, which is cooled below the melting point of the matrix material, the vehicle solidifies (due to heat exchange between the molten material and cold air), and solid lipid microparticles are formed at the same time. This technology is fat based, and lipid carriers, such as wax and oil (*e.g.* palm oil, beeswax, cocoa butter, and kernel oil) can be used. This encapsulation technique can potentially change the functionality, reduce the hygroscopicity, mask taste or odour, change solubility, and provide physical protection in addition to allowing the controlled release of these ingredients. This low-cost technology is relatively simple to apply and scale up, and it does not require the use of organic solvents and the application of high temperatures in the process. Therefore, spray chilling encapsulation may facilitate the development and production of functional and enriched foods as it may solve some technological problems associated with the use of certain ingredients, such as those that have high reactivity and low stability.

Key words: spray cooling, spray congealing, nutrient microencapsulation, solid lipid microparticles (SLMs), bioactive compounds

Introduction

The use of encapsulation technology has increased in the last 10 years to address some limitations in the use of medicines, food ingredients, cosmetics, veterinary products and hygiene products. The most popular techniques used to develop microparticles are spray coating, coacervation, solvent evaporation, ionic gelation, liposomes, spray drying and spray chilling (also known as spray cooling and spray congealing).

Spray chilling technology consists of making a solution dispersion or emulsion containing the active ingredient and a molten carrier, which is then atomised into a chamber where cold air or liquid nitrogen is injected. In the case of emulsions, spray chilling technology can be applied to a water-in-fat emulsion in the presence of an emulsifier, such as soy lecithin (*1–4*). Under these conditions, the carrier instantly solidifies, forming spherical particles, and the solubility of these particles depends on the hydrophilic/lipophilic nature of the carriers. These particles can be as small as a microparticle depending mainly on the device used for the atomisation process. To meet food industry requirements, carriers must be food grade. Lipophilic materials that have a melting

*Corresponding author; Phone: ++55 19 3565 4139; Fax: ++55 19 3565 4284; E-mail: carmenft@usp.br

point higher than room temperature are mostly used, thus yielding solid lipid microparticles (SLMs). The most recommended carriers for the development of particles by means of spray chilling are fatty acids, alcohols, triacylglycerols and waxes.

Spray chilling is a convenient technique for the encapsulation of food ingredients because it is a low-cost continuous process, and it is easy to scale up. Moreover, spray chilling does not require organic solvents, such as alcohols or ether, and it does not require application of high temperatures, which should be considered when thermosensitive ingredients, such as ω-3 fatty acids, enzymes and probiotics, need to be encapsulated. However, spray chilling encapsulation presents some technological disadvantages, such as low encapsulation efficiency and the possibility of expulsion of the active ingredient during storage. Another disadvantage of spray chilling encapsulation is related to the hydrophobic character of the particles, which can make some applications difficult.

There is no consensus in the literature regarding the nomenclature of the spray chilling encapsulation technique, which can be considered synonymous with spray cooling (*5*,*6*) and spray congealing (*7–10*). There is often overlapping of terms in technical and scientific literature. The terms spray chilling and spray cooling are normally used when taking into consideration the melting point of the carrier. Herein, spray chilling is the process that uses carriers with a melting point between 32 and 42 °C for the production of spray particles, and spray cooling is the encapsulation process in which the carrier has a melting point between 45 and 122 °C (*11–14*). The term spray congealing is employed indiscriminately when molten carriers are used regardless of their melting temperature (*15*,*16*). However, this impasse or the lack of consensus regarding the right terminology does not obscure the real importance of this encapsulation technology.

Currently, many publications are available in the literature describing the preparation of lipid particles by spray chilling for different purposes as follows: flavour and odour masking, production of ingredients with increased stability, protection and controlled release of probiotics, and encapsulation of bioactive proteins and peptides. However, most studies are from the pharmaceutical field, and there has not been an article published regarding the compilation of such data for the food industry. Based on these considerations, the purpose of the present article is to highlight the importance of spray chilling encapsulation in food fields.

Spray Chilling Technology

In general, the spray chilling process can be divided into two steps. The first step consists of adding the bioactive compound to the carrier material, which is usually a lipophilic compound, to be encapsulated. This incorporation process can be performed by dissolving or mechanically dispersing the material into the encapsulating matrix (the latter is the most widely applied method). The use of an emulsion is also a method to incorporate some hydrophilic bioactive agents (*2–4*). The second step consists of atomisation of the molten material, which is typically carried out by a heated atomising nozzle to maintain a proper temperature, thus avoiding solidification of the feeding material. When this material is atomised in contact with a refrigerated chamber (due to the injection of cold air or liquid N_2), a heat transfer occurs between the molten material and the cold air, thus leading to solidification of the carrier and the formation of particles (*5*).

The residence time of droplets in the spray cooling chamber is relatively short (only a few seconds). The particles are collected in a container located below the cooling chamber, and fine particles are transported by air into a cyclone where they are collected in another container (Fig. 1).

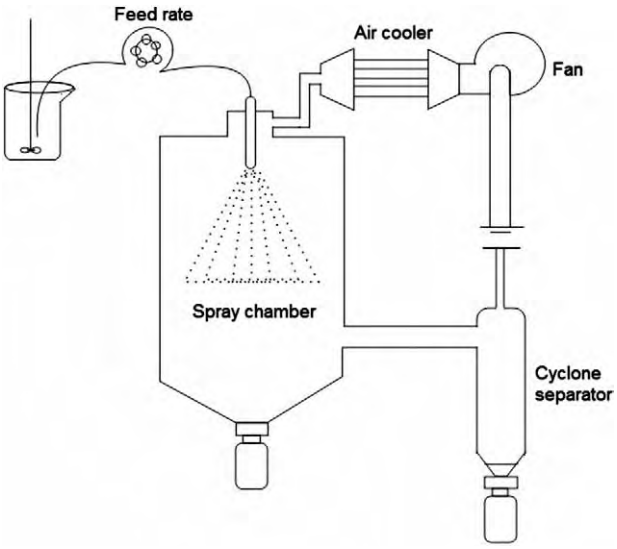

Fig. 1. Scheme of spray chilling equipment

The preparation of particles using this method has been applied in various sectors, including pharmaceutical, cosmetic, agricultural, veterinary and food industry (*1*). The application of spray chilling encapsulation process has also been reported for the production of both food ingredients and several drugs (*17*).

Numerous applications of SLMs obtained by spray chilling have been investigated, such as odour and taste masking (*18*,*19*); protection of the active ingredient against detrimental conditions, such as pH, enzyme activity, moisture, oxygen and light; optimisation of the dissolution of poorly soluble drugs; modulating the release kinetics of active compounds; and improvement of flow properties, handling, appearance and other purposes (*8*).

If lipids are used as the carrier material, the final product is insoluble in water and there is usually controlled release of its contents by utilising the melting point of the carrier (*20*) or by digestion of the carrier in the intestine. The proper selection of the carrier is crucial because the encapsulation process can modify its properties, such as reduce its hygroscopicity and/or increase its chemical/physical stability (*18*).

The atomisation of the molten mixture (carrier plus active ingredient) and the solidification process are con-

sidered critical steps. The atomisation process is related to the disintegration of the molten mixture into small particles (*21*), and the solidification process is associated with the processing of the molten material into a solid (obtained by cooling). From the operational standpoint, insufficient cooling leads to agglomeration of the droplets and/or adhesion of these droplets on the surface of the chamber, thus negatively affecting the morphology, process and other properties of the microparticles.

Spray chilling is similar to spray drying, which is a widely studied and widespread technology. However, there is a difference between these processes in terms of direction of energy flow. With regard to spray drying, the energy is applied to the droplet forcing the solvent evaporation. In spray chilling encapsulation, however, the energy is removed from the droplet forcing the solidification of the carrier (*5*). The spray chilling technique may be considered to be a merger between the hot melt technology (coating or agglomeration) and the spray drying technique. Table 1 (*5,8,10,14,22–25*) presents several differences between these techniques (spray chilling and spray drying).

The initial spray chilling configuration is similar to the spray drying configuration, but there is no solvent evaporation. A conventional spray dryer (when there is input of hot air) can also be used as a spray cooler (when there is input of cold air). The apparatus consists of two main parts: a cooling chamber and an atomiser. For an efficient process, it is recommended that the molten mixture dispersion presents a narrow melting temperature range, so the particles can also be solidified during the spraying process (*26*).

Both spray drying and spray chilling techniques do not produce reservoir-type microcapsules, but instead they produce matrix-type microspheres. However, spray chilling produces dense and massive microspheres, and spray drying generally produces hollow microspheres (Fig. 2).

There are also similarities between the SLMs obtained by the spray chilling technology and by the spray coating technology. These methods can both be fat based, and the physical nature of these processes is similar because they have the same release mechanisms that differ from the spray drying regarding the functionality of par-

Table 1. Differences between spray chilling and spray drying techniques

	Spray drying	Spray chilling	Ref.
Energy flow	energy applied in the droplet forcing evaporation of the medium	energy removed from the droplet forcing the solidification of the medium	(*5*)
Equipment	feeding tubes without heating	heated feeding tubes (to avoid solidification)	(*8*)
Flow in the chamber	hot air	cold air or liquid N_2	(*8*)
Particle size	5–150 μm	20–200 μm	(*14*)
Dissolution mechanism	dissolution	diffusion, heating, lipases and bile salts (GI tract)	(*22*)
Particle morphology	geometric particle with porous and irregular surface due to solvent evaporation	dense, spherical and smooth surface (no effects of solvent evaporation)	(*23*)
Carrier	water-soluble polymers	waxes, fatty acids, water-soluble polymers and water-insoluble monomers	(*24*)
Food ingredients	vitamins, flavours, starter cultures, carotenoids, oils, fats, enzymes and acidulants	iron sulphate, vitamins, minerals, acidulants, enzymes and probiotics	(*25*)
Process steps	dispersing or dissolving the active compound in aqueous solution coating, atomisation, dehydration	dispersing or dissolving the active compound in the molten lipid mixture, atomisation, cooling	(*10*)
Load/%	5–50	10–20	(*10*)

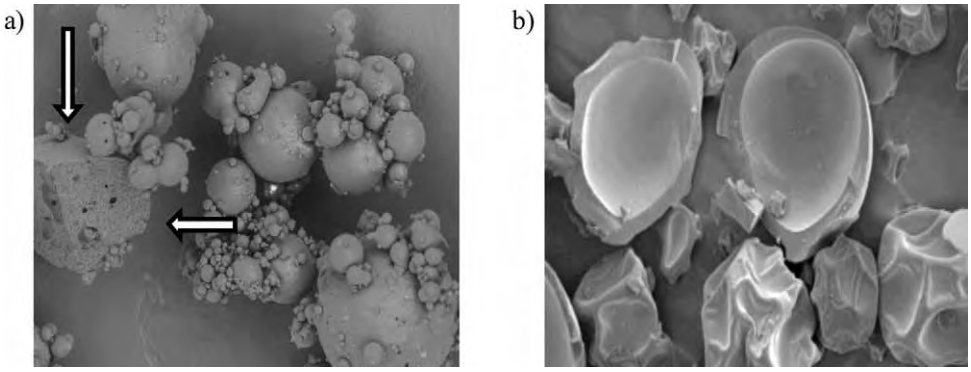

Fig. 2. Differences between particles produced by spray drying and spray chilling: a) micrograph of a fractured particle produced by spray chilling, b) micrograph of a fractured particle produced by spray drying

ticles. Both processes can be used to produce SLMs at low temperatures. However, while spray chilling is used to produce SLMs, spray coating is used for recovering particles. Thus, spray coating has the advantage of producing reservoir-type microcapsules. During the spray coating process, the particles are kept in suspension in a chamber while the coating solution is nebulised over them. When molten lipid matrices are used as coatings, the chamber is kept at low temperatures for promoting solidification of the lipid while recovering the particles.

A wide variety of materials, including lipid material, can be used for the coating of particles by spray coating and spray chilling (*23*). The use of lipids during spray coating leads to SLM features similar to those obtained by spray chilling, including the release mechanism. As the spray coating technique allows the thickness of the coating layer to be adjusted, the control of the release speed of the bioactive compound can be modulated with more accuracy, thus obtaining a desired release profile. Another advantage of the spray coating over the spray chilling technique is the amount of active material that can be used for encapsulation. Currently, spray chillers have a limitation of the maximum amount of active material in the feed. Several spray adaptations were studied using pneumatic atomising nozzle to obtain microspheres with 30 % solid active ingredients and 50 % liquid active ingredients (*10*).

Both the spray chilling and spray coating techniques have the possibility of microencapsulation of thermolabile ingredients, including enzymes and microorganisms, but it is necessary to pay attention to the thermal behaviour of the core and the carrier. Lower melting points and temperatures reached in the cooling chamber result in greater chances of success in obtaining particles without compromising the stability of the active material during the encapsulation process.

Spray coating technology presents some advantages when compared to spray chilling. One of them is the possibility of adjusting the lipid coating thickness by adjusting some process parameters. The spray coating technique also allows multilayer coating with hydrophobic or hydrophilic coats, which enables greater flexibility in the applications of these microparticles in relation to SLMs obtained by spray chilling when incorporated in other products. In addition, there are differences in the structure of the particles obtained by spray chilling and spray coating. In spray chilling, microparticles are matrix-type particles in which the bioactive component is dispersed throughout the volume of the microparticles or microspheres. In spray coating, SLMs are reservoir-type microparticles or microcapsules in which the active ingredient is enclosed by a layer or multiple layers. Thus, in the SLMs produced by spray coating, the bioactive ingredients are better protected compared to the microparticles obtained by spray chilling because in the SLMs produced by spray chilling, part of the bioactive component is dispersed on the surface of the particle.

Process Variables

The following main variables should be strictly monitored in the spray chilling process: melting point of the matrix used, temperature of the molten material during processing, chamber temperature, atomising air temperature, atomising air pressure, and feeding flow of the molten mixture (*8*). Table 2 (*2,8,10,28,29*) summarises several operation conditions of the spray chilling process.

The following conditions are critical to obtain uniform particles: low viscosity and high speed atomisation. Das and Gupta (*30*) studied the micropelletisation technique using modified spray congealing technology with a cross-linked gelatin matrix, and they suggested that the ideal viscosity for this system is approx. 0.024 Pa·s at 55 °C.

The spray chilling performance depends strictly on the spray atomisation efficiency of the molten mixture. The efficiency of the atomisation process, in turn, is directly associated with different types of devices that can perform the atomisation. These devices (atomisers) may be pressure nozzles, centrifugal atomisers, rotary atomisers, dual fluid atomisers or ultrasonic atomisers (*5*). The devices are shown in Fig. 3 (*31*). All available atomisers have similar characteristics, and they all are inadequate when spraying mixtures that have high viscosity. The feeding and pressure conditions employed in the process can exert effects on the homogeneous distribution of the particles. Albertini *et al.* (*10*) described this limiting profile assuming the difficulty of atomising a mixture containing active ingredients in a mass fraction exceeding 30 %. However, these authors suggested that by altering the design of the atomiser, there is a possibility of overcoming the threshold feeding up to 50 % (by mass).

Some studies have been conducted to investigate the effects of process parameters on particle features. Maschke *et al.* (*9*) found that by increasing the atomisation pressure from 5 to 6 bar, there is a decrease in the size of particles obtained by spray chilling. Viscosity is another important variable that influences the particle size, and it can be regulated by monitoring the temperature or by the type and amount of dispersed solids. Low viscosity (due to high temperature) results in smaller particle sizes (*9*), while higher viscosity (for example, due to the addition of solids) results in larger particle sizes (*10*).

The molten mixture, which is the feed stream, presents a characteristic curve of solidification. When the atomised droplets come into contact with the cooled medium, the material cools to a temperature of solidification. Thereafter, the temperature remains constant during the heat release of the product, and stable SLMs are then formed. Some products that have a variety of fatty acids, such as hydrogenated palm kernel oil, do not have a well-defined solidification point. The phase change may occur in a temperature range, or, depending on the condition of the molten material, the product may migrate to an amorphous form without releasing the solidification heat because a non-crystal formation occurs. The atomised material passes through three stages of cooling: liquid cooling, solidification and particle cooling. The temperature of the droplets decreases as they come into contact with cold air. When the solidification temperature is reached, the droplets will gradually solidify. As the freshly solidified particles have a higher temperature than the environment, they continue losing heat until room temperature is reached.

Table 2. Some operating conditions of spray chilling processes

Nozzle	Chamber	Temperature gradient (molten mixture→ air chamber)	Liquid spray rate	Bioactive component/carrier	Air pressure	Ref.
Dual fluid nozzle	15 cm diameter 60 cm length	70 °C → 0–5 °C	6.0 to 23.4 mL/min	Glimepiride/Gelucire 50/13R	1.09 and 1.59 bar	(*8*)
Dual fluid atomiser (0.7 mm)	–	65 °C → 10 °C	force of gravity	α-tocopherol/interesterified fat with fully hydrogenated soybean oil	0.25 MPa	(*28*)
Wide pneumatic nozzle (4.5 mm)	1.80 m in height and 75 cm in diameter	80 to 100 °C* → (25±1) °C	by both the force of gravity and the effect of Venturi	propafenone hydrochloride and vitamin E/carnauba wax, cetearyl and stearyl alcohols	1–3 bar depending on the desired particle size	(*10*)
Ultrasonic atomiser	–	70 °C → room temperature	–	verapamil HCl/ microcrystalline wax, stearyl alcohol and mixtures of the two	–	(*29*)
Dual fluid (0.7 mm)	–	48 °C → 10 °C	force of gravity	*B. lactis* and *L. acidophilus*/ interesterified fat with palm and palm kernel oil	0.98 kPa	(*2*)
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 °C → (13±2) °C	40 mL/min	lycopene/interesterified fats and refined vegetable oils	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 to 80 °C → (15±2) °C	45 mL/min	soy protein hydrolysate/ interesterified fats and refined vegetable oils	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	(52±2) °C → (15±2) °C	60 mL/min	probiotic/interesterified fat with palm and palm kernel oil	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 °C → (13±2) °C	60 mL/min	ascorbic acid/interesterified fat with palm and palm kernel oil	5 bar	**

*carriers were heated to 10 °C above the melting point
**studies of microencapsulation by spray chilling from our group (unpublished)

Fig. 3. Pressure nozzle and rotary nozzle, respectively. Reprinted from: GEA Process Engineering Inc. (*31*)

Another important approach is to control the temperature of the lipid material during solidification because it prevents the polymorphism of fats, which directly impacts the release profile of the active material/bioactive compound. The lipid matrix can crystallise in different ways depending on different reasons related to the cooling process. For example, rapid cooling results in a lipid compound preferably in the unstable α form, and slow cooling tends to lead to the formation of the β form (*32*).

Currently, several studies have investigated the performance and improvement of spray chillers, including the use of pneumatic atomising nozzles (*10*), compact ultrasound atomisers (*33*), and ultrasonic atomisers, to disperse the atomised particles (*34*).

Ilić *et al*. (*8*) studied the influence of several parameters on the obtained particle size when using the spray chilling microencapsulation process. By varying the atomising pressure and liquid feed rate, they reported that the microparticle median sizes ranged from 58 to 278 μm and that the total process yields range from 81 to 96 %. An increased liquid feed rate was found to increase microparticle size, and higher atomising pressures were found to decrease the microparticle size. These authors concluded that the dominant process parameter regarding microparticle size is achieved by monitoring the atomising pressure in relation to the feed rate.

Morphological Characteristics of Particles

Regarding the physical structure, particles produced by spray chilling are typically matrix-type particles, where

the active ingredient is dissolved or dispersed throughout the volume of the particle and not just in its centre. As this is not a reservoir-type system, where the bioactive compound is fully covered by the carrier, these particles cannot be denominated as microcapsules but are instead denominated as microspheres or microparticles (for those produced on the micrometre scale). Fig. 4 shows particles or microspheres produced by the spray chilling technique.

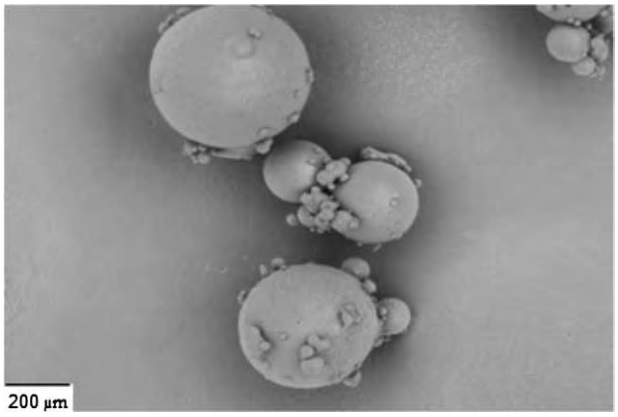

Fig. 4. Micrograph obtained by scanning electron microscopy (SEM) of particles produced by spray chilling using palm oil as a carrier (500× magnification)

In general, the particles produced by spray chilling are micrometric and impermeable to water (but not resistant to water). The particles have a spherical form, which facilitates their flow, and the active ingredient is normally distributed uniformly within the entire particle volume (*8*). These are several essential qualities for a suitable incorporation of the material due to the reduction of surface tension between the microparticle hydrophobic surface and the aqueous environment to which it is added, thus allowing the flow of particles in the food matrix (*26*). Because the process does not involve solvent evaporation, which is commonly observed in other techniques such as spray drying, the particles produced by spray chilling are usually dense and not porous, and they tend to be mechanically resistant and remain intact upon agitation (*26*).

The particle size depends on both formulating and operating parameters. Formulating parameters include the size and concentration of the active ingredient as well as the viscosity of the feed. The operating parameters consist of the configuration of the atomisation device and working conditions (*i.e.* disk configuration, disk rotational speed, air nozzle pressure, and temperature). An additional coating may be applied to microparticles obtained by spray chilling, using spray coating technology, to ensure a complete coverage of the particle and to eliminate undesirable interactions during embedding and storage (*26*).

Regarding the equipment operational configuration, there is a specific height to be used to obtain a suitable fall of particles, and such a parameter depends on the required particle size and melting characteristics of the material (*14*).

Carriers and Additives Used in Food/Feed Encapsulation

Lipids are interesting alternatives to be used as coating materials due to their ability to assume a variety of morphological states, such as emulsions, liposomes and SLMs (*35*). Several characteristics of a suitable carrier should be taken into consideration prior to the process as follows: regulatory acceptability for use in foods; stability under typical process conditions; ease of atomisation; and moderate melting temperature, which is aimed at minimising the degradation of the filling component (*36*). A proper selection of the carrier is important because it may change some properties of the encapsulated material, such as control of the release profile, masking of unpleasant taste, reduction of gastrointestinal irritation, and increased viability in some media (*2,9,37–39*).

The use of surfactants directly impacts the stability of SLMs. The choice of the surfactant agent depends on the compound to be encapsulated and also on the application of the final product. The surfactant should not provide undesirable characteristics to the final product (*40,41*).

The particle release profile can also be influenced by changes in lipid matrices, concentration of surfactant (such as soy lecithin) and by some production parameters (*42*). These surfactants are added to provide greater stability to the capsule as they aid in effective connection between the active ingredient and the matrix. Several researchers have analysed the incorporation of lecithin in the lipid matrix to optimise the incorporation of the active ingredient, and they showed that the encapsulation efficiency increases linearly with increasing concentration of lecithin (up to a certain percentage). This effect was attributed to the development of micelles in the middle of the lipid matrix, which contributes to an additional incorporation of the active ingredient (*43*).

Release Mechanism

Microencapsulation enables controlled release of the active ingredient. In response to specific stimuli, the particle releases its active ingredient in a specific environment. The release mechanisms of bioactive compound from solid lipid microparticles in the intestine can be associated with the presence of digestive enzymes, particularly pancreatic lipase and bile salts (which act as detergents). Another possible release mechanism is through the increase of the temperature above the melting point of the carrier.

The particle type, geometry and composition define the release mechanism of the active ingredient. The processes that employ hydrophilic carriers generally trigger a more rapid release of the active ingredient in relation to those agents that have a lipid carrier (fats and waxes), thus retarding the release of the active compound (*44*). The release of active ingredients from particles obtained by spray chilling can occur *via* erosion and leaching of the matrix. Depending on the type and concentration, some surfactants can dramatically affect the dissolution rate of the matrix.

With regard to SLMs, the release rate can be activated by enzymatic degradation or temperature. When activated by enzymes, lipids are degraded by the action of lipases in the digestive system. When activated by temperature, the active ingredient is released in response to the temperature change affecting the physical state and release rate of the bioactive compound. In this context, two distinct concepts should be noted: (*i*) temperature sensitivity, which is an important characteristic that needs to be taken into consideration for those materials that expand or collapse when a critical temperature is reached, and (*ii*) activation by fusion, which is related to the melting of the carrier, such as those made of modified lipid or wax, in response to the increasing temperature (*45*).

With respect to vitamins, which are potentially oxidisable compounds, the microencapsulation process can also increase their chemical stability and improve the masking of possible off-flavours or odours. In this case, the vitamin must be released after ingestion or directly in the stomach or intestines. For this purpose, hydrophobic materials are employed, although cellulose derivatives and cross-linked proteins can also promote enteral release (*46*).

The concept of release after ingestion, which reflects the actual digestion mechanism of the carrier, is connected with the condition of microparticles containing probiotics. These microorganisms are beneficial to the host's health. However, to be effective, the probiotic strain must remain alive after passing through the stomach because acidic medium and the presence of oxygen are harmful to the microorganism (*47–49*). Therefore, the timing associated with the fact that lipid digestion (carrier) effectively takes place in the intestine where the probiotic strain must act reflects the efficiency and the basic condition to apply this technique.

In the SLM, not the entire bioactive ingredient is effectively encapsulated as it remains on the particle surface. This condition leads to a high initial release of this bioactive compound and is followed by the osmotic diffusion (even if in a small amount) in the matrix. Mechanical breakdowns and melting of the lipid matrix elements also release the bioactive compound (*6*). Additionally, other factors influence the release kinetics, such as osmotic force, slow diffusion rate of water through the imperfections of the capsule, and mechanical disruption (*6*).

Zaky *et al.* (*50*) studied the factors that impact the release kinetics of protein in triglyceride microparticles prepared by spray congealing. These authors investigated the effect of the protein particle size, morphology and distribution in the release of the encapsulated microparticles by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results showed that water entered and dissolved the protein, which led to the formation of water-filled pores allowing the diffusion of the active ingredient in the outside part of the matrix. The penetration of water and release of protein are strongly correlated, showing the importance of more realistic three-dimensional analysis to study the distribution of the protein within the particle.

Furthermore, SLMs have the advantage of lipids being easily digested in the intestine by lipases causing the release of active compounds in the vicinity of their site of action. Thus, it would be interesting to encapsulate probiotics, prebiotics, some proteins, peptides, iron, ω-3 fatty acids, vitamins, antioxidants and many other compounds.

Advantages of the Process

Currently, the use of spray chilling has increased due to the numerous advantages associated with the technological process, such as speed, performance, and relatively low cost. Once this technique does not require the use of water or organic solvents, the elimination of residual solvents will not be required. Moreover, it is a fast, safe and reproducible physical process because it is associated with an easy adjustment of particle size (*51*).

In the last two decades, spray chilling has been considered to be an environmentally friendly technique compared to other procedures, such as spray drying. Spray chilling also reduces energy use and time of operation (*52*). Another positive aspect is the ease to scale up the production because this technique can be operated continuously with the elimination of some manufacturing steps (*53*).

Other advantages of spray chilling include the use of low temperature in the process, thus not requiring heat. Moreover, there is usually controlled release of the SLM contents around the melting point of the carrier and by digestion of the carrier in the intestine. The SLMs are almost perfect spheres, which are structures that give free-flowing powders.

Disadvantages of the Process

Although SLMs present some advantages, some of the technological disadvantages are as follows: low encapsulation capacity of the active material; possibility of expulsion of the active ingredient by the matrix during the particle shelf life; and the degradation of lipid carrier applied for the dispersion development, which may affect the active ingredient material, thereby influencing its stability and/or its release profile (*54*).

Another limitation to be considered is the proper choice of the material to be encapsulated. The encapsulated material should be stable at the carrier melting temperature. For many thermolabile or unstable food ingredients, the degradation temperature is recurrently low, thereby reducing the possibilities of using a suitable carrier. The use of molten mixtures should also be considered, which requires operational attention to avoid agglomeration and solidification of such materials in the production line, thus impairing the efficiency of the atomisation process.

The method has a drawback related to fast cooling rates that sometimes crystallise the lipid matrix into a polymorphic form (unstable α arrangement), which leads to the development of disordered chains and/or undesirable orientation, thus promoting lower barrier properties due to the tendency of more stable arrangements resulting in the release of the active ingredient (*32,53*).

Other possible disadvantages include the effect of particles on food texture, which depends on the particle

size, as well as the possibility of particles to float in liquid systems. In addition, SLMs prepared by spray chilling are insoluble in water due to the lipid carrier, which can limit or not allow some applications. Moreover, the matrix structure of the particles obtained by spray chilling leads to the dispersion of the part of the active material that is not protected on the surface of the particles.

Encapsulation of Functional Ingredients by Spray Chilling

Microencapsulation has been widely used in various industrial applications. However, even though microencapsulation by spray chilling has been thoroughly studied in the last years, especially in the pharmaceutical and veterinary production, it has just a few food-based industrial applications. Although the use of encapsulation is fairly new in the food field, the interest in spray chilling technology has grown significantly. This interest grows as the need arises to develop alternatives for new applications. In this regard, the encapsulation of food ingredients that present functional properties has been studied more vigorously.

A common characteristic of many functional ingredients is that they are subjected to rapid inactivation or degradation (*55*). Thus, the incorporation of bioactive ingredients in foods presents many challenges, especially with respect to their stability during processing and storage and the need to prevent undesirable interactions with the food matrix (*56*). Encapsulation technology arises in this context as a viable alternative to ensure that the functional ingredient may be active in the body, that is, it must be delivered to the site of action at a relevant concentration for a sufficiently long period of time to do its work. Furthermore, by encapsulating the active ingredient into a food matrix, the loss of food quality is avoided, thus ensuring the product's intrinsic characteristics (*57*).

Although rarely studied by food researchers, spray chilling has several advantages that make it an important alternative for encapsulation of functional ingredients. The process is fast, simple and relatively inexpensive. Moreover, spray chilling can be applied to different types of functional ingredients, such as vitamins, minerals, antioxidant compounds, proteins, protein hydrolysates and probiotic microorganisms.

The use of lipid material as a carrier together with the use of low temperatures and the absence of organic solvents during the process are some of the advantages that have encouraged researchers to explore the microencapsulation of food ingredients by means of spray chilling to overcome technological limitations in their use. The process has been tested for different purposes, including the development of controlled release systems and protection of food ingredients against adverse environmental conditions, such as the presence of light, oxygen or unfavourable pH. Furthermore, the process has been tested for taste masking and encapsulation of flavour ingredients, such as peptides and proteins, with therapeutic potential.

Encapsulation of Probiotic Microorganisms

Although the first reports involving studies with probiotics are not recent, the incorporation of these microorganisms in foods is still considered a challenge to the industry. Probiotics represent one of the most important classes of functional ingredients and are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host (*58*).

To be able to present prophylactic or therapeutic functions, probiotic microorganisms need to have their functional structures preserved until they reach their site of action in a high enough quantity to be capable of positively influencing the local microbiota (*55*). However, a number of factors may compromise the functionality and/or the viability of probiotic microorganisms. These factors are related to the technological processes used for food production, the physicochemical characteristics of the food matrix to which the probiotic is added and its passage through the gastrointestinal tract until its arrival in the intestine, which is its primary site of action (*59*).

Microencapsulation is a promising alternative to overcome the problems related to the vulnerability of probiotic cells to adverse factors, including the presence of oxygen and acidic media (*60*,*61*). Various techniques have been used for the encapsulation of probiotics, and each technique presents particular advantages and disadvantages. Among the available techniques, the following are highlighted: extrusion, atomisation or spray drying, emulsion, coacervation, spray coating and immobilisation in fat or starch granules (*62*).

The spray chilling technique has several advantages in the encapsulation of probiotic microorganisms. The absence of organic solvents during the encapsulation process is one of these advantages. The use of these organic chemicals is necessary in other techniques and may be toxic/lethal to the probiotic strains, which compromises not only the viability but also their functionality.

With spray chilling, it is possible to develop SLMs only by using the lipid matrix and a probiotic culture without using any further substance. Furthermore, spray chilling does not require the application of high temperatures to produce the microparticles that contain probiotics, which differs from the spray drying and extrusion techniques. However, there is the need to melt the lipid matrix. It is possible to use fats with a low melting point, which prevents the microorganism from being affected by the temperature. Another good aspect of the spray chilling technique is related to the release mechanism of the active ingredient. If the matrix is composed of fats, the release of the bacteria occurs directly in the intestine as a result of the action of lipases present in the intestinal lumen.

Pedroso *et al.* (*2*) encapsulated probiotics by spray chilling using interesterified palm fat and palm kernel, and they found that the SLMs provided protection for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* against the simulated gastric and intestinal fluids. Moreover, they obtained promising results for viability during storage when refrigerator and freezer storage temperatures were applied.

Pedroso *et al.* (*3*) also reported that the encapsulation of *B. lactis* and *L. acidophilus* in cocoa fat by spray chilling provides protection and cell viability. Although *in vivo* gastrointestinal studies demonstrate protection, the viability during storage of SLMs is low. This study indicated that spray chilling using fat as a carrier is an innovative technology for the protection, application and delivery of probiotics. The use of spray chilling favours the microencapsulation of bacteria mainly because it does not employ high temperatures or toxic solvents in the process.

Encapsulation of Vitamins and Minerals

Vitamins may be added to food products to enhance their nutritional value or to act as additives, such as antioxidants or colouring agents added to cured products. Herein, essential minerals are usually added to foods to enhance their nutritional value. The nutrients in these foods may be hampered by the low stability of vitamins or by their ability to interact with other food compounds, thus promoting undesirable changes to the food chemical and sensory properties. Iron is a classic example because its bioavailability is severely affected by interactions with food compounds (*e.g.* tannins, phytates and polyphenols), and iron may also act as a catalyst for the oxidation of fats and vitamins (*56*). Microencapsulation has been studied as an alternative to add these nutrients to foods. Once more, the choice of the encapsulation technique is a limiting factor because the vitamin content and chemical stability can be negatively affected by several factors related to the microencapsulation processes. Some technological features related to spray chilling, such as not using organic solvents and high temperatures, have stimulated further studies involving the encapsulation of these nutrients.

To develop a stable salt for the fortification of iodine, iron and vitamin A, Zimmermann *et al.* (*63*) applied the spray chilling technique to package potassium iodate, micronised ferric pyrophosphate, and retinyl palmitate into microcapsules (mean particle size of 100 μm) using hydrogenated palm oil as a carrier. The purpose of microencapsulation was to ensure iron bioavailability to prevent colour changes and to ensure the chemical stability of iodine and vitamin A. The microparticles were used in a randomised, double-blind trial that evaluated the bioavailability of these nutrients and the nutritional deficit in the studied population. The results showed that iron, vitamin A and iodate are highly stable when added to salt, and its use for a six-month period is efficacious in reducing the prevalence of iron, iodine, and vitamin A deficiencies in the studied population.

The addition of vitamin E to foods represents an interesting strategy to ensure its adequate daily intake. However, the addition of vitamin E into foods may be difficult due to its chemical instability, that is, it slowly undergoes oxidation by atmospheric oxygen by means of a reaction catalysed by light and heat in the presence of metals. Based on this consideration, Gamboa *et al.* (*28*) used the spray chilling technique to encapsulate α-tocopherol using interesterified fat with no *trans* isomer fatty acids prepared with fully hydrogenated soybean oil and soybean oil in the mass ratio of 70:30. The results showed values for the encapsulation efficiency above 90 %, and high levels of retention of the active agent were attained. Thus, the α-tocopherol encapsulation by spray chilling was successful.

Vitamin C is another important nutrient for food companies. This vitamin is widely used by the industry to supplement foods or to act as an antioxidant agent. However, the stability of vitamin C is considerably reduced when it is added to solutions due to the influence of temperature, pH, and presence of oxygen and metal ions (*64*). In a study performed by our research group (unpublished data), ascorbic acid was encapsulated by spray chilling using interesterified fat and palm kernel oil as a carrier. The results showed that the stability of ascorbic acid was substantially higher compared to free ascorbic acid. By measuring the instrumental colour, it was possible to observe a significant colour change in free ascorbic acid stored at 22 and 37 °C. This effect was associated with the development of compounds resulting from the degradation of ascorbic acid. In contrast, the colour change observed in the encapsulated ascorbic acid stored under similar conditions was considerably smaller, thereby confirming that spray chilling is a useful alternative to enhance the chemical stability of ascorbic acid.

Zoet *et al.* (*65*) patented microencapsulation of fat-soluble vitamins (*e.g.* vitamin D) by a spray cooling/chilling process. The process included making a homogeneous solution of a fat-soluble vitamin with the fatty phase preferably being a hydrogenated vegetable oil, such as palm kernel oil, cotton seed oil, sesame seed oil, palm oil, carnauba wax or beeswax. These authors suggested that the carrier should have a melting point in the range from 45 to 90 °C, and their invention relates to the use of microencapsulated fat-soluble vitamins, which was defined herein before as an ingredient in animal feed.

Encapsulation of Proteins and Protein Hydrolysates

The application of hydrolysed proteins that have a specific biological activity for the development of functional foods is of great interest for industrial purposes. However, the bitterness of hydrolysates and their low structural stability may limit the use of these ingredients in food products. Additionally, some protein hydrolysates are hygroscopic and reactive (*66*). In this case, encapsulation can be useful for masking the bitter taste and preventing the high reactivity of protein hydrolysates, which may cause undesirable changes in food. Although scientific studies are limited in the literature, the spray chilling technique has been mainly studied for masking the taste of antibiotics (*38*).

Taste masking is often cited in the literature as one of the main purposes of drug/food microencapsulation. However, spray chilling has not been explored for this purpose by food companies, and only few studies have explored the application of spray chilling microencapsulation in the production of drugs. Yajima *et al.* (*38*) reported the microencapsulation of clarithromycin, which is a macrolide antibiotic that has a strong bitter flavour.

These authors found that when clarithromycin was microencapsulated using glyceryl monostearate and aminoalkyl methacrylate copolymer, the drug did not dissolve in the mouth but instead was released immediately in the intestinal tract, resulting not only in taste masking but also offering a high bioavailability.

Another application of spray chilling that has not been fully explored is the microencapsulation of proteins and peptides. Although the use of these components in pharmaceutical formulations has experienced rapid growth since 1980 with the advent of recombinant DNA technology, the development of delivery systems is still considered challenging due to difficulties in maintaining the stability of proteins (*67*).

The choice of the technique for encapsulation is limited by the need for maintaining the integrity and bioactivity of the protein, and the use of high temperatures and organic solvents are two factors that can be directly linked with protein denaturation (*68*). Taking this into consideration, the use of spray chilling can be advantageous because the process does not require the use of organic solvents or elevated temperatures. Moreover, carriers that have a high biocompatibility, such as triacylglycerides, are used in formulations for parenteral delivery (*9*). Several publications have addressed the use of microencapsulation for the development of controlled release systems for peptides and proteins of high therapeutic potential, including lactase (*69*), somatostatin (*70*), insulin (*9*), growth hormone (*71*) and casein hydrolysate (*72*). Recently, a study conducted by Maschke *et al.* (*9*) showed positive results regarding the stability of insulin towards the spray chilling microencapsulation process. Using glycerol tripalmitate as the carrier, these authors demonstrated that it is possible to obtain spherical microcapsules with different protein fractions (0.5, 1 and 2 %) with particle sizes between 182.2 and 315 μm, and their experimental results also showed that insulin is released for at least 28 days, indicating a possible release for up to six months.

Di Sabatino *et al.* (*73*) produced lipid-based particulate systems by a spray congealing technique using bovine serum albumin as the model protein, and they reported that the solvent-free drug encapsulation process can be successfully employed to obtain particles with high (10–20 % by mass) protein loading without altering its structure.

Despite the therapeutic potential of some peptides, proteins and protein hydrolysates, their low structural stability (especially for proteins), bitter taste (of some peptides and hydrolysates), hygroscopicity, allergenicity and reactivity represent obstacles for their use with the aim to produce functional foods. In addition, some of these products should not be digested before they reach the gut because digestion can destroy their therapeutic effect. Consequently, the use of these protein hydrolysates is challenging for both food industries and researchers. Microencapsulation by spray chilling technology may be an alternative for reducing these problems. As this process does not require the use of organic or aqueous solvents and high temperatures, it could be suitable for protection and production of protein delivery systems.

Conclusions

Although spray chilling encapsulation is not a new method, it is exploited to a lesser extent compared to spray drying encapsulation, especially in the food science field. In the last 10 years, however, mainly in the veterinary and pharmaceutical fields, there has been a significant increase of published papers involving spray chilling microencapsulation. Many recent research articles have aimed at understanding the process variables of spray chilling encapsulation and to propose changes in the equipment and/or procedures, as well as to propose new carriers in order to improve the process performance in relation to the development of microparticles. It is likely that with the increase of successful reports on spray chilling encapsulation, more researchers will be interested in using this technique, thus enabling further studies and new applications in various technological fields.

This technique represents an excellent alternative for encapsulation of various food ingredients with the possibility of providing controlled release, taste and aroma masking as well as conferring a remarkable stability for different compounds. In addition to the above-mentioned applications, the use of spray chilling technique has a potential to address many other limitations in the food industry, such as the reduction in the volatility of flavourings and the hygroscopicity of powders, without excessively increasing the commercial value of food ingredients once it becomes a low-cost technique.

References

1. H.N.M. Chambi, I.D. Alvim, D. Barrera-Arellano, C.R.F. Grosso, Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterization and release profiles, *Food Res. Int. 41* (2008) 229–236.
2. D.L. Pedroso, M. Thomazini, R.J.B. Heinemann, C.S. Favaro-Trindade, Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling, *Int. Dairy J. 26* (2012) 127–132.
3. D.L. Pedroso, M. Dogensky, M. Thomazini, R.J.B. Heinemann, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology, *Braz. J. Microbiol.* (in press).
4. M.D.M.M. Ribeiro, D.B. Arellano, C.R.F. Grosso, The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process, *Food Res. Int. 47* (2012) 38–44.
5. M.J. Killeen, The process of spray drying and spray congealing, *Pharm. Eng. 13* (1993) 56–64.
6. S. Gouin, Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends Food Sci. Tech. 15* (2004) 330–347.
7. C. Thies: A Survey of Microencapsulation Processes. In: *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, S. Benita (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (1996) pp. 1–20.
8. I. Ilić, R. Dreu, M. Burjak, M. Homar, J. Kerč, S. Srčič, Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology, *Int. J. Pharm. 378* (2009) 176–183.

9. A. Maschke, C. Becker, D. Eyrich, J. Kiermaier, T. Blunk, A. Göpferich, Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof, *Eur. J. Pharm. Biopharm. 65* (2007) 175–187.
10. B. Albertini, N. Passerini, F. Pattarino, L. Rodriguez, New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances, *Eur. J. Pharm. Biopharm. 69* (2008) 348–357.
11. L.S. Jackson, K. Lee, Microencapsulation in the food industry, *Lebensmitt. Wiss. Technol. 24* (1991) 289–297.
12. S.J. Risch: Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, S.J. Risch, G.A. Reineccius (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, USA (1995) pp. 2–7.
13. K.G.H. Desai, H.J. Park, Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres, *J. Microencapsul. 22* (2005) 377–395.
14. N.J. Zuidam, E. Shimoni: Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 5–11.
15. B. Albertini, N. Passerini, M. Di Sabatino, D. Monti, S. Burgalassi, P. Chetoni, L. Rodriguez, Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization, *Int. J. Pharm. 399* (2010) 71–79.
16. A. Samad, M. Tariq, M.I. Alam, M.S. Akhter: Microsphere: A Novel Drug Delivery System. In: *Colloids in Drug Delivery*, M. Fanun (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2010) pp. 455–478.
17. B.F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli, C.N. Mulligan, Encapsulation in the food industry: A review, *Int. J. Food Sci. Nutr. 50* (1999) 213–224.
18. Y. Akiyama, M. Yoshioka, H. Horibe, S. Hirai, N. Kitamori, H. Toguchi, Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids, *J. Controll. Release, 26* (1993) 1–10.
19. T. Yajima, N. Umeki, S. Itai, Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of clarithromycin in wax matrix, *Chem. Pharm. Bull. 47* (1999) 220–225.
20. G.V. Barbosa-Cánovas, E. Ortega-Rivas, P. Juliano, H. Yan: Food Powders. In: *Current Topics on Bioprocess in Food Industry*, C. Larroche, A. Pandey, C.G. Dussap (Eds.), Springer-Verlag, New York, NY, USA (2008) pp. 232–241.
21. X.D. Liu, T. Atarashi, T. Furuta, H. Yoshii, S. Aishima, M. Ohkawara, P. Linko, Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying, *Drying Technol. 19* (2001) 1361–1374.
22. N.J. Zuidam, E. Heinrich: Encapsulation of Aroma. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 129–132.
23. I. Ghebre-Sellassie, A. Knoch: Pelletization Techniques. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 11*, J. Swarbrick, J.C. Boylan (Eds.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (2006) pp. 369–394.
24. A.K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends Food Sci. Technol. 18* (2007) 240–251.
25. C. Wandrey, A. Bartkowiak, S.E. Harding: Materials for Encapsulation. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 83–87.
26. J.M. Lakkis: Encapsulation and Controlled Release in Bakery Applications. In: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, J.M. Lakkis (Ed.), Blackwell Publishing, Ames, IA, USA (2007) pp. 116–177.
27. S.R.L. Werner, J.R. Jones, A.H.J. Paterson, R.H. Archer, D.L. Pearce, Air-suspension coating in the food industry: Part II – Micro-level process approach, *Powder Technol. 171* (2007) 34–45.
28. O.D Gamboa, L.G. Gonçalves, C.F. Grosso, Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method, *Procedia Food Sci. 1* (2011) 1732–1739.
29. N. Passerini, B. Perissutti, B. Albertini, D. Voinovich, M. Moneghini, L. Rodriguez, Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing, *J. Controll. Release, 88* (2003) 263–275.
30. S.K. Das, B.K. Gupta, Optimization of controlled drug release through micropelletization, *Drug Dev. Ind. Pharm. 14* (1988) 1673–1697.
31. Gea Process Engineering Inc., Maryland, Columbia, MD, USA (*http://www.niroinc.com/technologies/atomizers.asp*).
32. T. Eldem, P. Speiser, H. Altorfer, Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy, *Pharm. Res. 8* (1991) 178–184.
33. A. Fini, L. Rodriguez, C. Cavallari, B. Albertini, N. Passerini, Ultrasound-compacted and spray-congealed indomethacin/polyethylene glycol systems, *Int. J. Pharm. 247* (2002) 11–22.
34. L. Rodriguez, N. Passerini, C. Cavallari, M. Cini, P. Sancin, A. Fini, Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomiser for spray-congealing processes, *Int. J. Pharm. 183* (1999) 133–143.
35. A.J. Leonel, H.N.M. Chambi, D. Barrera-Arellano, H.O. Pastore, C.R.F. Grosso, Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound, *Ciênc. Tecnol. Aliment. 30* (2010) 276–281.
36. A.S. Achanta, P.S. Adusumilli, K.W. James, C.T. Rhodes, Development of hot melt coating methods, *Drug Dev. Ind. Pharm. 23* (1997) 441–449.
37. N. Passerini, B. Perissutti, M. Moneghini, D. Voinovich, B. Albertini, C. Cavallari, L. Rodriguez, Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spry-congealing process using ultrasounds, *J. Pharm. Sci. 91* (2002) 699–707.
38. T. Yajima, A. Nogata, M. Demachi, N. Umeki, S. Itai, N. Yunoki, M. Nemoto, Particle design for taste-masking using a spray-congealing technique, *Chem. Pharm. Bull. 44* (1996) 187–191.
39. U.N. Wanasundara, F. Shahidi, Storage stability of microencapsulated seal blubber oil, *J. Food Lipids*, *2* (1995) 73–86.
40. W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev. 47* (2001) 165–196.
41. B.D. Kim, K. Na, H.K. Choi, Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan, *Eur. J. Pharm. Sci. 24* (2005) 199–205.
42. S.A. Wissing, O. Kayser, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev. 56* (2004) 1257–1272.
43. M.A. Schubert, M. Harms, C.C. Müller-Goymann, Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin, *Eur. J. Pharm. Sci. 27* (2006) 226–236.
44. C. Whorton: Factors Influencing Volatile Release from Encapsulation Matrices. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, S.J. Risch, G.A. Reineccius (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, USA (1995) pp. 134–142.
45. F. Depypere, K. Dewettinck, F. Ronsse, J. Pieters, Food powder microencapsulation: Principles, problems and opportunities, *Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol. 1* (2003) 75–94.

46. C.S. Brazel, Microencapsulation: Offering solutions for the food industry, *Cereal Foods World, 44* (1999) 388–390.

47. C.S. Fávaro-Trindade, C.R.F. Grosso, Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile, *J. Microencapsul. 19* (2002) 485–494.

48. A.C. Oliveira, T.S. Moretti, C. Boschini, J.C.C. Baliero, O. Freitas, C.S. Favaro-Trindade, Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying, *J. Microencapsul. 24* (2007) 673–681.

49. A.C. Oliveira, T.S. Moretti, C. Boschini, J.C.C. Baliero, O. Freitas, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying, *Drying Technol. 25* (2007) 1687–1693.

50. A. Zaky, A. Elbakry, A. Ehmer, M. Breunig, A. Goepferich, The mechanism of protein release from triglyceride microspheres, *J. Controll. Release, 147* (2010) 202–210.

51. B. Albertini, N. Passerini, M.L. González-Rodríguez, B. Perissutti, L. Rodriguez, Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles, *J. Controll. Release, 100* (2004) 233–246.

52. N. Passerini, S. Qi, B. Albertini, M. Grassi, L. Rodriguez, D.Q. Craig, Solid lipid microparticles produced by spray congealing: Influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release, *J. Pharm. Sci. 99* (2010) 916–931.

53. M. Emås, H. Nyqvist, Methods of studying aging and stabilization of spray-congealed solid dispersions with carnauba wax. 1. Microcalorimetric investigation, *Int. J. Pharm. 197* (2000) 117–127.

54. R. Turton, X.X. Cheng: Cooling Processes and Congealing. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare, New York, NY, USA (2007) pp. 761–773.

55. P. De Vos, M.M. Faas, M. Spasojevic, J. Sikkema, Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *Int. Dairy J. 20* (2010) 292–302.

56. C.P. Champagne, P. Fustier, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Curr. Opin. Biotechnol. 18* (2007) 184–190.

57. S.S. Kuang, J.C. Oliveira, A.M. Crean, Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50* (2010) 951–968.

58. Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, *FAO Food and Nutrition, 85*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy (2006) (*ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf*).

59. I. Jankovic, W. Sybesma, P. Phothirath, E. Ananta, A. Mercenier, Application of probiotics in food products – Challenges and new approaches, *Curr. Opin. Biotechnol. 21* (2010) 175–181.

60. C.R.F. Grosso, C.S. Fávaro–Trindade, Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt, *Braz. J. Microbiol. 35* (2004) 151–156.

61. R. Vidhyalakshmi, R. Bhakyaraj, R.S. Subhasree, Encapsulation 'The future of probiotics' - A review, *Adv. Biol. Res. 3* (2009) 96–103.

62. C.S. Favaro-Trindade, R.J.B. Heinemann, D.L. Pedroso, Developments in probiotic encapsulation, *CAB Rev. 6* (2011) 1–8.

63. M.B. Zimmermann, R. Wegmüller, C. Zeder, N. Chaouki, T. Torresani, The effects of vitamin A deficiency and vitamin A supplementation on thyroid function in goitrous children, *J. Clin. Endocrinol. Metab. 89* (2004) 5441–5447.

64. M.S. Uddin, M.N.A. Hawlader, H.J. Zhu, Microencapsulation of ascorbic acid: Effect of process variables on product characteristics, *J. Microencapsul. 18* (2001) 199–209.

65. F.D. Zoet, J. Grandia, M. Sibeijn, Encapsulated fat soluble vitamin. *NL patent 050668* (2011).

66. C.S. Favaro-Trindade, A.S. Santana, E.S. Monterrey-Quintero, M.A. Trindade, F.M. Netto, The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate, *Food Hydrocolloids*, *24* (2010) 336–340.

67. U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm. 59* (2005) 375–388.

68. H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J. Controll. Release*, *58* (1999) 143–151.

69. A. Dashevsky, Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads, *Int. J. Pharm. 161* (1998) 1–5.

70. H. Reithmeier, J. Herrmann, A. Göpferich, Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin, *Int. J. Pharm. 218* (2001) 133–143.

71. H.H. Kwak, W.S. Shim, M.K. Choi, M.K Son, Y.J. Kim, H.C. Yang *et al.*, Development of a sustained-release recombinant human growth hormone formulation, *J. Controll. Release*, *137* (2009) 160–165.

72. D.V. Mendanha, S.E.M. Ortiz, C.S. Favaro-Trindade, A. Mauri, E.S. Monterrey-Quintero, M. Thomazini, Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin, *Food Res. Int. 42* (2009) 1099–1104.

73. M. Di Sabatino, B. Albertini, V.L. Kett, N. Passerini, Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation, *Eur. J. Pharm. Sci. 46* (2012) 346–356.