



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

MICRO E NANOCÁPSULAS DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS
INSATURADOS DE CARPA COMUM UTILIZANDO QUITOSANA, GELATINA
E SUAS BLENDS COMO MATERIAL DE PAREDE

VANESSA MENDONÇA ESQUERDO

Tese apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de
doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO

Orientador

GUILHERME LUIZ DOTTO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

MICRO E NANOCÁPSULAS DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS
INSATURADOS DE CARPA COMUM UTILIZANDO QUITOSANA, GELATINA E
SUAS BLENDS COMO MATERIAL DE PAREDE

VANESSA MENDONÇA ESQUERDO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do
título de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO

Orientador

GUILHERME LUIZ DOTTO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

E779m Esquerdo, Vanessa Mendonça.

Micro e nanocápsulas de concentrados de ácidos graxos insaturados de carpa comum utilizando quitosana, gelatina e suas blendas como material de parede / Vanessa Mendonça Esquerdo. – 2018.

148 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.

Orientador: Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto.

Coorientador: Dr. Guilherme Luiz Dotto.

1. Ácidos graxos insaturados 2. Emulsão 3. Gelatina 4. Microestrutura
5. Nanocápsulas 6. Quitosana I. Pinto, Luiz Antonio de Almeida II. Dotto,
Guilherme Luiz III. Título.

CDU 664.34

APROVAÇÃO

Tese defendida por Vanessa Mendonça Esquerdo aprovada em 27 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



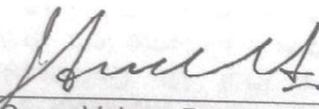
Prof. Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto - FURG



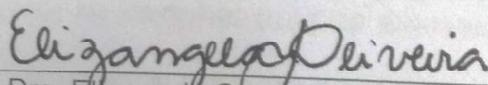
Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert - FURG



Profa. Dra. Cristiana Lima Dora - FURG



Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi - UFPel



Profa. Dra. Elizângela Gonçalves de Oliveira - UNIPAMPA

Dedico este trabalho a meus pais Valdir e Luciana e minha vó Luiza, que me impulsionaram a seguir em frente sempre.

AGRADECIMENTOS

Deus

Fonte da esperança, da força e da energia. Pelo dom da vida, pela saúde, coragem e proteção.
Por todas as bênçãos alcançadas e por Vossa presença em minha vida.

Aos meus pais, Valdir e Luciana.

Pela mão estendida, o colo carinhoso e o abraço amigo! Todas as minhas vitórias são fruto do amor, incentivo e confiança de vocês. Muito obrigada por toda dedicação, amo vocês.

A minha vó, Luiza.

Mãe duas vezes. Quem me incentiva a voar e manter sempre os pés no chão! Muito obrigada por estar sempre ao meu lado. Amor incondicional.

Ao meu namorado Igor

Por ser meu equilíbrio quando a ansiedade sobressai e a calma das minhas tempestades.
Aprendi que às vezes só precisamos de uma mão para segurar e um coração para nos entender. Obrigada pela confiança. Te amo.

Ao meu Professor Orientador Luiz Antonio de Almeida Pinto

Muito obrigada por me apresentar à pesquisa e ao amor a docência. Por sempre incentivar cada passo na minha jornada acadêmica e acreditar na minha evolução, desde o “pé quebrado”. Agradeço pela confiança, orientação, amizade e paciência.

Ao co-orientador Guilherme Luiz Dotto

Pela parceria e apoio na elaboração deste trabalho, meu muito obrigado.

As minhas meninas de iniciação científica

Deliéle, Thais, Natalia e Andressa por terem confiado em mim como co-orientadora. Meu muito obrigado por participarem da elaboração deste trabalho e da minha evolução pessoal.

Ao ex-IC, colega e amigo Patrick Peres

Por sempre estar disposto a colaborar e por toda ajuda na realização dos experimentos.
Aprendi muito contigo. Muito obrigada por tudo.

A colega e amiga Michele Monte

Minha parceira de vida fitness, isotermas e risadas. Muito obrigada por participar da minha caminhada, incentivar minhas loucuras e acreditar. És uma pessoa maravilhosa, e sou grata por te conhecer!

Aos colegas de laboratório

Juntos rimos, choramos, e de mãos dadas conseguimos seguir sempre em frente. Tenho muito orgulho da nossa história, do nosso trabalho, da nossa amizade. Tantas pessoas especiais que passaram e deixaram sua marca na minha vida! Vocês são de mais.

Ao técnico Jaques Rizzi (*in memoriam*)

A vida é um lindo caminho de cruzadas e ensinamentos. Agradeço por ter cruzado teu caminho e aprendido contigo. Continuarás sempre presente na nossa lembrança e eternizado pela saudade.

Ao LTA, LCA, LEB, LASCQ e MIBI e aos seus respectivos técnicos

Pela colaboração na realização de experimentos fundamentais para este estudo.

Ao CEME-SUL/FURG

Pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos membros da banca

Pela disponibilidade, o meu sentimento de gratidão e respeito.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação

Pelos conhecimentos passados.

A FURG

Pela estrutura física e por propiciar ensino e pesquisa de qualidade.

A CAPES E CNPQ

Pelo auxílio financeiro.

Às vezes eu tropeço, caio
E me quebro em pedaços
Isso me fortalece.
Oxe, se um de mim já é forte,
Imagine vários.

Bráulio Bessa

RESUMO

O óleo de pescado é uma fonte rica em ácidos graxos insaturados, porém sua utilização no preparo de produtos alimentícios é tarefa difícil devido a sua baixa solubilidade em água e instabilidade oxidativa. A formação de nanocápsulas por emulsificação e microestruturas com polímeros como quitosana e gelatina é uma alternativa pra melhorar estes aspectos. Neste trabalho foram elaboradas nanocápsulas e microestruturas de concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI) obtidos a partir de óleo de carpa comum (*Cyprinus carpio*) utilizando gelatina e quitosana, na forma pura e suas blends, como agentes encapsulantes. Foram avaliados os efeitos da proporção de quitosana:gelatina (100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100 (%)), concentração de polímero (1 e 2 % (m/v)) e tempo de homogeneização (10 e 20 min) nas características das nanoemulsões. A separação de fases ocorreu quando a proporção de quitosana:gelatina era igual ou superior a 50:50%. As nanoemulsões com proporção de quitosana acima de 70% permaneceram visivelmente estáveis, sem separação de fases, durante mais de 30 dias. O maior tempo de homogeneização (20 min) e a menor concentração de biopolímeros (1% m/v) resultaram em menores tamanhos de partículas e índice de polidispersão. O incremento na quantidade de gelatina levou a diminuição do tamanho das nanocápsulas. O potencial Zeta aumentou com a quantidade de quitosana (de 26,5 a 31,5 mV), enquanto o pH e o índice de refração não foram afetados pela proporção de biopolímeros. Após 7 dias de armazenamento, a nanoemulsão com 90:10 de proporção de quitosana:gelatina permaneceu no intervalo aceitável da legislação para os valores de índice de peróxido, p-anisidina e oxidação total (TOTOX). Após encontrar as melhores condições, as emulsões foram secas em liofilizador a fim de produzir microestruturas estáveis contendo as nanocápsulas. As microestruturas obtidas por liofilização foram irregulares e porosas com volume de poros variando de 0,015 a 0,029 m³ kg⁻¹ e porosidade entre 93 e 97 %, tonalidade amarelada, baixa intensidade de coloração, com predominância da cor do material de parede, confirmando um encapsulamento efetivo. As eficiências de encapsulamento variaram de 70 a 78%. Os valores de peróxido demonstraram que a microestrutura elaborada com quitosana pura foi a que apresentou melhor proteção dos concentrados de AGI em relação à oxidação primária. A adição da gelatina levou a oxidação mais rápida dos concentrados de AGI, essa diferença provocada pelo aumento da quantidade de gelatina demonstrou que houve uma inefetividade da gelatina como revestimento polimérico no óleo, deixando as paredes mais finas. As isotermas de adsorção de vapor de água foram estudadas nas temperaturas de 4°C e 25°C. O modelo de GAB foi o que apresentou o ajuste mais adequado e as formas isotérmicas foram do tipo II (sigmoide). O aumento da temperatura provocou diminuição do conteúdo de umidade. A adsorção de água foi um processo espontâneo, favorável e controlado pela entalpia. As microestruturas elaboradas com quitosana pura apresentaram características satisfatórias e alto rendimento de processo mostrando que a quitosana tem potencial para ser utilizada como um agente encapsulante de nanocápsulas lipídicas secas por liofilização.

Palavras-chave: Ácidos graxos insaturados. Emulsão. Gelatina. Microestrutura. Nanocápsulas. Quitosana.

ABSTRACT

MICRO AND NANOCAPSULES OF UNSATURATED FATTY ACIDS CONCENTRATES FROM COMMON CARP USING CHITOSAN, GELATIN AND ITS BLENDS AS A WALL MATERIAL

Fish oil is rich in unsaturated fatty acids, but their use in the preparation of food products is difficult because of its low solubility in water and oxidative instability. The formation of nanocapsules by emulsions and microstructures with polymers, such as chitosan and gelatin, is an alternative to improve these aspects. In this work, nanoemulsions and microstructures of unsaturated fatty acid (UFA) concentrates obtained from common carp oil (*Cyprinus carpio*) were prepared using gelatin and chitosan in pure form and their blends as encapsulating agents. The effects of chitosan:gelatin ratio (100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90, 0:100), polymer concentration (1 and 2% (w/v)) and homogenization time (10 and 20 min) on the nanoemulsions characteristics were evaluated. Phase separation occurred when the chitosan:gelatin ratio was higher than 50:50. Nanoemulsions using chitosan proportion over than 70% remained visually stable, with no phase separation, for more of 30 days. The highest homogenization time (20 min) and the lowest biopolymers concentration (1% w/v) resulted in smallest particles sizes and polydispersity indexes. The increase in the amount of gelatin led to a decrease in the nanocapsules size. Zeta potential increased with the amount of chitosan (from 26.5 to 31.5 mV), while pH and refractive index were not affected by the biopolymers ratio. After 7 days of storage, the nanoemulsion with 90:10 of chitosan: gelatin ratio was in the acceptable range of the legislation for peroxide index, p-anisidine and total oxidation (TOTOX) values. After finding the best conditions, the emulsions were dried by lyophilization to produce stable microstructures containing the nanocapsules. The microstructures obtained by lyophilization were irregular and porous with pore volume ranging from 0.015 to 0.029 m³ kg⁻¹ and porosity between 93 and 97 %, yellowish coloration, low color intensity, and the predominance of the wall material color, confirming an effective encapsulation. The encapsulation efficiency ranged from 70 to 78 %. The peroxide indexes showed that the microstructure elaborated with pure chitosan was the one that presented better protection of the UFA concentrates in relation to the primary oxidation. Gelatin addition led to the faster oxidation of UFA concentrates. These difference, caused by the increased amount of gelatin, demonstrated that gelatin was ineffective as a polymer coating on the oil, providing a thinner wall. The adsorption isotherms of water vapor were studied at temperatures of 4°C and 25°C. The GAB model presented the most suitable fit and, the isothermal forms were type II (sigmoid). The temperature increase caused a decrease in the moisture content. The water adsorption was a spontaneous and favorable process, controlled by enthalpy. The microstructures elaborated with pure chitosan presented satisfactory characteristics and high process yield showing that, the chitosan has potential to be used as an encapsulating agent of dry lipid nanocapsules by lyophilization.

Keywords: Unsaturated fatty acids. Emulsion. Gelatin. Microstructure. Nanocapsules. Chitosan.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes proporções de biopolímeros utilizados para a elaboração da fase aquosa das nanoemulsões	71
Tabela 2 – Valores de atividade (a_w) de água para as diferentes concentrações de H_2SO_4 ...	79
Tabela 3 – Parâmetros de qualidade e perfil graxo do óleo branqueado e dos concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI)	83
Tabela 4 – Distribuição de tamanho e índice de polidispersão (IPD) das nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de material de parede (MP), concentrações de biopolímeros (CB) e tempos de homogeneização (TH)	89
Tabela 5 – Resultados obtidos para o potencial Zeta, pH, turbidez e índice de refração de nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de quitosana:gelatina na fase líquida (1% m/v) e tempo de homogeneização de 20 min	92
Tabela 6 – Parâmetros de cor das matérias-primas, do padrão (quitosana liofilizada) e das microestruturas, e eficiência de encapsulamento (EE) e rendimento do processo de secagem (R) das microestruturas contendo as nanocápsulas liofilizadas.....	101
Tabela 7 – Valores de densidade aparente (ρ_p), porosidade (ϵ_p) e volume de poros (V_p) das microestruturas obtidas contendo as nanocápsulas	108
Tabela 8 – Estimativa dos parâmetros, erro médio relativo (EMR) e R^2 dos modelos para as isotermas de adsorção das microestruturas contendo as cápsulas de AGI	111
Tabela 9 – Valores aproximados para as condições de estabilidade adequadas para as diferentes variações de microestruturas contendo as cápsulas de concentrados de AGI	120
Tabela 10 – Parâmetros obtidos pela análise compensatória de ΔH versus ΔS	122
Tabela 11 – Raio médio de poros (R_p) para diferentes atividades de água nas temperaturas analisadas das microestruturas contendo as nanocápsulas	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos principais ácidos graxos encontrados em óleo de pescado	31
Figura 2 – Estrutura química principal das unidades de cadeia quitosana, desacetilada (direita) e acetilada (esquerda).....	43
Figura 3 – Estrutura química da gelatina	46
Figura 4 – Curva típica de isoterma de sorção	60
Figura 5 – Fluxograma de extração, refino e concentração do óleo de pescado.....	65
Figura 6 – Imagens fotográficas da (a) Carpa comum; (b) vísceras; (c) separação do óleo bruto; (d) óleo degomado; (e) óleo neutralizado; (f) etapa de branqueamento (g) óleo branqueado	66
Figura 7 – Imagens fotográficas da: (a) etapa de hidrólise; (b) etapa de complexação; (c) separação dos cristais formados; (d) concentrados de ácidos graxos insaturados.....	67
Figura 8 – Fluxograma de extração da quitina e produção da quitosana	69
Figura 9 – Diagrama do processo de produção das emulsões	72
Figura 10 – Diagrama tridimensional de cores	76
Figura 11 – (a) Imagem fotográfica e (b) micrografia da quitosana em pó	85
Figura 12 – (a) Imagem fotográfica e (b) micrografia do pó de gelatina.....	86
Figura 13 – Nanoemulsão formada usando diferentes proporções de quitosana e gelatina em fase aquosa (quitosana:gelatina) (a) 100:0, (b) 90:10, (c) 70:30, (d) 50:50, (e) 30:70, (f) 10:90 e (g) 0:100	88
Figura 14 – Valores médios (n = 3) da distribuição do tamanho de partícula (% volume) de nanocápsulas com diferentes proporções de quitosana:gelatina: (a) 100:0, (b) 90:10 e (c) 70:30, com concentração de biopolímero de 1% ou 2% , e dois tempos de homogeneização (10 e 20 min)	90
Figura 15 – Imagens microscópicas: (a) óleo sem presença de biopolímeros; Nanocápsulas formadas utilizando quitosana e gelatina na fase aquosa (1% m/v) e 20 min de tempo de homogeneização, nas proporções de (b) 100:0, (c) 90:10 e (d) 70:30	93
Figura 16 – Efeito das proporções de biopolímeros (quitosana:gelatina (●) 100:0, (■) 90:10 e (▲) 70:30) na fase aquosa (1% m/v) de nanoemulsões ao longo do tempo sobre: (a) índices de peróxido, (b) valores de p-anisidina, e (c) oxidação total (TOTOX).....	95
Figura 17 – Imagens fotográficas da microestrutura formada utilizando quitosana e gelatina nas proporções de (a) 100:0, (b) 90:10 e (c) 70:30	97
Figura 18 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 100% de quitosana (a) ×250, (b) ×1.000 (c) ×2.5000 e (c) ×15.000.	98
Figura 19 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 90% de quitosana e 10% de gelatina (a) ×250, (b) ×1.000 (c) ×2.5000 e (c) ×15.000	99
Figura 20 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 70% de quitosana e 30% de gelatina (a) ×250, (b) ×1.000 (c) ×2.5000 e (c) ×15.000	99
Figura 21 – Espectro FT-IR: (a) concentrados de AGI, (b) quitosana pura, (c) gelatina pura e microestruturas utilizando proporções de (d) 100:0 (e) 90:10 e (f) 70:30 (quitosana:gelatina) contendo as cápsulas de concentrados de AGI	103
Figura 22 – Termogramas da (a) quitosana, (b) gelatina (c) concentrados de AGI, e microcápsulas de concentrados de AGI, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede (d) 100:0 (e) 90:10 e (f) 70:30).....	105
Figura 23 – Difratogramas de raios-X da (a) quitosana e gelatina em pó e, (b) das microestruturas contendo as nanocápsulas de concentrados de AGI, utilizando diferentes	

proporções de material de parede	107
Figura 24 – Índice de peróxido dos concentrados de AGI não encapsulados e das microestruturas formadas	109
Figura 25 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de 4°C e 25°C para as microestruturas utilizando proporção 100:0 de quitosana:gelatina.....	112
Figura 26 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de 4°C e 25°C para as microestruturas utilizando proporção 90:10 de quitosana:gelatina.....	113
Figura 27 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de 4 °C e 25 °C para as microestruturas utilizando proporção 70:30 de quitosana:gelatina.....	113
Figura 28 – Curvas isostéricas para a adsorção das microestruturas utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede (a) 100:0 (b) 90:10 e (c) 70:30 nas temperaturas analisadas	116
Figura 29 – Entalpia diferencial de adsorção (ΔH) das microestruturas, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede, em função da umidade de equilíbrio	117
Figura 30 – Entropia diferencial de adsorção (ΔS) das microestruturas, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede, em função da umidade de equilíbrio	119
Figura 31 – Análise compensatória da entalpia e entropia diferencial de adsorção das microestruturas diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede	121
Figura 1A – Classificação das isotermas.....	144
Figura 2A – Isoterma de sorção sigmoide	146

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo	Definição	Unidade
a_1	Absorbância da solução 1	nm
A_1	Parâmetro de ajuste do modelo de OSWIN	Adimensional
a_2	Absorbância da solução 2	nm
a^*	Cromaticidade que varia do verde até o vermelho	Adimensional
a_0^*	Cromaticidade da cor padrão	Adimensional
$A_{C=O}$	Absorbância do grupamento C=O	nm
A_{-OH}	Absorbância referente a ligação -OH	nm
AGI	Ácidos graxos insaturados	-
AGI _T	Ácidos graxos insaturados total	g
AGI _S	Ácidos graxos insaturados superficial	g
a_w	Atividade de água	Adimensional
b^*	Cromaticidade que varia do azul até o amarelo	Adimensional
b_0^*	Cromaticidade da cor padrão	Adimensional
B_1	Parâmetro de ajuste do modelo de OSWIN	Adimensional
c	Concentração de polímero	$g\ mL^{-1}$
C^*	Croma	Adimensional
C_B	Constante do modelo de BET	Adimensional
C_G	Constante do modelo de GAB	Adimensional
EMR	Erro médio relativo	%
H_{ab}	Ângulo Hue	°
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance	-
IPD	Índice de polidispersão	-
k	Constante do modelo de GAB	Adimensional
k_D	Constante de equilíbrio termodinâmico	Adimensional
k_H	Coefficiente de Huggins	Adimensional
L^*	Luminosidade	Adimensional
L_0^*	Luminosidade da cor padrão	Adimensional
M	Massa da amostra	g
MM	Massa molar	Da
N	número de pontos experimentais	Adimensional
N_{TS}	Concentração da solução de tiosulfato	$mol\ L^{-1}$
pAV	Valor de P-anisidina	Adimensional
pV	Índice de peróxido	$mEq\ kg^{-1}$
R	Constante universal dos gases	$8,314\ kJ\ mol^{-1}\ K^{-1}$
R^2	Coefficiente de determinação	Adimensional
r_c	Raio crítico	nm
r_p	Raio do poro	nm
T	Temperatura	K
T_β	Temperatura isocinética	K
T_{hm}	Temperatura média harmônica	K
V_a	Volume de tiosulfato gasto na amostra	mL
V_b	Volume de tiosulfato gasto no branco	mL
V_M	Volume molar do sorbato	$m^3\ mol^{-1}$
X_e	Umidade de equilíbrio do material	$kg_{\text{água}}\ kg_{ss}^{-1}$
X_{ei}	Umidade experimental	$kg\ kg_{ss}^{-1}$
X_m	Umidade da monocamada	$kg_{\text{água}}\ kg_{ss}^{-1}$

X_{pi}	Umidade estimada pelo modelo	$kg\ kg^{-1}_{ss}$
Δa^*	$a^* - a_0^*$	Adimensional
Δb^*	$b^* - b_0^*$	Adimensional
ΔE_{ab}^*	Diferença de cor	Adimensional
ΔG	Energia livre de Gibbs	$kJ\ mol^{-1}$
ΔH	Entalpia de adsorção	$kJ\ mol^{-1}$
ΔL^*	$L^* - L_0^*$	Adimensional
ΔS	Entropia de adsorção	$kJ\ mol^{-1}\ K^{-1}$
η	viscosidade intrínseca	$mL\ g^{-1}$
η_{sp}	Relação entre a viscosidade do polímero em solução e o solvente	Adimensional
η_{sp}/c	Viscosidade reduzida	$mL\ g^{-1}$
σ	Tensão superficial	$N\ m^{-1}$
τ	Espessura da camada de água adsorvida	nm
%EE	Eficiência de encapsulamento	%
%R	Rendimento da reação	%
%UR	Umidade relativa	%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 NANOTECNOLOGIA E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	27
3.2 ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (AGI).....	28
3.2.1 Fontes de ácidos graxos insaturados	28
3.2.2 Identificação de AGI por cromatografia	31
3.2.3 Efeito da ingestão de AGI	32
3.2.4 Oxidação lipídica	33
3.3 NANOEMULSÕES.....	35
3.3.1 Propriedades das nanoemulsões	35
3.3.2 Métodos de preparo de nanoemulsões	37
3.3.3 Nanoemulsões e nanocápsulas	39
3.4 MATERIAIS DE PAREDE.....	41
3.4.1 Quitosana	42
3.4.1.1 Origem e produção da quitosana	44
3.4.2 Gelatina	45
3.4.2.1 Origem e produção da gelatina	46
3.5 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO OLEOSO.....	48
3.5.1 Estabilidade das suspensões	48
3.5.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD) e Índice de Poldispersão (IPD)	50
3.5.3 Potencial Zeta	52
3.5.4 Difração de raios X (DRX) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)	53
3.5.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	55
3.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
3.6. MÉTODOS DE SECAGEM	56
3.6.1 Liofilização	57
3.7 ADSORÇÃO DE ÁGUA	58
3.8 NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS	65
4.2 MATERIAIS DE PAREDE.....	68
4.2.1 Obtenção e caracterização da quitosana	68
4.2.2 Caracterização da gelatina	70
4.3 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS	71
4.3.1 Caracterização das nanoemulsões	72
4.3.1.1 Estabilidade visual, distribuição de tamanho e índice de poldispersão	72
4.3.1.2 Potencial Zeta e pH	73
4.3.1.3 Turbidez, índice de refração e análise ótica	73
4.3.1.4 Experimentos de oxidação	73
4.4 SECAGEM DAS NANOCápsulas	75

4.4.1 Caracterização das microestruturas contendo as nanocápsulas	75
4.4.2 Isotermas de sorção.....	78
4.4.2.1 Propriedades Termodinâmicas	79
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 PROPRIEDADES DOS CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS	83
5.2 PROPRIEDADES DOS BIOPOLÍMEROS	84
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOcápsulas	87
5.3.1 Efeito dos biopolímeros e sua interação na estabilidade, tamanho de partícula e índice de polidispersão	87
5.3.2 Potencial Zeta, pH, Turbidez, índice de refração e morfologia das nanoemulsões	91
5.3.3 Estabilidade oxidativa das nanocápsulas	94
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESTRUTURAS	97
5.5 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO	110
5.6 PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS	115
6 CONCLUSÃO	125
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
APÊNDICES.....	143
APÊNDICE 1: Tipos de Isotermas de Sorção	144
APÊNDICE 2: Isoterma de sorção sigmoide.....	146
APÊNDICE 3: Produção técnico-científica do período de permanência no curso.....	147

1 INTRODUÇÃO

Algumas indústrias de alimentos estão incorporando compostos bioativos nas suas formulações. A nanotecnologia vem sendo utilizada para minimizar obstáculos durante o desenvolvimento de novos produtos. Dentre os nano materiais estudados atualmente podem ser citados as nanoemulsões e nanocápsulas (ABBAS et al., 2015; LEE; McCLEMENTS, 2010). Alimentos, pesticidas e fármacos têm utilizado nanomateriais para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos bioativos, como por exemplo, concentrados de ácidos graxos insaturados (ESQUERDO; DOTTO; PINTO, 2015; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016). O encapsulamento destes compostos ativos pode proporcionar proteção contra a degradação durante a produção e vida útil, impedindo assim a perda do valor nutricional, e proporcionando o aumento da solubilidade (KOMAIKO et al., 2016).

Os ácidos graxos insaturados (AGI) se destacam por serem importantes para a suplementação alimentar e farmacêutica (KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016). O óleo de peixe apresenta uma composição única, diferente de óleos derivados de vegetais e de outros animais, devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (CREXI et al, 2010). O consumo destes ácidos graxos de cadeia longa está intimamente relacionado a inúmeros efeitos benéficos na saúde humana (GARCÍA-MORENO et al., 2016). A indústria de alimentos está ajudando os consumidores a aumentar o seu consumo de ácidos graxos insaturados através da produção de vários tipos de alimentos funcionais. No entanto, a produção de alimentos enriquecidos é tarefa difícil, devido à sua baixa solubilidade em água, instabilidade química e baixa biodisponibilidade (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2015; KOMAIKO et al., 2016). Cápsulas podem proteger contra a oxidação de óleo de peixe, proporcionando uma barreira física entre o óleo e o oxigênio e/ou pro-oxidantes (GARCÍA-MORENO et al., 2016). Dependendo das propriedades do material de parede utilizado, é possível a elaboração de nanocápsulas com características diferenciadas (KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016).

Uma grande variedade de materiais pode ser utilizada para revestir ou encapsular lipídios em sistema de nanoemulsões. O material de revestimento das cápsulas deve possuir qualidade alimentar, ser biodegradável e estável em sistemas alimentícios durante o processamento, armazenamento e consumo. No entanto, apenas um número limitado de materiais possui certificados para aplicações em alimentos (GRAS) (FATHI et al., 2014; WANDREY et al., 2010). Um material de parede potencial para a aplicação em nano escala é

a quitosana. Este polímero catiônico, derivado de recursos naturais renováveis, tem sido estudado em nanotecnologia devido a sua mucoadesividade, biodegradabilidade, propriedades formadoras de filme e capacidade de funcionalização dada pela presença de grupos amino e hidroxila (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004). Outro material que tem possibilidade de aplicação como agente de encapsulamento é a gelatina, uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno animal. A gelatina possui grande número de diferentes grupos funcionais acessíveis na sua estrutura e seu uso se destaca devido ao seu alto teor de aminoácidos como a glicina, prolina e alanina (SAHOO et al., 2015; WANDREY et al., 2010).

Existem alguns métodos para aumentar a estabilidade das nanocápsulas. O encapsulamento por liofilização, para a obtenção da estrutura seca é utilizado para preservar e proteger a viabilidade do material ativo. Geralmente, o encapsulamento é aplicado para aumentar a estabilidade físico-química das partículas obtendo um produto final aceitável, especialmente nos casos em que as condições de armazenamento são desfavoráveis (TOMÁS et al., 2015). Porém a secagem causa mudanças na matriz sólida que aprisiona o óleo. Quando o teor de umidade ou a temperatura aumenta essas mudanças físicas podem ocasionar a liberação parcial de lipídios encapsulados, deixando-os mais expostos para uma rápida oxidação. O conhecimento do comportamento das isotermas de sorção de vapor de água em função da temperatura fornece um critério confiável para prever a estabilidade do armazenamento e a vida útil de produtos alimentícios (ESCALONA-GARCÍA et al., 2016).

Este estudo tem um efeito sinérgico para a cadeia produtiva de alimentos, uma vez que, propicia o gerenciamento, transformação e aproveitamento de resíduos de indústrias de alimentos e, gera produtos alimentícios de alto valor agregado. Neste contexto, a utilização dos polímeros quitosana e gelatina, como materiais de revestimento para a preparação nanocápsulas contendo concentrados de AGI obtidos a partir de óleo de carpa comum (*Cyprinus carpio*) é uma nova alternativa para a indústria de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção micro e nanocápsulas de concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI), obtidos a partir do óleo de vísceras de carpa, utilizando os biopolímeros quitosana e gelatina na forma pura e em blendas como material de parede. Após, realizar a secagem do material por liofilização a fim de produzir microestruturas estáveis contendo as nanocápsulas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter concentrados de ácidos graxos insaturados através da reação de hidrólise e complexação com ureia, utilizando óleo branqueado extraído de vísceras de carpa comum;
- Produzir quitosana a partir de resíduos de camarão;
- Caracterizar os materiais de parede (quitosana e gelatina comercial) quanto as suas propriedades físico-químicas, estruturais, térmicas e morfológicas;
- Preparar micro e nanocápsulas contendo AGI pela técnica de emulsificação, utilizando quitosana e gelatina puras, e suas blendas, como materiais de parede;
- Caracterizar os nanocarreadores obtidos quanto as suas estabilidades físicas e oxidativas;
- Realizar a secagem das nanocápsulas por liofilização;
- Avaliar a eficiência de encapsulamento, a estabilidade oxidativa e as isotermas de sorção de vapor de água das microestruturas contendo as nanocápsulas secas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOTECNOLOGIA E A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A nanotecnologia começou a ser discutida em 1959 pelo físico Richard Feynman, com a palestra *There's Plenty of Room at the Bottom*, onde ele discutia a manipulação de escalas muito pequenas, ao nível de moléculas e átomos, isto é, a nanoescala. O prefixo “nano” (anão em grego) está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro (CHAU et al., 2007; POOLE Jr.; OWEN, 2003). O termo nanopartículas (NP) inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o agente ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede da cápsula. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica (REIS et al., 2006). Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (POOLE JR.; OWEN, 2003). Este fato torna-se um desafio para os cientistas, mas constitui-se também numa grande oportunidade para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades e funcionalidades antes impossíveis de serem atingidas (KANE; STROOKE, 2007).

Nesse contexto, a interação entre as ciências naturais e as engenharias tem crescido vigorosamente em razão de um interesse comum por pequenas estruturas. A biologia vem revelando uma vasta gama de nanoestruturas funcionais sofisticadas, enquanto as ciências físicas têm desenvolvido métodos de síntese e instrumentos de medidas para a caracterização de materiais nanoestruturados (SEEMAN, 2003). A maioria das pesquisas nanotecnológicas foca no desenvolvimento de aplicações em biociência e engenharia. Estratégias para aplicar nanociência em indústria de alimentos são bastante diferentes das aplicações mais tradicionais de nanotecnologia. O processamento de alimentos envolve uma ampla variedade de matérias-primas e processos tecnológicos (MORARU et al., 2003).

Alimentos e bebidas são setores que movimentam trilhões de dólares. As indústrias de alimentos estão em constante busca de maneiras para melhorar a eficiência de produção, segurança alimentar e características dos alimentos a fim de aumentar a vantagem competitiva e participação de mercado. A nanotecnologia tem impacto sobre todas as fases de produção, desde a agricultura, passando pelo processamento, onde a criação de emulsões e encapsulamento evoluíram para nanoescala até o produto final, onde a área de embalagens tem ganhado inúmeros melhoramentos pela incorporação de nanopartículas (CUSHEN et al.,

2012). A elevada demanda por alimentos funcionais com maior valor nutricional, menor dose de conservantes sintéticos e melhores características organolépticas levam a aplicação do nanoencapsulamento no processamento de alimentos. Esta tecnologia pode ser utilizada para aumentar a estabilidade de compostos sensíveis durante a produção, armazenagem e ingestão, diminuir a evaporação e degradação de bioativos voláteis ou limitar a exposição ao oxigênio, água ou luz (FATHI et al., 2014). Dentre os alimentos funcionais que vem ganhando destaque pode-se citar produtos nutracêuticos para suplementação de ácidos graxos insaturados (AGI). Devido ao elevado grau de insaturações presentes nos AGI, essas moléculas se tornam mais susceptíveis a fenômenos de oxidação (BELHAJ; TEHRANY; LINDER, 2010).

3.2 ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS (AGI)

Os lipídios são um dos princípios imediatos mais importantes dos alimentos. Correspondem ao principal aporte energético da dieta na maioria dos países industrializados, suprimindo cerca de 45% das necessidades energéticas. A maioria dos lipídios é derivada de carnes, óleos e produtos lácteos, dando origem a uma grande ingestão de ácidos graxos saturados e quantidade relativamente modesta de polienos. As gorduras saturadas representam o fator de risco mais estabelecido na dieta humana para doenças cardiovasculares, enquanto que os AGI provavelmente são os lipídios mais importantes que proporcionariam efeitos benéficos se a ingestão alimentar for aumentada (BENATTI et al., 2004; ORDOÑEZ et al., 2005).

Quimicamente, os AGI apresentam uma ou mais ligações duplas entre os carbonos nas suas moléculas, normalmente na configuração *cis*. Existem duas famílias principais de ácidos graxos poli-insaturados: $\omega-3$ e $\omega-6$. Essas famílias de ácidos graxos não são conversíveis e possuem papéis bioquímicos muito importantes. Os ácidos graxos essenciais, eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega-3$) e docosaexaenoico (DHA, C22:6 $\omega-3$) são dois dos principais compostos representativos, conhecidos como ácidos graxos essenciais porque são componentes básicos das estruturas de nossas células e não podem ser sintetizados pelo organismo humano (STORLIEN et al., 2000).

3.2.1 Fontes de ácidos graxos insaturados

Os problemas para a saúde humana associados à ingestão excessiva de gordura na dieta são bem conhecidos, como obesidade, resistência à insulina, doenças cardíacas e

algumas formas de câncer. Atualmente, tem sido dada importância às fontes de fornecimento de AGI devido às mudanças na dieta humana e o aparecimento de doenças relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como a sua reconhecida significância terapêutica, especialmente àqueles da família ômega-3 (DERNER et al., 2006). As fontes predominantes de AGI são óleos vegetais e de pescado, sendo o óleo de pescado considerado a mais comum, mais econômica e a principal fonte de ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3) e docosaenoico (DHA, C22:6 ω -3) na dieta humana (BENATTI et al., 2004; CREXI et al., 2010; WALKER et al., 2015a)

Carpas (*Cyprinids*) contribuem com mais de 20 milhões de toneladas para a produção de pescado em todo o mundo e, representam cerca de 40% da produção global de aquicultura e 70% da produção total de aquicultura de água doce (piscicultura). Em comparação com outras espécies importantes da aquicultura, como o salmão e o camarão, a carpa é reconhecida como um peixe ecologicamente correto por consumir muito menos farinha e óleo de pescado. Uma das espécies dominantes do *Cyprinid*, a *Cyprinus carpio* (carpa comum) é cultivada em mais de 100 países em todo o mundo, e representa até 10% da produção anual de aquicultura de água doce (XU et al., 2014).

Segundo dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção brasileira de pescados com origem da aquicultura em 2013 foi de 476.512 toneladas. A região Sul correspondeu a 22,5 % da produção nacional com 107.448 toneladas, sendo a carpa e a tilápia as espécies mais cultivadas nesta modalidade na região (MPA, 2015). O relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), divulgado em 2016, estima que o País deve registrar crescimento de 104% na pesca e na aquicultura até 2025 (FAO, 2016).

Porém, os resíduos gerados durante o beneficiamento de pescado (vísceras, peles, cabeças e espinhaços) podem totalizar 60% da matéria-prima. Estes são considerados matérias-primas de baixa qualidade e, se não utilizados, podem causar problemas ambientais, sanitários e econômicos (KOŁODZIEJSKA et al., 2008). As vísceras de pescado são uma rica fonte de ácidos graxos, podendo ser utilizadas como matéria prima para a extração de óleo de pescado (CREXI et al., 2010).

O óleo de pescado pode ser obtido através do processo termomecânico de extração, sendo necessária uma etapa de cocção para favorecer a coagulação das proteínas e, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular, gerando a liberação do óleo e água que estavam fisiologicamente ligados. No seu estado bruto, o óleo de pescado pode apresentar impurezas e compostos como ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, fosfatídeos e

produtos de oxidação lipídica, que o tornam inadequado para o consumo humano. Dessa maneira, os óleos brutos requerem o refino para atender aos padrões de qualidade para a produção de óleos e gerar produtos aceitáveis para o consumo humano (CREXI et al., 2009).

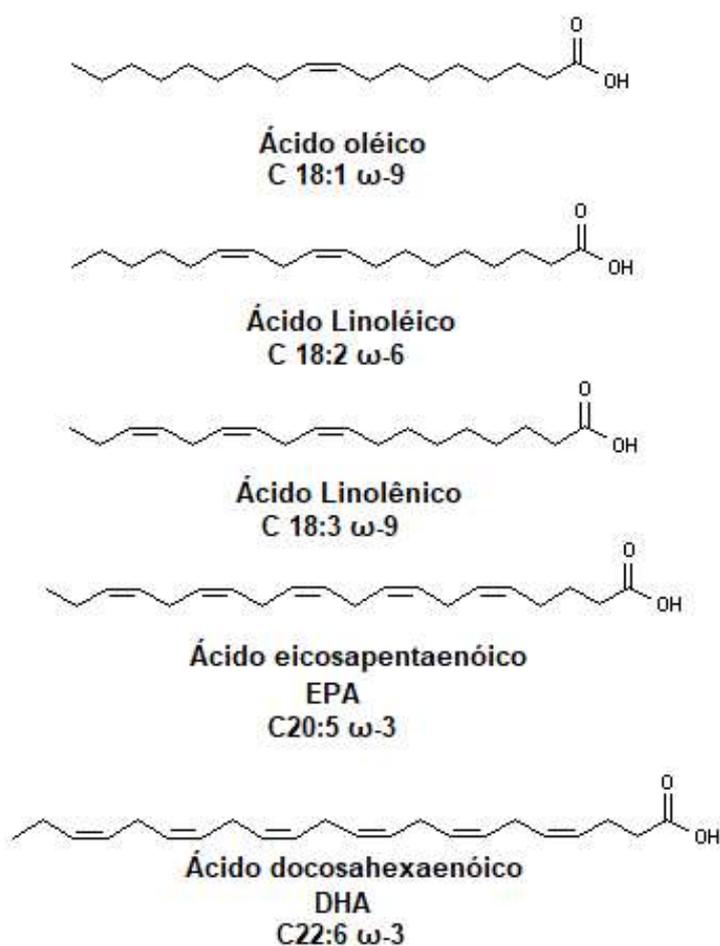
Para sua purificação o óleo bruto passa pelas etapas de refino de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. As operações de refino removem componentes indesejáveis, garantindo assim características de pureza e estabilidade satisfatórias (acidez, cor, oxidativa e sensorial), não alterando o conteúdo dos ácidos graxos dos triacilgliceróis (CREXI et al., 2010). Durante o refino, as perdas de óleo e o contato com o oxigênio devem ser mínimos. As exposições do óleo à temperaturas altas devem ser por tempos curtos e a vácuo, para produzir um óleo de qualidade e com estabilidade oxidativa (OETTERER et al., 2006).

Na degomagem, os fosfolipídios, também chamados de gomas, são os principais compostos entre os componentes menores que fazem parte do óleo bruto a ser retirados. Isso ocorre através da separação dos fosfolipídios hidratáveis e dos não hidratáveis, uma vez que estes se tornam insolúveis no óleo e se decompõe, formando depósitos que se assemelham a gomas de cor caramelo. Devido à acidez proveniente da matéria-prima e a adição de soluções salinas ou ácidas, é necessário à etapa de neutralização destes compostos. Essa etapa consiste em fazer reagir todos os ácidos graxos livres com um álcali, normalmente NaOH. Os ácidos graxos livres combinados com álcali formam sais orgânicos de sódio ou sabões. O óleo resultante ainda contém um pouco de sabão, e então recebe a adição de água pré-aquecida para a eliminação da soda e da espuma do óleo. O óleo obtido está isento de sabão, mas muito úmido, devendo ser conduzido para um secador a vácuo (umidade em torno de 0,1%) (CREXI et al., 2010; OETTERER et al., 2006). Apesar da etapa de degomagem remover certa quantidade de corantes presentes no óleo, ele não deixa o óleo completamente límpido. Por isso se faz necessário uma etapa de branqueamento. O branqueamento promove por adsorção a remoção dos pigmentos do óleo, além de melhorar a sua estabilidade oxidativa (CREXI et al., 2010; OETTERER et al., 2006).

O óleo refinado de pescado por constituir uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados pode ser utilizado como matéria-prima para preparar concentrados de ácidos graxos mono e poli-insaturados. A obtenção de concentrados de AGI pode ser realizada por técnicas como: cristalização por resfriamento, extração fluídica supercrítica, destilação molecular, concentração por lipases (LIU et al., 2006; WANASUNDARA; SAHIDI, 1999). Outra forma mais simples e eficiente de obtenção de concentrados de AGPI é o método de complexação com ureia. Este método de separação baseia-se na separação pelo grau de

instauração, onde os ácidos mais insaturados são menos complexados com a ureia. Primeiramente, realiza-se uma hidrólise química ou enzimática dos óleos de pescado, obtendo-se os ácidos graxos livres que são misturados a uma solução alcoólica de ureia. O método da complexação da ureia é baseado na separação pelo grau de insaturação, onde a fração complexada contém os ácidos graxos saturados, disponibilizando os concentrados de AGI (CREXI et al., 2012, PAIM, 2012). A Figura 1 apresenta alguns dos principais ácidos graxos encontrados nos concentrados de AGI obtidos a partir do óleo de pescado.

Figura 1 – Estrutura química dos principais ácidos graxos encontrados em óleo de pescado.



3.2.2 Identificação de AGI por cromatografia

A técnica mais utilizada para análise do perfil em ácidos graxos dos lipídios é a cromatografia gasosa (CG). Para determinar os níveis de AGI nos óleos, o processo começa com uma extração líquida para obtenção das amostras de óleo. Posteriormente, o teor de óleo é determinado por gravimetria e, em seguida o óleo é convertido em derivados voláteis de

ésteres metílicos seguido pela análise de cromatografia gasosa (VONGSVIVUT et al., 2012). A cromatografia é uma técnica de separação, principalmente utilizada em análises químicas. Pode ser utilizada para fins de preparação, quantificação e identificação. É uma técnica poderosa e versátil, em um processo que pode separar uma mistura nos seus componentes individuais e, simultaneamente, proporcionar uma estimativa quantitativa de cada constituinte (SCOTT, 2003).

3.2.3 Efeito da ingestão de AGI

Os AGI exercem importante função no metabolismo e transporte de gorduras, na manutenção da composição, estrutura e integridade das membranas celulares, na modulação dos receptores de hormônios e na função imune. Além de serem precursores dos eicosanóides, que participam da regulação da pressão sanguínea, da frequência cardíaca, das respostas inflamatórias e imunológicas e do sistema nervoso central (CALDER, 2015; ORDOÑEZ et al., 2005). O seu consumo está intimamente relacionado à ação anti-inflamatória, prevenção de doenças cardiovasculares, regeneração de neurônios e desenvolvimento cerebral. O ômega-3 reduz o risco de Alzheimer, demência e cansaço mental; contribui no tratamento da depressão, ansiedade e alterações no sono e diminui os níveis sanguíneos de colesterol total, colesterol ruim (LDL), aumentando a produção do colesterol bom (HDL) (BENATTI et al., 2004; CALDER, 2015).

Comparado com gorduras saturadas, os AGI quando ingeridos são mais facilmente utilizados para produção de energia. O aumento do grau de insaturação, numa dada extensão da cadeia de carbono, aumenta a mobilidade relativa de gordura armazenada, tornando os AGI mais disponíveis ao organismo (BENATTI et al., 2004).

O óleo de peixe diminui a produção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e triglicerídeos, devido à inibição da síntese dos triglicerídeos hepáticos (STORLIEN et al., 2000). Os benefícios positivos para a saúde estimularam o interesse industrial em AGI para a produção de suplementos e alimentos funcionais. No entanto, devido à sua natureza insaturada, esses concentrados são altamente suscetíveis à oxidação lipídica, o que pode levar à formação de compostos indesejáveis, podendo ser prejudiciais à saúde (JACOBSEN, 2015).

3.2.4 Oxidação lipídica

A oxidação é umas das principais reações de deterioração dos alimentos, e implica na deterioração e redução do valor nutritivo do alimento, sendo alguns produtos resultantes potencialmente tóxicos. Os principais substratos dessas reações são os AGI, já que as ligações duplas são centros ativos que podem reagir com o oxigênio. A estrutura do ácido graxo afeta grandemente a sua susceptibilidade à oxidação. Ácidos graxos poli-insaturados são muito mais susceptíveis à oxidação do que os ácidos graxos saturados (KRALOVEC et al., 2012). O ácido oleico, com uma única ligação dupla, reage aproximadamente 10 vezes mais rápido do que o seu derivado saturado, o ácido esteárico. Enquanto o linoleico (2 ligações duplas) reage mais do que 100 vezes mais rápido, e linolênico (3 ligações duplas) reage quase 200 vezes mais rápido. EPA (5 ligações duplas) e DHA (6 ligações duplas) são extremamente suscetíveis à oxidação (POKORNY et al., 2001).

A oxidação é um processo de radical livre, e pode ser iniciado por uma variedade de fatores incluindo luz, calor, metais e enzimas. Na maioria dos casos, a oxidação lipídica prossegue através de uma reação em cadeia de radicais livres, consistindo em três etapas: iniciação, propagação e terminação (JACOBSEN, 2015; ORDOÑEZ et al., 2005). Na etapa de iniciação, um radical de hidrogênio ($H\bullet$) é extraído a partir do AGI pelo qual se forma um radical livre, que se combina com oxigênio, formando peróxidos lipídicos. Essa reação tem elevada energia de ativação, sendo necessária a presença de catalisadores como íons metálicos, ferro ou calor. Na reação de propagação, o radical lipídico livre altamente reativo reage com oxigênio, o que leva a formação de mais radicais de peróxido. Acumulam-se os peróxidos, e é nessa etapa que se oxida a maioria dos lipídios insaturados. O radical lipídico reage com o oxigênio na repetição da primeira reação de propagação. Na presença de calor, ferro heme ou íons metálicos, os peróxidos se decompõem em produtos secundários de oxidação (voláteis). Os voláteis formados incluem aldeídos, cetonas e álcoois, bem como hidrocarbonetos. A presença de luz também pode iniciar a oxidação lipídica através de uma reação em cadeia de radicais livres, ou através da geração de oxigênio singlete, que pode reagir diretamente com lipídios insaturados sem a formação inicial de um radical lipídico livre. Na reação de terminação, dois radicais reagem um com o outro por meio do qual um produto não radical é formado, e a reação de oxidação lipídica é encerrada (JACOBSEN, 2015; ORDOÑEZ et al., 2005).

Cada ligação dupla é um portal de abstração de hidrogênio, permitindo a formação de mais de 16 isômeros de hidroperóxido de EPA e 20 isômeros hidroperóxidos para DHA.

Os fatores que afetam a taxa de oxidação incluem a composição de ácidos graxos, grau de dispersão dos lípidios, atividade de água, condições de armazenagem e presença de oxigênio, pró-oxidantes e antioxidantes (YOSHII et al., 2002). Assim, a determinação de algumas propriedades químicas são bastante importantes para avaliar a qualidade dos óleos.

O índice de peróxido expressa, em miliequivalentes de oxigênio ativo, a quantidade de peróxido em 1000 g de amostra. Como peróxidos são produtos iniciais de oxidação, este índice é útil para caracterizar o estágio inicial da degradação oxidativa (oxidação primária). É muito importante por definir a deterioração dos lípidios, principalmente pela presença de compostos de baixa massa molar provenientes da degradação, por exemplo, aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos. Estes compostos são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. O método baseia-se, na capacidade dos peróxidos orgânicos oxidarem o iodeto de potássio formando iodo (GRANATO; NUNES, 2016).

Alguns dos compostos considerados responsáveis pelo ranço desenvolvido em óleos são aldeídos. Assim, o índice de p-anisidina é uma medida proporcional ao teor de aldeídos insaturados resultantes da degradação dos hidroperóxidos sendo, portanto, um parâmetro relacionado à oxidação secundária dos compostos lipídicos (GRANATO; NUNES, 2016).

Durante as fases iniciais da oxidação lipídica, os hidroperóxidos podem aumentar pronunciadamente até um máximo, quando então começam a decrescer por causa da sua degradação. Logo, a combinação do índice de peróxido e do índice de p-anisidina possibilita o cálculo do valor total de oxidação (TOTOX), proporcionando uma ideia mais global da oxidação, uma vez que são considerados tanto o potencial da degradação da qualidade organoléptica (representada pelos peróxidos), quanto os produtos dessa degradação (representados pelos aldeídos) (GRANATO; NUNES, 2016).

Para evitar a oxidação dos AGI, que pode resultar em perda de atividade, e facilitar sua incorporação em alimentos, se faz necessário a utilização de tecnologias especiais. Uma abordagem bem sucedida para incorporar o óleo de pescado em produtos alimentícios é a produção de emulsões do tipo óleo-em-água. Nanoemulsões têm um grande potencial para superar os desafios associados com o desenvolvimento de produtos de alimentos e bebidas enriquecidos com AGI. Emulsões podem proteger contra a oxidação do óleo de pescado, proporcionando uma barreira física entre o óleo e o oxigênio e/ou pró-oxidantes, e aumentar sua dispersibilidade em água (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2015; GARCÍA-MORENO et al., 2016).

3.3 NANOEMULSÕES

Uma emulsão pode ser definida como um material que contém pequenas gotículas de óleo dispersas em um meio aquoso (emulsão óleo em água), ou pequenas gotas de água dispersas em um meio lipídico (emulsão água em óleo), no qual as fases são pelo menos imiscíveis. As gotículas presentes na emulsão são referidas como fase dispersa ou interna, e o material que compõe o líquido circundante é normalmente referido como fase externa ou dispersante (McCLEMENTS; WEISS, 2005).

O termo nanoemulsão é utilizado porque, além de indicar gotículas em escala nanométrica, é conciso e evita interpretações erradas com o termo microemulsão (que são sistemas termodinamicamente estáveis). Devido ao seu tamanho característico, as nanoemulsões possuem estabilidade contra sedimentação. Essas propriedades produzem nanoemulsões de interesse para estudos fundamentais e para aplicações práticas (por exemplo, campos químicos, farmacêuticos, cosméticos, etc.) (SOLANS et al., 2005).

Há um grande interesse dentre produtos alimentícios, agrotóxicos e farmacêuticos no uso de emulsões para encapsular, proteger e entregar componentes lipofílicos ativos (como concentrados de AGI). Para determinadas aplicações, é desejável que as dispersões coloidais contenham partículas em escala nanométrica, as nanoemulsões, pois proporcionam vantagens como melhor estabilidade, são opticamente mais claras e podem aumentar a disponibilidade de certos compostos bioativos (McCLEMENTS, 2012).

3.3.1 Propriedades das nanoemulsões

As propriedades termodinâmicas das nanoemulsões são semelhantes às das emulsões convencionais. A principal diferença entre elas é que as nanoemulsões possuem cinética de desestabilização mais lenta, o que as torna mais estáveis, tendo uma grande estabilidade em suspensão e uma longa vida útil devido, principalmente, ao tamanho de suas gotículas e ao elevado movimento browniano (DEY et al., 2012). Uma importante aplicação de nanoemulsões é para incorporar ingredientes ativos lipofílicos em alimentos de base aquosa ou bebidas que devem permanecer transparentes, tais como alguns tipos de água, refrigerantes enriquecidos, molhos, sobremesas, gelatinas e sucos (VELIKOV; PELAN, 2008).

Os principais fatores que determinam as propriedades óticas de uma nanoemulsão são dados pela relação entre índice de refração, concentração do óleo e tamanho das partículas

na distribuição coloidal. Essa relação é relevante para o desenvolvimento de produtos que devem ser translúcidos ou opacos. Estudos demonstram que a aparência óptica de emulsões de óleo-em-água pode ser modulada alterando o tamanho e concentração das gotículas. Nanoemulsões translúcidas devem ter diâmetro de gotas inferior a 50 nm. Acima de 50 nm, as emulsões começam a ficar mais turvas. A eficiência da dispersão das gotículas da fase oleosa determina o quanto de óleo pode ser incorporado até que haja alterações na sua turbidez. Para produtos turvos, a maioria de gotículas deve situar-se entre cerca de 200 e 400 nm de diâmetro (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

Outra característica importante das nanoemulsões é a sua estabilidade. O tamanho reduzido das nanopartículas resulta na prevenção da floculação e coalescência das gotículas. A cinética de desestabilização de nanoemulsões é tão lenta (aproximadamente de meses) que elas são consideradas cineticamente estáveis. A maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*) sozinha regula o processo de desestabilização (ANTON; VANDAMME, 2011). É praticamente impossível parar a maturação de Ostwald, o que a torna de grande importância para a manutenção da estabilidade da emulsão em longo prazo. Este efeito é obtido pela diferença de solubilidade e dos potenciais químicos entre partículas de tamanhos diferentes. Teoricamente, esse efeito deveria conduzir à separação das fases, mas a taxa de crescimento é amplamente reduzida com o aumento de raio. É um processo de coalescimento, onde as gotículas dispersas se agregam as gotas maiores devido à uma diferença de pressão entre as partículas de diferentes tamanhos (MEINDERS; VLIET, 2004). A maturação de Ostwald ou difusão molecular surge a partir de altos valores de polidispersão nas emulsões e da diferença na solubilidade entre gotículas pequenas e grandes (SOLANS et al., 2005, TADROS et al., 2004).

A maturação de Ostwald leva à condensação de todas as gotículas em uma única gota ou separação de fases. Entretanto, isso não ocorre na prática, desde que a velocidade de crescimento do tamanho da gota diminua com o aumento do tamanho do glóbulo (TADROS et al., 2004). A redução do processo de maturação de Ostwald pode ser obtida pela adição de uma pequena quantidade de um segundo óleo apresentando baixa solubilidade na fase aquosa, bem como a adição de um segundo surfactante com o mesmo comprimento de cadeia alquila e maior grau de etoxilação do que o surfactante principal, no caso de sistemas estabilizados com surfactantes não iônicos etoxilados (SOLANS et al., 2005).

A influência das propriedades surfactantes sobre as estabilidades física e química de nanoemulsões para a elaboração de nanopartículas lipídicas sólidas foi investigada por Salminen et al., (2013). As nanopartículas apresentaram diâmetros médios variando entre

131–168 nm e índices de polidispersão (PDI) próximos a 0,2, indicando que eram estáveis à agregação das partículas, o que pode ser atribuída a repulsão eletrostática. A estabilidade a longo prazo foi medida após 50 dias, e os resultados mostraram que as emulsões eram fisicamente estáveis. A estabilidade física das nanopartículas de lipídios é altamente dependente da forma como os agentes tensoativos podem controlar o processo de cristalização durante a preparação, bem como durante o armazenamento.

3.3.2 Métodos de preparo de nanoemulsões

As nanoemulsões são de particular interesse como sistemas de liberação coloidais, porque elas podem ser facilmente fabricadas a partir de ingredientes de qualidade alimentar que usam operações de processamento relativamente simples, tais como misturas, cisalhamento e homogeneização (RAO; McCLEMENTS, 2011). Para o preparo de uma emulsão, são necessários água, óleo, surfactante e energia (TADROS et al., 2004).

O agente tensoativo escolhido deverá ser capaz de reduzir a tensão interfacial a um valor muito pequeno, o que facilita o processo de dispersão durante a preparação da emulsão e proporciona uma película flexível, que pode deformar-se prontamente em torno das gotículas. Este comportamento de adsorção pode ser atribuído à natureza do solvente e da natureza química do agente tensoativo, que combina ambos os grupos polares e não polares, em uma única molécula. O valores baixos de HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*) são geralmente utilizados para a formulação de emulsões água em óleo (w/o), enquanto que tensoativos que possuem elevado valor de HLB elevado (> 12) favorecem a formação de emulsões óleo em água (o/w) (GLATTER et al., 2001; TALEGAONKAR et al., 2008). Os *Tweens* são uma gama de tensoativos leves não iônicos que proporcionam benefícios em uma série de aplicações, tendo valor de HLB de 15.0. Alguns *Tweens* possuem aprovação de uso em alimentos e um histórico seguro de longa data. Como não iônicos, os *Tweens* oferecem muitas vantagens sobre os surfactantes iônicos, incluindo aumento da estabilidade, flexibilidade de formulação e maior compatibilidade. Eles são estáveis em ácidos fracos, álcalis e eletrólitos e não reagem com ingredientes ativos iônicos. Os *Tweens* são de natureza hidrofílica, e são solúveis ou dispersíveis em água e soluções diluídas de eletrólitos. A solubilidade das soluções aquosas de *Tweens* aumenta com o grau de etoxilação.

As técnicas de preparo e o material de fabricação são os responsáveis pelas características finais, qualidade e aplicação da nanoemulsão preparada. A qualidade de nanogotas é geralmente dependente do tipo de material utilizado, isto é, óleo e emulsionante,

enquanto o tamanho das gotículas é determinado pela concentração de lipídeos e pela medida de forças disruptivas aplicadas para preparar a nanoemulsão (ABBAS et al., 2015). Existe um número limitado de surfactantes de grau alimentício disponíveis para o preparo e estabilização destes sistemas coloidais. Muitos destes são surfactantes sintéticos que não podem ser aplicados em diversos países, ou que podem ser utilizados em baixos níveis devido a questões regulamentares, econômicas ou sensoriais (ABBAS et al., 2015; RAO; McCLEMENTS, 2011).

Além da adição de emulsionantes, outro modo de manter as nanoemulsões mais estáveis é a adição de outros estabilizadores, tais como modificadores de textura e inibidores de maturação. O tipo de solvente que pode ser adicionado influencia diretamente nas características das emulsões (HUYNH et al., 2009, ZEEB et al. 2014). Alguns autores estudam a adição de álcoois sobre a formação e estabilidade de emulsões. Zeeb et al. (2014) demonstraram que a adição de álcoois de cadeia curta, para as emulsões estabilizadas com proteína antes da homogeneização pode reduzir o tamanho das gotas produzidas, facilitando assim a formação de nanoemulsão. Esquerdo et al. (2014) produziram microcápsulas de concentrados de AGI de óleo de pescada, e compararam a influência da adição dos solventes etanol e hexano no preparo das nanoemulsões. O etanol foi o solvente mais adequado para o preparo das microcápsulas, apresentando boas características texturais.

A formação de nanoemulsões, também chamada de dispersão ou emulsificação, geralmente é conseguida através de métodos como agitadores, homogeneizadores de alta pressão ou ultrassons. Esses são chamados métodos de "alta energia" que fornecem energia suficiente para aumentar área interfacial óleo/água. Os métodos de "baixa energia"(emulsificação espontânea, inversão de fases) também permitem a formulação de nanoemulsões, sem necessidade de qualquer dispositivo ou energia. Os métodos de baixa energia tiram vantagem das propriedades físico-químicas intrínsecas dos componentes, a fim de gerar gotículas submicrônicas (ANTON; VANDAMME, 2011, SOLANS et al., 2005). O método de preparo das nanoemulsões possui grande influência sobre as propriedades físico-químicas das mesmas, as quais, por sua vez, têm consequência direta sobre a instabilidade termodinâmica de tais preparações (PEY et al., 2006).

Os menores tamanhos de partículas são conseguidos quando o equipamento fornece energia no tempo mais curto com o fluxo mais homogêneo. Homogeneizadores de alta pressão atendem a esses requisitos, portanto, eles são amplamente utilizados para preparar nanoemulsões. Os microfluidizadores são semelhantes aos homogeneizadores de alta pressão. No entanto, a concepção dos canais através dos quais a pré-emulsão flui no interior do

dispositivo é diferente. O microfluidizador divide uma emulsão em dois fluxos que colidem entre si em uma câmara de interação. Forças destrutivas intensas são geradas dentro da câmara de interação quando as duas correntes de emulsão que se movem rapidamente colidem, levando à ruptura altamente eficiente das gotículas. A emulsificação por ultrassom também é muito eficiente na redução do tamanho de gota, mas é adequado apenas para pequenas quantidades. A eficiência do processo de dispersão é fortemente dependente do tempo de ultrassons em diferentes amplitudes e, quanto mais hidrofóbico é o monômero mais longo o tempo de sonicação necessário (SOLANS et al., 2005).

O processo de emulsificação espontânea ocorre ao adicionar uma solução de um solvente hidromiscível, contendo uma pequena concentração de óleo, na água. As gotículas de óleo são formadas com diâmetro dependente da razão entre o excesso de solvente e o óleo (SOLANS et al., 2005). Neste caso, a fonte de energia empregada é originada principalmente das turbulências interfaciais, que está intimamente ligado ao gradiente de tensão superficial induzido pela difusão do soluto entre as duas fases (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

As nanoemulsões também podem ser obtidas empregando as propriedades físico-químicas do sistema. Esses métodos alteram a curvatura espontânea do surfactante. Para os tensoativos não iônicos, isto pode ser conseguido alterando a temperatura do sistema, forçando uma transição a partir de uma emulsão óleo em água à baixas temperaturas para uma emulsão água-em-óleo em maiores temperaturas (TPI, *transition phase inversion*). Durante o arrefecimento, o sistema atravessa um ponto de curvatura zero espontânea e tensão superficial mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas. Além da temperatura, outros parâmetros como a concentração ou o valor de pH podem ser considerados (FERNANDEZ et al., 2004).

3.3.3 Nanoemulsões e nanocápsulas

As nanocápsulas poliméricas são sistemas coloidais transportadores que foram desenvolvidos para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais (FATHI et al., 2014). O encapsulamento pode ser definido como um processo para reter uma substância (agente ativo) dentro de outra (material de parede) (NEDOVIC et al., 2011). Um método tradicional para a produção das nanocápsulas é pelo sistema de emulsificação seguido de evaporação do solvente (ASSIS et al., 2012).

Os primeiros registros sobre a utilização de microcápsulas surgiram em 1930, mas somente na década de 50 foram desenvolvidos os primeiros produtos utilizando material

encapsulado. O processo consistia na utilização de microcápsulas contendo um corante impregnadas em papel para a substituição do papel carbono. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas contendo um corante não ativado (incolor), recoberta por outra camada contendo um reagente também incolor. A pressão do lápis na superfície do papel rompia as cápsulas, liberando o corante, produzindo uma cópia idêntica ao escrito no outro papel (RÉ, 1998).

O encapsulamento foi originalmente introduzido na área da biotecnologia para tornar os processos de produção mais eficientes, pois a matriz em torno das células permite uma separação rápida e eficiente das células produtoras e dos metabólitos. Essas tecnologias desenvolvidas há aproximadamente 60 anos, são de interesse significativo para o setor farmacêutico (especialmente para o fornecimento de medicamentos e vacinas), mas também têm relevância para a indústria de alimentos (NEDOVIC et al., 2011). Na área de alimentos, os estudos utilizando encapsulamento começaram na década de 1960, com a elaboração de microcápsulas de óleos essenciais para prevenir a oxidação e perda de substâncias voláteis e controlar a liberação de aroma (RÉ, 1998).

Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem adicionado compostos funcionais a alguns de seus produtos. Esses compostos geralmente são altamente suscetíveis a condições ambientais, de processamento e/ou degradação pelos fluidos gastrointestinais e, portanto, o encapsulamento impôs uma abordagem para proteção efetiva. Os compostos funcionais são usados para controlar as propriedades de sabor, cor, textura ou preservação, além de adicionar benefícios potenciais para a saúde. O encapsulamento também pode ser aplicado para a modificação das características físicas do material original, a fim de permitir uma manipulação mais fácil, ajudar a separar os componentes da mistura que de outra forma reagiriam um com o outro ou para proporcionar uma concentração adequada e dispersão uniforme de um agente ativo (NEDOVIC et al., 2011).

O encapsulamento é um meio de isolar uma substância das reações utilizando uma matéria circundante. Após o encapsulamento, a entropia do isolado diminui; a potência aumenta e, em alguns casos, o isolado gera novas funções. A definição da finalidade de encapsulamento é um critério importante para a seleção de um material. O efeito pode ser, por exemplo, o aumento da vida útil, de mascaramento de gosto ou garantia de liberação controlada (WANDREY et al., 2010). Os efeitos do encapsulamento de AGI, que são nutrientes essenciais para os seres humanos, estão intimamente relacionados às funções e propriedades dos lipídios. As vantagens do encapsulamento lipídico são resumidas abaixo (MATSUNO; ADACHI, 1993).

- A auto-oxidação de lipídios é retardada;
- O aumento da estabilidade permite a utilização plena dos lipídios;
- Os sabores solubilizados nos lipídios podem ser mantidos até o uso (liberação controlada);
- O sabor das substâncias amargas lipossolúveis pode ser mascarado pela inclusão em um lipídio encapsulado;
- Os lipídios encapsulados podem funcionar como transportadores de substâncias fisiologicamente ativas lipossolúveis, desde a boca até o intestino. Os transportadores protegem as substâncias dissolvidas contra a hidrólise enzimática e, servem como mediadores de absorção.

A alta atividade emulsionante é facilmente avaliada medindo a absorção de luz ou o tamanho médio das partículas imediatamente após a formação da emulsão. Devem ser utilizadas condições especificadas: concentrações e volumes de materiais lipídicos e de paredes, o tipo de equipamento utilizado para preparo de nanocarreadores, a fonte de energia e a duração da homogeneização devem ser controladas (MATSUNO; ADACHI, 1993). Uma vez que um meio simples e conveniente de formação do encapsulamento foi desenvolvido, vários materiais de parede podem ser utilizados.

3.4 MATERIAIS DE PAREDE

Muitas substâncias podem ser usadas para revestir ou encapsular líquidos, sólidos ou gases de diferentes tipos e propriedades. Diferentes compostos, aceitos para o encapsulamento de medicamentos, não são aprovados para uso na indústria de alimentos, porque muitas dessas substâncias não são certificadas para aplicações alimentares como materiais "geralmente reconhecidos como seguros" (GRAS). Na verdade, todo o processo alimentar deve ser projetado para atender aos requisitos de segurança de agências governamentais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil ou *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (NEDOVIC et al., 2011).

O material de parede deve ser de origem alimentar, biodegradável e estável em sistemas alimentares durante o processamento, armazenamento e consumo. A maioria dos materiais utilizados para microencapsulamento no setor de alimentos são biomoléculas. Os materiais de transporte de nanoescala mais adequados para aplicações alimentares são baseados em carboidratos, proteínas ou lipídios (FATHI et al., 2014). O material de parede

adequado deve apresentar alta atividade emulsificante, alta estabilidade e os lipídios não devem separar-se da emulsão durante a desidratação (MATSUNO; ADACHI, 1993).

Os critérios mais importantes para a seleção de um material de parede são a funcionalidade que o encapsulamento deve fornecer ao produto final, potenciais restrições para o material de revestimento, concentração de encapsulados, tipo de liberação, requisitos de estabilidade e restrições de custos. Os materiais utilizados para o *design* do invólucro protetor de produtos encapsulados devem ser de qualidade alimentar, biodegradáveis e capazes de formar uma barreira entre a fase interna e seus arredores. Seja qual for o material em questão, a conversão das características físico-químicas dos materiais será a condição prévia para o desenvolvimento de produtos alimentares bem-sucedidos. Portanto, são pré-requisitos estudar e analisar todas as propriedades do material de parede potencial, para concluir e prever seu comportamento em condições presentes nas formulações de alimentos (NEDOVIC et al., 2011).

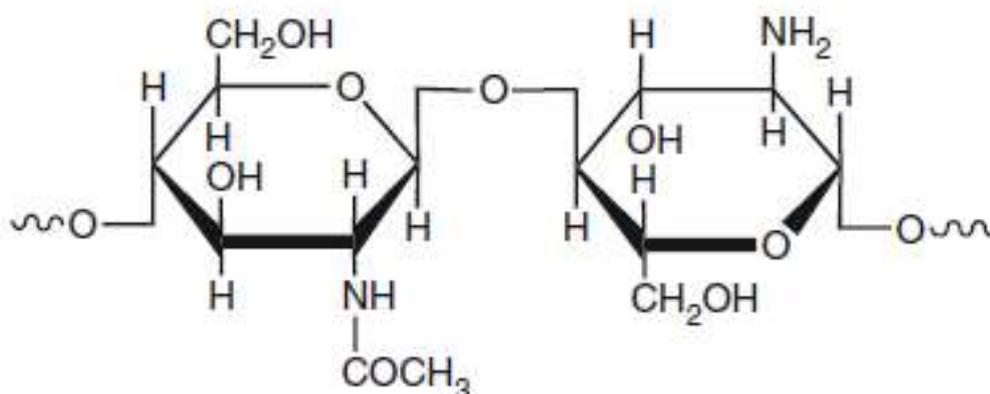
3.4.1 Quitosana

Os sistemas de entrega à base de polissacarídeos são adequados para muitas aplicações da indústria, uma vez que são biocompatíveis e biodegradáveis e, possuem um alto potencial para serem modificados para alcançar as propriedades necessárias. Ao contrário dos carreadores lipídicos, os sistemas de liberação baseados em carboidratos podem interagir com uma ampla gama de compostos bioativos através dos seus grupos funcionais, o que os torna transportadores versáteis para ligar e aprisionar uma variedade de ingredientes alimentares bioativos hidrofílicos e hidrofóbicos. Eles são considerados como um invólucro adequado em processos de alta temperatura devido à sua estabilidade em comparação com lipídios ou proteínas que podem ser derretidos ou desnaturados (FATHI et al., 2014).

A quitina (β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina) é o segundo polímero em abundância na natureza, logo após a celulose. A quitina é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) que, quando desacetiladas, resultam na estrutura β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, denominada quitosana (Figura 2) (WESKA et al., 2007). Embora a quitina e quitosana sejam consideradas biopolímeros distintos, o grau de desacetilação (quantidade de monômeros desacetilados em suas cadeias) é que define a forma do biopolímero predominante. Quando o grau de desacetilação da quitina alcança valores de aproximadamente 50% (dependendo da

origem do polímero), a mesma fica solúvel em meio aquoso ácido e é chamada de quitosana (RINAUDO, 2006).

Figura 2 – Estrutura química principal das unidades de cadeia quitosana, desacetilada (direita) e acetilada (esquerda).



Fonte: Wandrey et al. (2010).

A quitosana pode ser classificada como um polieletrólito catiônico não carregado permanentemente. Devido a um valor de pKa de aproximadamente 6,5, a quitosana é carregado positivamente e é solúvel em meio ácido a neutro. A densidade da carga e a solubilidade dependem do grau de desacetilação. Somente a quitosana com grau de desacetilação superior a 50% é solúvel em meio aquoso ácido. A quitosana apresenta sensibilidade ao pH, pois dissolve-se facilmente em valores de pH ácidos, mas é insolúvel a intervalos de pH mais elevados. A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados inorgânicos, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos, quando o pH da solução é menor que 6,0, como ácido fórmico, acético, tartárico e ácidos cítricos (WANDREY et al., 2010).

A massa molar depende da fonte e da tecnologia de isolamento, mas pode atingir valores de cerca de $5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. As massas e oligômeros molares inferiores são obtidos pela degradação da cadeia em várias condições que produzem frequentemente produtos, que diferem da composição e disposição das sequências das moléculas. A natureza mucoadesiva da quitosana a torna uma boa candidata para prolongar o tempo de residência e aumentar o tempo de liberação do encapsulante no meio gastrointestinal. A quitosana forma géis com tripolifosfato e alginato. Além disso, tem uma ótima capacidade de formação de filmes. Os grupos amino e hidroxila da quitosana são quimicamente reativos e podem ser modificados

(FATHI et al., 2014). Os grupos amino estão disponíveis para reações químicas (preparação de derivados) e formação de sais com ácidos. Os grupos hidroxila C-6 (primário) e C-3 (secundário) também podem ser utilizados na preparação de derivados (RINAUDO, 2006).

A alta hidrofiliabilidade da quitosana, devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de micro e nanopartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais, etc (LARANJEIRA; FAVERE, 2009). Além disso, nas aplicações da indústria alimentícia, recebe interesse mundial, pois além de ser obtida de recursos naturais renováveis, é biologicamente reprodutível, biodegradável, biocompatível, não tóxica e com função biológica. Na indústria de alimentos é aplicada como antioxidante, agente antimicrobiano, proporciona a recuperação de proteínas solúveis e pode ser utilizada como revestimento comestível (KLAYPRADIT; HUANG; 2008).

3.4.1.1 Origem e produção da quitosana

A quitina, principal fonte de quitosana, possui uma produção anual de aproximadamente 10^{12} toneladas em biomassa (WANDREY et al., 2010). A quitina está presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos, sendo suas principais fontes naturais os resíduos de camarão, siri e lagosta. A partir dessa matéria-prima, rejeito abundante e com relativo baixo custo da indústria de alimentos marinhos, é produzida a quitina (WESKA et al., 2007).

A separação da quitina, normalmente envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. A sua extração a partir dos exoesqueletos de crustáceos consiste na desmineralização, desproteínização, e remoção de pigmentos (etapa também de desodorização). Na desmineralização podem ser utilizadas soluções aquosas de diferentes ácidos. Nesta etapa são eliminados os sais minerais, principalmente carbonato e fosfato de cálcio. Devem ser evitadas condições vigorosas, pois podem provocar a despolimerização e, conseqüentemente, a degradação da estrutura da quitina, o que alteraria o seu caráter macromolecular. A eliminação das proteínas presentes na matéria prima pode ser utilizando tratamento com diferentes bases. Assim como na desmineralização, as condições utilizadas devem ser brandas a fim de evitar ou minimizar a hidrólise e despolimerização na molécula de quitina. Por fim, a remoção dos pigmentos,

quando presentes, pode ser feita por extração com solventes ou por branqueamento (WESKA et al., 2007).

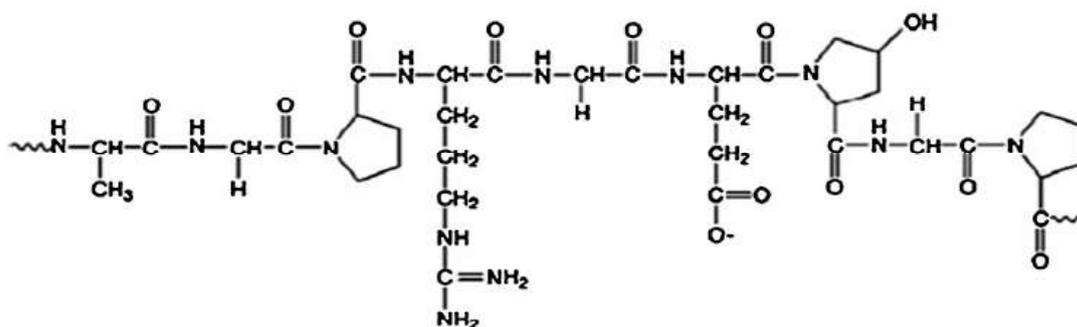
A obtenção da quitosana pode ser realizada enzimaticamente ou por desacetilação alcalina da quitina, sendo este último método o mais utilizado (WANDREY et al., 2010). Quando a quitosana é preparada pela N-desacetilação da quitina, são feitos tratamentos com soluções alcalinas concentradas à altas temperaturas. Dentre os fatores que controlam a velocidade da desacetilação, a distribuição das unidades desacetiladas ao longo da cadeia e a massa molar podem ser citados a concentração alcalina, relação entre solução alcalina e quitina, tempo e temperatura como os mais importantes. Durante o curso da desacetilação, parte das ligações N-acetil do polímero são rompidas com a formação de unidades de D-glucosamina que contém um grupo amínico livre, aumentando a solubilidade do polímero em meios aquosos. Após a desacetilação, o polímero já é considerado quitosana, e geralmente passa por um processo de purificação para diminuir o conteúdo de cinzas e, conseqüentemente, concentrar a quitosana (WESKA et al., 2007).

3.4.2 Gelatina

As proteínas são macromoléculas naturais compostas por cadeias lineares de aminoácidos. As proteínas têm um papel central em todos os organismos vivos com uma ampla gama de funções. Grandes quantidades de proteínas são diretamente usadas como alimentos. A gelatina é uma proteína derivada do tecido animal conhecida desde a antiguidade, usada pela primeira vez como cola em 6000 ac. Este biopolímero é derivado da hidrólise parcial do colágeno, e consiste em proteínas (85–92%), sais minerais e água. O colágeno é o principal constituinte de todo o tecido conjuntivo fibroso branco que ocorre em animais (cartilagem, tendões, peles e ossos). A estrutura química da gelatina é mostrada na Figura 3

As gelatinas, na sua forma pura, apresentam-se como de sólidos translúcidos e quebradiços, incolores ou ligeiramente amarelados, quase insípidos e inodoros. As gelatinas são fundidas quando aquecidas e solidificam-se quando são novamente arrefecidas. As gelatinas de mamífero se dissolvem em água quente formando soluções de alta viscosidade, que gelificam a refrigeração abaixo de 35–40 °C. A gelatina também é solúvel na maioria dos solventes polares. As soluções aquosas mostram fluxo viscoelástico e birrefringência de transmissão. A solubilidade da gelatina é determinada pela fonte e pelo método de fabricação (WANDREY et al., 2010)..

Figura 3 – Estrutura química da gelatina.



Fonte: Sahoo et al. (2015).

As moléculas de gelatina contêm sequências repetidas de aminoácidos, como por exemplo, glicina, prolina e alanina. A estrutura primária da gelatina oferece muitas possibilidades de modificação química e agregação de medicamentos covalentes. Isso pode ser feito dentro da matriz ou apenas na superfície da macromolécula. No passado, as modificações químicas eram feitas nas macromoléculas de gelatina. Com a nanotecnologia, a superfície das partículas é usada. Essas propriedades, combinadas com o alto potencial de sistemas de entrega de nanotecnologia, tornam as nanopartículas à base de gelatina um sistema promissor de transporte para entrega de fármacos (SAHOO et al., 2015). A gelatina é utilizada como o principal ingrediente das cápsulas na indústria farmacêutica. Uma propriedade importante dessas cápsulas é que derretem em água a uma temperatura acima de 30°C, e liberam facilmente os medicamentos que contêm no trato digestivo humano devido à temperatura, pH gástrico e enzimas digestivas (DUCONSEILLE et al., 2015; WANDREY et al., 2010). As nanopartículas à base de gelatina são promissoras por serem obtidas de fontes renováveis, serem biocompatíveis, recicláveis e abundantes, possuem capacidade de ligação de vários grupos ativos, além de maior estabilidade durante o armazenamento e *in vivo* (SAHOO et al., 2015).

3.4.2.1 Origem e produção da gelatina

As fontes mais abundantes para a produção de gelatina são pele de suínos (46%), peles bovinas (29,4%), ossos de suínos e bovinos (23,1%) e peles de pescado (1,5%) (DUCONSEILLE et al., 2015; WANDREY et al., 2010). Dependendo da matéria-prima utilizada (fonte e idade do animal), o colágeno não possui exatamente a mesma estrutura, composição e propriedades, e a gelatina também não. A molécula de colágeno, composta por

três cadeias α entrelaçadas, chamada de tripla hélice, adota uma estrutura tridimensional que fornece uma geometria ideal para pontes de hidrogênio. O colágeno é geralmente extraído com tratamento ácido e solubilizado sem alterar a sua tripla hélice. Contudo, o tratamento térmico cliva as pontes de hidrogênio que estabiliza a configuração da tripla hélice, e converte a sua conformação helicoidal em conformação espiralada resultando em gelatina. A desnaturação do colágeno provoca a separação total ou parcial das cadeias devido à destruição das pontes de hidrogênio, causando a perda da conformação da tripla hélice. Portanto, o colágeno e a gelatina são diferentes formas da mesma macromolécula, e a gelatina é a forma parcialmente hidrolisada do colágeno. A composição de aminoácidos da gelatina é similar ao do colágeno de onde foi obtida, e é caracterizada pela sequência de gly-x-y, onde x é na maior parte prolina e y é hidroxiprolina (WANDREY et al., 2010).

A conversão do colágeno em gelatina pode ser obtida através do aquecimento deste, em meio ácido ou alcalino, resultando em dois tipos de gelatina: gelatina de tipo A por tratamento com ácido (pH 1,5–3,0) e tipo B por tratamento alcalino (pH 12). O processo de obtenção da gelatina consiste de três etapas: tratamento da matéria-prima, extração da gelatina e purificação/secagem (DUCONSEILLE et al., 2015; SILVA et al., 2011).

A preparação industrial de gelatina envolve a hidrólise controlada da estrutura organizada do colágeno para obter gelatina solúvel, através de um pré-tratamento ácido ou alcalino da matéria-prima. Em seguida, este material é submetido a uma desnaturação térmica. Durante a desnaturação, a molécula de colágeno é quebrada em pequenos fragmentos e as triplas hélices são separadas, fazendo com que as massas molares variem dependendo da preparação e fonte da matéria-prima. A hidrólise do colágeno pode atingir três resultados: formar três cadeias α independentes, formar uma cadeia β e uma α , ou apenas uma cadeia γ , cuja principal diferença é a massa molar da gelatina. Para a forma α , a massa molar varia de 80 a 125 kDa, para a β , de 160 a 250 kDa e a forma γ possui a massa molar de 240 a 375 kDa. As maiores massas molares usualmente são características de melhores preparações (KARIM; BHAT, 2009).

A severidade do tratamento de extração é determinante para as propriedades funcionais. Gelatinas resultantes de extrações em maiores temperaturas apresentam perfil de massa molar menor do que as frações resultantes de extrações em menores temperaturas (ARNESEN; GILDBERG, 2006). A força do gel é a principal propriedade reológica da gelatina, e o seu valor comercial é baseado principalmente no seu valor de grau Bloom, que é a força do gel, ou poder geleificante. Além da influência da composição de aminoácidos e distribuição da massa molar da gelatina, a força do gel pode variar também com sua

concentração, temperatura e tempo de maturação (CHOI; REGENSTEIN, 2000). Outra característica importante é a temperatura na qual uma solução de gelatina muda do estado sólido ao estado líquido, e vice-versa (temperaturas de gelificação e de fusão). Estas propriedades são governadas pelas proporções dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina no colágeno in natura, pela massa molar, assim como as complexas interações determinadas pelo raio das cadeias α e β presentes na gelatina (HAUG et al., 2004).

Numerosos tipos de gelatina comercial estão disponíveis no mercado. As gelatinas comerciais são misturas proteicas heterogêneas de polipeptídios constituídas por 18 aminoácidos específicos (SAHOO et al., 2015; WANDREY et al., 2010). As gelatinas são anfifílicas, o que fornece boa propriedade emulsionante, e podem se comportar como polieletrólitos em solução aquosa, dependendo do pH. Os pontos isoelétricos das gelatinas tipo A estão na faixa de pH 7–9,4, enquanto que as gelatinas tipo B possuem pontos isoelétricos na faixa de pH 4,8–5,5. Além dessas diferenças, as gelatinas de tipo A geralmente têm viscosidades intrínsecas mais baixas para uma determinada massa molar do que as do tipo B. As propriedades funcionais são dependentes das suas propriedades físico-químicas e estruturais, que são determinantes para definir sua aplicabilidade (DUCONSEILLE et al., 2015).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO OLEOSO

Dentre os fatores ambientais que podem afetar a estabilidade das nanocápsulas contendo concentrados de AGI estão: temperatura, luz e oxigênio. Esses fatores podem ocasionar reações químicas e físicas, como alterações no tamanho e distribuição de tamanho das partículas, formação de precipitados, oxidação e hidrólise de componentes do sistema. O estudo da estabilidade deve incluir a caracterização do produto final e, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento da formulação contendo as nanocápsulas. Várias são as análises importantes para atestar a qualidade do produto final, como estabilidade, tamanho de gota e distribuição, potencial Zeta, forma de associação, comportamento térmico, índice de refração, além do aspecto macroscópico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

3.5.1 Estabilidade das suspensões

As emulsões são sistemas termodinamicamente desfavoráveis que tendem a quebrar ao longo do tempo devido a uma variedade de mecanismos físico-químicos, incluindo a separação gravitacional, floculação, coalescência e maturação de Ostwald. Todos esses mecanismos de instabilidade levam a uma mudança na organização estrutural dos vários componentes dentro do sistema (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014). Os testes de estabilidade para nanoemulsões são muito mais simples e menos requeridos em comparação com dispersões grosseiras, como emulsões e suspensões, onde o diâmetro das gotas e as mudanças de fase ocorrem com mais frequência (QADIR et al., 2016).

A separação gravitacional é uma das formas mais comuns de instabilidade física em emulsões comerciais, e pode assumir a forma de creme (*creaming index*) ou sedimentação, dependendo da densidade relativa das gotículas de óleo e da fase aquosa circundante. O creme é o movimento ascendente das gotículas quando apresentam uma densidade mais baixa do que a fase aquosa, enquanto que a sedimentação é o movimento descendente das gotículas quando elas apresentam uma densidade maior que a fase aquosa. Um dos problemas mais comuns relatados em emulsões de bebidas é o *ringing*, que é o acúmulo de um anel visível de gotículas de óleo no topo de um produto. Este efeito chamado *creaming index* pode ocorrer porque a população de gotículas na emulsão inicial era muito grande ou porque ocorreu algum crescimento de gotículas durante o armazenamento, por exemplo, devido a floculação, coalescência ou maturação de Ostwald. Para uma primeira aproximação, a velocidade que uma gota de óleo move para cima em uma emulsão diluída devido à gravidade é dada pela lei de Stokes (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

A estabilidade da emulsão é controlada pelas propriedades do filme interfacial formado entre a fase aquosa e a oleosa e, pelas características físico-químicas da camada de adsorção formada na superfície dos glóbulos dispersos. Essas propriedades incluem, além da diminuição da tensão interfacial, as características da solução contínua próxima a interface, dependentes da composição e da concentração do agente tensoativo e/ou polímeros utilizados (HOLMBERG, 2010). Esse filme pode induzir forças estéricas e eletrostáticas repulsivas entre glóbulos próximos. A adição de tensoativos permite a formação de uma monocamada adsorvida a interface, e uma dupla camada iônica pode ser formada ao redor dos glóbulos (CAPEK, 2004).

A camada de recobrimento geralmente tem uma densidade maior do que as fases de óleo, de modo que um aumento na fração de volume de material de parede tende a aumentar a densidade global das partículas. Isso tem implicações importantes para a prevenção da separação gravitacional em emulsões de bebidas com tamanhos de gotículas

pequenas, uma vez que reduz o contraste de densidade entre as partículas e a fase aquosa. Além disso, partículas muito pequenas podem realmente sedimentar em vez de formar creme se contiverem camadas emulsionantes suficientemente grossas e densas. Assim, deve ser possível produzir partículas de densidade adequada em emulsões controlando o tamanho do núcleo de óleo e a espessura da camada do material de parede adsorvido, formando as nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

3.5.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD) e Índice de Polidispersão (IPD)

A propriedade física mais importante de nanopartículas é o tamanho, que deve ser estimado com precisão e também pode corresponder a uma distribuição de tamanho. Desde o advento do interesse em nanotecnologia, as medições das nanopartículas já percorram um longo caminho. A dispersão de luz é uma das técnicas mais comumente utilizadas para a determinação do tamanho das partículas em alimentos (BRAR; VERMA 2011).

Espalhamento de luz dinâmico, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons ou dispersão de luz, é uma técnica usada para medir o movimento browniano que relaciona este movimento a um diâmetro hidrodinâmico equivalente com o movimento de partículas menores que estão sendo superestimados através da equação de Stokes–Einstein. Através da iluminação das partículas com um laser e analisando as flutuações de intensidade na luz dispersa, o ELD permite calcular o tamanho das partículas. Através da aplicação da função de autocorrelação e cálculo subsequente do decaimento exponencial, o tamanho médio das partículas pode ser calculado a partir flutuações dependentes do tempo na intensidade da luz. ELD fornece uma avaliação rápida e adequada do tamanho e, é frequentemente usado para avaliar a distribuição de tamanho das partículas, bem como a estabilidade do seu tamanho durante o armazenamento (BRAR; VERMA 2011; LIM et al., 2013; QADIR et al., 2016).

A distribuição de tamanho das gotículas presente em uma nanoemulsão tem grande impacto sobre sua estabilidade física e suas propriedades ópticas. Para isso, imediatamente após o processo de fabricação é muito importante que se obtenha a distribuição do tamanho das gotas, para garantir que o produto final atendeu aos critérios de qualidade esperados. Pode também ser importante para medir alterações na distribuição de tamanho de gota do produto durante a armazenagem, ou acompanhar um ensaio de armazenagem acelerada para prever a sua estabilidade em longo prazo (McCLEMENTS, 2007; PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

A mudança das propriedades reológicas deve-se principalmente à variação de diâmetro médio de gota. As proteínas, por exemplo, são substâncias com atividade de superfície utilizadas para estabilizar as emulsões por adsorção na interface óleo-água, desse modo, reduzindo a tensão interfacial, e formando uma barreira de energia mecânica na interface contra coalescência no sistema de emulsão. A maioria dos sistemas de emulsão usados em alimentos e bebidas apresentam um comportamento de pseudoplasticidade, o que é importante para diminuir a viscosidade sob fluxo durante o consumo (ZHANG et al. 2014).

A concentração de partículas dentro de uma classe de tamanhos é geralmente apresentada como volume ou número por cento, enquanto que o tamanho das partículas é normalmente apresentado como o raio da partícula, quer do ponto médio ou do diâmetro. A mesma distribuição de tamanho de partícula pode parecer muito diferente se for representada graficamente como volume versus tamanho de partículas ou como número versus tamanho de partículas. Emulsões de bebidas comerciais, por exemplo, são sempre sistemas polidispersos que podem ser caracterizados como sendo "monomodal", "bimodal" ou "multimodal" dependendo se há um, dois, ou mais picos na distribuição de tamanho de partícula. O ideal é a obtenção de uma distribuição monomodal estreita, o que normalmente fornece a melhor estabilidade em longo prazo. Por exemplo, pode ser possível detectar uma pequena população de partículas grandes que podem causar problemas com a formação de creme durante a armazenagem em longo prazo (LIM et al., 2013; PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

Um segundo número importante é o índice de polidispersão (IPD), que é uma medida da largura da distribuição de tamanho de partícula. A polidispersão é um parâmetro calculado da análise da função de autocorrelação em medidas de espalhamento de luz dinâmico. Nesta análise assume-se que as partículas possuem tamanho único e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação. Os valores de polidispersão variam de 0 a 1. Um valor mais alto indica uma distribuição menos homogênea no tamanho das nanopartículas. Tipicamente, os diâmetros medidos com ELD variam entre 100 e 300 nm e possuem um índice de polidispersão inferior a 0,3. É importante saber como interpretar intensidade, volume e número. Índices de polidispersão inferiores a 0,1 são tipicamente referidos como "monodisperso". Se este não for o caso, então a amostra é polidispersa e contém tamanhos variados de partículas. Uma vez que cada tamanho tem uma função de correlação diferente, mais ampla será a distribuição, e pior será o ajuste. Se a polidispersão for superior a 0,3, significa que as distribuições são multimodais, mostrando picos múltiplos, isto é um sinal adicional de que a amostra é polidispersa ou existem partículas contaminantes misturadas com a amostra (LIM et al., 2013; NANOCOMPOSIX, 2015).

3.5.3 Potencial Zeta

Alterações na superfície das nanopartículas podem ser medidas pela estimativa do potencial de superfície, densidade de grupos funcionais ou pelo aumento na hidrofília da superfície. Um dos métodos para medir essas alterações é a determinação do potencial Zeta das suspensões. O potencial Zeta reflete a composição da interface das nanopartículas, seja em relação aos tensoativos utilizados ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A determinação do potencial Zeta é geralmente realizada utilizando técnicas eletroforéticas específicas. Elevados valores de potencial Zeta, acima de 20mV, positivos ou negativos, sugerem suspensões de nanocápsulas mais estáveis, devido à repulsão entre as partículas que previne sua agregação. O potencial Zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, já que indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas (BENITA; LEVY, 1993; PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014; ROLAND et al., 2003).

Para as emulsões estéricamente estabilizadas, a carga de gotículas pode não ser importante em termos de sua estabilidade física, mas ainda pode ser importante em sistemas onde ocorrem reações químicas dentro das gotículas de óleo, que são induzidas por espécies iônicas solúveis em água, como a oxidação de AGI por metais de transição (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014). O potencial Zeta pode ser determinado na formulação de nanoemulsões ricas em AGI para indicar a estabilidade desejada e a carga da superfície (VYAS; SHAHIWALA; AMIJI, 2008).

O limite entre as fases de óleo e de água numa emulsão é constituído por uma zona estreita que rodeia cada gota de óleo, e contém uma mistura de óleo, água, e moléculas de emulsionantes, bem como, eventualmente, outras espécies moleculares. A região interfacial faz uma fração significativa do volume de uma gota quando o diâmetro das gotículas é inferior a 1 mm. A região interfacial pode influenciar muitas propriedades físico-químicas importantes e propriedades sensoriais de nanoemulsões, incluindo a sua estabilidade, reologia, sensação na boca e sabor. Algumas das propriedades mais importantes da região interfacial são: composição, organização estrutural, espessura, reologia, tensão interfacial e carga. A carga elétrica na interface da gotícula influencia a sua interação com outras moléculas carregadas, bem como a sua estabilidade para a agregação. A espessura e a reologia da região interfacial influenciam a estabilidade de emulsões, a separação gravitacional, a coalescência e a floculação. Por este motivo, muitas vezes é importante ter um

conhecimento sobre as propriedades interfaciais das gotículas em uma emulsão, e para estabelecer os principais fatores que as influenciam (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

A investigação da natureza das ligações entre o material de parede e as gotículas lipídicas, e da influência desta natureza nas propriedades físico-químicas da emulsão pode revelar informações úteis para a formulação de novos alimentos com diferentes propriedades reológicas (YUAN et al., 2013). A incorporação de um agente tensoativo na emulsão diminui a tensão interfacial entre óleo e fase aquosa, que por sua vez reduz a viscosidade da emulsão. O comportamento interfacial é um aspecto importante tanto para a formação da nanoemulsão quanto para a estabilidade (ZHANG et al. 2014).

3.5.4 Difração de raios X (DRX) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os lipídios podem apresentar diferentes formas polimórficas. O polimorfismo é observado devido à organização das cadeias de alcanos nos empacotamentos α (hexagonal), β' (ortorrômbica) e β (triclínica). O empacotamento hexagonal α é a forma mais desordenada, a ortorrômbica β' é menos desordenada e o empacotamento triclínico β é o mais organizado. Desta forma, para uma aplicação industrial das partículas é necessário controlar este polimorfismo (ALLAIS, 2003; BUNJES et al., 2007). A estrutura polimórfica tem influência direta na eficiência de encapsulamento e na liberação do ativo durante o processo de estocagem sendo, portanto, muito importante a sua caracterização. Uma das técnicas empregadas para caracterizar a estrutura polimórfica das nanocápsulas lipídicas é a difração de raios-X, que determina o comprimento dos espaçamentos longos e curtos do retículo lipídico. Além disto, a difração de raios-X permite diferenciar entre um material amorfo e um material cristalino e serve para, por exemplo, avaliar a influência do constituinte óleo presente em nano estruturas (MEHNERT; MADER, 2001; MÜLLER et al., 2000; RUKTANONCHAI et al., 2008).

As técnicas de difração de raios-X são uma família de técnicas analíticas não-destrutivas que revelam informações sobre a estrutura cristalográfica, composição química e propriedades físicas dos materiais. DRX é baseada na observação da intensidade dispersa de um feixe de raios-X atingindo uma amostra como uma função de ângulos incidentes e dispersos, polarização e comprimento de onda ou energia. DRX é utilizado principalmente para a identificação de materiais monofásicos, determinação da estrutura cristalina, identificação e análise estrutural de amostras, reconhecimento de materiais amorfos em misturas parcialmente cristalinas, determinação do tamanho do cristal a partir da análise do

alargamento do pico e estudo da expansão térmica em estruturas cristalinas, usando equipamento de aquecimento por etapas. É importante a associação desta técnica com a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC), visto que, o DSC permite diferenciar sólidos amorfos e líquidos (MEHNERT; MADER, 2001; MÜLLER et al., 2000; QADIR et al., 2016; RUKTANONCHAI et al., 2008).

Além das análises das substâncias que compõe os óleos ricos em AGI, pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de verificar a qualidade dos alimentos enriquecidos. Dentre as pesquisas pode-se citar a análise do efeito da temperatura de processamento a que esses alimentos são submetidos. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) monitora efeitos de calor associados com transições de fase e de reações químicas, como uma função da temperatura. A referência é um material inerte. As temperaturas da amostra e do material inerte sofrem um aumento à taxa constante. A amostra de referência deve ter uma capacidade calorífica bem definida nos intervalos de temperaturas a serem verificados. Durante o aquecimento de uma amostra, por exemplo, desde a temperatura ambiente até à sua temperatura de decomposição, picos de variação de entalpia podem ser obtidos, cada pico corresponde a um efeito de calor associado com um processo específico, tal como cristalização ou fusão (BANERJEE et al., 2013; REY et al., 1993). Devido a capacidade calorífica da célula de DSC ser conhecida, esta diferença de temperatura pode ser convertida em entalpia. A representação gráfica da técnica DSC é observada em curvas chamadas termogramas. Os eventos térmicos são representados por picos ou desvios da linha da base da curva e, por convenção, assume-se que eventos acima da linha da base são exotérmicos, e abaixo são endotérmicos. A área do pico pode ser relacionada com a variação da entalpia (GRANATO; NUNES, 2016).

A técnica DSC pode ser utilizada para adquirir informações qualitativas sobre o estado físico do concentrado de AGI presentes na nanoemulsão. As curvas DSC podem ser utilizadas com sucesso para detectar transições de fase, incluindo o revestimento de regiões cristalinas, e para analisar a proporção de gordura sólida ou a proporção de cristais de gelo da nanoemulsão. Os termogramas obtidos pela análise de DSC fornecem a temperatura e o calor de fusão das amostras, e esta técnica pode também ser utilizada para a determinação da morfologia dos cristais das amostras, que também pode ser verificada por difração de raios-X (BANERJEE et al., 2013; REY et al., 1993).

3.5.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situadas entre as regiões do visível e das micro-ondas. A porção de maior utilidade para as análises estão situadas entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . A espectroscopia de infravermelho baseia-se em uma radiação infravermelha que passa através de uma amostra, onde é principalmente absorvida pela amostra e uma parte dela é transmitida. O espectro resultante representa a absorção e transmissão molecular, criando a impressão digital da amostra. Cada amostra apresenta seus picos de absorção característicos que correspondem às frequências de vibrações entre as ligações dos átomos do material. Como cada material diferente é uma combinação única de átomos, nenhum composto produz o mesmo espectro infravermelho. Portanto, a FT-IR resulta em identificação positiva de diferentes adições de materiais ao tamanho dos picos no espectro que é uma indicação direta da quantidade de material presente na amostra (QADIR et al., 2016; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Na FT-IR a radiação contendo todos os comprimentos de onda é separada em dois feixes. Um deles permanece fixo, e o outro se move (espelho móvel). Fazendo-se variar as distâncias percorridas pelos dois feixes, obtêm-se uma sequência de interferências construtivas e destrutivas e, conseqüentemente, variações na intensidade de radiação recebida pelo detector, chamado interferograma. Uma transformação de Fourier converte o interferograma obtido, dando origem ao espectro completo de infravermelho. As principais vantagens da FT-IR são de que ela pode determinar a qualidade ou consistência de uma amostra, o pequeno tempo necessário para análises (porque todas as frequências são medidas simultaneamente) e o fato de ser um método muito sensível. Essas vantagens tornam as medidas feitas por FT-IR extremamente precisas e reprodutíveis (QADIR et al., 2016; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

De acordo com Belhaj et al. (2010), a estabilidade oxidativa de amostras pode ser acompanhada, entre outros métodos, por espectroscopia de infravermelho (FT-IR). Ela permite a determinação quantitativa e qualitativa de compostos orgânicos em amostras e a intensidade das bandas no espectro é proporcional à concentração. O aumento da oxidação é monitorado pelo crescimento da banda de absorção na região da hidroxila.

3.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas e estado de agregação podem ser verificados utilizando alguma forma de microscopia. A microscopia óptica convencional só pode ser utilizada para estudar microestruturas grandes ($d > 1000$ nm), sendo insuficiente para estudar a morfologia de nanopartículas devido a sua resolução da microscopia. Neste caso, a microscopia eletrônica é mais adequada, tendo a resolução necessária para estudar partículas nanométricas (JOYE; McCLEMENTS, 2014).

MEV é capaz de produzir imagens de alta resolução de uma superfície de amostra. As imagens têm uma aparência tridimensional característica e são úteis para determinar a estrutura da superfície. Também é capaz de produzir imagens de alta resolução com maior ampliação. A maior ampliação produz maior profundidade de campo, maior resolução e facilidade de observação de amostras (QADIR et al., 2016).

A análise por MEV pode fornecer informações sobre as características de superfície, tais como composição e topologia. As amostras devem ser congeladas, secas ou fraturadas e, posteriormente, revestidas com compostos de metal, o que significa que é preciso ter cuidado para que a estrutura da amostra não seja alterada antes da observação (JOYE; McCLEMENTS, 2014). As micrografias podem verificar características físicas das partículas após determinado período de armazenamento e, verificar se houve degradação em relação ao material no tempo inicial. Além disso, as imagens de MEV podem ser utilizadas para a visualização da morfologia de microcápsulas secas por liofilização, onde após a secagem da suspensão são esperadas superfícies altamente porosas (KARACA et al., 2013), e também para verificar a integridade das partículas após a sua adição no alimento.

3.6. MÉTODOS DE SECAGEM

Para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas existe a dificuldade de incorporar fármacos, o que exige o desenvolvimento de formulações, e o estudo das estabilidades química e física em longo prazo, uma vez que estas são preparadas em meio líquido. Agregação e fusão das partículas podem ocorrer após um longo período de estocagem (DE JAEGHERE et al., 1999), além de degradação dos constituintes da formulação e contaminação microbiana.

Os produtos alimentícios baseados em preparações por emulsificação apresentam algumas desvantagens, como o risco de oxidação. Nestes sistemas sugere-se que a oxidação

lipídica é iniciada na interface entre a fase oleosa e a fase aquosa, ou entre a fase oleosa e o ar. Como a fase contínua é aquosa, pode ocorrer degradação polimérica por hidrólise, além da instabilidade físico-química, em virtude da agregação e sedimentação das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Tendo em vista que, estes problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através de uma operação de secagem, vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas sólidas (como microestruturas) para as nanocápsulas, ampliando as perspectivas para a utilização destes sistemas carreadores de fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O estudo de secagem refere-se à remoção de água e outros líquidos ou solventes orgânicos de materiais sólidos. A secagem ou desidratação de materiais biológicos se usa também como uma técnica de preservação. Os microrganismos que provocam a decomposição dos alimentos não podem crescer e multiplicar-se em ausência de água, apresentando suas atividades diminuídas quando o conteúdo de água se reduz a menos que $10 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ (base úmida, b.u.). Porém, geralmente é necessário reduzir este conteúdo de umidade para cerca de $5 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ (b.u.) para preservar o valor nutritivo. Materiais secos podem ser armazenados por grandes períodos de tempo sem perda de suas características (GEANKOPLIS, 1998). A secagem das suspensões de nanopartículas pode ser realizada através da operação de sublimação (liofilização), e esta operação é indicada para ingredientes sensíveis ao calor (SCHAFFAZICK et al., 2003).

3.6.1 Liofilização

Alguns produtos alimentícios, farmacêuticos e biológicos que não devem ser expostos à altas temperaturas em uma secagem convencional, podem ser secos por liofilização. Em geral, o material a ser seco é exposto a um ambiente muito frio. A liofilização ou criosecagem é uma operação de desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura tais que a água, previamente congelada, passa do estado sólido diretamente para estado gasoso (sublimação) (ORDOÑEZ et al., 2005). Segundo Reis et al. (2006), a liofilização pode ser um processo altamente estabilizador. É geralmente aplicada para melhorar a estabilidade físico-química das nanopartículas para conseguir um produto industrialmente aceitável, especialmente nos casos em que as condições de armazenamento são desfavoráveis.

Como a liofilização é realizada em baixas temperaturas e na ausência de ar atmosférico, as características nutritivas do produto final praticamente não são alteradas. O congelamento é considerado o ponto mais importante do processo. Tem como objetivo transformar as soluções aquosas da amostra em uma mistura de duas fases: uma constituída por cristais de gelo, e a outra pela solução concentrada dos solutos. O tipo e a velocidade de congelamento apresentam grande repercussão na estrutura final do produto, pois a distribuição de poros neste depende do tamanho e da localização dos cristais de gelo formados (ORDOÑEZ et al., 2005).

A segunda etapa é a secagem. Dependendo das condições de temperatura e de pressão, qualquer substância pode se apresentar sob um dos três estados de agregação: sólido, líquido ou gasoso. Em determinadas condições podem coexistir duas ou três fases. A uma certa pressão e temperatura pode-se ter o chamado ponto triplo, que possibilita a coexistência das três fases. A temperatura e pressão mais baixas que as do ponto triplo, a fase líquida deixa de existir e a substância passa direto do estado sólido para o gasoso. O ponto triplo da água é definido como uma temperatura de aproximadamente 0 °C e pressão de 4,7 mm Hg (ORDOÑEZ et al., 2005).

Na secagem, o vácuo é iniciado e o gelo é sublimado por pressão reduzida. À medida que o gelo sublima, a amostra fica porosa. O vapor originado na interface atravessa o material seco na câmara de liofilização e é condensado abaixo da câmara de secagem, no condensador. E por último, a segunda secagem na qual é retirada a água residual adsorvida a microestrutura obtendo-se o material seco. A liofilização dá lugar a produtos alimentícios e farmacêuticos de mais alta qualidade comparados a qualquer outro método de secagem. O principal fator para que isto ocorra é a rigidez estrutural, que se preserva na substância congelada quando acontece a sublimação. Isto evita o colapso da estrutura porosa depois de seca. As temperaturas baixas que são utilizadas reduzem ao mínimo as reações de degradação que quase sempre ocorrem nos processos comuns de secagem (ORDOÑEZ et al., 2005).

3.7 ADSORÇÃO DE ÁGUA

Existem quatro fatores principais que afetam a oxidação dos lipídios encapsulados durante a produção e estocagem: temperatura, atividade de água (a_w), umidade e temperatura de transição vítrea. Um aspecto consideravelmente interessante é o efeito da atividade de água nas mudanças físicas da matriz sólida de aprisionamento de lipídios, que pode afetar a distribuição do óleo e, conseqüentemente, a acessibilidade do oxigênio a ele. Após a secagem,

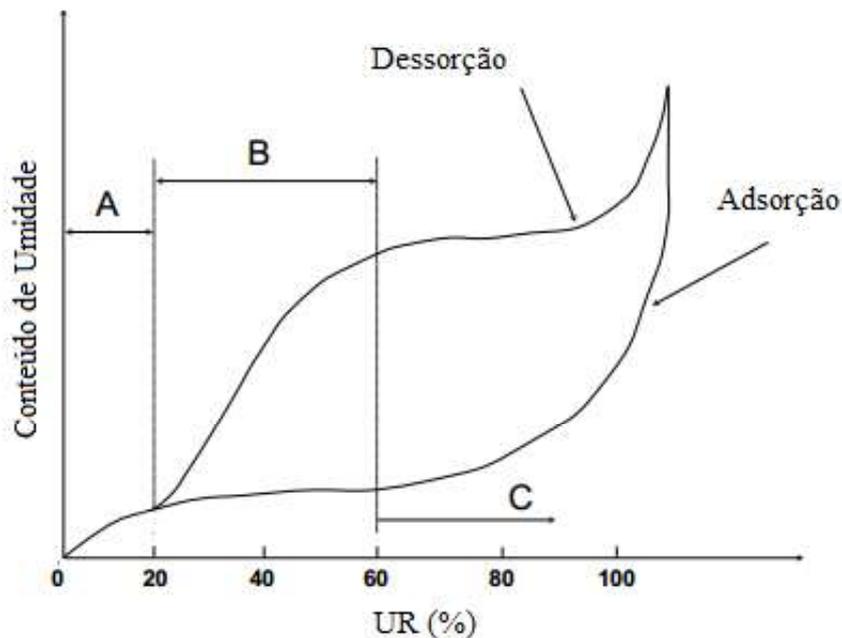
é obtida uma matriz sólida altamente viscosa no estado amorfo vítreo. Quando o teor de umidade ou a temperatura aumenta, o sólido muda do estado vítreo amorfo para um estado “borrachoso” com alta mobilidade molecular. A temperatura na mudança de estado, denominada temperatura de transição vítrea, depende da natureza da matriz sólida e, diminui à medida que o teor de umidade aumenta. Como a mobilidade molecular é aumentada pelo efeito plastificante da água ou pela temperatura, o chamado colapso pode ocorrer. Essas mudanças físicas estão associadas à liberação parcial de lipídios encapsulados, e o óleo liberado pode então estar mais exposto e passar por uma rápida oxidação (ESCALONA–GARCÍA et al., 2016).

A atividade da água e a temperatura de transição vítrea estão inter-relacionadas e, em conjunto, provocam mudanças estruturais na matriz da microcápsula, eventualmente levando ao colapso, adesividade e encolhimento, de modo que ambos têm influência na estabilidade de um sistema alimentício (ESCALONA–GARCÍA et al., 2016). O potencial químico da água no material é igual ao potencial químico de vapor de água no ambiente, e a atividade de água definida como a razão da fugacidade da água no material em relação a fugacidade da água pura a mesma temperatura. No equilíbrio a relação entre a_w do material e umidade relativa (%UR) do ar no ambiente é dada pela Equação 1:

$$a_w = \frac{\%UR}{100} \quad (1)$$

A umidade de equilíbrio é definida como sendo o conteúdo de umidade que o material apresenta quando a pressão de vapor da água em sua superfície se iguala a pressão de vapor da água do ar que o envolve. A relação entre o conteúdo de umidade do material e a atividade de água correspondente, para uma dada temperatura, é conhecida como isoterma de sorção. As isotermas podem representar a perda de umidade (dessorção) ou o ganho de umidade (adsorção) em função da atividade de água do meio. O conhecimento destas curvas de sorção é indispensável para determinar o teor de água final necessário para estabilizar um produto e, impedir crescimento de bactérias, leveduras, fungos, oxidação lipídica entre outros.

As isotermas de adsorção podem ser utilizadas para prever mudanças na estabilidade dos alimentos, determinar e selecionar os métodos de estocagem. Na operação de secagem, a umidade de equilíbrio determina o ponto final de secagem e, portanto, o uso racional para se obter um produto de umidade desejável e menor custo (PARK et al, 2014). A Figura 4 mostra a forma típica das isotermas de sorção.

Figura 4 – Curva típica de isoterma de sorção

Fonte: Mujumdar (2006).

Na Figura 4, as curvas são caracterizadas por três zonas distintas, A, B e C. Na região A a água está fortemente ligada aos sítios e não está disponível para reação. Nesta região há essencialmente sorção de vapor de água na monocamada, não existindo diferença nas curvas de dessorção e adsorção. A seção B é uma região de transição em que a sorção ocorre nas multicamadas. Na seção C a inclinação da curva aumenta drasticamente, o que é atribuído a condensação capilar e excesso de água em capilares maiores, estando disponível como solvente (MUJUMDAR, 2006).

Um grande número de modelos (teóricos, semiempíricos e empíricos) têm sido propostos na literatura para descrever a umidade de equilíbrio. Uma das importantes aplicações das equações de isoterma é a energia de ligação de água e umidade da monocamada molecular, que indicam a relação com as reações químicas que determinam a deterioração dos materiais biológicos, através das áreas expostas da matriz sólida (PARK, et al. 2014). Os modelos mais citados são GAB (Guggenheim, Anderson e de Bôer) e BET (Brunauer, Emmet e Teller) (ANDERSON, 1946; BRUNAUER et al., 1940), os quais seus parâmetros possuem significado físico, e estão apresentados nas Equações 2 e 3, respectivamente:

$$X_e = \frac{X_m C_G k a w}{(1 - k a w)(1 - k a w + C_G k a w)} \quad (2)$$

$$X_e = \frac{X_m C_B a_w}{(1-a_w)(1-a_w+C_B a_w)} \quad (3)$$

sendo X_e a umidade de equilíbrio do material ($\text{kg}_{\text{água}} \text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$), X_m a umidade da monocamada ($\text{kg}_{\text{água}} \text{kg}_{\text{ss}}^{-1}$), C_G , C_B e k os parâmetros de ajuste.

O modelo da isoterma de Guggenheim, Anderson e Boer (GAB) Equação (2) tem sido usado para descrever o comportamento da sorção nos alimentos. O modelo conta com um número razoável de parâmetros (três), o qual representa adequadamente os dados experimentais numa atividade de água de interesse prático nos alimentos, que varia entre 0,10 a 0,90. A equação de GAB é conhecida como a equação fundamental para caracterizar a sorção de água dos alimentos (BETIOL, 2016).

O modelo da isoterma de Brunauer, Emmet e Teller (BET) é um dos mais empregados para determinar o conteúdo de umidade da monocamada nos alimentos. As duas constantes obtidas do modelo de BET são o teor de umidade da monocamada (X_e) e a constante de energia (C_B , adimensional), as quais se derivam da equação de Langmuir. O modelo opera em uma gama limitada de a_w , no entanto, o conceito de monocamada de BET é um ponto positivo para a estabilidade da umidade de alimentos secos e, um indicador de estabilidade com relação ao teor de umidade (BETIOL, 2016).

Ambas as isotermas (BET e GAB) estão intimamente relacionadas, pois seguem o mesmo modelo estatístico. Ao postular que, os estados das moléculas de água na multicamada são iguais uns aos outros, mas diferentes daquele no estado líquido, o modelo GAB introduziu um segundo estágio de sorção bem diferenciado para as moléculas de água. Este pressuposto introduz um grau adicional de liberdade (uma constante adicional, k) pelo qual o modelo GAB ganha maior versatilidade. As duas constantes GAB, denotadas por C_G e k , são constantes de energia como a constante BET C_B , mas com significados físicos ligeiramente diferentes. A constante C_B de BET está relacionada à diferença entre o potencial químico das moléculas de sorbato no estado líquido puro e na primeira camada de sorção. Por outro lado, a constante C_G de GAB está relacionada à diferença dessa magnitude nas camadas superiores e na monocamada, enquanto a constante k está relacionada a diferença no sorbato puro em estado líquido e na multicamada. Além disso, a constante k de GAB é, praticamente sem exceção, próxima, porém menor que a unidade, fato que constitui uma característica significativa dessa isoterma (TIMMERMANN; CHIRIFE; IGLESIAS, 2001).

Na literatura também são citados outros modelos semiempíricos e empíricos mais simples e que são utilizados para a previsão da umidade de equilíbrio, como por exemplo, o

modelo de Oswin (KAYA; KAHYAOGU, 2007). O modelo de Oswin (1946) foi desenvolvido através de dois parâmetros empíricos aplicando a solução de séries progressivas para curvas sigmóides. O modelo é bastante simples para operar e válido para determinar a umidade de equilíbrio nas isotermas de sorção de alimentos granulados (farinhas e cereais), carnes e vegetais. O modelo obtido é representado pela Equação 4 (BETIOL, 2016):

$$X_e = A_1 \left(\frac{a_w}{1-a_w} \right)^{B_1} \quad (4)$$

sendo A_1 , B_1 parâmetros de ajuste do modelo.

As funções termodinâmicas são calculadas a partir das isotermas de sorção, o que permite a interpretação dos resultados experimentais de acordo com a afirmação da teoria. A termodinâmica da sorção de vapor de água fornece um critério confiável para prever a estabilidade do armazenamento e a vida útil de produtos alimentares secos. A análise termodinâmica da sorção precisa do conhecimento do comportamento das isotermas em função da temperatura.

De acordo com Lago e Noreña (2015), os parâmetros termodinâmicos diferenciais revelam informações qualitativas sobre os diferentes níveis de energia na adsorção de água. Se a água adsorvida for considerada organizada em várias camadas de adsorção, cada uma apresentando diferentes intensidades de interação entre adsorvente e adsorbato, tanto a entalpia como a entropia quantificam os estados energéticos das moléculas de água adsorvidas em diferentes camadas, e desta forma, a entalpia quantifica os níveis de energia e a entropia mede o grau de aleatoriedade ou desordem das moléculas de água no sistema. Assim, a entropia integral mínima pode ser interpretada como o teor de umidade requerido para formar uma monocamada, onde a atividade da água em que um produto seco é mais estável, e fortes ligações ocorrem entre a água (adsorbato) e o alimento (adsorvente) que corresponde a menos água disponível para reações químicas e de deterioração (ESCALONA–GARCÍA et al., 2016).

3.8 NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS

Micro e nanocápsulas são sistemas vesiculares em que uma determinada substância está confinada a uma cavidade, consistindo em um núcleo interno líquido rodeado por uma membrana polimérica (COUVREUR et al., 1995). Neste caso, as substâncias ativas

são normalmente dissolvidas no núcleo interno, mas também podem ser adsorvidas na superfície da cápsula. O material de parede consiste na barreira externa e geralmente é feito de compostos que formam uma rede com a estrutura. Esses compostos são normalmente polímeros (por exemplo: gelatina e quitosana) (ASSIS et al., 2012; REIS et al., 2006). Os sistemas de entrega baseados em emulsão são usados para encapsular AGI e outros nutracêuticos lipofílicos e são capazes de transportar, distribuir e proteger os conteúdos altamente suscetíveis às condições ambientais, de processamento e/ou gastrointestinais (NEJADMANSOURI et al., 2016).

Sistemas baseados em emulsões com várias estruturas têm sido utilizados para a entrega de ingredientes alimentares lipofílicos. As emulsões podem ser fornecidas no estado líquido, gelificado ou em pó (AUGUSTIN; HEMAR, 2008). Os sistemas de entrega mais amplamente usados para a incorporação de óleos omega-3 nos alimentos e bebidas são os óleos a granel, emulsões e pós. Existem desafios consideráveis para incorporar omega-3 em muitos tipos de produtos alimentares funcionais, devido à sua baixa solubilidade em água, baixa estabilidade química, e biodisponibilidade variável (WALKER et al., 2015a). Os pós microencapsulados podem ser utilizados para mistura com outros ingredientes secos, ou incorporados em alguns produtos alimentares em várias fases durante o processamento (por exemplo, pós de óleo ômega-3 encapsulado em fórmulas para lactentes, barras de café da manhã, leites, ovos, patês e iogurtes) ou reconstituído antes da sua incorporação em produtos líquidos (AUGUSTIN; HEMAR, 2008).

O encapsulamento fornece um isolamento de substância usando um material circundante, capaz de prolongar a vida útil do produto (NEDOVIC et al., 2011). A quitosana e a gelatina podem ser utilizadas para preparar nanocápsulas para diferentes propósitos. A variedade dos tipos de quitosana e gelatina permite a preparação de cápsulas de diferentes formas e tamanhos. Devido ao seu grande uso em sistemas de liberação modificada de fármacos, esses polímeros têm sido largamente estudados pela indústria farmacêutica (GONSALVES et al., 2009). Os métodos propostos para preparar as cápsulas são baseados na formação espontânea de complexos entre os polímeros e poliânions, ou a gelificação de uma solução de polímero dispersa em uma emulsão de óleo (REIS et al., 2006).

A literatura apresenta estudos sobre o encapsulamento do óleo de peixe por emulsões (NEJADMANSOURI et al., 2016, PRIETO; CALVO, 2017), micro e nanopartículas (YANG; CIFTI, 2017), lipossomas (GHORBANZADE et al., 2017), pós (BINSI et al., 2017), nanofibras (GARCÍA-MORENO, et al., 2017). Klaypradit e Huang (2008) estudaram o encapsulamento de óleo de atum com quitosana, e a análise de tamanho

de partícula mostrou que a interação entre o material de parede e o óleo tem capacidade de evitar a instabilidade da emulsão, podendo levar a aplicação na indústria alimentícia para melhorar a estabilidade.

Na maioria dos casos, a fração lipídica das cápsulas é obtida a partir de óleo de pescado refinado, sendo o uso de concentrados de AGI uma opção promissora. Paralelamente a isso, a nanoescala atrai atenção devido ao seu pequeno tamanho que oferece vantagens em relação às micropartículas, como maior estabilidade e absorção intestinal. Yu et al. (2017) demonstraram que compostos bioativos e biopolímeros como materiais de parede podem atuar sinergicamente e, são uma alternativa na elaboração de alimentos funcionais.

A ingestão de óleo rico em ω -3, incorporado em emulsões convencionais, não é sempre bem recebida pelos consumidores, devido principalmente ao seu cheiro característico e, tendência a produzir um refluxo desagradável. Estudos de desenvolvimento de novos veículos orais com uma melhor aceitação por parte do consumidor e uma maior biodisponibilidade seria altamente benéfico (DEY et al., 2012). Nanocápsulas de ômega-3 podem ser utilizados na indústria alimentícia para fortificar alimentos e bebidas com estes lipídios bioativos, ou elas poderiam ser usadas na indústria de suplementos ou farmacêutica para aumentar a bioatividade terapêutica de ácido graxo ômega-3.

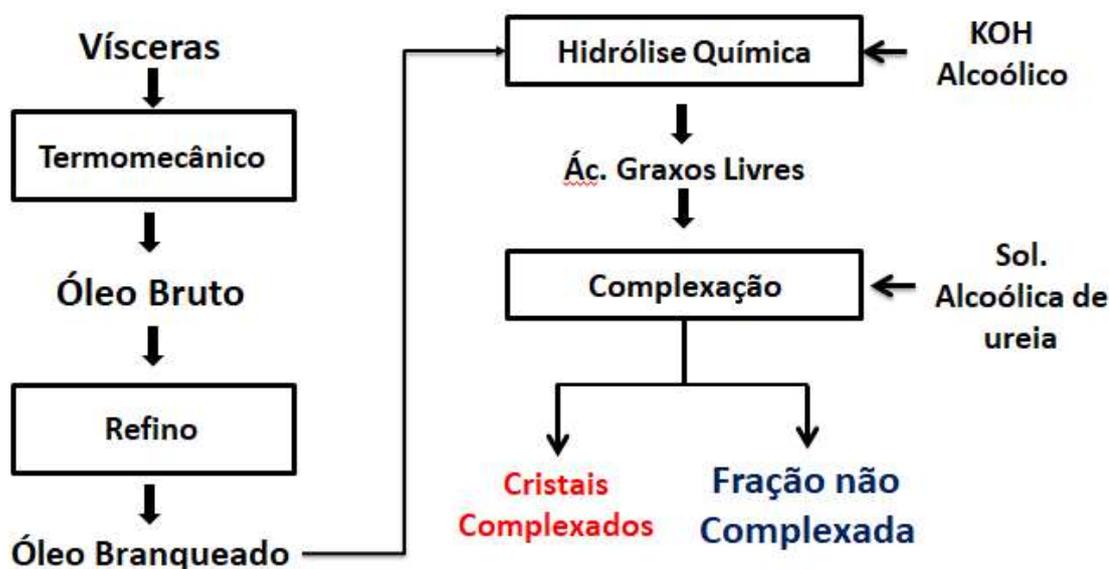
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

Os AGI foram obtidos de vísceras de carpa comum (*Cyprinus carpio*) fornecidas por um piscicultor do município de Roca Sales – RS, Brasil, seguindo o fluxograma apresentado na Figura 5. Após o abate das carpas (Figura 6(a)), as vísceras (Figura 6(b)) foram imediatamente refrigeradas e transportadas até o Laboratório de Tecnologia Industrial/EQA/FURG, onde foram armazenadas em congelador (-10°C) até sua utilização.

O óleo bruto foi extraído de acordo Crexi et al. (2009). Inicialmente a matéria-prima foi submetida à cocção (1,5 kg) (Rochedo – Idealclave, Brasil) durante 30 min à 98±2 °C. Em seguida, ocorreu a prensagem obtendo-se o licor de prensa e os sólidos. A separação do óleo bruto de pescado do licor de prensa foi realizada por centrifugação (Sigma 6–15, D–37250, Alemanha), com rotação de 7000 × g durante 20 min à 25°C, obtendo-se o óleo bruto de pescado (Figura 6(c)) (180 g).

Figura 5 – Fluxograma de extração, refino e concentração do óleo de pescado.

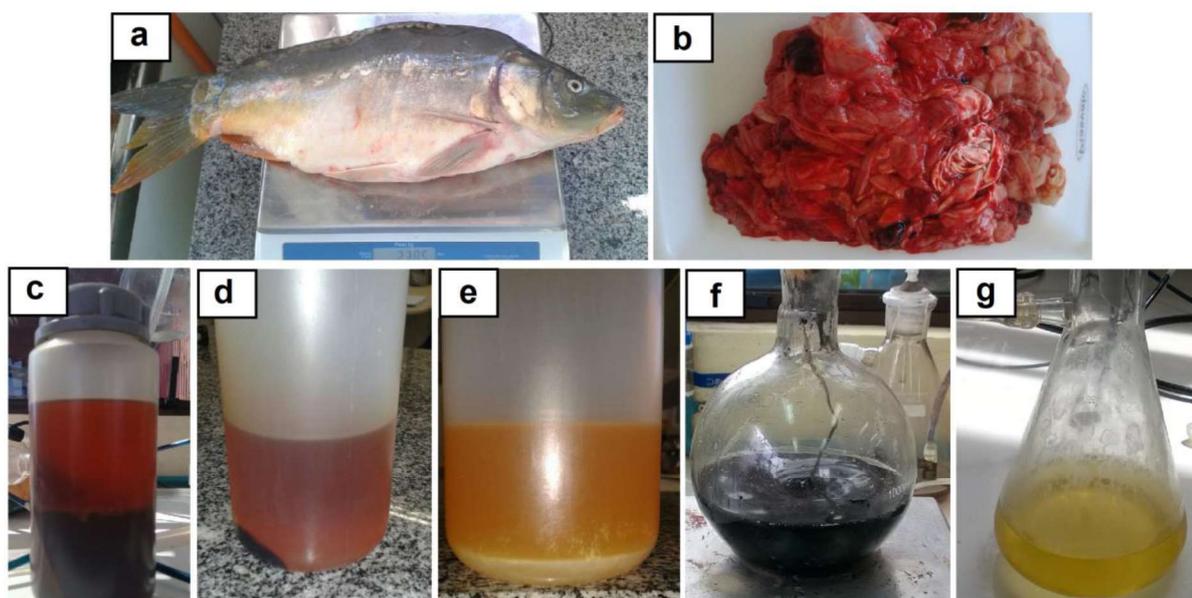


O óleo bruto obtido passou pelas etapas do processo de refino químico (degomagem, neutralização, lavagem, secagem e branqueamento), realizadas segundo Crexi et al. (2010). Para a realização da degomagem, a massa de óleo bruto foi pesada e elevada a uma temperatura de 80°C, sob vácuo de 710 mmHg e agitação de 500 rpm, com adição de 1,0% de ácido fosfórico (85% v/v) em relação à massa do óleo. Essas condições foram

mantidas por 20 min com posterior centrifugação para separação das gomas (Figura 6(d)). A etapa de neutralização ocorreu sob vácuo (710 mmHg) e agitação a 40°C durante 20 min, com adição de solução de hidróxido de sódio 0,2 kg kg⁻¹ (utilizando 4,0% de excesso em relação ao índice de acidez determinado após a etapa da degomagem). A temperatura foi rapidamente elevada à 80°C para facilitar a separação da borra formada. Assim que a temperatura de 80°C foi atingida, o óleo foi resfriado até 35°C, sob vácuo (710 mmHg). Após esse procedimento o material foi centrifugado por 20 min a 7000 × g, para a separação da borra (Sigma 6–15, D–37250, Alemanha) (Figura 6(e)).

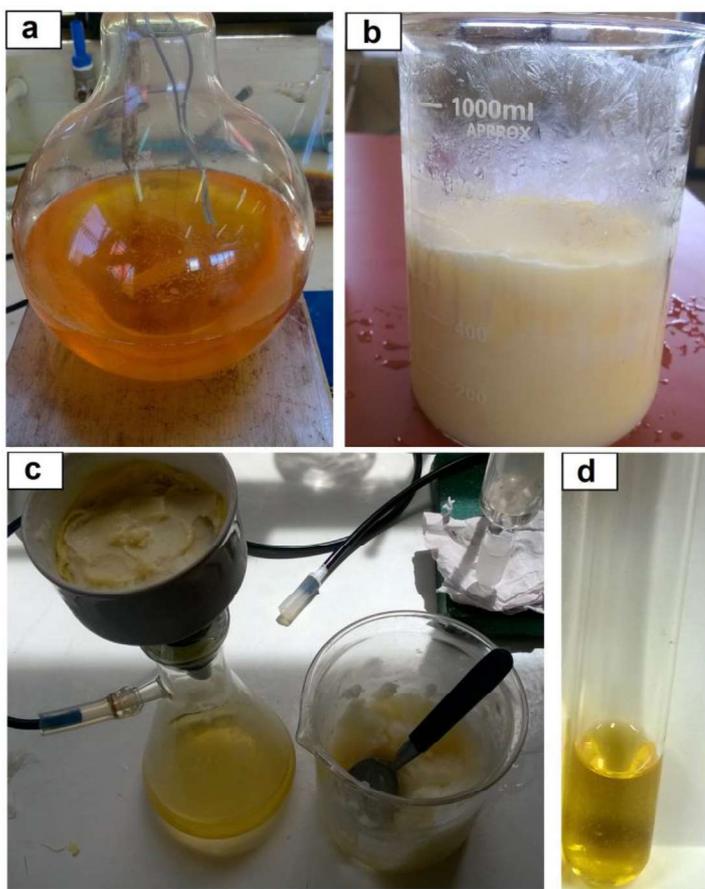
Na etapa de lavagem, adicionou-se água destilada a 95°C (10% em relação à massa de óleo) com vácuo (710 mmHg), agitação de 500 rpm e temperatura do óleo mantida a 50°C, durante 5 min. Essa etapa foi repetida três vezes. Foi realizada então a desumidificação com duração de 20 min, temperatura de 90 a 95°C e agitação de 500 rpm (Multitec, Modelo 752A, Brasil). O branqueamento foi realizado a 70°C, sob vácuo de 710 mmHg e agitação de 40 rpm, com adição de 5% (m/m) de adsorvente (razão em massa 9:1 de terra ativada Tonsil 110F e carvão ativado) e tempo de contato de 20 min (Figura 6(f)). Finalmente, o material foi filtrado em funil de Buchner com pré-capa de terra diatomácea, obtendo-se o óleo branqueado (Figura 6(g)).

Figura 6 – Imagens fotográficas da (a) carpa comum; (b) vísceras; (c) separação do óleo bruto; (d) óleo degomado; (e) óleo neutralizado; (f) etapa de branqueamento (g) óleo branqueado.



O óleo branqueado de carpa foi submetido à reação de hidrólise química (CREXI et al., 2012), utilizando as condições de concentração do catalisador de 22% (m/m), proporção óleo/álcool etílico de 1:39 (m/m), temperatura de 60°C e tempo de 1 h para a obtenção dos ácidos graxos livres (Figura 7 (a)). Após o término da reação de hidrólise, a separação dos ácidos graxos livres foi realizada conforme procedimento descrito por Wanasundara e Shahidi (1999), sendo adicionada à mistura saponificada água destilada na quantidade de duas vezes o volume em relação à massa inicial de óleo. Para a extração da matéria insaponificável foi adicionado hexano (quatro vezes o volume de hexano em relação à massa de óleo inicial) este procedimento foi realizado duas vezes. A matéria insaponificável que contém hexano foi descartada. A matéria saponificável foi acidificada com solução de HCl 3 mol L⁻¹ sob agitação até pH de 1. Após, transferiu-se a mistura para um funil de separação e os ácidos graxos foram extraídos com adição de hexano (duas vezes o volume em relação à quantidade inicial de óleo).

Figura 7 – Imagens fotográficas da: (a) etapa de hidrólise; (b) etapa de complexação; (c) separação dos cristais formados; (d) concentrados de ácidos graxos insaturados.



Os ácidos graxos livres obtidos através da reação de hidrólise foram complexados utilizando solução alcoólica de ureia (20% p/v em álcool etílico 95%), relação de mistura ácido graxo:ureia de 6:1 (m/m), realizada à $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 14 h (Figura 7(b)) (PAIM et al., 2012). A separação dos cristais formados foi realizada por filtração a vácuo em lã de vidro (Figura 7(c)). A parte líquida (fração não complexada) foi diluída com volume igual de água e acidificada à pH 4–5 com HCl 6 mol L^{-1} , após foi adicionado volume igual de hexano e agitar a mistura por 1 h, transferindo-a então para um funil de separação. A camada de hexano foi lavada com água destilada (igual volume) e separada a água (CREXI et al., 2012), obtendo-se ao final os concentrados de AGI (Figura 7(d)).

As metodologias analíticas utilizadas para os índices de caracterização do óleo branqueado e dos concentrados de AGI foram realizadas segundo os métodos da AOCS (1980). Os índices foram: índice de peróxido (Cd 8 – 53) e valor de anisidina (Cd 18 – 90). Para determinação dos perfis de ácidos graxos e avaliação do rendimento da reação de complexação com ureia foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa (Varian–3400 CX, Palo Alto, EUA). Para injeção no equipamento, os ésteres metílicos foram preparados conforme metodologia descrita por Metcalfe, Schimitz e Pelka (1966).

4.2 MATERIAIS DE PAREDE

4.2.1 Obtenção e caracterização da quitosana

A quitosana foi produzida a partir de resíduos de camarão (*Penaeus brasiliensis*), obtidos de indústrias pesqueiras (Rio Grande, RS, Brasil), de acordo com o esquema apresentado na Figura 8 (WESKA et al., 2007).

Para a extração da quitina, 7 kg de resíduos de camarão previamente limpos para a retirada dos materiais grosseiros foram submetidos as etapas de desmineralização, desproteíntização e desodorização. A etapa de desmineralização procedeu utilizando solução de HCl 2,5% (v/v) na proporção (volume:massa) de 2:1 solução/resíduo. Foram feitas oito lavagens de 2 min com 56 L de água para a retirada do ácido. Após foi realizada a desproteíntização, utilizando NaOH 5% (m/v) na proporção (volume:massa) de 3:1 solução/resíduo. As lavagens foram repetidas. Por fim, para a desodorização/despigmentação foi adicionada solução de hipoclorito de sódio 0,36% (v/v) na proporção (volume:massa) de 5:1 solução/resíduo. Após seis lavagens de 3 min com 56 L de água, o material foi seco por 4 h à 80°C , obtendo-se a quitina (aproximadamente 240 g) (WESKA et al., 2007).

A quitina (150 g) foi desacetilada para a obtenção da quitosana em reator de aço inoxidável com aquecimento e agitação mecânica, em escala semi-piloto, contendo 3 L de solução de NaOH (421 g L^{-1}) à 130°C por 1,5 h, sob agitação de 50 rpm (WESKA et al., 2007). A quitosana obtida foi dissolvida em solução de ácido acético (1%, v/v) sob agitação mecânica por 70 min. Após a solução foi centrifugada à $6500 \times g$ por 20 min. O precipitado foi descartado e adicionou-se solução de NaOH ao sobrenadante até que o pH atingisse 12,5. Neutralizou-se, e centrifugou-se a solução por 20 min à $6500 \times g$, obtendo-se a quitosana purificada (75g). Para a obtenção da quitosana em pó com umidade comercial (10,0%, m/m, em base úmida), essa foi seca em leito de jorro, de acordo com o procedimento descrito por Dotto et al. (2011), obtendo-se ao fim do processo aproximadamente 55 g de quitosana em pó.

Figura 8 – Fluxograma de extração da quitina e produção da quitosana.



A quitosana foi caracterizada, segundo as normas da AOAC (1995), quanto a sua umidade e cinzas pelo método gravimétrico, e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, em que o fator de conversão utilizado para N-quitosana foi de 11,49. O pó foi visualizado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio eletrônico (JEOL, JSM 6060, JAPÃO) (LI et al., 2010).

O grau de desacetilação foi determinado por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (Prestige,21210045, Japão), de acordo com a Equação 5 (CERVERA et al., 2004):

$$GD = 87.8 - [3(A_{C=O}/A_{OH})] \quad (5)$$

sendo GD o grau de desacetilação (%), AC=O a absorvância do grupamento C=O e A–OH a absorvância do grupo –OH.

A massa molar da quitosana foi obtida através do método da viscosidade intrínseca (viscosímetro capilar Cannon–Fenske, Schott Gerate, GMBH–D65719, Alemanha) a 25°C. A viscosidade reduzida foi determinada pela Equação de Huggins (Equação 6) e depois convertida em massa molar pela Equação de Mark–Houwink–Sakurada (Equação 7) (ROBERTS; DOMSZY, 1982).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (6)$$

$$[\eta] = K (MM)^\alpha \quad (7)$$

sendo η_{sp} a viscosidade específica, η_{sp}/c a viscosidade reduzida (mL g^{-1}), k_H o coeficiente da equação de Huggins, e c a concentração do polímero (g mL^{-1}), η a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}), MM a massa molar (Da), $K=1,81 \times 10^{-3} \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,93$ (ROBERTS; DOMSZY, 1982).

4.2.2 Caracterização da gelatina

A gelatina de pele suína (tipo A), grau alimentício/farmacêutico, foi adquirida da Sigma–Aldrich (Merck, Brasil). O pó foi visualizado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio eletrônico (Jeol, JSM 6060, Japão) (LI et al., 2010). A gelatina foi caracterizada de acordo com o ângulo de Hue (Hab) pela Equação 8, usando o sistema Minolta (CR 300, Minolta, EUA) através da medição do diagrama tridimensional de cores ($L^* -a^* -b^*$). A amostra foi colocada em uma superfície branca para a realização das leituras (YOUN et al., 2009).

$$H_{ab} = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (8)$$

A força do gel da gelatina (6,6%, m/v) foi medida usando um texturômetro (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Reino Unido) com sonda de Teflon (12,5 mm de diâmetro), pressionando 4 mm na gelatina à velocidade de 1 mm s^{-1} (SILVA et al., 2014a). Para o ponto de fusão, foram colocados 5 mL de solução de gelatina (6,6%, m/v) em tubos de ensaio em banho termostatizado (Quimis 214 D 2, Brasil) à 45°C por 15 min, resfriados em banho de gelo e, em seguida, mantidos a 10°C em refrigerador por 17 ± 1 h. Uma solução de clorofórmio e corante de azul de metileno (3:1, v:v) foi utilizado como indicador. Foram adicionadas cinco gotas do indicador sobre o gel e sua temperatura elevada em $0,1^{\circ}\text{C}$ a cada 2 min. O ponto de fusão foi o valor da média entre a temperatura no momento da penetração das gotas, e a temperatura em que a solução estivesse completamente corada (SILVA et al., 2014a).

4.3 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS

O método de emulsão óleo em água foi utilizado para preparar as nanoemulsões contendo os concentrados de AGI. Para isso, foram preparadas duas fases (uma aquosa e uma oleosa). Inicialmente, para formar a fase aquosa, foram elaboradas soluções contendo os biopolímeros quitosana e gelatina (1 e 2%, m/v), na forma pura e em blendas, como mostrado na Tabela 1. Utilizou-se água ultrapura para as diluições.

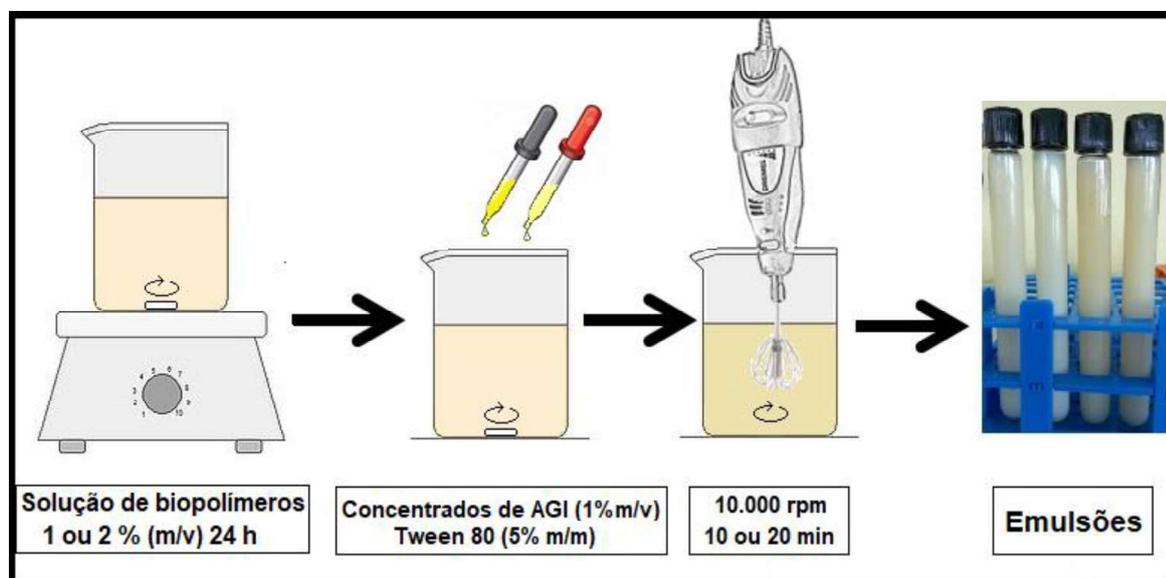
Tabela 1 – Diferentes proporções de biopolímeros utilizados para a elaboração da fase aquosa das nanoemulsões.

Emulsão	Quitosana (%)	Gelatina (%)
A	100	0
B	90	10
C	70	30
D	50	50
E	30	70
F	10	90
G	0	100

A quitosana foi diluída com auxílio de solução de ácido acético 1% (v/v). As soluções obtidas foram agitadas em agitador magnético (300 rpm) durante 24 h à temperatura ambiente, até completa dissolução dos biopolímeros. Após a fase oleosa, constituída pelos

concentrados de AGI (1%, m/v) e o surfactante *Tween* 80® (Polyoxyethylen-20-sorbitan-monooleate, massa molar 1310 g mol^{-1}), 5% m/m em relação ao biopolímero) (definido por testes preliminares) foi vertida na solução. As soluções foram homogeneizadas em agitador mecânico (Dremel, modelo 300, México) à 10.000 rpm (ESQUERDO; DOTTO; PINTO, 2015). Foram variadas as proporções em massa de biopolímero:óleo (1:1, 2:1) e tempo de homogeneização (10 e 20 min), produzindo quatro emulsões diferentes para cada proporção de biopolímeros. A Figura 9 apresenta resumidamente o esquema para a produção das emulsões.

Figura 9 – Diagrama do processo de produção das emulsões



4.3.1 Caracterização das nanoemulsões

4.3.1.1 Estabilidade visual, distribuição de tamanho e índice de polidispersão

A estabilidade visual das nanoemulsões foi determinada de acordo com Klaypradit e Huang (2008), em tubos de ensaio durante 30 dias. Cada emulsão (15 mL) foi colocada em um tubo de ensaio e armazenada à temperatura ambiente durante 1 mês, em triplicata. Foram realizadas avaliações visuais diárias para verificar o aparecimento de separação de fases.

As nanoemulsões estáveis (sem separação de fases) foram caracterizadas de acordo com sua distribuição de tamanho e índice de polidispersão (IPD) usando o método de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido)

(AHMAD et al., 2011). As análises foram realizadas em triplicata, sem necessidade de diluição. Os resultados foram expressos como o diâmetro médio da partícula.

Baseados nos resultados obtidos, para cada proporção de biopolímero foi selecionada uma emulsão estável e com o menor tamanho de partícula para continuar sendo caracterizada.

4.3.1.2 Potencial Zeta e pH

A análise do potencial Zeta é utilizada para refletir o potencial da superfície das partículas nas dispersões coloidais (AHMAD et al., 2011). A carga de gotículas (potencial Zeta) das nanoemulsões foi medida usando dispersão de luz dinâmica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido). Para determinar o pH das nanoemulsões formadas, após a preparação da amostra, o pH foi medido por um medidor de pH digital (Marte, MB-10, Brasil) à temperatura ambiente

4.3.1.3 Turbidez, índice de refração e análise ótica

A turbidez (absorbância) das nanoemulsões foi determinada usando um espectrofotômetro de luz UV/Vis a 600 nm (Biospectro, SP-22, Brasil). As nanoemulsões foram diluídas 25 vezes com água ultrapura. O índice de refração das nanoemulsões foi determinado em refratômetro (ABBE-BIOBRIX, 2WAJ, Brasil), com escala de refração de 1,300 a 1,700. Para ambas as análises, cada medida foi replicada três vezes à temperatura ambiente. A água destilada foi usada como branco.

A fim de complementar a caracterização das gotículas formadas, 20 μ L de emulsão, sem diluição, foram colocadas em uma placa de vidro e fixadas com o auxílio de uma lamínula. A análise das gotículas ocorreu em microscópio ótico (Zeiss, Scope A1, Alemanha) com ampliação objetiva de 100 \times .

4.3.1.4 Experimentos de oxidação

A oxidação das nanoemulsões contendo os concentrados de AGI/biopolímeros foi analisada considerando os valores de índice de peróxido, p-anisidina e TOTOX. As amostras foram armazenadas em tubos tampados, refrigeradas a 4°C e analisadas após a preparação (dia zero) e, diariamente durante uma semana.

O índice de peróxido (IP) foi determinado de acordo com Karaca et al. (2013). As amostras foram pesadas (0,2 g de óleo em emulsão) no frasco *Erlenmeyer*. Após foi adicionada 30 mL de solução de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v) e 0,5 mL de solução de iodeto de potássio (KI) saturada e, agitou-se até a dissolução completa. Após 1 min de descanso no escuro, adicionou-se 30 mL de água destilada e 0,5 mL de indicador de amido (1%, p/v). A solução foi titulada com tiosulfato de sódio 0,001 mol L⁻¹, agitando continuamente, até desaparecer a cor azul. O índice de peróxido (IP) foi calculado pela Equação 9:

$$PV = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{m} \quad (9)$$

sendo V_a o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_b o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), N a concentração do tiosulfato de sódio (mol L⁻¹), e m a massa de concentrados de AGI (g).

Os valores de p-anisidina (pAV) foram determinados de acordo com Julio et al. (2015) com modificações. As amostras de nanoemulsão (m) contendo 0,3 g de óleo foram colocadas em um tubo Falcon e agitou-se com solução de isooctano (2,4-trimetilpentano) (50 mL) até dissolução completa. Os tubos foram centrifugados durante 10 min a 4000 × g (Centribio, 80-2B, Brasil). A solução foi transferida para uma cubeta (1 cm × 1 cm) e a absorbância (a₁) foi medida a 350 nm (Biospectro, S-22, Brasil), utilizando isooctano puro como branco. Em seguida, foram transferidos 5 mL da solução restante de centrifugação para tubos de ensaio e adicionou-se 1 mL de solução de p-anisidina (solução 0,25% p/v em ácido acético glacial). Os tubos foram fechados, agitados e permaneceram no escuro por 10 min. A absorbância (a₂) foi medida a 350 nm contra o branco do isooctano com p-anisidina. O valor pAV foi determinado pela Equação 10 e a oxidação total de óleo (valor TOTOX) foi calculada como mostrado na Equação 11 (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002):

$$pAV = \frac{25(1,2 \times (a_2 - a_1))}{m} \quad (10)$$

$$TOTOX = (2 \times IP) + pAV \quad (11)$$

4.4 SECAGEM DAS NANOCÁPSULAS

A fim de obter microestruturas contendo as cápsulas, as nanoemulsões foram secas utilizando o método de evaporação do solvente via liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003). O princípio da liofilização é a desidratação por sublimação da fração de gelo de um produto congelado (ANWAR; KUNZ, 2011). Na primeira etapa (congelamento), as emulsões (200 mL) foram vertidas em bandejas de inox e levadas ao ultra freezer (Indrel, IULT 90-D, Brasil) por 48 h à -80°C . Após a secagem por sublimação ocorreu em liofilizador (Liobras, L108, Brasil), onde as amostras permaneceram por 48 h à -54°C e vácuo de 44 μHg , até a evaporação completa dos solventes.

4.4.1 Caracterização das microestruturas contendo as nanocápsulas

Após a secagem das emulsões, as microestruturas obtidas foram caracterizadas quanto à sua morfologia, composição, cor, eficiência de encapsulamento, rendimento de processo, grupamentos funcionais, forma de associação, porosidade, volume de poros e resistência à oxidação.

A morfologia das microestruturas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio eletrônico (Jeol, JSM 6060, Japão) (KARACA et al., 2013; LI et al., 2010). As amostras foram colocadas em suportes de aço inoxidável (*stubs*) e, após metalizadas com ouro. Para as análises foram utilizadas acelerações de voltagem de 5 e 10 kV e faixa de magnificação e 30 a 100000 vezes.

A análise da composição elementar da superfície das microestruturas foi realizada através da técnica semiquantitativa de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX) (LIU et al., 2011). A metalização das amostras foi realizada a vácuo, utilizando ouro. Posteriormente, as mostras foram colocadas em um microscópio eletrônico acoplado com a análise de EDX (Jeol, JSM 5800, JApão), sendo utilizada a aceleração de voltagem de 10,0 kV.

Os parâmetros de cor das microestruturas foram determinados utilizando o sistema Minolta (CR-300, Minolta Corporation, Ramsey, EUA), através da medida do diagrama de cor tridimensional ($L^*-a^*-b^*$) (Figura 10). A luminosidade L^* indica o valor máximo de 100, que representa uma perfeita reflexão difusa, enquanto que o valor mínimo é zero e constitui o preto; a^* indica cromaticidade tendendo do verde (-) até o vermelho (+) e b^* indica a cromaticidade que varia do azul (-) até o amarelo (+). As amostras foram

A eficiência de encapsulamento foi avaliada de acordo com Gallardo et al. (2013). Para a extração do óleo (AGI_T), pesou-se 1 g de amostra e adicionou-se lentamente 10 mL de HCl. Os tubos foram colocados em banho de água a 70°C, aquecidos a 100°C e, depois fervidos durante 30 min. Após arrefecimento até à temperatura ambiente (25°C), foram adicionados 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter de petróleo e os tubos foram agitados vigorosamente durante 1 min. A solução de éter (sobrenadante) foi separada e filtrada através de algodão. A fase aquosa remanescente foi ainda extraída duas vezes por 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e o óleo foi seco em estufa a 100°C até peso constante. O óleo superficial (AGI_S) pode ser definido como a fração que é facilmente extraída com solventes orgânicos sem interrupção da matriz sólida. Para isso, as microestruturas (4 g) foram agitadas com 75 mL de éter etílico durante 15 min a 25°C. A suspensão foi filtrada em algodão e, a amostra sobre o filtro foi enxaguada três vezes com éter etílico. O solvente foi seco e evaporado em rotaevaporador para se obter a massa de óleo superficial. A eficiência de encapsulamento (%EE) foi calculada a partir da Equação 14:

$$\%EE = \frac{AGI_T - AGI_S}{AGI_T} \times 100 \quad (14)$$

Para o rendimento do processo de secagem, as nanocápsulas liofilizadas foram pesadas em balança analítica (Marte, AY220, Brasil). O rendimento foi obtido utilizando Equação 15 (GONSALVES, et al., 2009):

$$\text{Rendimento do Processo (\%)} = \frac{\text{quantidade real de amostra (g)}}{\text{quantidade teórica de amostra (g)}} \times 100\% \quad (15)$$

Os grupos funcionais das microestruturas obtidas foram identificados pela análise de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (PRESTIGE 21, 210045, Japão). As amostras foram submetidas à determinação espectroscópica na região do infravermelho (450–4500 cm^{-1}), usando a técnica de refletância atenuada total (MUZZARELLI et al., 2004).

A determinação da forma de associação dos AGI às microestruturas contendo as microcápsulas e nanocápsulas foi realizada por espectroscopia no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X (FUREBY, 2003; SCHAFFAZICK et al. 2003). As curvas DSC (Shimadzu, DSC-60, Japão) foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio. A amostra (2 mg) foi pesada, selada e mantida a 20°C durante 10 min e aquecida de 20°C a 250°C, a uma taxa de aquecimento de 5°C min^{-1} . Os difratogramas foram obtidos por difração

de raios-X (DRX) (Bruker, D8 Advance, Japão). Foi utilizada uma corrente de 40 mA, voltagem de 40 kV com escaneamento 2θ na faixa de 10° a 90° , comprimento de onda (λ): $1,5418\text{\AA}$ em tubo de cobre.

A densidade do sólido (ρ_s) foi obtida da literatura e a densidade aparente (ρ_p) foi estimada através da relação entre massa/volume do balanço analítico (Marte, AY220, Brasil). A porosidade (ε_p) e o volume de poros (V_p) da microestrutura de quitosana foram calculados pelas Equações 16 e 17, respectivamente (LEYVA-RAMOS et al., 2012; PICCIN et al., 2011):

$$\varepsilon_p = 1 - \frac{\rho_p}{\rho_s} \quad (16)$$

$$V_p = \frac{1}{\rho_p} - \frac{1}{\rho_s} \quad (17)$$

A oxidação de cápsulas de AGI-polímero foi analisada considerando o índice de peróxido de acordo com o descrito na seção 4.3.1.4. As amostras foram analisadas no final da secagem (dia zero) e após 7, 14, 21, 28, 35 e 45 dias de armazenamento refrigerado a 4°C .

4.4.2 Isotermas de sorção

As isotermas de adsorção foram determinadas pelo método gravimétrico (ESCALONA-GARCÍA et al., 2016) nas temperaturas de 4°C e 25°C . Aproximadamente 0,2 g de amostra de microestruturas foram colocadas em frascos de vidro fechados hermeticamente (altura de 7 cm e diâmetro de 6 cm), que continham soluções de ácido sulfúrico em diferentes concentrações ($0,2$ a $0,7 \text{ kg kg}^{-1}$) para prover uma atividade de água (a_w) variando de $0,102$ a $0,753 \text{ kg kg}^{-1}$. Cada frasco continha um suporte para que as amostras não entrassem em contato com a solução ácida e permitisse a transferência de umidade. Os frascos foram colocados em incubadora com temperatura controlada durante o tempo necessário, de tempos em tempos os frascos eram retirados da incubadora para que a solução ácida fosse agitada, usando um agitador magnético, e em seguida efetuada a pesagem do suporte com a amostra e, retornavam para a incubadora até atingir o equilíbrio. O equilíbrio foi assumido quando a diferença entre duas medidas consecutivas foi menor que 1 mg g^{-1} de sólido (15 – 20 dias).

Os valores da atividade de água através das diferentes concentrações de solução de ácido sulfúrico estão apresentados na Tabela 2. A umidade das microestruturas foi determinada pela diferença na massa após a secagem em estufa a vácuo, a 70°C por 6 h. As determinações de equilíbrio foram conduzidas em triplicata. Os valores médios foram utilizados na determinação das isotermas de adsorção de umidade.

Tabela 2 – Valores de atividade de água (a_w) para as diferentes concentrações de H_2SO_4 .

Conc. H_2SO_4 (% m m ⁻¹)	a_w
30	0,75
35	0,66
40	0,56
45	0,45
50	0,35
55	0,25
65	0,10

Fonte: Perry; Chilton (1983).

Neste trabalho foram utilizados três modelos de isotermas para ajustar os dados experimentais de equilíbrio. Os resultados de umidade de equilíbrio (X_e) em função da atividade de água (a_w) foram ajustados aos modelos de GAB (Equação 2) e BET (Equação 3), os quais têm uma sólida base teórica, e ao modelo empírico de Oswin (Equação 4), apresentados no Capítulo de Revisão Bibliográfica (Item 3.7).

4.4.2.1 Propriedades Termodinâmicas

Os valores das variações da energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram estimados a fim de obter informações sobre o comportamento termodinâmico da adsorção. Estes valores indicam se o processo é espontâneo ou não espontâneo, favorável ou desfavorável, endotérmico ou exotérmico e oferecem informações sobre a heterogeneidade do adsorvente (RUTHVEN, 1984).

O calor isostérico de sorção, ou entalpia diferencial de sorção, é um indicador do estado da água adsorvida no material sólido. Para um dado conteúdo de umidade, a entalpia

diferencial de sorção (ΔH_a) foi estimada através da Equação de Clausius–Clapeyron (Equação 18) (RIZVI, 1986).

$$\frac{d\ln(a_w)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H_a}{R} \quad (18)$$

Após a integração, a relação entre a entalpia diferencial de sorção (ΔH) e a entropia diferencial de sorção (ΔS) é dada pela Equação 19 (AGUERRE; SUAREZ; VIOLLAZ, 1986; KAYA; KAHYAOGU, 2007). A variação de entalpia e a variação de entropia de sorção foram calculadas utilizando uma análise de regressão linear.

$$-\ln(a_w) = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} \quad (19)$$

sendo ΔH a entalpia diferencial de sorção (J gmol^{-1}), ΔS a entropia diferencial de sorção ($\text{J gmol}^{-1} \text{K}^{-1}$), R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J gmol}^{-1} \text{K}^{-1}$), T a temperatura absoluta (K), a_w a atividade de água para a temperatura T (K).

A teoria da compensação propõe uma relação linear entre ΔH e ΔS , onde a entalpia também pode ser calculada pela Equação de Gibbs–Helmholtz (Equação 20) (SHARMA et al., 2009).

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (20)$$

sendo ΔG é a variação da energia livre de Gibbs (kJ mol^{-1}), a qual é calculada pela Equação 21 (TAITANO et al., 2011):

$$\Delta G = -RT\ln(a_w) \quad (21)$$

A variação da energia livre de Gibbs (Equação 21) foi usada para indicar a afinidade do adsorvente pela água, e verificar se a sorção de água é um processo espontâneo ou não (TAITANO et al., 2011). Para determinar a variação de energia livre devido à mudança de conteúdo de umidade das microestruturas, foram utilizados dados de a_w gerados pelo modelo de melhor ajuste das isotermas de sorção, e considerando cada temperatura analisada (YOGENDRARAJAH et al., 2015).

A existência de uma relação linear entre entalpia e entropia para sorção de água foi reportada em muitos alimentos ricos em polissacarídeos (LAGO; NOREÑA, 2015; AGUERRE; SUAREZ; VIOLLAZ, 1986). Foi utilizada a Equação 22 para a verificação da compensação entalpia–entropia.

$$\Delta H = T_{\beta}\Delta S + \Delta G \quad (22)$$

sendo T_{β} a temperatura isocinética (K), representando a temperatura onde todas as reações ocorrem na mesma proporção.

Para validar a teoria da compensação, a temperatura isocinética (T_{β}) foi comparada com a temperatura média harmônica (T_{hm}), onde a temperatura média harmônica foi calculada pela Equação 23:

$$T_{hm} = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^{n_i} \left(\frac{1}{T_i}\right)} \quad (23)$$

sendo n o número de isotermas de sorção empregados.

Se $T_{\beta} > T_{hm}$ o processo é controlado pela entalpia, enquanto que se a condição oposta for observada, $T_{\beta} < T_{hm}$, o processo é controlado pela entropia (LAGO; NOREÑA, 2015).

A caracterização do adsorvente (sólido) foi feita em termos da determinação do tamanho médio dos poros. A Equação de Kelvin (Equação 24) foi utilizada para o cálculo de raio crítico. Esta equação aplica-se principalmente à região de condensação da isoterma (SINGH et al., 2001).

$$r_c = \frac{2\sigma V_M}{RT \ln\left(\frac{1}{a_w}\right)} \quad (24)$$

sendo r_c o raio crítico (m), σ a tensão superficial ($N m^{-1}$), V_M o volume molar do sorbato ($m^3 mol^{-1}$), R a constante universal dos gases ($kJ kgmol^{-1} K^{-1}$), T a temperatura (K) e a_w é a atividade de água.

A condensação capilar em mesoporos ocorre somente após uma camada de adsorbato de espessura τ formar-se nas paredes dos poros, e isso faz com que ela seja considerada um processo secundário. Assim, é necessário levar em consideração a espessura

da multicamada τ em qualquer cálculo de raio ou largura de grupo de mesoporos (MONTE, 2016). A espessura da camada de água adsorvida foi calculada a partir da Equação de Halsey (Equação (25)) e o raio de poro (r_p) foi obtido pela soma do raio crítico r_c , quando ocorre a condensação capilar ou evaporação, e a espessura da multicamada, τ , conforme Equação 26 (SINGH et al., 2001).

$$\tau = 0,354 \left(\frac{-5}{\ln_{aw}} \right)^{1/3} \quad (25)$$

$$r_p = r_c + \tau \quad (26)$$

sendo τ a espessura da multicamada (m).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes dos modelos de isotermas e os parâmetros termodinâmicos foram estimados por regressão não linear, com auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA) . Foi utilizada a função objetivo Quasi-Newton. A qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi avaliada mediante o coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio relativo (EMR) (Equação 27):

$$EMR = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|X_{ei} - X_{pi}|}{X_{ei}} \quad (27)$$

sendo X_{ei} conteúdo de umidade experimental e X_{pi} a umidade estimada pelo modelo (kg kg^{-1}_{ss}), respectivamente, e n o número de pontos experimentais. Um bom ajuste é considerado quando $EMR < 10\%$ (LOMAURO et al., 1985). Os resultados de caracterização das amostras foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES DOS CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

A Tabela 3 mostra os parâmetros de qualidade e composição de ácidos graxos do óleo branqueado e concentrados de AGI obtidos durante o processo.

Tabela 3 – Parâmetros de qualidade e perfil graxo do óleo branqueado e dos concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI).

Parâmetro*	Óleo Branqueado	Concentrados de AGI
Índice de Peróxido ($\text{meq}_{\text{O}_2} \text{kg}^{-1} \text{óleo}$)	2,92 ± 0,05 ^b	3,61 ± 0,06 ^a
Valor de p-Anisidina	4,80 ± 0,21 ^b	6,44 ± 0,23 ^a
Ácidos graxos (maior quantidade)		
Ácido palmítico (16:0)	16,51 ± 0,05 ^a	4,48 ± 0,03 ^b
Ácido Palmitoléico (16:1)	5,50 ± 0,03 ^b	7,05 ± 0,01 ^a
Ácido Esteárico (18:0)	3,99 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,02 ^b
Ácido Oleico (18:1)	26,25 ± 0,02 ^b	31,92 ± 0,01 ^a
Ácido Linoleico (18:2)	18,63 ± 0,02 ^b	26,17 ± 0,01 ^a
Ácido Linolênico (18:3)	7,55 ± 0,01 ^b	11,20 ± 0,01 ^a
Ácido Eicosanóico (20:1)	2,00 ± 0,01 ^a	1,68 ± 0,01 ^b
Ácido Dihomo- γ -linolênico (20:3)	1,53 ± 0,01 ^b	2,18 ± 0,01 ^a
Ácido Araquidônico (20:4)	1,70 ± 0,01 ^b	2,98 ± 0,01 ^a
Ácido Eicosapentaenoico (20:5)	2,53 ± 0,01 ^b	4,68 ± 0,01 ^a
Ácido Docosaenoico (22:6)	2,55 ± 0,01 ^b	4,98 ± 0,01 ^a
% Total de ácidos graxos		
Saturados	26,70 ± 0,03 ^a	6,90 ± 0,02 ^b
Insaturados (AGMI+AGPI)	69,30 ± 0,01 ^b	88,50 ± 0,01 ^a
Não identificados	4,00 ± 0,01 ^b	4,60 ± 0,01 ^a

* média ± desvio padrão (n=3). AGPI= ácidos graxos poli-insaturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados.

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A partir dos dados da Tabela 3, pode-se observar que as frações apresentaram valores similares aos encontrados na literatura (CREXI et al., 2012, PAIM, 2012). A hidrólise e a complexação levaram a um aumento no valor de peróxido e anisidina dos concentrados de AGI em comparação com o óleo branqueado ($p < 0,05$), provavelmente devido às condições do processo, mantendo os valores dentro dos limites estabelecidos para consumo humano. De acordo com a Comissão do CODEX Alimentarius, estes valores ($IP \leq 5 \text{ meq kg}^{-1}$, p-anisidina ≤ 20) mostram que o óleo utilizado neste estudo está dentro dos padrões de qualidade aceitáveis (CODEX, 2013).

O rendimento de reação para a fração não complexada com ureia (concentrados de ácidos graxos livres) do óleo obtido de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*) foi de 32,3 %. O óleo branqueado de carpa apresentou cerca de 70% de AGI e, após a hidrólise e complexação com ureia, a fração não complexada (contendo os concentrados) apresentou soma de 88,5% de ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados (Tabela 3).

Além disso, a partir Tabela 3 pode-se verificar que o C-18:1, C-18:2 e C-18:3, foram os ácidos graxos com maior teor na fração não complexada com ureia, o que corresponde a cerca de 69% dos ácidos graxos totais. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Crexi et al. (2010), que concluíram que o óleo refinado obtido de vísceras de carpa pode ser considerado uma rica fonte de ácidos graxos essenciais.

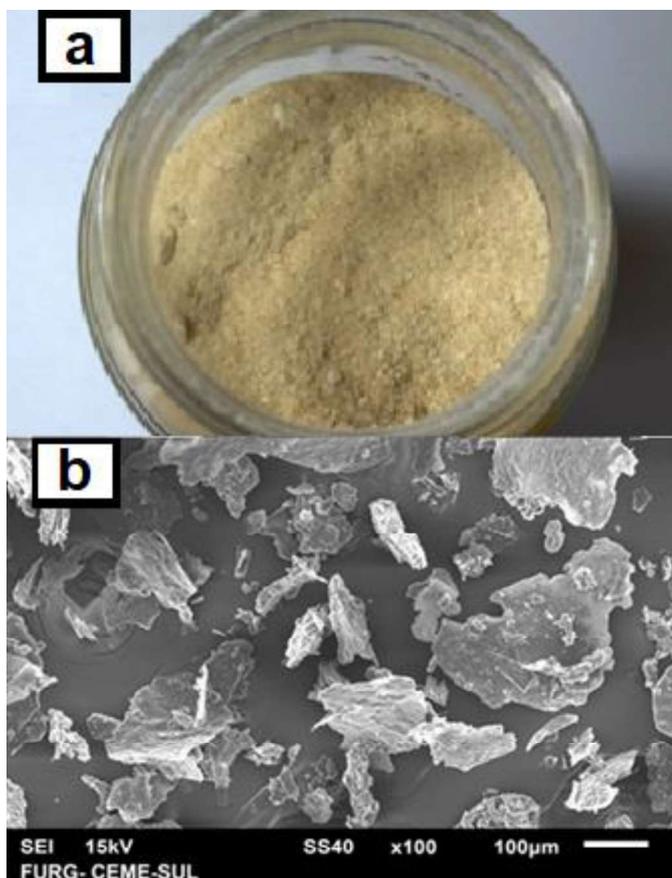
5.2 PROPRIEDADES DOS BIOPOLÍMEROS

A quitosana obtida foi um pó fino que apresentou umidade de 7,9% (m/m), estando dentro da faixa da quitosana comercial (até 10% m/m, b.u.) e um baixo teor de cinzas (0,4 %). O valor de N-total encontrado foi de 91,7 %. A Figura 11 apresenta as características superficiais da quitosana em pó. Na Figura 11(a) está apresentada a imagem fotográfica da quitosana em pó. Na Figura 11(b) a micrografia com ampliação de 100×. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se observar que a quitosana se apresenta como um pó.

O pó de quitosana apresentou grau de desacetilação de $86 \pm 1\%$ e massa molar de $153 \pm 5 \text{ kDa}$. O parâmetro grau de desacetilação (quantidade de monômeros desacetilados na cadeia) define a conversão da quitina em quitosana. Quando o grau de desacetilação excede 50%, a quitosana produzida torna-se solúvel em meio ácido aquoso. A quitina com um grau de desacetilação acima de 75% é reconhecida como quitosana (ELGADIR et al., 2015). A massa molar também interfere na solubilização das amostras. A quitosana com massas

molares baixas é mais facilmente dissolvida e forma soluções menos viscosas (WESKA et al., 2007; ELGADIR et al., 2015).

Figura 11 – (a) Imagem fotográfica e (b) micrografia da quitosana em pó.

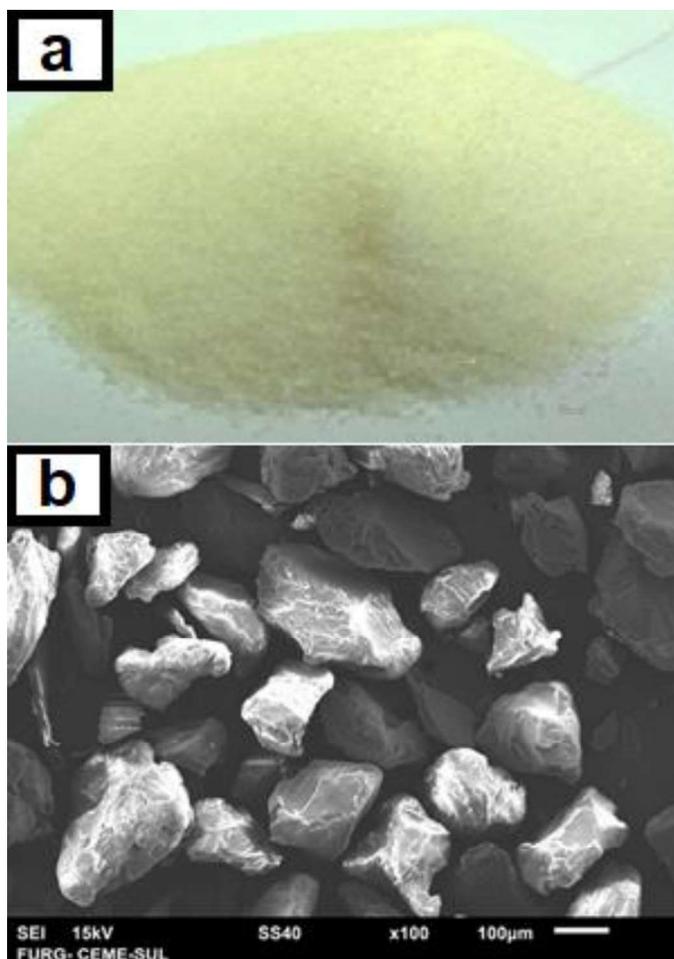


O grau de desacetilação e massa molar são os dois parâmetros fundamentais que podem afetar as propriedades e a funcionalidade da quitosana. Estas propriedades incluem solubilidade, viscosidade e coagulação (ELGADIR et al., 2015). A quitosana é facilmente dissolvida em soluções de ácido fraco e pode ser utilizada em forma diluída para preparar emulsões (FATHI et al., 2014). Os valores de umidade, grau de desacetilação e massa molar foram semelhantes aos obtidos para quitosana seca pelo procedimento de Dotto et al. (2011), demonstrando que o processo de produção foi eficiente.

A Figura 12 apresenta a morfologia da gelatina utilizada, a qual se encontra na forma de um pó homogêneo. A gelatina Tipo A tem ponto isoelétrico variando de 7 a 9 (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014). A força do gel foi de 307 ± 2 g, que é um critério importante para determinar a qualidade da gelatina. Espera-se que a gelatina comercial de

pele suíno presente de cerca de 300 g. Valores mais baixos indicam gelatinas de qualidade inferior.

Figura 12 – (a) Imagem fotográfica e (b) micrografia do pó de gelatina.



O ponto de fusão foi de $31,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Esta determinação é importante para o uso de gelatina como material de revestimento em cápsulas à medida que elas se fundem quando em contato com temperaturas acima do ponto de fusão e, liberam facilmente os medicamentos que contêm no trato digestivo humano devido à temperatura, pH gástrico e enzimas digestivas (WANDREY et al., 2010). A força do gel e o ponto de fusão estão associados aos teores de prolina e hidroxiprolina e a massa molar. O processo de gelificação envolve uma transição de uma estrutura sem uma forma definida para uma tripla hélice, a uma temperatura determinada (SILVA et al., 2014a). Em relação à cor da gelatina, o ângulo Hue foi de $82 \pm 3^{\circ}$, correspondendo ao amarelado. As gelatinas na sua forma pura devem ser substâncias sólidas, frágeis, translúcidas, incolores ou ligeiramente amarelas, quase insípidas e inodoras (WANDREY et al., 2010).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

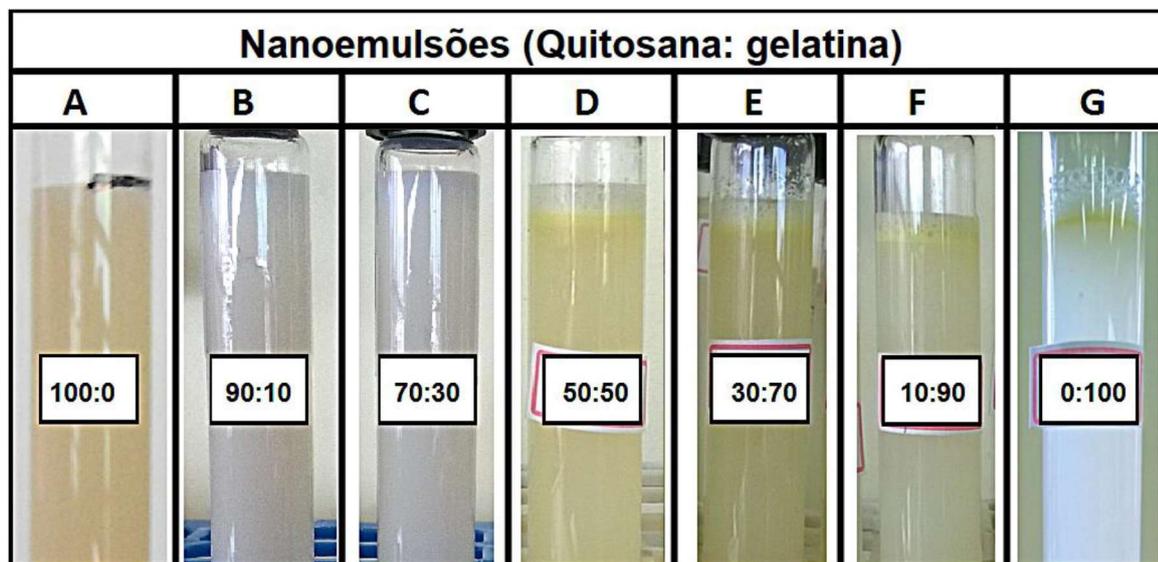
5.3.1 Efeito dos biopolímeros e sua interação na estabilidade, tamanho de partícula e índice de polidispersão

Soluções de quitosana e gelatina puras, e suas misturas foram preparadas. Como pode ser visto na Figura 13, após a homogeneização, as emulsões usando proporções com 50% ou mais de gelatina (m/m), para todas as condições, não foram capazes de formar emulsão, apresentando separação de fases (Figura 13 (d), (e), (f) e (g)). A gelatina tem sido usada como um surfactante eficiente, capaz de atuar como emulsionante em emulsões de óleo em água. No entanto, quando usada isolada ou em grande proporção pode produzir gotas relativamente grandes, prejudicando a estabilidade. O seu uso associado a outros ingredientes é recomendado para melhorar a eficácia na formação e estabilização de emulsões (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

Piacentini et al. (2013) testaram o microencapsulamento de gotículas de óleo usando gelatina de peixe e goma arábica por emulsão por membrana. Para estimar a influência da proporção de gelatina de peixe e goma arábica na fase aquosa, a mistura de biopolímero foi variada de 30:70 a 80:20. Os autores descobriram que, dependendo da relação proteína:carboidrato utilizada, a parede formada em torno do óleo podia tornar-se mais fina, levando à coalescência. Bejrapha et al. (2011) estudaram o papel da gelatina na estabilidade das nanocápsulas de oleoresina capsicum na matriz de gelatina. Os autores verificaram que uma quantidade adequada de gelatina deveria ser usada, pois concentrações relativamente baixas ou altas não foram adequadas devido à sua própria solubilidade limitada, resultando na agregação de complexos quando a concentração de gelatina aumentou.

As nanocápsulas formadas por quitosana pura (Figura 13(a)) e misturas de quitosana: gelatina (90:10 e 70:30) (Figura 13(b) e 13(c), respectivamente) se apresentaram de forma estável após 30 dias, sem separação de fases. Após o armazenamento, quando existe cremação (separação de fases), as emulsões ficam visualmente separadas em uma camada opaca na superfície, uma camada com alta turbidez ao meio e/ou uma camada ligeiramente turva na parte inferior. Devido ao seu pequeno tamanho de gotículas, as nanoemulsões aumentaram a estabilidade à separação ou agregação gravitacional (ESQUERDO et al., 2016). As nanoemulsões estáveis foram caracterizadas pelo tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD).

Figura 13 – Imagens das emulsões logo após sua homogeneização usando diferentes proporções de quitosana e gelatina em fase aquosa (quitosana: gelatina) (a) 100:0, (b) 90:10, (c) 70:30, (d) 50:50, (e) 30:70, (f) 10:90 e (g) 0:100.



O efeito do tempo de homogeneização (10 e 20 min) e a concentração de polímeros na fase aquosa (1 e 2% m/v) na preparação das nanocápsulas estão apresentados na Tabela 4. Como pode ser visto, para todas as combinações de biopolímeros, a condição do maior tempo de homogeneização (20 min) e menor concentração de polímero (1% m/v) proporcionou menores tamanhos de partículas. Isso demonstra que, o tamanho de gotículas produzidas depende da energia e do tempo e homogeneização, além da composição (concentração) das fases. Normalmente, as nanoemulsões exigem o uso de alta energia mecânica para serem produzidas. A energia mecânica perturba as fases separadas, misturando-as, e formando pequenas gotas de óleo. O tamanho das gotas é tipicamente reduzido pelo aumento e duração da energia, na presença de surfactantes cuidadosamente selecionados (WALKER et al., 2015a). O uso de biopolímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) como co-tensoativos pode ajudar a estabilizar as nanoemulsões por adsorção à superfície das gotículas, protegendo o óleo da agregação e atuando como material de parede. Em alguns casos, a concentração de polímero pode aumentar o tamanho das partículas. Este fenômeno pode estar associado à interrupção da interferência induzida por penetração de água nas gotículas de óleo mediadas pela concentração aumentada de surfactante e, levando a ejeção de gotículas de óleo na fase aquosa (QADIR et al., 2016).

Tabela 4 – Distribuição de tamanho e índice de polidispersão (IPD) das nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de material de parede (MP), concentrações de biopolímeros (CB) e tempos de homogeneização (TH).

MP (Quitosana :gelatina)	CB (m/v)	TH (min)	Tamanho (nm)*	IPD*
100:0	1%	10	369,3 ± 1,8 ^b	0,260 ± 0,023 ^a
	1%	20	292,0 ± 4,3 ^d	0,208 ± 0,029 ^a
	2%	10	475,3 ± 7,1 ^a	0,243 ± 0,023 ^a
	2%	20	339,0 ± 3,5 ^c	0,242 ± 0,029 ^a
90:10	1%	10	128,1 ± 0,9 ^b	0,287 ± 0,032 ^a
	1%	20	79,3 ± 1,2 ^d	0,250 ± 0,012 ^a
	2%	10	194,2 ± 4,1 ^a	0,292 ± 0,029 ^a
	2%	20	106,7 ± 0,8 ^c	0,269 ± 0,027 ^a
70:30	1%	10	65,4 ± 1,3 ^b	0,202 ± 0,028 ^a
	1%	20	34,8 ± 0,7 ^d	0,245 ± 0,025 ^a
	2%	10	53,9 ± 1,4 ^a	0,249 ± 0,024 ^a
	2%	20	49,5 ± 0,9 ^c	0,215 ± 0,032 ^a

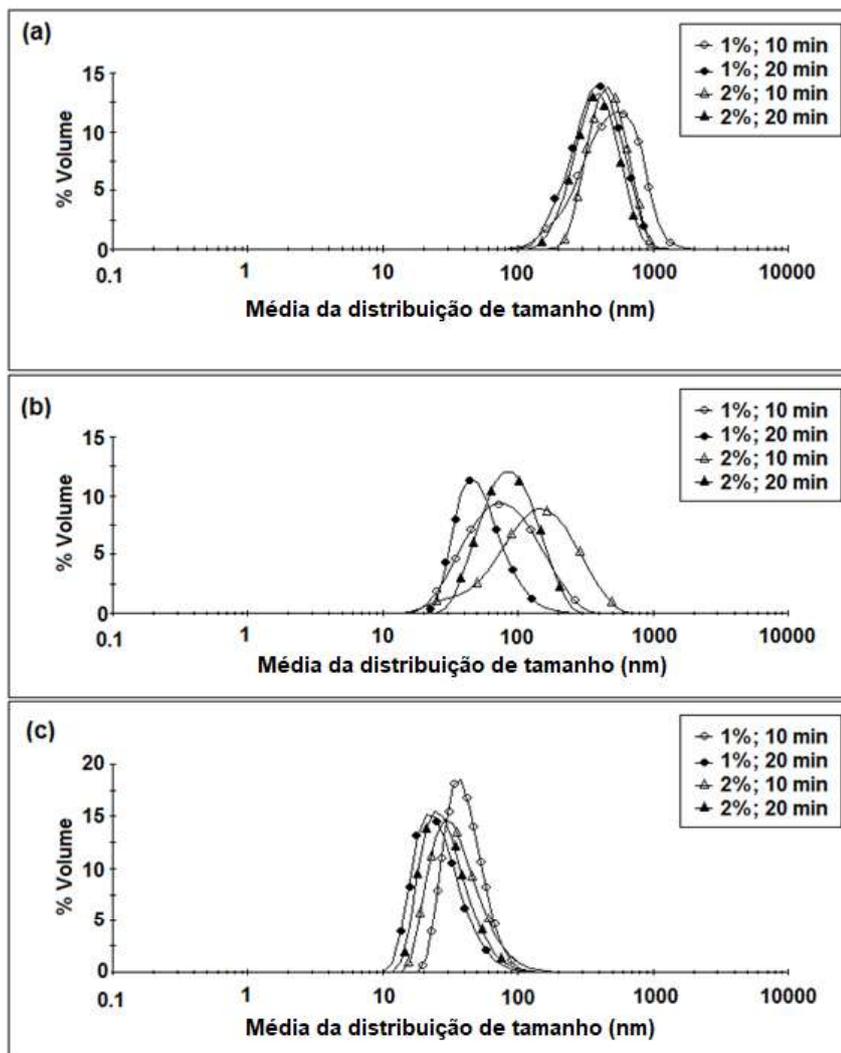
* média ± desvio padrão (n=3). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05) para a mesma relação de material de parede (MP).

Yuan et al. (2013) examinaram a influência da adição de quitosana nas emulsões contendo isolado proteico de soro de leite. A pH 3, com o aumento da concentração, não houve evidência de agregação de gotículas no tamanho das partículas ou nas observações visuais das emulsões. A alta estabilidade destas emulsões pode ser atribuída ao fato de que não houve atração entre as superfícies do polímero e gotículas. Além disso, pode-se observar

na Tabela 4 que a adição de gelatina levou a uma diminuição no tamanho das partículas. Surh et al. (2006) usando gelatina para estabilizar as emulsões de óleo em água, determinaram que a quantidade de gotículas grandes observadas nas emulsões tende a diminuir à medida que aumentou a concentração de gelatina de pescado.

As distribuições de tamanho de partícula das diferentes emulsões estão mostradas na Figura 14.

Figura 14 – Valores médios ($n = 3$) da distribuição do tamanho de partícula (% volume) de nanocápsulas com diferentes proporções de quitosana:gelatina: (a) 100:0, (b) 90:10 e (c) 70:30, com concentração de biopolímero de 1% ou 2%, e dois tempos de homogeneização (10 e 20 min).



Nanoemulsões são formadas por gotículas muito pequenas, com diâmetros de partícula variando de 10 a 300 nm e baixa polidispersão. Quanto menor é seu valor, mais

homogênea é a amostra, sendo os valores apropriados inferiores a 0,3 (LIM et al., 2013). Todas as amostras apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 (Tabela 4) e distribuição de tamanho de partícula monomodal (Figura 14), indicando homogeneidade, com gotículas distribuídas em uma faixa estreita. A composição da emulsão e as condições de homogeneização estudadas não registraram diferença significativa entre os índices de polidispersão para cada proporção de biopolímero.

Para cada proporção de biopolímero (quitosana:gelatina) (100:0, 90:10 e 70:30) mostrada na Tabela 4, foi selecionada uma emulsão para ser caracterizada. O critério de seleção utilizado foi o menor tamanho de gotícula. Assim, em todas as proporções, foram selecionadas as nanoemulsões preparadas usando 20 min de tempo de homogeneização e concentração de polímero na fase líquida de 1% (m/v).

5.3.2 Potencial Zeta, pH, Turbidez, índice de refração e morfologia das nanoemulsões

O potencial Zeta reflete a composição interfacial das nanoemulsões em relação ao surfactante ou a presença de moléculas com carga. Inicialmente, foram medidos os potenciais das soluções iniciais de quitosana e gelatina, que foram de 32,8 e 13,8 mV, respectivamente. O potencial Zeta das nanoemulsões preparadas foi medido (Tabela 5), e todos os valores foram positivos com carga interfacial variando de 26,5 a 31,0 mV. Os resultados positivos podem ser atribuídos à presença de quitosana, que carrega uma carga positiva na molécula quando em um meio ácido (pH ~ 3,7) (WANDREY et al., 2010). Li et al. (2016) prepararam nanoemulsões de óleo de triglicerídeos de cadeia média, *Tween* 80 e lecitina para encapsular curcumina com quitosana e, os autores verificaram que após a adição de quitosana nas nanoemulsões o potencial Zeta foi alterado de negativo para positivo.

Os valores de potencial Zeta acima de 20 mV sugerem nanoemulsões estáveis, devido à repulsão entre as partículas e impedem a agregação (WANDREY et al., 2010; PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014). A diminuição da carga das gotículas nas misturas pode ser explicada pela substituição parcial da quitosana (biopolímero catiônico, 32,8 mV) por gelatina, que é um biopolímero anfotérico (13,8 mV) e, portanto, tem uma carga mais baixa na superfície das gotículas (SAHOO et al., 2015).

Não houve diferenças significativas nos valores de pH das nanoemulsões (Tabela 5), medidos no tempo 0. Para aplicações alimentares, é importante estabelecer as características elétricas das moléculas de biopolímero usadas (potencial Zeta versus pH), uma vez que as interações eletrostáticas podem afetar as interações dos ingredientes e a

estabilidade da emulsão. O valor do pH é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade de emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final (PIORKOWSKI; McCLEMENTS, 2014).

Tabela 5 – Resultados obtidos para o potencial Zeta, pH, turbidez e índice de refração de nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de quitosana:gelatina na fase líquida (1% m/v) e tempo de homogeneização de 20 min.

Material de parede (quitosana:gelatina)	Potencial Zeta (mV)*	pH*	Turbidez*	Índice de refração*
(100:0)	31,5 ± 0,4 ^a	3,74 ± 0,05 ^a	0,538 ± 0,003 ^a	1,3360 ± 0,0001 ^a
(90:10)	30,1 ± 0,3 ^b	3,76 ± 0,06 ^a	0,498 ± 0,005 ^b	1,3355 ± 0,0004 ^a
(70:30)	26,5 ± 1,2 ^c	3,80 ± 0,05 ^a	0,476 ± 0,002 ^c	1,3360 ± 0,0002 ^a

* média ± desvio padrão (n=3). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p < 0,05).

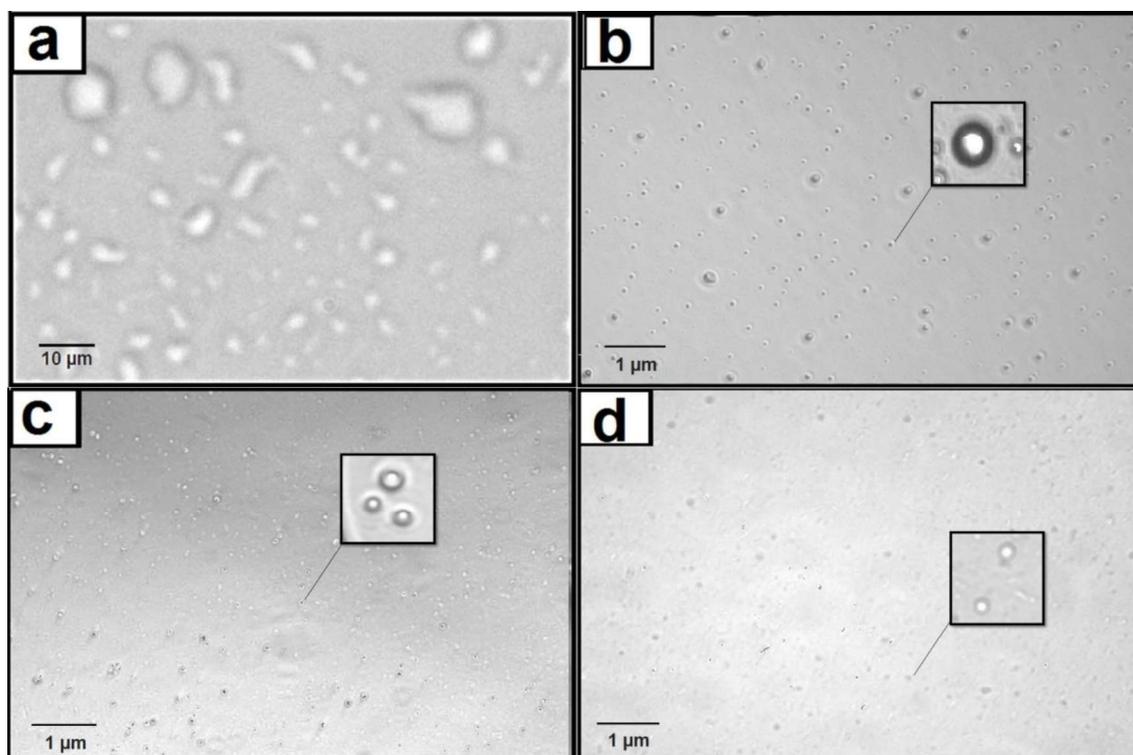
A turbidez e o índice de refração das suspensões foram medidos para complementar as informações sobre suas propriedades de dispersão de luz. De acordo com McClements (2002), a aparência geral de uma emulsão é influenciada pelas suas características coloidais. A dispersão é em grande parte responsável pela turbidez, opacidade e leveza de uma emulsão, enquanto a absorção é em grande parte responsável pela cromaticidade. Na Tabela 5, a turbidez diminuiu com a diminuição do tamanho das gotículas (Tabela 4). Uluata et al. (2016) determinaram efeito semelhante em emulsões de óleo de pescado e, atribuíram esse efeito ao fato de que pequenas gotículas se espalharam menos que as grandes gotículas.

Os valores do índice de refração foram estatisticamente semelhantes em todas as amostras (Tabela 5). O índice de refração é influenciado pela concentração de materiais presentes na emulsão de óleo em água, sendo intimamente relacionado à luminosidade das amostras (McCLEMENTS, 2002). Como as concentrações de polímeros para todas as emulsões foram semelhantes, não foi verificada nenhuma perturbação. Além disso, Dey et al. (2012) testaram o índice de refração de emulsões convencionais e nanoemulsões de óleo de pescado rico em EPA e DHA, e determinaram que não havia diferença entre os índices de

refração, concluindo que as formulações eram termodinamicamente e quimicamente estáveis e, permaneceram isotrópicas.

A Figura 15 mostra imagens de microscópio ótico dos concentrados de AGI antes da homogeneização com os biopolímeros e após a formação das nanoemulsões. Pode-se observar uma mudança no formato das gotículas dos concentrados (Figura 15(a)) que eram irregulares, e após a formação de nanoemulsões (Figura 15(b), (c) e (d)) as gotículas de óleo se apresentaram de forma esférica, com boa integridade. Além disso, a formação de uma parede polimérica ao redor do núcleo de óleo pode ser vista, confirmando o revestimento (encapsulamento) dos concentrados de AGI de óleo de peixe. Assim como visualizado na análise de espalhamento de luz (Tabela 4), as cápsulas formadas utilizando apenas quitosana na fase aquosa apresentaram maior tamanho. Com o revestimento adicional de biopolímeros nas gotículas, foi possível preparar emulsões estáveis contendo óleo de peixe concentrado rico em ômega 3.

Figura 15 – Imagens microscópicas: (a) óleo sem presença de biopolímeros; Nanocápsulas formadas utilizando quitosana e gelatina na fase aquosa (1% m/v) e 20 min de tempo de homogeneização, nas proporções de (b) 100:0, (c) 90:10 e (d) 70:30.



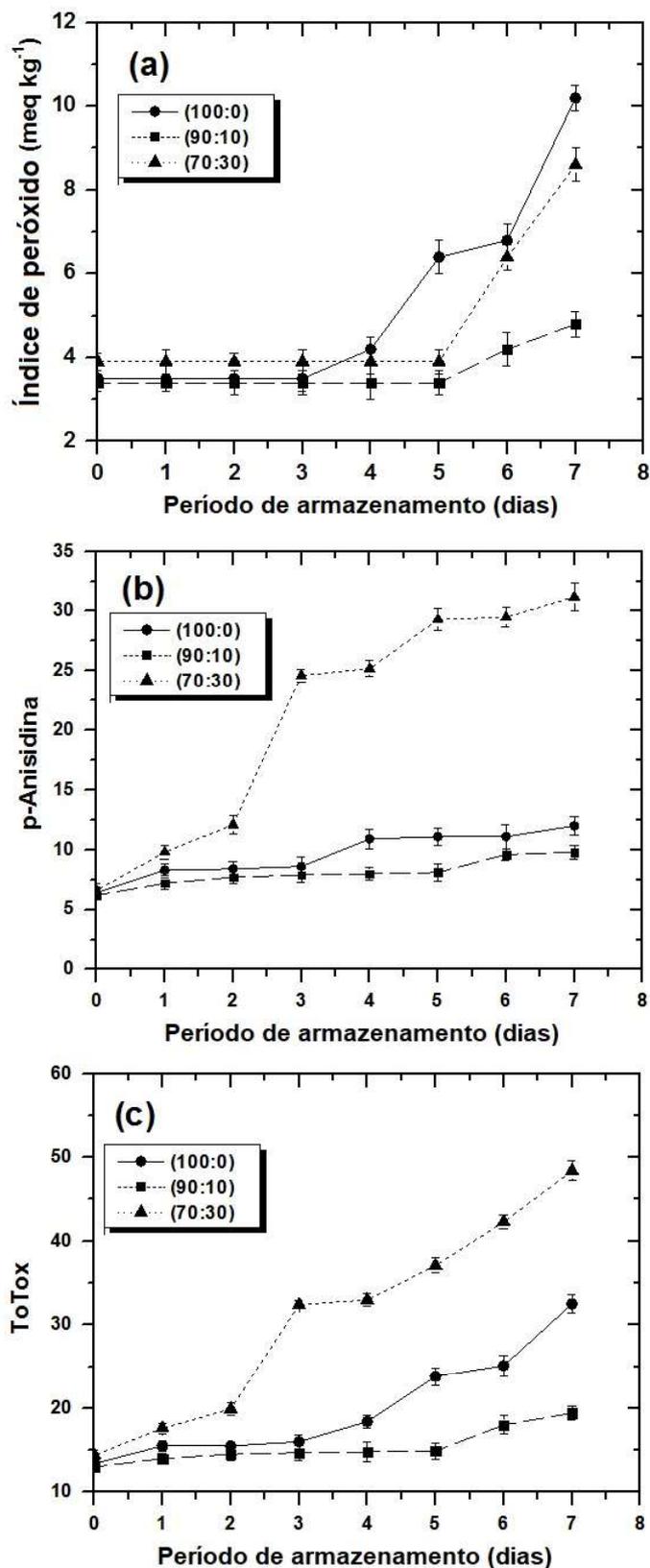
5.3.3 Estabilidade oxidativa das nanocápsulas

A estabilidade oxidativa das nanocápsulas contendo os concentrados de AGI, elaboradas com diferentes proporções de biopolímeros, foi verificada (Figura 16). Os produtos de oxidação primária foram monitorados medindo o índice de peróxido (Figura 16(a)), enquanto os produtos de oxidação secundária foram verificados pelos valores de p-anisidina (Figura 16(b)). A oxidação total foi calculada pelo valor TOTOX (Figura 16(c)).

A influência dos biopolímeros na oxidação das nanocápsulas foi comparada. Para todas as nanoemulsões, os valores de peróxido e p-anisidina aumentaram ao longo dos dias de armazenamento. No entanto, a formulação que apresentou a proporção de quitosana:gelatina 90:10 mostrou menos oxidação após 7 dias (índice peróxido de 4,8 meq kg⁻¹, p-Anisidina de 9,0 e TOTOX de 19,4). Estudos sugerem que a quitosana pode atuar como antioxidante em emulsões, pela adsorção na superfície de lipídios, formando uma camada de polímero ao redor das gotículas de óleo. O revestimento (encapsulamento) tem uma carga positiva, com capacidade para repelir íons catiônicos de metais de transição (que é um dos principais fatores de oxidação) (NUCHI et al., 2001). A gelatina (um agente não iônico) atuando como co-surfactante, associada ao *Tween* 80 (um agente não iônico) é capaz de formar complexos interfaciais na superfície dos glóbulos dispersos, que promovem uma estabilização maior da emulsão do que quando apenas um agente emulsionante é empregado. Assim, a gelatina pode ter ajudado a quitosana a aderir às superfícies lipídicas, formando uma película carregada eletricamente, sendo uma melhor barreira à oxidação. Porém, o aumento da quantidade de gelatina reduziu a proporção de quitosana para formar o revestimento polimérico no óleo, deixando as paredes mais finas (Figura 15) podendo ser o motivo do aumento da oxidação primária e secundária (PIACENTINI et al., 2013; SCHULMAN; COCKBAIN, 1940).

Além disso, a oxidação lipídica é acelerada por reações químicas que ocorrem na superfície das gotículas da emulsão. Assim, a taxa de oxidação lipídica aumenta à medida que o tamanho das gotículas diminui, devido à maior área superficial exposta à fase aquosa (OSBORN; AKOH, 2004). Este fato corrobora com os altos valores de p-anisidina (31,2) encontrados para a proporção de 70:30, que apresentaram os menores tamanhos de gotículas. Estes resultados demonstram que a presença de polissacarídeos na composição das nanoemulsões tem um papel importante para reduzir a oxidação dos ácidos graxos, e o estudo de proporções apropriadas leva à formação de uma camada interfacial de polímero mais eficiente.

Figura 16 – Efeito das proporções ao longo do tempo de biopolímeros (quitosana:gelatina (●) 100:0, (■) 90:10 e (▲) 70:30) na fase aquosa (1% m/v) de nanoemulsões sobre: (a) índices de peróxido, (b) valores de p-anisidina, e (c) oxidação total (TOTOX).



Salvia-Trujillo et al. (2016) avaliaram o impacto da adição de polissacarídeos sobre a estabilidade química de nanoemulsões enriquecidas com óleo de peixe ricos em ômega-3. Os resultados indicaram que a carga de uma molécula de polissacarídeo desempenha um papel importante na oxidação de ácidos graxos nas emulsões. Uluata et al. (2016) estudaram o efeito do tamanho de partícula na estabilidade das emulsões de óleo de peixe. Os produtos de oxidação primária e secundária indicaram que a taxa de oxidação aumentou com a diminuição do tamanho das gotículas, pois a luz conseguiu penetrar mais facilmente e gerar espécies reativas de oxigênio em pequenas gotas. A estabilidade oxidativa de nanoemulsões de óleo de peixe produzidos por emulsificação espontânea foi estudada por Walker et al. (2015b) e, avaliada pelos valores de peróxido e ácido tiobarbitúrico durante 14 dias. Foram testados o efeito da concentração de surfactante e tamanho de partículas na sua estabilidade oxidativa. Nem o tamanho de partículas nem a concentração do tensoativo tiveram um grande impacto sobre a taxa de oxidação de lipídios nas emulsões de óleo de peixe, para produzir emulsões que podem ser adequados para fortificar os sistemas alimentares ou bebidas.

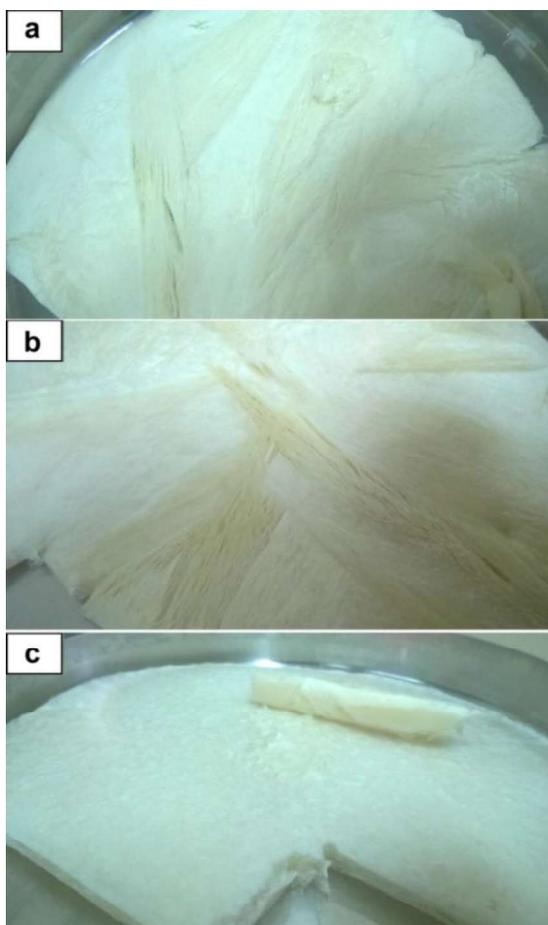
De acordo com o Padrão Geral de Aditivos Alimentares (*General Standard of Food Additives*, CODEX, 2013), na categoria de alimentos: banha, sebo, óleo de peixe e outras gorduras animais, deve cumprir o seguinte: índice de peróxido $\leq 5 \text{ meq kg}^{-1}$, valor de p-anisidina ≤ 20 e oxidação total (valor TOTOX) ≤ 26 para garantir uma boa qualidade e a proteção do consumidor.

Apesar, de as nanoemulsões terem permanecido sem separação de fases por 30 dias, as nanocápsulas com os melhores resultados de oxidação (relação de 90:10) permaneceu dentro do limite aceitável por 7 dias (CODEX, 2013), mostrando o índice de peróxido variando de um mínimo de $3,4 \text{ meq kg}^{-1}$ a um máximo de $4,8 \text{ meq kg}^{-1}$. Os valores de p-anisidina variaram de 6,2 a 9,8. O TOTOX foi de cerca de 13,0 e, após uma semana de armazenamento, foi de 19,4. Estes resultados têm implicações importantes para o desenvolvimento das nanocápsulas, a fim de reforçar os alimentos e bebidas. Com o revestimento adicional de biopolímeros nas gotículas, foi possível preparar emulsões estáveis contendo concentrados de AGI a partir de óleo de carpa, sendo a proporção 90:10 a que gerou resultados mais adequados, com maior proteção dos concentrados de AGI. Assim, a fim de verificar a possibilidade do aumento da estabilidade das nanocápsulas, as mesmas foram secas por liofilização, para a obtenção de microestruturas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESTRUTURAS

As nanocápsulas de concentrados de AGI utilizando os biopolímeros quitosana:gelatina (1% m/v), nas proporções de 100:0, 90:10 e 70:30 foram liofilizadas a fim de obter e estudar as microestruturas formadas, e verificar a influência da modificação da proporção dos materiais de parede. Os experimentos para produzir microestruturas por congelamento foram projetados para obter informações sobre a estabilidade das microcápsulas quando o processo não envolve tratamento térmico. Este método é aplicado para avaliar o efeito de baixas temperaturas de secagem na produção e estabilidade das microcápsulas de óleo de peixe. As imagens fotográficas das amostras liofilizadas estão apresentadas na Figura 17, onde pode se observar uma estrutura esponjosa, irregular, muito leve e altamente porosa. Anwar e Kunz (2011) encontraram uma estrutura similar para microcápsulas de óleo de peixe obtidas por liofilização.

Figura 17 – Imagens fotográfica da microestrutura formada utilizando quitosana e gelatina nas proporções de (a) 100:0, (b) 90:10 e (c) 70:30.



As características texturais das microestruturas formadas podem ser observadas nas Figuras 18, 19 e 20, para os diferentes materiais de parede utilizados. Através das micrografias obtidas, observa-se que as cápsulas formadas apresentaram forma esférica, aderida à superfície da microestrutura. Além disso, pode-se confirmar que a adição de gelatina proporcionou uma diminuição no tamanho das gotículas de AGI encapsulados. Para as três amostras analisadas, o espectro EDX, apresentou como principais elementos presentes na superfície: carbono, nitrogênio e oxigênio. Essa composição é justificada pela estrutura química dos componentes utilizados para a elaboração das emulsões (óleo, quitosana e gelatina (Figuras 1, 2 e 3)), que são formados por átomos de carbono nitrogênio e oxigênio majoritariamente.

Figura 18 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 100% de quitosana (a) $\times 250$, (b) $\times 1.000$ (c) $\times 2.5000$ e (d) $\times 15.000$.

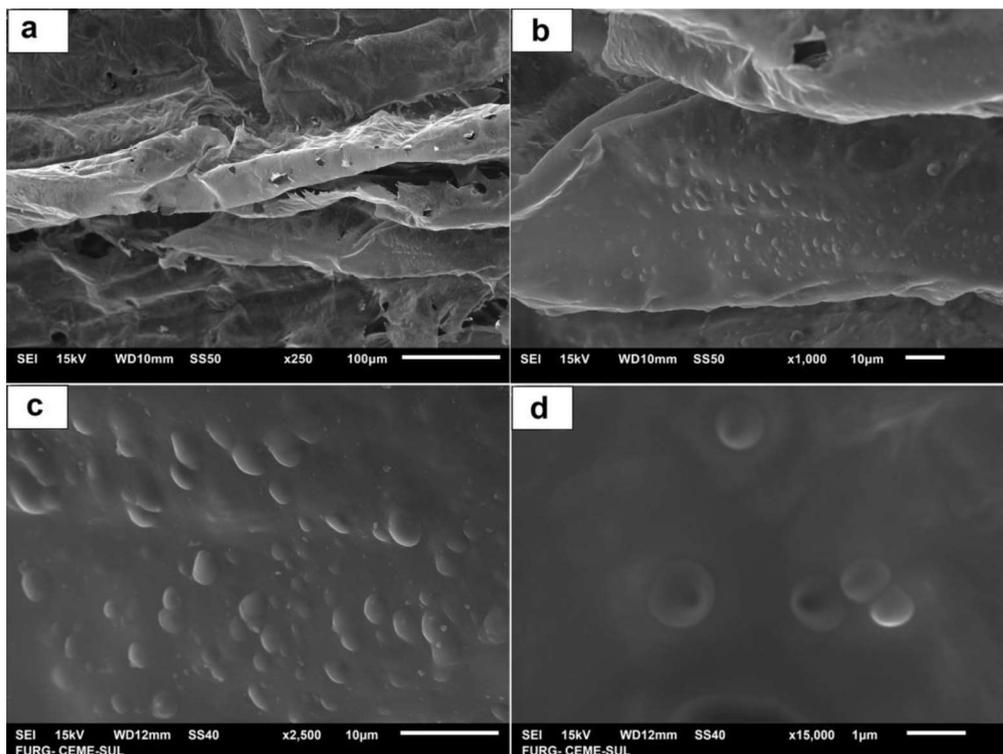


Figura 19 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 90% de quitosana e 10% de gelatina (a) $\times 250$, (b) $\times 1.000$ (c) $\times 2.5000$ e (c) $\times 15.000$.

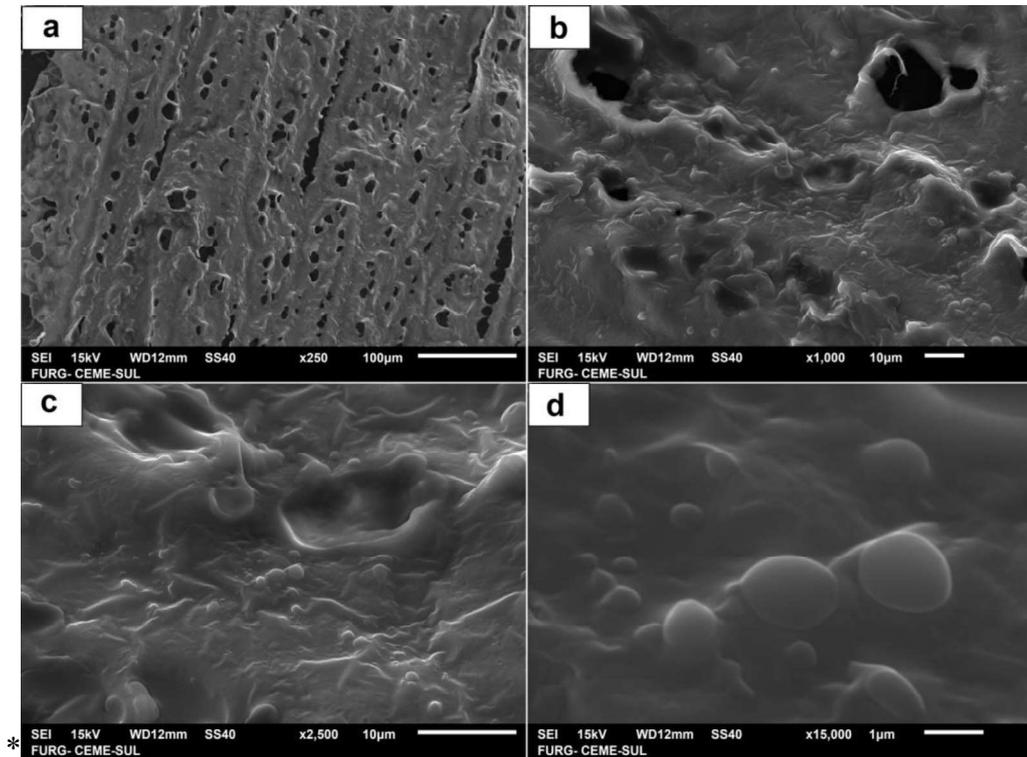
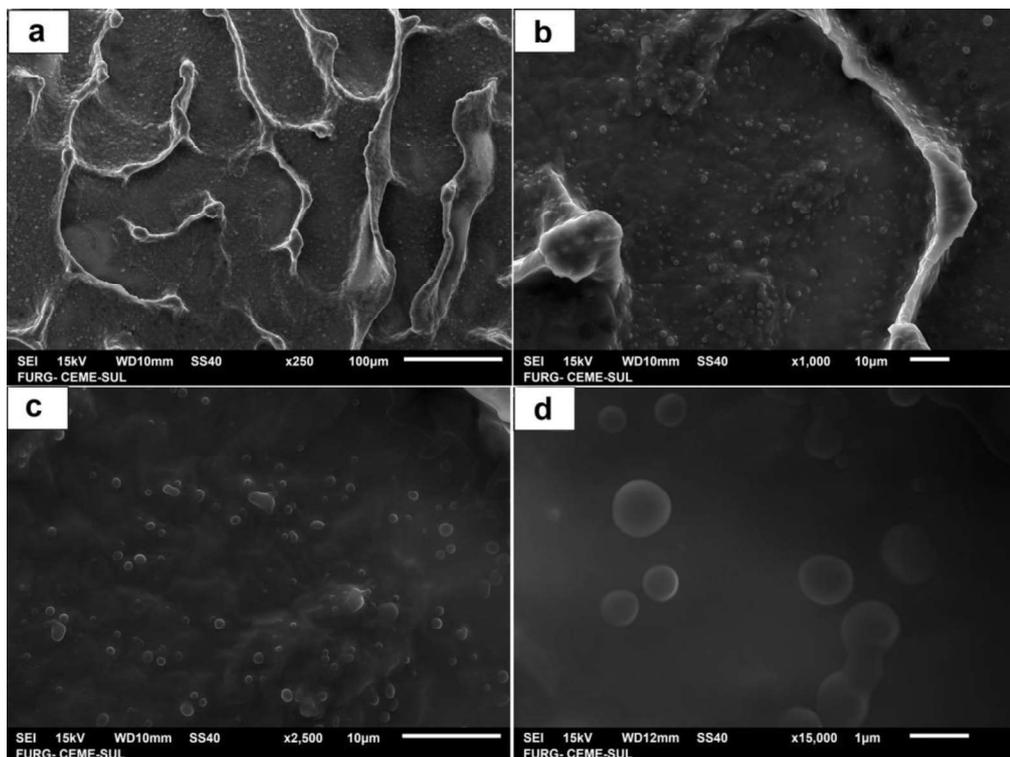


Figura 20 – Micrografias das cápsulas liofilizadas utilizando 70% de quitosana e 30% de gelatina (a) $\times 250$, (b) $\times 1.000$ (c) $\times 2.5000$ e (c) $\times 15.000$.



A Tabela 6 mostra os parâmetros de cor das matérias-primas utilizadas para a elaboração das emulsões e eficiência de encapsulamento e rendimento do processo, de uma amostra de quitosana pura liofilizada (padrão) e das microestruturas contendo os concentrados de AGI utilizando as diferentes proporções de material de parede. Em relação aos parâmetros de L^* , as amostras estudadas apresentaram diferença significativa, porém todas tiveram tendência à cor clara e, o aumento da substituição de quitosana por gelatina levou a um leve escurecimento, devido provavelmente a gelificação. Além disso, a gelatina em pó apresentou um valor de L^* inferior da quitosana em pó, confirmando a tendência a um leve escurecimento. Para b^* , os altos valores positivos indicam tendência à cor amarelada, confirmada pelos valores do ângulo Hue (H_{ab}), que mostraram que as microestruturas apresentaram tonalidade amarelada.

O croma (C^*) (Tabela 6), que é o valor da intensidade da cor de uma amostra percebida pelos seres humanos, encontrado nesta pesquisa foi baixo, indicando que a intensidade da cor das amostras do presente estudo não é intensa. Já os concentrados de AGI apresentaram ângulo Hue de 74° , mostrando uma tendência a tonalidade alaranjada e o menor valor de croma associado à sua menor intensidade devido a transparência do óleo. O baixo valor de ΔE_{ab}^* indicou que o processo de encapsulamento teve pouco efeito sobre a cor do produto final, demonstrando predominância da cor do material de parede, confirmando um encapsulamento efetivo. Klaypradit e Huang (2008) encontraram resultados semelhantes no encapsulamento do óleo de peixe usando quitosana como agente encapsulante.

As eficiências de encapsulamento (EE) variaram de 70 a 78%. Essa diferença provocada pelo aumento da quantidade de gelatina demonstrou que houve uma inefetividade da gelatina como revestimento polimérico no óleo, deixando as paredes mais finas. Esse resultado pode ser confirmado verificando-se o valor de L^* quando os valores de EE eram mais baixos. Sabendo-se que, o L^* dos concentrados de AGI foi baixo, essa alteração no valor pode representar o óleo presente na superfície das microestruturas. Minimizar a quantidade de óleo superficial é crucial na microencapsulação lipídica, já que este material pode se oxidar a taxas mais rápidas do que o óleo encapsulado, causando rancidez e reduzindo a vida útil do produto acabado (KARACA et al., 2013).

Tabela 6 – Parâmetros de cor das matérias-primas, do padrão (quitosana liofilizada) e das microestruturas e eficiência de encapsulamento (EE) e rendimento do processo de secagem (R) das microestruturas contendo as nanocápsulas liofilizadas.

Análises	Amostras						
	Quitosana em pó	Gelatina em pó	Concentrados de AGI	Padrão	100:0	90:10	70:30
L*	81,07 ± 1,41 ^a	77,16 ± 1,86 ^b	29,76 ± 1,64 ^c	86,84 ± 1,22 ^d	83,02 ± 1,24 ^{a,d}	82,40 ± 0,87 ^{a,d}	78,66 ± 1,04 ^{a,b}
a*	3,09 ± 0,20 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	- 1,58 ± 0,20 ^c	1,02 ± 0,05 ^d	0,06 ± 0,05 ^c	- 0,11 ± 0,07 ^f	- 0,56 ± 0,08 ^g
b*	26,63 ± 3,13 ^a	12,57 ± 0,47 ^b	5,14 ± 2,51 ^c	13,45 ± 0,34 ^d	15,98 ± 1,19 ^e	14,57 ± 0,67 ^{d,e}	9,46 ± 0,32 ^f
ΔE_{ab}*	-	-	-	-	3,82 ± 0,36 ^a	3,38 ± 0,69 ^a	8,08 ± 0,98 ^b
C*	26,32 ± 3,11 ^a	12,31 ± 0,47 ^b	5,37 ± 0,15 ^c	13,48 ± 0,89 ^b	15,50 ± 1,19 ^b	14,41 ± 0,67 ^b	9,47 ± 0,31 ^d
H_{ab} (°)	83,31 ± 0,74 ^a	89,55 ± 1,27 ^a	74,87 ± 1,99 ^b	85,70 ± 1,90 ^a	88,55 ± 0,86 ^a	89,17 ± 0,68 ^a	86,49 ± 0,53 ^a
EE (%)	-	-	-	-	78,1 ± 0,6 ^a	73,7 ± 0,8 ^b	70,6 ± 0,4 ^c
R (%)	-	-	-	99,3 ± 0,3 ^a	99,0 ± 0,8 ^a	99,0 ± 0,6 ^a	99,1 ± 0,6 ^a

* média ± desvio padrão (n=3). Letras sobrescritas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p < 0,05).

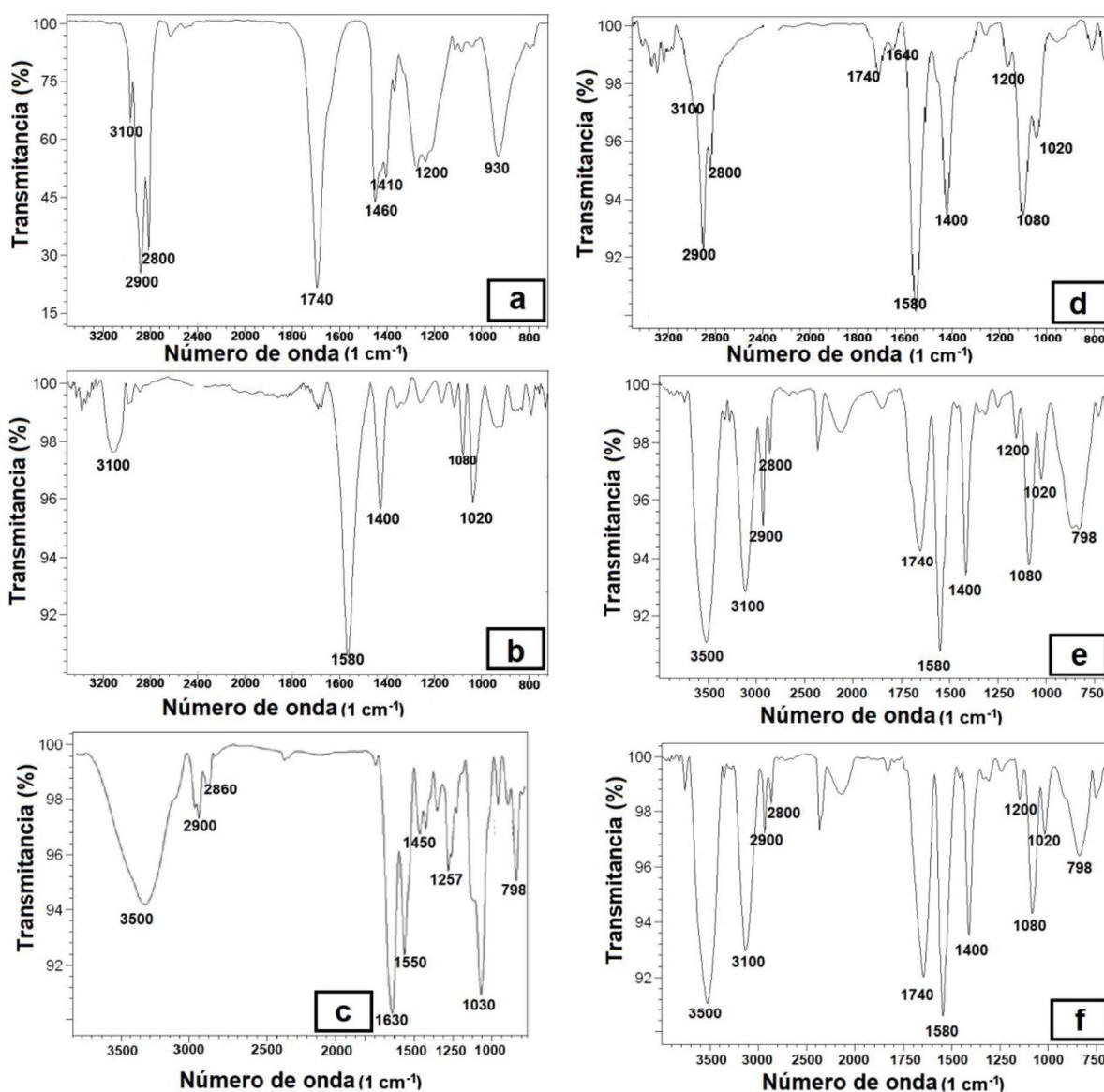
Aghbashlo et al. (2012) estudaram diferentes tipos de materiais de parede para o encapsulamento de óleo de peixe, e encontraram eficiência de encapsulamento variando de 76 % a 85 %. Klaypradit e Huang (2008) encontraram valores variando entre 79 e 83 % no encapsulamento de óleo de peixe com quitosana por atomizador ultrasônico. Eratte et al. (2015) encapsularam ácidos graxos ômega-3 de óleo de atum utilizando isolado proteico de soro de leite e goma arábica como materiais de parede, utilizando as técnicas de *spray dryer* e liofilização. Seus valores de eficiência de encapsulamento para as microcápsulas obtidas por liofilização foram de 76,3 %.

A quantidade de óleo retida na cápsula seca é importante porque influencia a estabilidade do produto. Sendo assim, as eficiências de encapsulamento encontradas neste trabalho são semelhantes às encontradas na literatura. O rendimento do processo de secagem por liofilização foi alto em todas as amostras. Esse fato se deve ao processo de secagem não ser um método destrutivo, proporcionando um elevado rendimento, sem perdas significativas. Peng et al. (2010) usando material à base de quitosana para encapsular o óleo de algas encontraram o rendimento do processo de 94%.

Os grupamentos funcionais nas microestruturas foram identificados por análise de FT-IR (Figura 21). Foram analisados os concentrados de AGI (Figura 21(a)), a quitosana pura (Figura 21(b)), a gelatina pura (Figura 21(c)) e as microestruturas (Figura 21(d), (e) e (f)) contendo as nanocápsulas com diferentes proporções de material de parede. Na Figura 21(a), pode ser observado a 3100 cm^{-1} , o pico relacionado a um hidrogênio ligado a um carbono insaturado. Foram identificadas as bandas 2900 , 2800 , 1740 e 1200 cm^{-1} . As bandas a 2900 e 2800 cm^{-1} representam as ligações simétricas e assimétricas de $-\text{CH}_2-$, respectivamente. A banda 1740 cm^{-1} é relativa às ligações $\text{C}=\text{O}$. A banda em torno de 1200 cm^{-1} é relativa a $\text{C}-\text{O}$ dos ésteres dos ácidos graxos formados após a hidrólise. As bandas encontradas são típicas de AGI. A Figura 21(b) mostra bandas vibracionais típicas da quitosana: 3100 cm^{-1} (relativa aos estiramentos das ligações $\text{O}-\text{H}$ e $\text{N}-\text{H}$), 1580 cm^{-1} (estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$ de amida), 1400 (deformação angular das ligações $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ e $\text{H}-\text{C}-\text{H}$), 1080 (ligação $\text{C}-\text{N}$ de amina) e 1020 cm^{-1} (estiramento da ligação $\text{C}-\text{O}$), sendo possível afirmar que os grupamentos NH_2 e OH , típicos da quitosana, estão presentes no espectro (DOTTO et al., 2013). Pode-se observar ainda, na Figura 21(c), as bandas de absorção nas regiões de amida características da gelatina. A banda que representa a amida-A situou-se em 3500 cm^{-1} , e em 2900 cm^{-1} encontra-se a banda relativa a amida-B, a formação desta banda está relacionada com o alongamento causado pelas ligações $\text{N}-\text{H}$. Em 2860 cm^{-1} pode-se observar as vibrações dos estiramentos das ligações $\text{C}-\text{H}$. A banda 1630 cm^{-1} representa os estiramentos do grupamento $\text{C}-\text{N}$ e

flexão N–H no plano da amida I. O pico 1550 cm^{-1} corresponde à absorção na região da amida II. As vibrações dos anéis de prolina e hidroxiprolina são representados pela banda 1450 cm^{-1} . A banda em 1257 cm^{-1} está relacionada ao estiramento C–N da amida III (AHMAD et al., 2011; SILVA, 2014a). Em 798 cm^{-1} é encontrado o pico referente à amida primária de aminoácidos em estado sólido.

Figura 21 – Espectro FT–IR: (a) concentrados de AGI, (b) quitosana pura, (c) gelatina pura e microestruturas utilizando proporções de (d) 100:0 (e) 90:10 e (f) 70:30 (quitosana:gelatina) contendo as cápsulas de concentrados de AGI.



Nas Figuras 21(d), (e) e (f), relativas às microestruturas formadas, pode-se observar a presença dos picos relativos à presença da quitosana e do óleo. Ocorreu uma

modificação de forma da banda 3100 cm^{-1} , que está associada ao hidrogênio ligado a um carbono insaturado, correspondente à ligação O–H. As faixas 2900 , 2800 , 1740 e 1200 cm^{-1} do óleo foram mantidas. Com a adição da gelatina, houve o aparecimento do pico em 3500 cm^{-1} relativo a presença da amida–A, e do pico em 798 cm^{-1} relativo a amida primária. Assim, a comparação dos espectros das substâncias puras e das microestruturas confirma a presença dos concentrados de AGI, gelatina e quitosana na microestrutura. Os espectros FT–IR de ambas as microestruturas contendo os concentrados de AGI foram aproximadamente iguais à mistura virtual dos espectros dos componentes iniciais. A natureza dos picos não variou para os concentrados combinados aos materiais de parede com a cápsula gerada, indicando a ausência de qualquer interação química forte entre óleo de pescado e o material de parede. Aghbashlo et al. (2012) encontraram comportamento semelhante ao encapsular óleo de pescado utilizando lactose e sacarose como materiais de parede, e definiram que os resultados evidenciaram as boas características de encapsulamento, relevantes para as características físicas de sua composição.

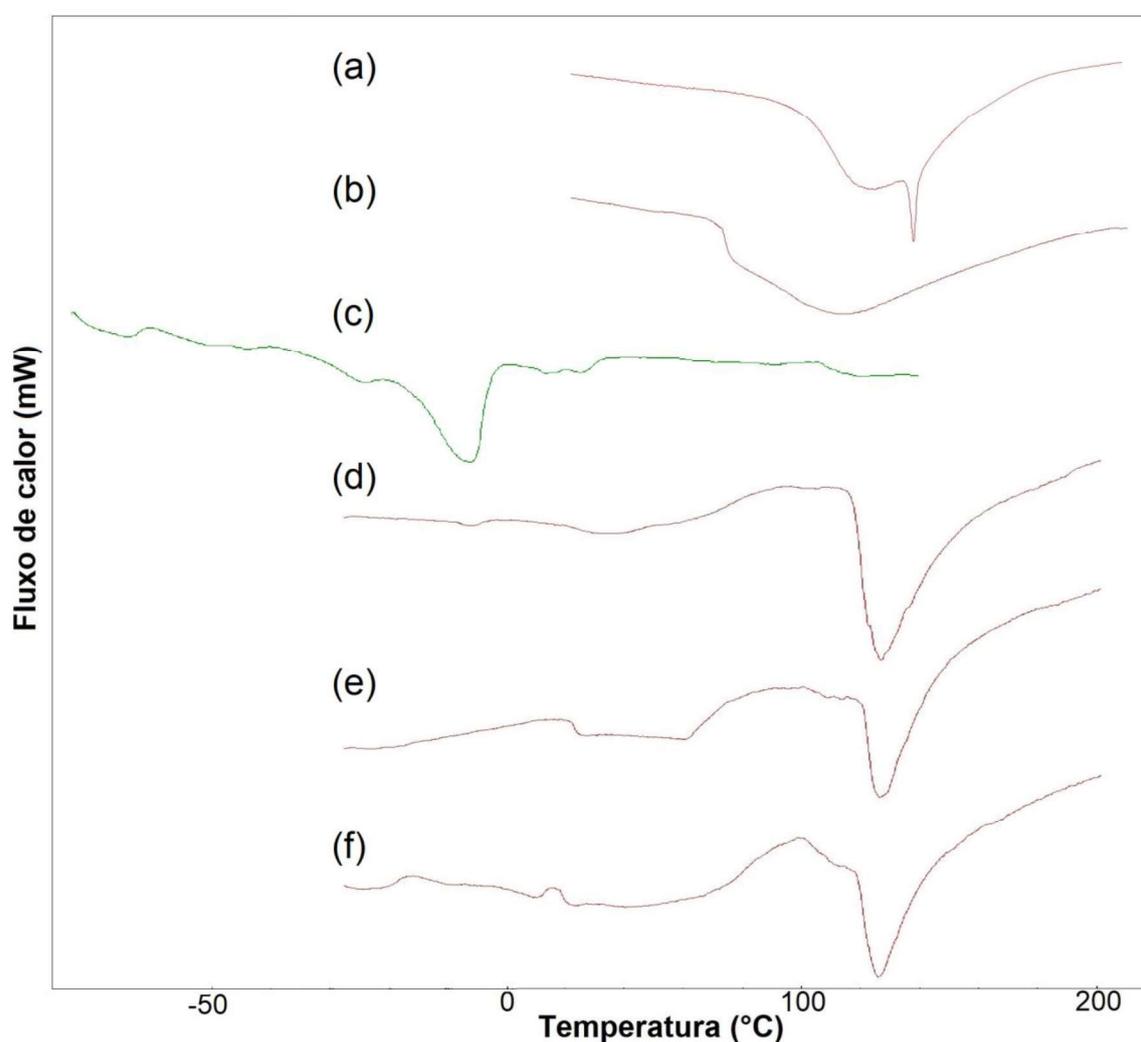
Os termogramas dos materiais de parede, dos concentrados de AGI e das microestruturas contendo as cápsulas estão apresentados na Figura 22, e apresentam as etapas de decomposição relacionadas à perda de massa. A Figura 22(a) mostra a curva DSC da quitosana pura representada por um pico endotérmico próximo de 100°C atribuído à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada a pontes de hidrogênio com grupos hidroxila da quitosana (CONTRI et al., 2014). O termograma da gelatina (Figura 22(b)) mostrou pico endotérmico amplo. Este pico, que corresponde à temperatura de fusão, é definido como a temperatura correspondente a ruptura de ligações entre as cadeias, resultando na fusão de cadeias peptídicas (FLORY; GARRETT, 1958).

Em relação ao termograma dos concentrados de ácidos graxos insaturados (Figura 22(c)) pode-se observar três picos principais a cerca de -65°C , -30°C e -5°C . O primeiro refere-se ao ponto de fusão de ácidos graxos poli-insaturados, como os ácidos graxos da família $\omega-3$ (EPA e DHA). O segundo e terceiro picos estão associados aos pontos de fusão dos ácidos linoleico e oleico, respectivamente, que estão presentes em grandes quantidades nos concentrados de AGI (Tabela 3) (ENGELMANN, 2017).

Para as três amostras de microestruturas (Figura 22 (d), (e) e (f)), é possível verificar um forte pico endotérmico com uma temperatura de início de 115°C , temperatura máxima de 125°C e temperatura de conclusão de 140°C . Este pico pode ser atribuído à degradação da estrutura de polissacarídeos da quitosana na microestrutura, incluindo a desidratação de anéis de sacarídeos, polimerização e decomposição de unidades acetiladas e

desacetiladas. Nas amostras utilizando gelatina, pode-se observar que houve um desvio na linha da base anterior ao pico, característico de eventos onde há mudança da capacidade calórica da amostra, provavelmente, relativo ao início da transição térmica associada à desnaturação das proteínas da gelatina, levando à perda da disposição dimensional das cadeias polipeptídicas.

Figura 22 – Termogramas da (a) quitosana, (b) gelatina (c) concentrados de AGI e microcápsulas de concentrados de AGI, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede (d) 100:0 (e) 90:10 e (f) 70:30).



A entalpia para a amostra utilizando apenas quitosana foi de $110,5 \text{ J g}^{-1}$. Com a substituição de 10 e 30% de gelatina, houve uma diminuição da entalpia para $78,6$ e $43,5 \text{ J g}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que a quitosana é termicamente mais estável do que as proteínas. De acordo com Liu et al., (2012), as interações entre gelatina e quitosana dependem

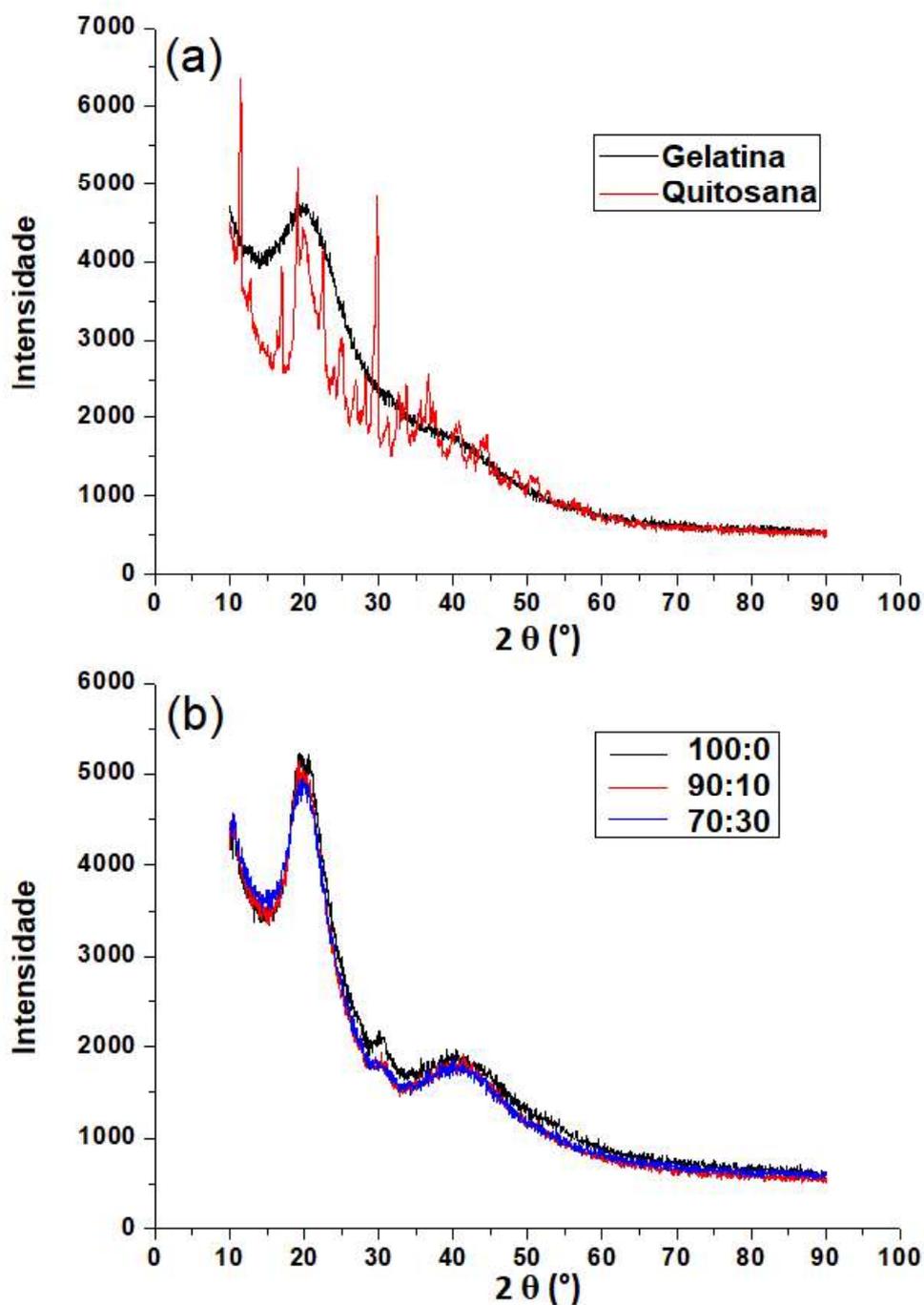
das propriedades físico-químicas de ambos os materiais. Variações na temperatura de transição entre 80 e 180°C indicam que as microestruturas de gelatina e quitosana têm boa miscibilidade. Além disso, de acordo com as curvas de DSC (Figura 22 (d), (e) e (f)), observam-se duas transições endotérmicas próximas a -25°C e 10°C, referentes às etapas de cristalização das cadeias insaturadas e saturadas. As temperaturas negativas de fusão das amostras estão relacionadas à presença dos AGI (SATHIVEL, 2005). Além disso, o desaparecimento dos picos a temperaturas negativas relativos aos concentrados de AGI, demonstra que os mesmos estão protegidos (encapsulados) pela estrutura polimérica, confirmando o encapsulamento efetivo. Os resultados demonstraram que a adição dos concentrados de AGI não teve impacto na estabilidade térmica das capsulas.

Na Figura 23 são apresentados os resultados de difração de raios-X da quitosana e gelatina em pó e das microestruturas contendo as nanocápsulas. De acordo com Gámiz-González et al. (2015), os picos principais da quitosana são em $2\theta = 9-10^\circ$ e $2\theta = 20-21^\circ$. Analisando o difratograma do pó de quitosana representado na Figura 23(a), a presença de picos característico, confirma a presença de domínios cristalinos em sua estrutura, demonstrando que a quitosana utilizada no trabalho é um polímero semicristalino, ou seja, uma mistura de cadeias cristalinas e amorfas que podem estar interconectadas. Para a gelatina em pó (Figura 23(a)) a amostra se apresentou amorfa, com picos de difração principais em torno de $2\theta = 20$ atribuídos à estrutura cristalina tripla helicoidal do colágeno desnaturado durante a extração da gelatina (BENBETTAÏEB et al., 2016).

A Figura 23 (a) e (b) permite a comparação entre as formas sólidas dos materiais de parede e das microestruturas formadas, onde para as emulsões secas observa-se uma perda considerável da intensidade dos picos presentes na quitosana (Figura 23(a)). Este tipo de comportamento traduz uma modificação da morfologia das partículas secas por liofilização, confirmando a formação de um produto amorfo. Desta forma, pode-se inferir que a alta taxa de agitação utilizada na preparação das nanoemulsões causou uma modificação estrutural na quitosana, confirmada pela alteração da curva do termograma obtido (Figura 22). Essas alterações indicam perda de cristalinidade devido à formação de novas ligações covalentes e alterações na estrutura da quitosana. De acordo com Vishnu et al. (2017), isto pode ser atribuído a um maior desdobramento das cadeias do polímero e ao encapsulamento bem sucedido do óleo dentro das micropartículas. Observações semelhantes foram feitas em espectros DRX de micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de coentro (DUMAN; KAYA, 2016) e microcápsulas de óleo de sardinha utilizando quitosana adicionada de ácido vanílico como material de parede (VISHNU et al., 2017). Mulik et al.

(2010) mostraram que o padrão de difração da curcumina é significativamente diferente do padrão de difração de nanopartículas de curcumina.

Figura 23 – Difratogramas de raios-X da (a) quitosana e gelatina em pó e (b) das microestruturas contendo as nanocápsulas de concentrados de AGI, utilizando diferentes proporções de material de parede.



Os valores de densidade aparente (ρ_p), porosidade (ϵ_p) e volume de poros (V_p) das microestruturas estão apresentados na Tabela 7. A porosidade e o volume de poros das microestruturas obtidas são considerados bastante elevados, se comparado aos valores da quitosana em pó determinados por Piccin et al. (2011) ($V_p = 9,5 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ e $\epsilon_p < 10\%$), utilizada como base inicial para a formação das microestruturas contendo as nanocápsulas. Os elevados valores de porosidade encontrados confirmam o apresentado pelas fotografias (Figura 17) e pelas micrografias (Figuras 18, 19 e 20) das microestruturas, onde se pode observar que todas tiveram aparência amorfa folhosa, consistindo de uma disposição irregular de grandes poros, contrastando com as partículas de quitosana (Figura 11) e gelatina (Figura 12), com granulometria homogênea e compacta. Estas características são especialmente importantes para fins de proteção do óleo encapsulado, uma vez que a elevada porosidade e volume de poros estão intimamente relacionados à maior difusão do oxigênio sobre a superfície da estrutura, facilitando as reações de oxidação devido ao contato entre o óleo e o oxigênio (ERATTE et al., 2015).

Tabela 7 – Valores de densidade aparente (ρ_p), porosidade (ϵ_p) e volume de poros (V_p) das microestruturas obtidas contendo as nanocápsulas.

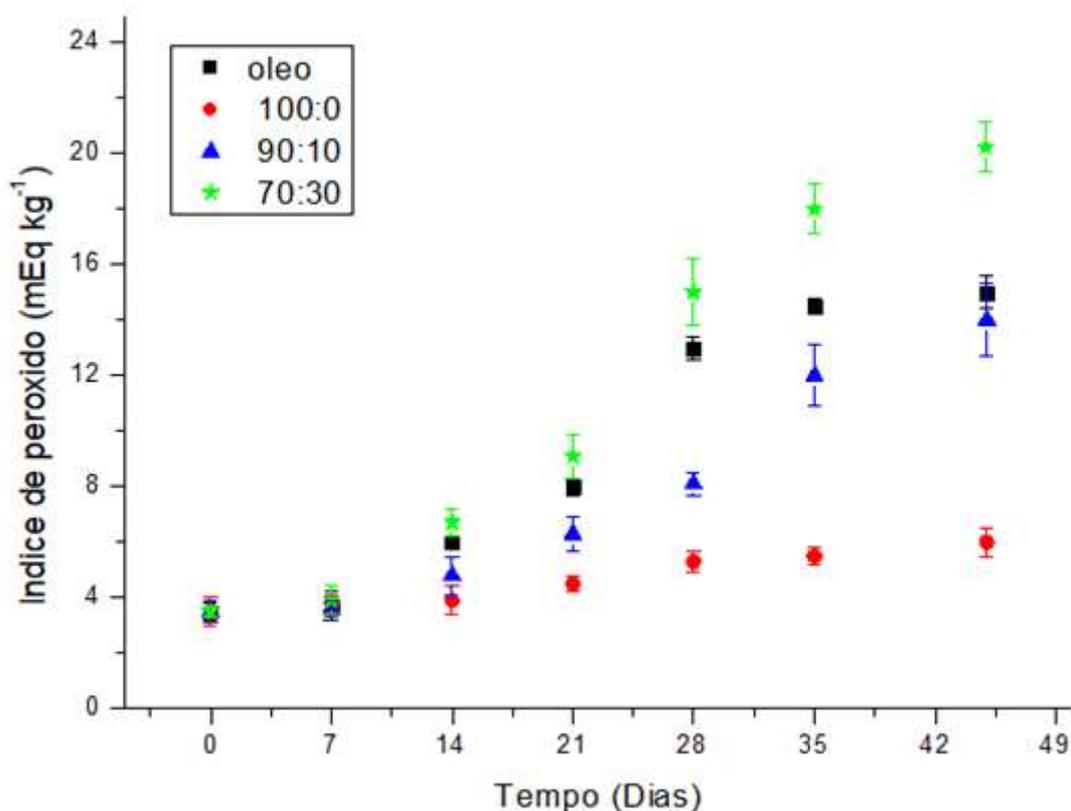
Características	Amostras microestruturas		
	100:0	90:10	70:30
ρ_p (kg m^{-3})	$61,8 \pm 5,4^a$	$40,4 \pm 2,4^b$	$37,8 \pm 0,9^c$
ϵ_p (%)	$93,7 \pm 0,9^a$	$96,6 \pm 0,5^b$	$97,4 \pm 0,1^c$
V_p ($\text{m}^3 \text{ kg}^{-1}$)	$0,015 \pm 0,003^a$	$0,023 \pm 0,005^b$	$0,029 \pm 0,002^c$

*média \pm desvio padrão (n=5). Letras sobrescritas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os concentrados de AGI utilizados no trabalho são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, altamente suscetíveis à degradação oxidativa. Os produtos oxidativos primários (medidos pelo índice de peróxido) podem participar na auto-oxidação de lipídios para produzir uma variedade de produtos secundários de oxidação, que podem ter efeitos adversos na qualidade do produto final (KARACA et al., 2013). Desta forma, a oxidação primária dos concentrados de AGI encapsulados foi testada através do índice de peróxido. As amostras foram armazenadas a 4°C por 45 dias, e os resultados são mostrados na Figura 24. O índice de peróxido dos concentrados de AGI não protegidos, ou encapsulados foi semelhante (~ 3.6

meq kg⁻¹) no tempo zero, demonstrando que o processo de encapsulamento não causou impacto na qualidade do óleo.

Figura 24 – Índice de peróxido dos concentrados de AGI não encapsulados e das microestruturas formadas.



Os resultados de índice de peróxido demonstram que a oxidação aumentou gradualmente à medida que o tempo de armazenamento avançou. A estabilidade de todas as amostras é influenciada em grande parte pelos materiais de revestimento utilizados. Para as microestruturas, o encapsulamento que utilizou a maior proporção de gelatina forneceu a proteção mais baixa. Inicialmente, a incorporação de gelatina na emulsão deveria proporcionar uma melhor inibição de oxidação devido a maior estabilidade das emulsões. Porém, os resultados de índice de peróxido aumentaram com o aumento da quantidade de gelatina, que causou uma diminuição no tamanho das cápsulas, e uma diminuição na eficiência de encapsulamento.

A capacidade de inclusão de um óleo dentro de um agente encapsulante é determinada significativamente pela estrutura molecular do polímero e do ácido graxo (comprimento de cadeia e número de ligações duplas) (YU et al., 2001). Apesar da gelatina

ter menor capacidade para formar invólucros em moléculas grandes complexas, o diâmetro das partículas formadas também determinou para as microestruturas um papel importante na estabilidade oxidativa. As microestruturas formadas contendo cápsulas menores possuíam uma maior quantidade de óleo superficial exposta, e também permitiram uma maior dispersão da luz, devido à alta porosidade do material, levando assim à uma oxidação mais rápida (ULUATA et al., 2016). Essa oxidação foi facilitada pela morfologia da microestrutura que era irregular, muito leve, altamente porosa (Tabela 7) e, portanto, tinha uma grande área superficial que pôde facilitar a difusão do oxigênio do ar sobre a superfície da partícula, que entrou na parte interna da partícula devido ao estado amorfo da matriz (Figura 23(b)). Devido a essa acessibilidade, o oxigênio pode facilmente decompor os lipídios nas matrizes poliméricas (ERATTE et al., 2015). As amostras que utilizaram apenas quitosana tiveram maiores tamanhos de cápsulas, maior eficiência de encapsulamento e menores porosidades. Essas características associadas proporcionaram a menor variação no índice de peróxido das microestruturas (3,6 a 6,0 meq kg⁻¹) durante o período de armazenamento, demonstrando que a quitosana proporcionou uma barreira eficiente para evitar a oxidação primária dos concentrados de AGI obtidos a partir de óleo de pescado.

A partir dos dados obtidos, verificou-se que após a secagem, houve um encapsulamento eficiente e as cápsulas formadas utilizando 100% de quitosana como material de parede conseguiram aumentar a estabilidade oxidativa dos concentrados de AGI para 45 dias. Assim, as isotermas de adsorção de água das microestruturas foram estudadas a fim de verificar o comportamento do material em diferentes atividades de água.

5.5 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO

Para as três microestruturas formadas, os dados de umidade de equilíbrio (X_e) em função da atividade de água (a_w) foram ajustados através de regressão não linear pelos modelos GAB, BET e Oswin, respectivamente, segundo as Equações (2), (3) e (4), sendo que os seus parâmetros estão apresentados na Tabela 8. As umidades de equilíbrio são informações necessárias na modelagem, sendo incorporadas como parte do modelo para caracterizar o sistema ou para servir como condições de contorno (MOREIRA, 2011).

Tabela 8 – Estimativa dos parâmetros, erro médio relativo (EMR) e R^2 dos modelos para as isotermas de adsorção das microestruturas contendo as cápsulas de AGI.

Parâmetros	Microestruturas					
	100:0		90:10		70:30	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25 °C
GAB						
X_m (kg kg ⁻¹ _{ss})	0,1424	0,0724	0,1049	0,0783	0,0834	0,0796
C_G	14,89	6,13	18,55	3,61	33,25	3,04
K	0,8119	0,9384	0,9041	0,9120	0,9076	0,8938
EMR (%)	3,56	4,74	3,42	4,45	3,64	2,37
R^2	0,9984	0,9953	0,9908	0,9909	0,9977	0,9990
BET						
X_m (kg kg ⁻¹ _{ss})	0,0956	0,0686	0,0831	0,0450	0,0703	0,0618
C_B	39,84	5,60	58,33	1,92	43,36	8,34
EMR (%)	6,67	13,24	5,65	12,10	7,94	12,51
R^2	0,9720	0,9727	0,9912	0,9435	0,9726	0,9621
OSWIN						
A_1	0,22	0,12	0,18	0,11	0,14	0,11
B_1	0,36	0,60	0,47	0,59	0,45	0,57
EMR (%)	8,99	11,75	11,93	7,36	6,98	11,66
R^2	0,9609	0,9811	0,9631	0,9937	0,9829	0,9761

Os dados experimentais das isotermas de adsorção ajustados aos modelos GAB, BET e Oswin estão apresentados nas Figuras 25, 26 e 27. A partir dos dados obtidos na Tabela 8 e das Figuras 25, 26 e 27, pode-se observar que o modelo GAB foi o que apresentou o ajuste mais adequado aos resultados experimentais, com os maiores valores para os coeficientes de determinação ($R^2 \geq 0,99$), e menores erros médios relativos ($< 5\%$). A literatura apresenta o modelo GAB como o modelo mais utilizado para determinar propriedades físicas de alimentos, por representar adequadamente os dados experimentais na faixa de atividade da água do maior interesse prático em alimentos ($0,1 < a_w < 0,9$) e, pela

introdução da constante k relacionada com a energia de interação de sorção na multicamada (TIMMERMANN; CHIRIFE; IGLESIAS, 2001).

As isotermas de sorção apresentaram a forma sigmoidal, com o teor de umidade de equilíbrio aumentando com a atividade de água para uma dada temperatura. Este comportamento é similar para a maioria das isotermas de sorção de materiais hidrofílicos, conforme reportado na literatura (KABLAN et al., 2008). O aumento da temperatura provocou diminuição do conteúdo de umidade, indicando a diminuição das forças de atração e, conseqüentemente, a saída de água do material. Com o aumento da temperatura, as moléculas de água começam a ter um aumento no nível da sua energia de ativação, tornando-se instáveis e quebrando as ligações intermoleculares entre as moléculas de água e os sítios de adsorção (LAGO; NOREÑA, 2015).

Figura 25 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de (●) 4°C e (▲) 25°C para as microestruturas utilizando proporção 100:0 de quitosana:gelatina.

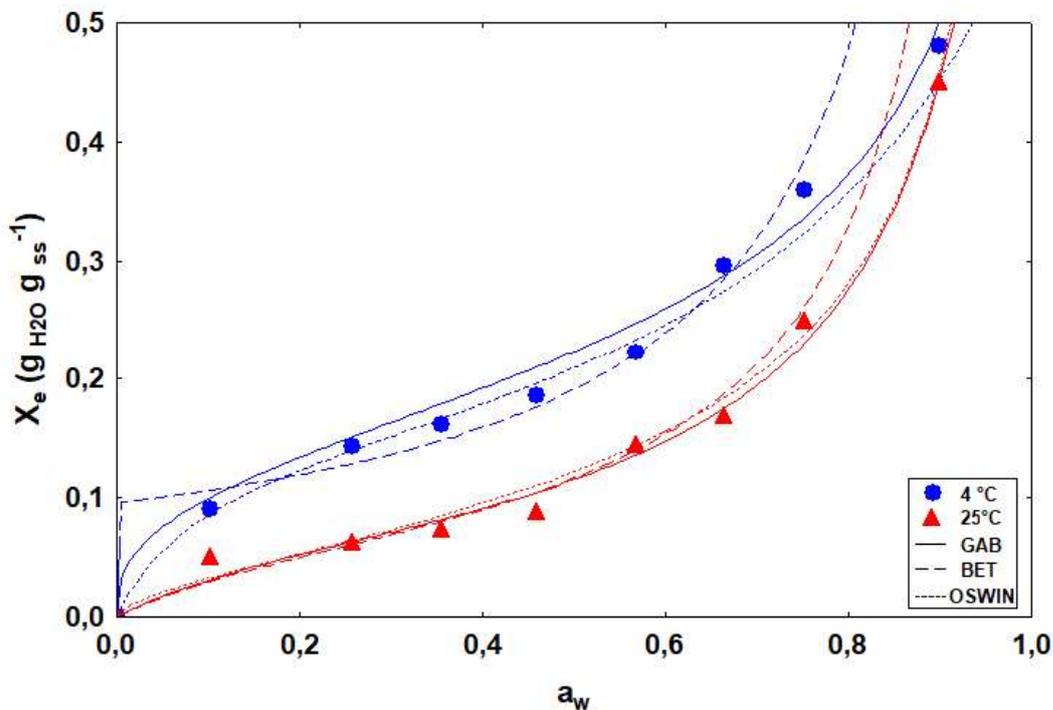


Figura 26 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de (●) 4°C e (▲) 25°C para as microestruturas utilizando proporção 90:10 de quitosana:gelatina.

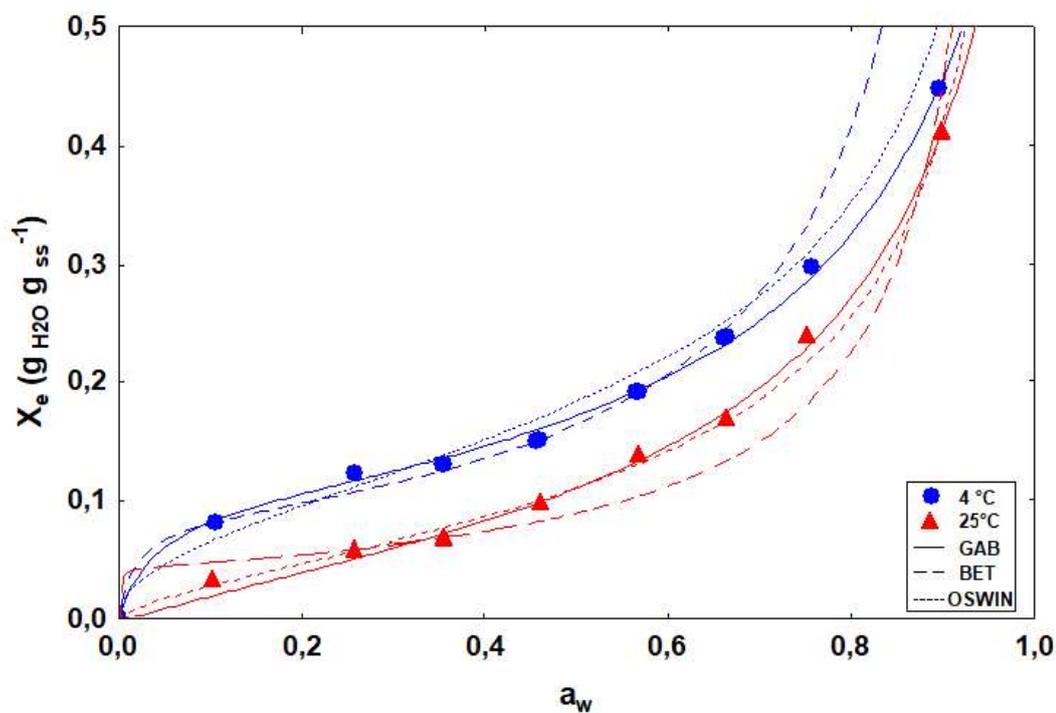
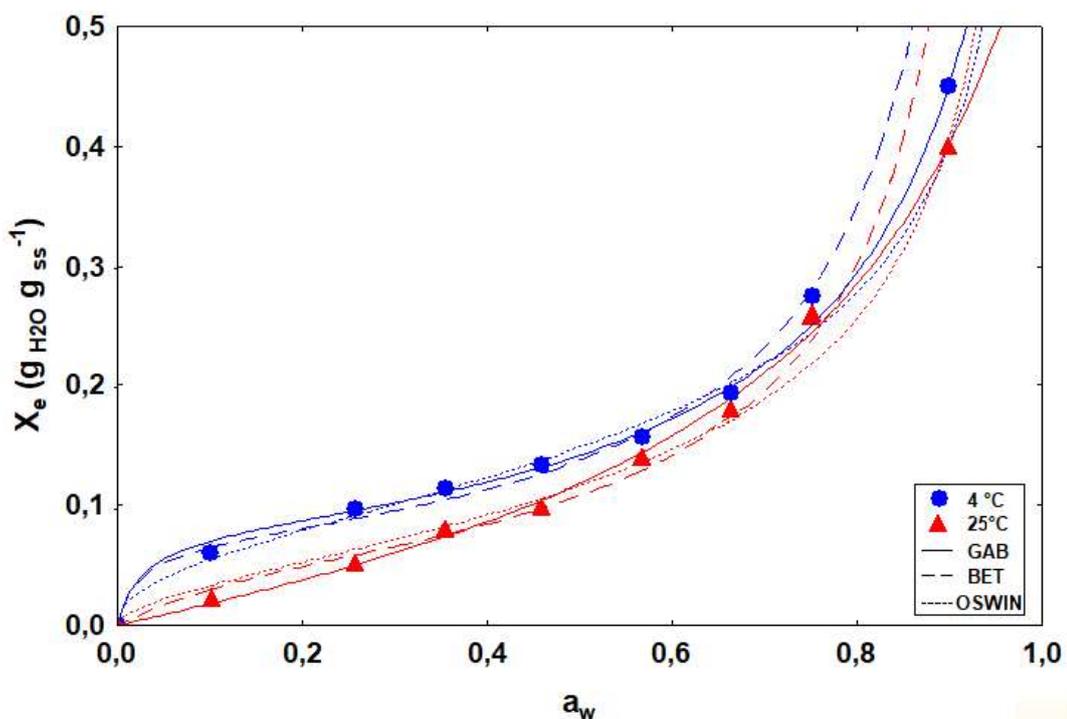


Figura 27 – Modelos GAB, BET e OSWIN ajustados aos dados experimentais das isotermas de adsorção de água nas temperaturas de (●) 4°C e (▲) 25°C para as microestruturas utilizando proporção 70:30 de quitosana:gelatina.



De acordo com a equação de GAB, o ajuste dos dados de sorção permitiu a estimativa dos valores de umidade da monocamada (X_m). O valor X_m é de particular interesse, uma vez que corresponde a quantidade de água fortemente ligada a locais específicos na superfície das microcápsulas e, representa o teor de umidade ideal para que os alimentos desidratados tenham uma vida útil máxima, limitando as reações de deterioração. Este parâmetro é importante para prever as condições de armazenamento e a deterioração dos alimentos, visto que ele é um indicador da disponibilidade dos sítios polares para estabelecer ligações com a água (FRANKEL, 2005).

Neste trabalho, os valores de X_m (Tabela 8) diminuíram em todas as amostras com o aumento da temperatura. O mesmo comportamento foi observado por Escalona-García et al. (2016) na elaboração de microcápsulas de óleo de chia com isolado proteico (0,063 – 0,052 $\text{kg}_{\text{H}_2\text{O}} \text{kg}^{-1}_{\text{ss}}$), e Silva et al. (2014b) com micropartículas de óleo essencial de alecrim (0,124 – 0,084 $\text{kg} \text{kg}^{-1}_{\text{ss}}$). A diminuição do X_m pode ser explicada devido a mudanças estruturais na matriz dos biopolímeros como resultado do aumento de temperatura, o que reduz os locais ativos na superfície das microcápsulas onde a água pode ser adsorvida (ESCALONA-GARCÍA et al., 2016). Além disso, os valores de X_m para as microestruturas usando apenas gelatina foram superiores. Isso pode ser explicado devido à adição de gelatina, que possui uma umidade de monocamada menor que a da quitosana. Monte (2016) encontrou umidade da monocamada (X_m) de 0,14 $\text{kg} \text{kg}^{-1}_{\text{ss}}$ para filmes de quitosana à 40°C, enquanto Mortola et al., (2003) encontraram umidade da monocamada (X_m) de 0,10 $\text{kg} \text{kg}^{-1}_{\text{ss}}$ para gelatina de pescado à 30°C. Além disso, a diminuição da eficiência de encapsulamento com maiores quantidades de gelatina deixou maior quantidade de óleo exposto na superfície da estrutura. Sabendo-se que o óleo é hidrofóbico, sua maior exposição justifica a diminuição dos valores de X_m com o aumento da substituição de quitosana por gelatina. Após a formação da monocamada, os sítios de adsorção são ocupados por ligações relativamente fracas de moléculas de água formando camadas sucessivas, as multicamadas, nas quais a deterioração do produto ocorre por meio de reações químicas ou biológicas (LAGO; NOREÑA, 2015).

A interpretação teórica dos parâmetros GAB permite derivar o comportamento de sorção da umidade nos materiais a partir da combinação dos valores de C_G e k . Em termos termodinâmicos, C_G representa a diferença no potencial químico entre as moléculas de água que foram adsorvidas na primeira camada e moléculas de água adsorvidas nas camadas subsequentes (LAGO; NOREÑA, 2015). O valor de C_G está relacionado ao calor de adsorção de umidade. Uma forte interação água-matriz é assumida à temperaturas mais baixas, com C_G aumentando à medida que a temperatura diminui (Tabela 8).

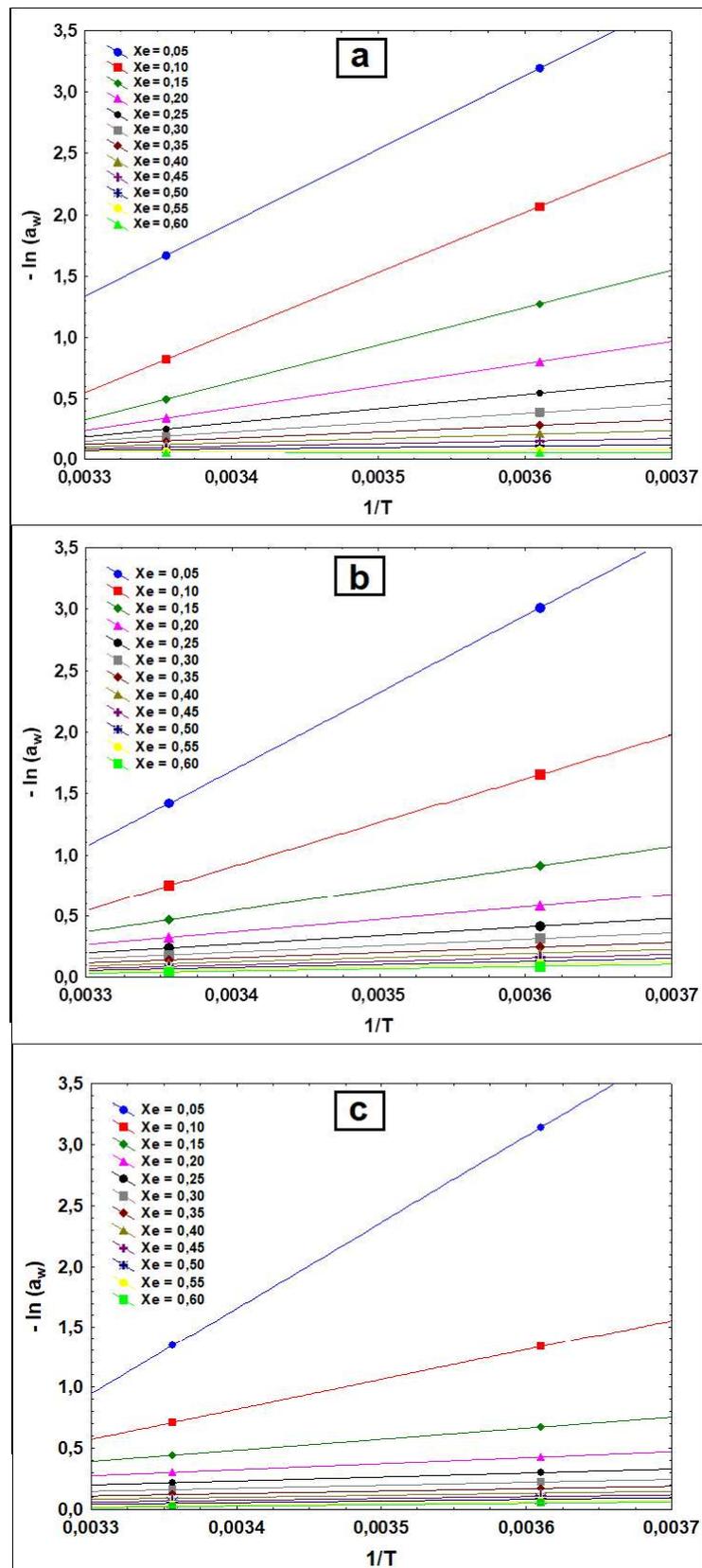
O parâmetro k está associado à energia de interação entre as moléculas e a massa de água nas multicamadas. Se $k = 1$, a água na multicamada tem propriedades líquidas. Lewicki (1997) afirmou que o modelo GAB descreve isotermas de tipo sigmoidal quando os valores de k se encontram entre 0,24 e 1 (confirmado pelas Figuras 25, 26 e 27). Para as microcápsulas, os valores de k ficaram dentro desse intervalo, e próximos da unidade comprovando-se estado puro do sorbato líquido nas multicamadas (ADEBOWALE et al., 2007).

Pelos gráficos apresentados nas Figuras 25, 26 e 27, as formas isotérmicas seguem um comportamento sigmóide, típico das isotermas do tipo II segundo a classificação de Brunauer et al. (1940) (APÊNDICE 1), o que caracteriza produtos com água pouco ligada a eles. De acordo com Brunauer et al. (1940), as isotermas que apresentam configuração do tipo I, IV e V não são de interesse para a área de alimentos, sendo que a grande parte das isotermas em alimentos apresenta a forma de “S” (sigmóide) Tipo II, (APÊNDICE 2), (ALVES, 2014). Este tipo de isoterma pode ser classificado em três regiões: uma primeira que corresponde à umidade da monocamada, fortemente limitada na matriz do produto. A segunda que é quase linear, correspondente à água da multicamada; e a terceira região está relacionada com a água livre disponível para reações químicas (BETIOL, 2016). O efeito da temperatura na isoterma é de grande importância porque a atividade da água é alterada em função da temperatura, e os alimentos são expostos a uma gama de temperaturas durante seu processamento e o armazenamento (LAGO; NOREÑA, 2015).

5.6 PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS

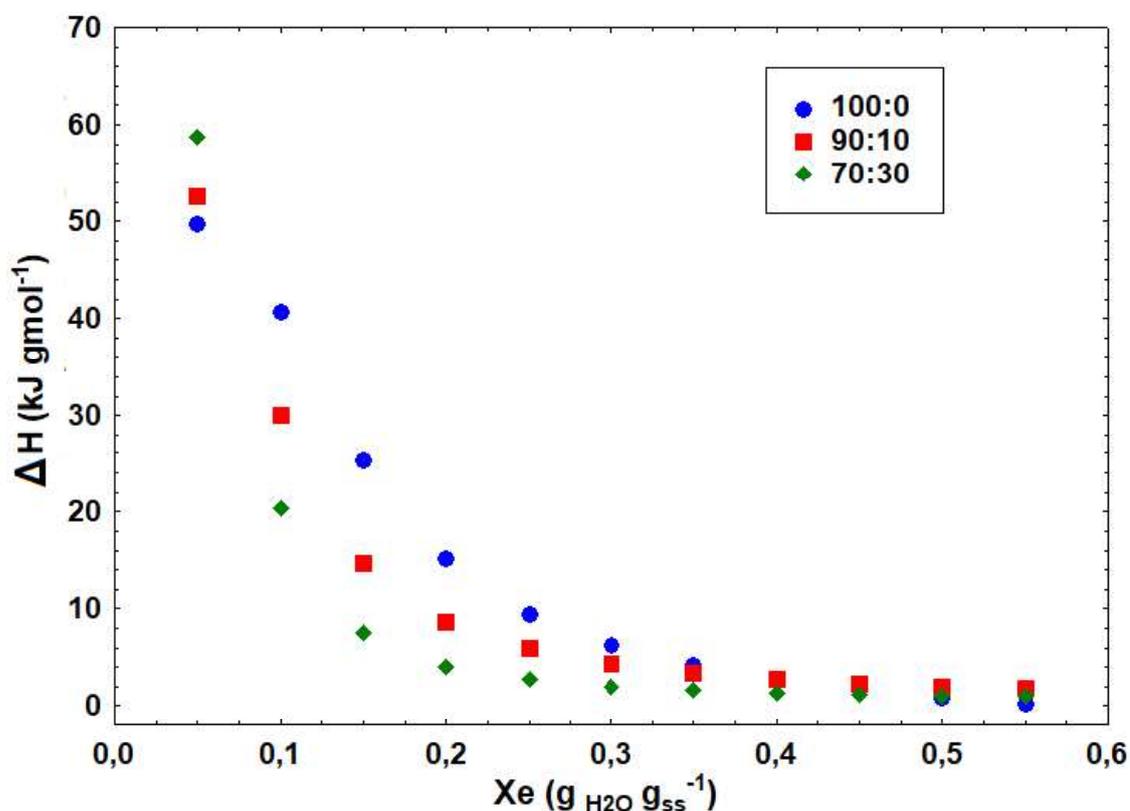
As propriedades termodinâmicas foram calculadas para as microestruturas. O modelo GAB foi utilizado para o cálculo de a_w correspondente a cada conteúdo de umidade (0,05 – 0,6 kg kg⁻¹), pois foi o modelo que melhor representou as isotermas de adsorção. O gráfico $-\ln(a_w)$ versus $1/T$ foi plotado, onde foram obtidas linhas retas para um conteúdo de umidade constante, como visto na Figura 28. Sendo que a_w em qualquer temperatura, a uma determinada umidade de equilíbrio, pôde ser calculada. A inclinação da linha se reduz a zero, quando o teor de umidade aumenta, devido à redução das interações da água (menos energia de ligação) com a superfície de adsorção, assemelhando-se mais ao comportando da água pura. O efeito da temperatura com respeito ao teor de umidade mostra ser maior a baixos conteúdos de umidade. Acima do valor de a_w de 0,8, não são observados efeitos da temperatura (BETIOL, 2016).

Figura 28 – Curvas isostéricas para a adsorção das microestruturas utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede (a) 100:0 (b) 90:10 e (c) 70:30 nas temperaturas analisadas.



Na Figura 29 estão mostrados os valores de entalpia diferencial de adsorção (ΔH) em função da umidade de equilíbrio, calculada a partir da isoterma obtida do modelo GAB. De acordo com Bonilla et al. (2010), os materiais de parede podem exibir em suas superfícies locais ativos com diferentes energias de interação. Todas as microcápsulas de concentrados de AGI apresentaram tendência semelhante na variação de sua entalpia diferencial, independentemente da composição de sua matriz polimérica.

Figura 29 – Entalpia diferencial de adsorção (ΔH) das microestruturas, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede, em função da umidade de equilíbrio.



A Figura 29 mostra que a entalpia diferencial teve uma forte dependência do conteúdo de umidade, com altos valores em baixas umidades de equilíbrio, e com o aumento da umidade decresceu rapidamente até a curva tornar-se assintótica. A entalpia diferencial apresentou valores mais elevados em umidades próximas aos valores correspondente ao da monocamada, e na medida em que os valores se aproximam da água multicamada, a entalpia diminuiu para valores próximos de 10 kJ mol^{-1} . Esse comportamento pode ser explicado por que em baixos teores de umidade, ocorre uma forte interação entre o produto e a água contida

nele, sendo preciso altos valores de energia (calor de sorção) para retirar a água presente nas amostras. À medida que o teor de umidade aumenta, a maioria dos locais de sorção se torna ocupada e a sorção ocorre em menos locais de ligação disponíveis com menor energia, proporcionando valores mais baixos de entalpia diferencial (LAGO; NOREÑA, 2015). Comportamento semelhante foi encontrado por Bonilla et al. (2010) nas isotermas de sorção de microcápsulas de óleo de canola com diferentes matrizes poliméricas, por Lago e Noreña (2015) com bagaço de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) desidratado e por Spada (2011) no uso do amido de pinhão como agente encapsulante. Para todas as amostras estudadas, valores positivos de ΔH^0 foram verificados, demonstrando que a adsorção de água pelas microestruturas foi um processo exotérmico.

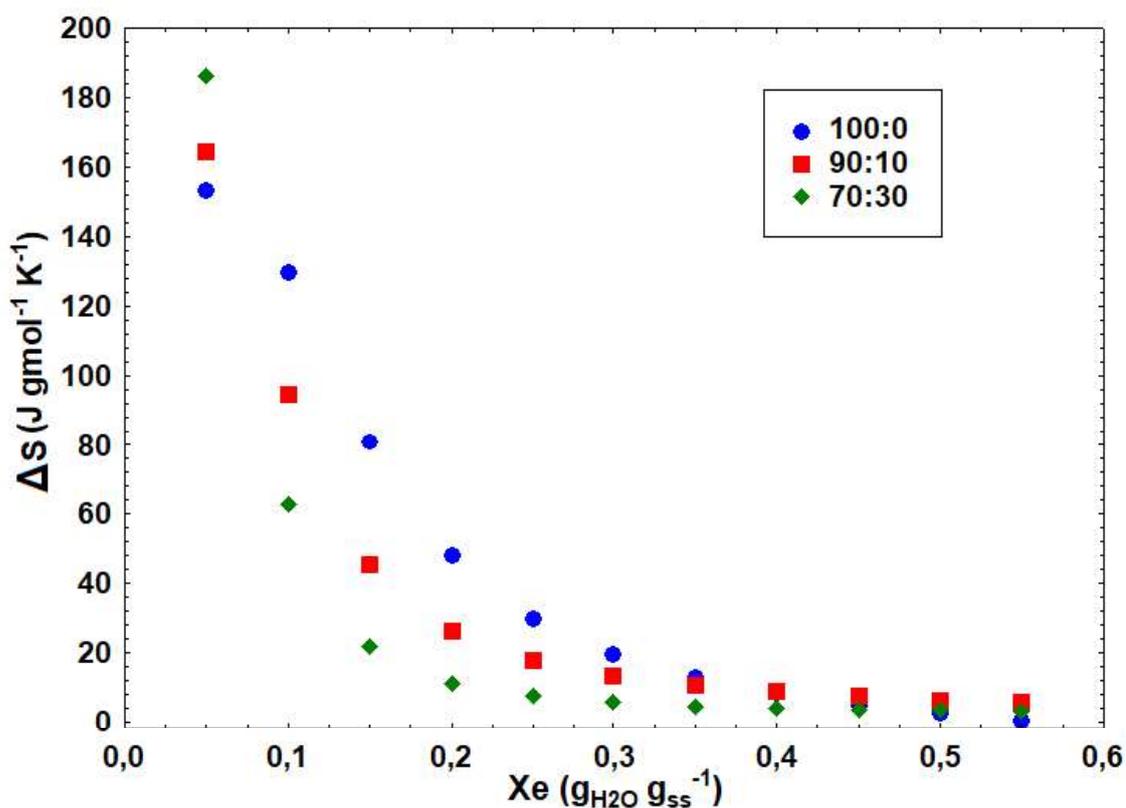
Abaixo da umidade de 0,10 (kg kg⁻¹), a entalpia de adsorção foi de 49, 52 e 58 kJ gmol⁻¹ para as microestruturas utilizando proporções e quitosana:gelatina de 100:0 90:10 e 70:30, respectivamente. O calor total de adsorção à 25°C (temperatura considerada ambiente) foi obtido pela soma da entalpia obtida e do calor de vaporização da água pura (assumindo-se 43,2 kJ gmol⁻¹). Para obtenção de uma microestrutura com umidade abaixo da monocamada (assegurar boa estabilidade), o calor total de sorção necessário seria em torno de 58,2, 51,8 e 47,3 kJ gmol⁻¹ para as microestruturas utilizando proporções e quitosana:gelatina de 100:0 90:10 e 70:30, respectivamente. A ocorrência deste fato pode estar associada com a modificação estrutural das amostras. Considerando-se que a entalpia ilustra a energia necessária para fazer um trabalho útil, a um teor de umidade mais elevado é necessária menos energia para remover a mesma quantidade de água em amostras mais secas, devido aos poucos locais de ligação disponíveis para promover a sorção (ou seja, menor porosidade) (BETIOL, 2016). Os resultados encontrados nos termogramas das microestruturas demonstram o mesmo comportamento (item 5.4), com um aumento da entalpia proporcional ao aumento da quantidade de quitosana, confirmando que a quitosana é mais termicamente estável que as proteínas.

A Figura 30 apresenta a variação da entropia diferencial de adsorção (ΔS) à 4°C e 25°C em função da umidade de equilíbrio para as microestruturas liofilizadas. Observa-se que a entropia diferencial de sorção aumentou com o decréscimo da umidade de equilíbrio, indicando que a entropia também exibiu uma forte dependência da umidade, com uma tendência exponencial semelhante à exibida pela entalpia diferencial. A entropia descreve o grau de ordem/desordem ou aleatoriedade do movimento das moléculas de água. As microestruturas apresentaram diminuição na entropia à medida que o teor de umidade aumentou, denotando uma restrição na mobilidade das moléculas de água porque os sítios

disponíveis ficam saturados (ESCALONA–GARCÍA et al., 2016). Bernstein et al. (2014) encontraram comportamento semelhante no estudo das propriedades termodinâmicas de sorção de microcápsulas de repolho roxo. Os autores verificaram que a entalpia e a entropia diferenciais de adsorção diminuíam com o aumento do teor de umidade.

Um ponto a destacar é o valor mínimo de entropia, que é considerado o ponto de estabilidade máxima, uma vez que as moléculas de água são mais ordenadas dentro da matriz, e ocorrem fortes ligações entre adsorbato–adsorventes, de modo que a água está menos disponível para participar de reações de deterioração. Neste trabalho, observou-se que com um teor de umidade acima de 30%, a entropia atingiu valores mínimos que permaneceram praticamente constantes, sendo interessante considerar uma zona de entropia mínima, que pode ser interpretada como a atividade da água na qual um produto alimentício tem a melhor estabilidade. Este mínimo ocorre quando fortes ligações entre o adsorbato (água) e o adsorvente (alimento) ocorrem.

Figura 30 – Entropia diferencial de adsorção (ΔS) das microestruturas, utilizando diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede, em função da umidade de equilíbrio.



As condições previstas para a máxima estabilidade obtidas a partir da análise termodinâmica das microcápsulas de concentrados de AGI são mostradas na Tabela 9. Como pode ser observado, é possível que a microestrutura de quitosana como material de parede (100:0) possua uma capacidade maior de se ligar de uma forma mais ordenada a maior quantidade de umidade sem induzir instabilidades no sistema, justificando os melhores resultados na proteção do óleo com essa proporção de material de parede. Estas condições podem ser consideradas como de máxima estabilidade para as microcápsulas onde a vida útil dos pós é aumentada. Um comportamento semelhante foi encontrado em microcápsulas de óleo de canola utilizando proteína isolada de soja como material de parede (BONILLA et al. 2010), onde os autores encontraram condições de estabilidade máxima na faixa de atividade de água entre 0,53 e 0,88 à 25 °C.

Tabela 9 – Valores aproximados para as condições de estabilidade adequadas para as diferentes variações de microestruturas contendo as cápsulas de concentrados de AGI.

	T (°C)	X _e (g _{H2O} g ⁻¹ _{ss})	a _w *
100:0	4	0,30 – 0,35	0,67 – 0,75
	25	0,30 – 0,35	0,80 – 0,85
90:10	4	0,25 – 0,30	0,65 – 0,72
	25	0,25 – 0,30	0,78 – 0,83
70:30	4	0,20 – 0,25	0,65 – 0,70
	25	0,20 – 0,25	0,73 – 0,80

*X_e e a_w = intervalos de conteúdo de umidade e atividade de água onde a entropia integral permanece praticamente constante.

Sabe-se que um requisito para confirmar a teoria da compensação entalpia-entropia é a necessidade de correlacionar entalpia e entropia por uma tendência linear, que está apresentada na Figura 31, isso significa que a mudança na entalpia é acompanhada por mudanças tanto na entropia como na energia livre de Gibbs. Para todas as amostras, obteve-se uma relação linear ($R^2 \geq 0,99$), a partir da qual a temperatura isocinética (T_β) foi derivada de acordo com a Equação 22. Deste modo, os resultados confirmam a teoria de compensação. Os parâmetros de temperatura isocinética (T_β) e energia livre de Gibbs (ΔG) obtidos por regressão linear estão na Tabela 10.

O valor negativo de ΔG sugere uma espontaneidade do processo de adsorção. Pode-se observar que as microestruturas utilizando proporção 70:30 requerem menos energia para transferir uma molécula de água do estado de vapor para o estado adsorvido, seguido das cápsulas nas microestruturas 90:10 e 100:0, respectivamente, onde mais valores negativos refletem que o processo de adsorção foi mais favorável energeticamente. Isto significa que as microestruturas 70:30 foram mais higroscópicas (porque as moléculas de água foram adsorvidas exigindo menos energia), e que o processo de adsorção é realizado de forma espontânea (BONILLA et al., 2010). A temperatura média harmônica (T_{hm}) calculada (287,5 K) foi superior a T_{β} (Tabela 10). Assim, com $T_{\beta} > T_{hm}$ pode-se dizer que a entalpia controla os processos de adsorção (LEFFLER, 1955). Além disso, uma vez que T_{hm} difere significativamente dos valores de T_{β} , a adequação da teoria da compensação para a adsorção de vapor de água em microestruturas contendo nanocápsulas de concentrados de AGI foi confirmada.

Figura 31 – Análise compensatória da entalpia e entropia diferencial de adsorção das microestruturas diferentes proporções de quitosana:gelatina como material de parede.

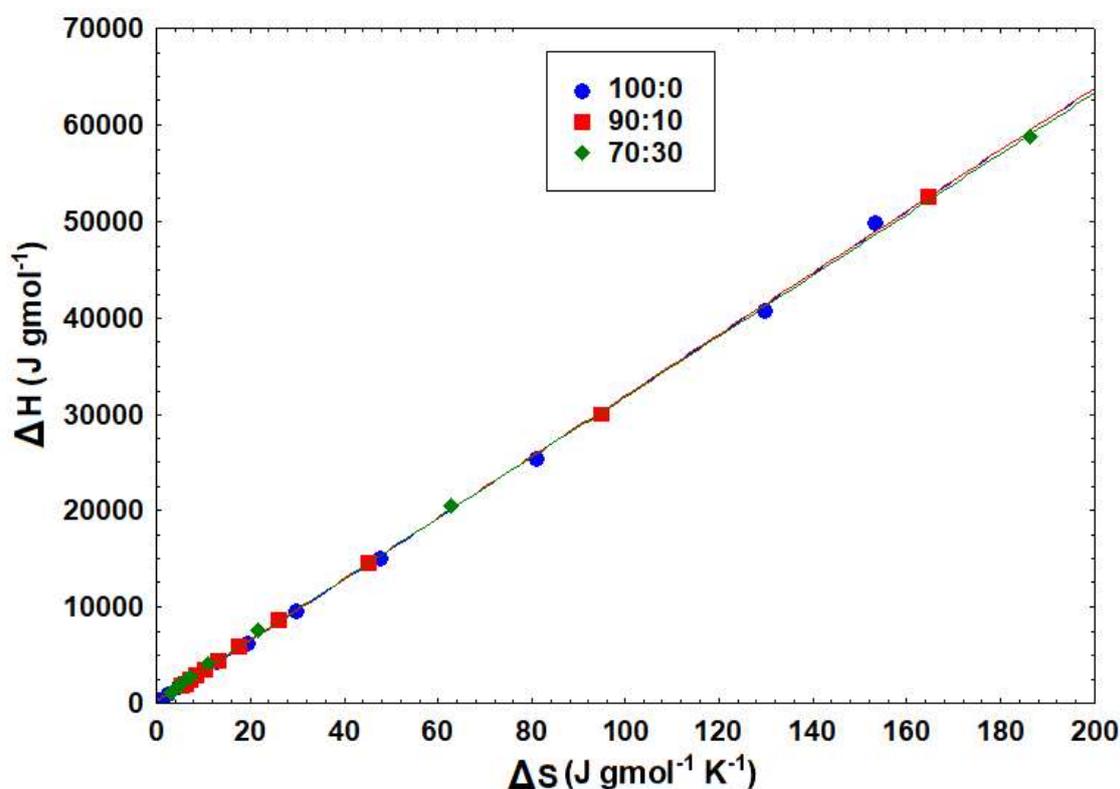


Tabela 10 – Parâmetros obtidos pela análise compensatória de ΔH versus ΔS .

	T_p (K)	ΔG (J g mol ⁻¹)	R^2
100:0	318,7	- 57,83	99,94
90:10	318,4	- 128,97	99,99
70:30	315,1	- 314,39	99,98

O raio crítico (r_c) das microestruturas liofilizadas foi determinado de acordo com a Equação 24, com diferentes teores de umidade, nas temperaturas de estudo. O raio crítico está associado principalmente à região de condensação, a espessura da multicamada (τ) e o raio médio de poro (r_p). Os resultados para o raio médio do poro estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Raio médio de poro (R_p) para diferentes atividades de água nas temperaturas analisadas das microestruturas contendo as nanocápsulas.

Xe	Microestruturas					
	100:0		90:10		70:30	
	r_p (nm) 4 °C	r_p (nm) 25 °C	r_p (nm) 4 °C	r_p (nm) 25 °C	r_p (nm) 4 °C	r_p (nm) 25 °C
0,05	0,74	1,10	0,75	1,23	0,75	1,28
0,10	0,99	1,85	1,14	1,98	1,35	2,07
0,15	1,39	2,74	1,78	2,88	2,27	3,02
0,20	1,97	3,73	2,53	3,92	3,28	4,15
0,25	2,69	4,82	3,35	5,11	4,42	5,51
0,30	3,56	6,02	4,26	6,51	5,73	7,18
0,35	4,63	7,36	5,28	8,17	7,25	9,28
0,40	6,00	8,86	6,43	10,17	9,05	12,01
0,45	7,20	10,57	7,76	12,65	11,25	15,72
0,50	8,32	12,52	9,30	15,78	13,97	21,07
0,55	10,10	14,77	11,11	19,89	17,45	29,51
0,60	12,41	17,42	13,28	25,54	22,06	44,81
0,65	13,24	20,58	15,94	33,80	28,50	81,35
0,70	18,95	24,40	19,27	47,07	38,12	97,81

O raio médio de poro (r_p) das microestruturas variou na faixa de 0,7 a 97 nm (Tabela 11). A classificação de acordo com o diâmetro dos poros é feita pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (IUPAC, 2012), que os denomina os poros dos materiais como: microporos (diâmetro < 2 nm), mesoporos (diâmetro na faixa de 2 – 50 nm) e macroporos (diâmetro > 50 nm). Pode-se perceber que na faixa de Xe de 0,05 a 0,15 aproximadamente (abaixo da monocamada) há uma maior presença de microporos, e para maiores que Xe (envolvendo as regiões de multicamada e condensação) há a predominância de mesoporos.

De acordo com Rouquerol, Rouquerol e Sing (1999), a presença de microporos está associada às fortes interações entre adsorvente-adsorbato que ocorrem em poros de dimensões moleculares, e é representada pelo formato característico da isoterma na região da monocamada. Pode-se verificar a partir dos resultados obtidos que o raio do poro aumentou com a umidade e com a temperatura (Tabela 11). Velazquez-Gutierrez et al. (2015) encontraram comportamento semelhante no estudo de mucilagem de semente de chia liofilizada, em que para as umidades de equilíbrio entre 0,025 e 0,25 $\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} \text{g}_{\text{ss}}^{-1}$ o tamanho de poro variou entre 0,7 e 6,5 nm e para todas as atividades de água, o raio do poro aumentou com o incremento da temperatura (25, 35 e 40°C). Rosa, Moraes e Pinto (2010) encontraram uma gama de raios de poros entre 0,51 e 29,7 nm para quitosana, e afirmaram que os mecanismos de difusão dependem das propriedades dentro da estrutura local da matriz porosa. Isso explica por que neste trabalho o processo de sorção de moléculas de água foi conduzido por entalpia. Velazquez-Gutierrez et al. (2015) reportaram que o processo de adsorção é controlado pela entalpia quando as moléculas de água são adsorvidas em mesoporos e macroporos, e a entropia controla quando a adsorção da água ocorre nos microporos. Além disso, os resultados encontrados na Tabela 11 demonstram que o raio do poro aumentou com o incremento de gelatina nas microestruturas, confirmando a maior porosidade e volume de poros obtida nas amostras 70:30 (Tabela 7) e, justificando o aumento da oxidação nestas condições.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram elaboradas nanocápsulas de concentrados de ácidos graxos insaturados (AGI) obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus carpio*), utilizando quitosana, gelatina e suas blendas, como material de Parede.

Os concentrados apresentaram um total de 88,5 % de ácidos graxos insaturados. O índice de peróxido foi de 2,92 mEq kg⁻¹ e o valor de p –anisidina foi de 2,48. Ambos dentro dos valores permitidos pela legislação. A quitosana em pó apresentou grau de desacetilação e massa molar de 86 % e 153 kDa, respectivamente. A gelatina comercial teve força do gel de 307 g e ponto de fusão de 31,5°C.

As nanocápsulas foram elaboradas, e os efeitos da proporção de quitosana:gelatina, concentração de polímero e tempo de homogeneização nas características das nanoemulsões foram avaliados. Quando a proporção de gelatina foi igual ou superior a 50% ocorreu separação de fases. As nanoemulsões com proporção de quitosana acima de 70% permaneceram visivelmente estáveis, sem separação de fases, durante mais de 30 dias. O maior tempo de homogeneização (20 min) e a menor concentração de biopolímeros (1% m/v) resultaram em menores tamanhos de partículas. O incremento na quantidade de gelatina levou à diminuição do tamanho das nanocápsulas de 292 nm para 34 nm para as proporções de 100:0 e 70:30 respectivamente.

O potencial Zeta aumentou com a quantidade de quitosana (de 26,5 a 31,5 mV), enquanto o pH e o índice de refração não foram afetados pela proporção de biopolímeros. A turbidez diminuiu com o aumento da quantidade de gelatina na solução. As cápsulas se apresentaram forma esférica, com boa integridade e com formação de uma parede polimérica ao redor do núcleo oleoso, confirmando o encapsulamento dos concentrados de AGI.

Após 7 dias de armazenamento, para todas as nanocápsulas, os valores de peróxido e p–anisidina aumentaram ao longo dos dias de armazenamento. No entanto, a nanoemulsão que apresentou a proporção de quitosana:gelatina 90:10 mostrou menos oxidação após 7 dias (índice de peróxido 4.8 meq kg⁻¹, p–Anisidina 9.0 e TOTOX 19.4). Demonstrando que os melhores resultados para a elaboração das cápsulas foram encontrados nestas condições.

Para o estudo das amostras secas, as nanocápsulas de concentrados de AGI utilizando os biopolímeros quitosana:gelatina (1% m/v) nas proporções de 100:0, 90:10 e 70:30 foram liofilizadas. Os materiais obtidos apresentaram estrutura irregular, leve e porosa, com tonalidade amarelada, com predominância da cor do material de parede, confirmando um

encapsulamento efetivo. A partir das micrografias obtidas, pôde-se confirmar a diminuição do tamanho das cápsulas com a substituição da quitosana por gelatina. Além disso, essa substituição também levou ao aumento do volume de poros ($0,015$ a $0,029 \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$) e da porosidade (93 e 97 %). As eficiências de encapsulamento variaram de 70% (70:30) a 78% (100:0). Nos termogramas das microestruturas houve o desaparecimento do pico referente ao óleo, justificando o encapsulamento. Os valores de índice de peróxido demonstraram que a microestrutura elaborada com quitosana pura foi a que apresentou melhor proteção dos concentrados de AGI em relação à oxidação primária.

A equação de GAB mostrou-se a mais adequada para a representação das isotermas de adsorção de vapor de água pelas microestruturas, apresentando aumentos do conteúdo de umidade (X_m) e do calor envolvido na monocamada (C_G) com a diminuição da temperatura. As formas isotérmicas seguiram um comportamento sigmóide, típico das isotermas do tipo II, o que caracteriza produtos com água pouco ligada a eles. Para obtenção de uma microestrutura com umidade abaixo da monocamada os valores do calor total de sorção foram em torno de 58,2, 51,8 e 47,3 kJ gmol^{-1} para as microestruturas utilizando proporções e quitosana:gelatina de 100:0, 90:10 e 70:30, respectivamente, confirmando que a quitosana é termicamente mais estável que a gelatina. A entropia diferencial de sorção aumentou com o decréscimo da umidade de equilíbrio, indicando uma forte dependência da umidade, com uma tendência exponencial semelhante à exibida pela entalpia diferencial. Os processos de sorção apresentaram teoria compensatória, com bom ajuste linear entre entalpia e entropia. A temperatura isocinética foi em torno de 315–318 K, sendo maior que a média harmônica (287 K), com a entalpia controlando ambos processos e sugerindo espontaneidade do processo de adsorção. Por meio das isotermas de sorção foram obtidos dados estruturais como o raio médio de poro, que aumentou com o aumento da quantidade de gelatina. Sendo assim, as microestruturas elaboradas com quitosana pura apresentaram características satisfatórias e alto rendimento de processo, mostrando que a quitosana tem potencial para ser utilizada como um agente encapsulante de nanocápsulas lipídicas secas por liofilização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; HAYAT, K.; HONG, X.; SHARIF, H.R.; ZHANG, X. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81–92, 2015.

ADEBOWALE, A.R.; SANI, I.; AWONORIN, S.; DANIEL, I., KUYE, A. Effect of cassava varieties on the sorption isotherm of tapioca grits. **International Journal of food Science and Technology**, v. 42, p. 448–452, 2007.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; MADADLOU A.; RAFIEE, S. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. **Food Research International**, v. 49, p. 379–388, 2012.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.

AGUERRE, R. J.; SUAREZ, C.; VIOLLAZ, P. E. Drying kinetics of rough rice grain. **Journal of Food Technology**, v. 17, p. 679–689, 1982.

AHMAD, J.; KOHLI, K.; MIR, S. R.; AMIN, S. Formulation of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Telmisartan with Improved Dissolution and Oral Bioavailability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, p. 958–968, 2011.

ALLAIS, C.; KELLER, G.; LESIEUR, P.; OLLIVON, M.; ARTZNER, F. X-Ray diffraction/calorimetry coupling A tool for polymorphism control. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**. v. 74, n. 3, p. 723–728, 2003.

ALVES, S. B. **Estudo teórico e experimental do processo de secagem do abacate (*Persea americana Mill.*)**. Tese (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2014.

ANDERSON, R.B. Modifications of the Brunauer, Emmet and Teller equation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, p. 686–691, 1946.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978–985, 2011.

ANTON, N.; BENOIT, JP.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ANWAR, S. H.; KUNZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 367–378, 2011.

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. Ed. AOAC. Washington D.C. (1995).

AOCS. **American Oil Chemists' Society**. Official and Tentative Methods of American Oil Chemists' Society, 3rd edn. USA, Champaign, 1980.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction of muscle proteins and gelatin from cod head. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 697–700, 2006.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; HERNÁNDEZ, C. P.; SOARES, L. A. S. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Review**, v. 38, n.4, p. 902–912, 2009.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L. Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods. In Doyle M. P.; Klaenhammer T. R. (Eds.). **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 463–477, 2015.

BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A.; GOYARY, D.; KARMAKAR, S.; VEER V. Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer–protein blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, p. 691–697, 2013.

BEJRAPHA, P., SURASSMO, S., CHOI, M. J., NAKAGAWA, K., MIN, S. G. Studies on the role of gelatin as a cryo- and lyo- protectant in the stability of capsicum oleoresin nanocapsules in gelatin matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p.320–331, 2011.

BELHAJ, N.; TEHRANY, E. M.; LINDER, M. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 187–195, 2010.

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281–302, 2004.

BENBETTAÏEB, N. CHAMBIN, O. KARBOWIAK, T. DEBEAUFORT, F. Release behavior of quercetin from chitosan–fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation, **Food Control**, v. 66, p. 315–319, 2016.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 1069–1079, 1993.

BERNSTEIN, A. **Estudo da cinética de branqueamento, do microencapsulamento por atomização e das propriedades termodinâmicas de sorção de repolho roxo (*Brassica oleracea L. var. capitata L. f. rubra*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

BETIOL, L. F. L. **Estudo das isotermas de adsorção do bagaço de mandioca proveniente da indústria de fécula**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2016.

BINSI, P. K., NAYAK, N., SARKAR, P. C., ASHRAF, M. P., NINAN, G., RAVISHANKAR C. N. Structural, functional and in vitro digestion characteristics of spray dried fish roe powder stabilised with gum Arabic. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1698–1708, 2017.

BONILLA E.; AZUARA, E.; BERISTAIN, C. I.; VERNON–CARTER, E–J. Predicting suitable storage conditions for spray–dried microcapsules formed with different biopolymer matrices. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 633–640, 2010.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light–scattering techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4–17, 2011.

BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; DEMING, W. E.; TROLLER, E. On the theory of Van der Waals adsorption of gases. **Journal American Chemical Society**, v. 62, p. 1723–1732, 1940.

BUNJES, H.; STEINIGER, F.; RICHTER, W. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. **Langmuir**. v. 23, n. 7, p. 4005–4011, 2007.

CALDER, P. C. Marine omega–3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015.

CAPEK, I. Degradation of kinetically–stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125–155, 2004.

CERVERA, M. F.; HEINAMAKI, J.; RASANEM, M.; MAUNU, S. L.; KARJALAINEN, M.; ACOSTA, O. M. N.; COLARTE, A. I.; YLIRUUSI, J. Solid state characterization of chitosan derived from lobster chitin. **Carbohydrate Polymer**, v. 58, p. 401–408, 2004.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269–280, 2007.

CHOI, S. S.; REGENSTEIN, J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 194–199, 2000.

CODEX Alimentarius Commission, **Report of the Codex Committee on Fats and Oils Electronic Working Group on the Development of a Codex Standard for Fish Oils**, Twenty–third Session, Codex standard, Rome, Italy, 2013. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccfo/ccfo23/fo23_03e.pdf – Acesso em: 13 de ago. 2017, 18:54:00.

CONTRI, R. V.; SOARES, R. M. D. POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 234–242, 2014.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 2–13, 1995.

CHRANIOTI, C.; NIKOLOUDAKI, A.; TZIA, C. Saffron and 646 beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 252–263, 2015.

CREXI, V. T.; MONTE, MAURÍCIO L.; MONTE, MICHELI L.; PINTO, L. A. A. Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates of Carp Oil: Chemical Hydrolysis and Urea Complexation. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 89, p. 329–334, 2012.

CREXI V. T.; MONTE, M. L.; SOUZA–SOARES, L. A.; PINTO, L.A.A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemistry**, v. 119, p. 945–950, 2010.

CREXI, V. T.; SOUZA–SOAREZ, L. A.; PINTO, L. A. A. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal and ensilage processes: characteristics and lipid profiles. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 1642–1648, 2009.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ–ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 30–46, 2012.

DE JAEGHERE, F.; ALLEMANN, E.; FEIJEN, J.; KISSEL, T.; DOELKER, E.; GURNY, R. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid–co–ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. **Pharmaceutical Research**, v.16, n.6, p.859–66, 1999.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DEY, T. K.; GHOSH, S.; GHOSH, M.; KOLEY, H.; DHAR, P. Comparative study of gastrointestinal absorption of EPA & DHA rich fish oil from nano and conventional emulsion formulation in rats. **Food Research International**, v. 49, p. 72–79, 2012.

DOTTO, G. L.; SOUZA, V. C.; PINTO, L. A. A. Drying of chitosan in a spouted bed: The influences of temperature and equipment geometry in powder quality. **LWT –Food Science and Technology**, v. 44, p. 1786–1792, 2011.

DOTTO, G.L.; MOURA, J.M.; CADAVAL JR., T.R.S.; PINTO, L.A.A. Application of chitosan films for the removal of food dyes from aqueous solutions by adsorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 214, p. 8–16, 2013.

DUCONSEILLE, A.; ASTRUC, T.; QUINTANA, N.; MEERSMAN, F.; SANTE–LHOUTELLIER V. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 360–376, 2015.

DUMAN, F.; KAYA, M. Crayfish chitosan for microencapsulation of coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 125–133, 2016.

ELGADIR, M.A. UDDIN M., FERDOSH, S. ADAM, A. CHOWDHURY, A. J. K., SARKER, M. Z. I. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on

various drug delivery systems: A review. **Journal of Food and Drug Analyses**, v. 23, p. 619–629, 2015.

ENGELMANN, J. I. **Obtenção de lipídios estruturados a partir de gordura animal e Óleo de pescado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

ERATTE, D.; MCKNIGHT, S.; GENGENBACH, T. R.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. P. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 882–892, 2015.

ESCALONA-GARCÍA, L. A.; PEDROZA-ISLAS, R.; NATIVIDAD, R.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; CARRILLO-NAVAS, H.; PÉREZ-ALONSO, C. Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 93–103, 2016.

ESQUERDO, V.M.; DOTTO, G.L.; PINTO, L.A.A. Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate-chitosan capsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.445, p.137–142, 2015.

ESQUERDO, V. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L.A.A. **Nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrates**. In: Grumezescu, A. M. (Eds.), *Emulsions: Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, p.71–100, Cap. 3, Ed. Elsevier, 2016.

ESQUERDO, V. M.; SILVA, J. B.; RODRIGUES, P. A.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of Unsaturated Fatty Acids/Chitosan Microcapsules: Influence of Solvent. **Macromolecular Symposia**, v. 343, p. 39–44, 2014.

FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2016, Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/357c79a0-7fee-428f-a04e-9e86ba1a2ac5/> Acesso em: 17 de jul. 2017, 19:03:00.

FATHI, M.; MART, A.; McCLEMENTS D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 18–39, 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 251, p. 53–58, 2004.

FLORY, P. J.; R. R. GARRETT. Phase transition in collagen and gelatin systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 4836–4845, 1958.

FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation** 2^a ed., p. 25–50. UK: Ed. Sawston, Cambridge, 2005.

FUREBY, A. M. Characterisation of spray-dried emulsions with mixed fat phases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n. 1–4, p. 65–79, 2003.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M. C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L. G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, p. 473–482, 2013.

GÁMIZ-GONZÁLEZ, M.A.; PISKIN, A.E.; PANDIS, C.; CHATZIMANOLIS MOUSTAKAS, C.; KYRITSIS, A.; MARÍ, B.; GÓMEZ RIBELLES, J.L.; VIDAURRE, A. Determining the influence of N-acetylation on water sorption in chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 110–116, 2015.

GARCÍA-MORENO, P. J.; DAMBERG, C.; CHRONAKIS, I. S.; JACOBSEN, C. Oxidative stability of pullulan electrospun fibers containing fish oil: effect of oil content and natural antioxidants addition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 1600305, p. 1–11, 2017.

GARCÍA-MORENO, P. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M., JACOBSEN, C. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 203, p. 124–135, 2016.

GEANKOPLIS, C. J. **Procesos de transporte y operaciones unitarias**. 3ª Edição. México: Companhia Editorial Continental S. A., 1998.

GHORBANZADE, T., JAFARI, S. M., AKHAVAN, S., HADAVI, R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

GLATTER, O.; ORTHABER, D.; STRADNER, A.; SCHERF, G.; FANUN, M.; GARTI, N.; CLÉMENT, V.; LESER, M. E. Sugar-Ester Nonionic Microemulsion: Structural Characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 24, p. 215–225, 2001.

GONSALVES, J. K. M. C.; COSTA, A. M. B; DE SOUSA, D. P.; AVALCANTI, S. C. H.; NUNES, R. S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, p. 1–8, 2009.

GRANATO, D.; NUNES, D. S. **Análises químicas, propriedades funcionais e controle de qualidade de alimentos e bebidas**. 1ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Editora Elsevier, 2016.

HAUG, I. J.; DRAGET, K. I.; SMIDSRÓD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 202–213, 2004.

HOLMBERG, K., Surfactant-templated nanomaterials synthesis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, n. 2, p. 355–364, 2010.

HUYNH, N.T.; PASSIRANI C.; SAULNIER, P.; BENOIT J. P. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 201–209, 2009.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Gold Book**. New York, IUPAC Ed., 2012.

JACOBSEN, C. Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, p. 1853–1866, 2015.

JOYE, I. J.; McCLEMENTES, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, p. 417–427, 2014.

JULIO, L. M.; IXTAINA, V. Y.; FERNÁNDEZ, M. A.; SÁNCHEZ, R. M. T.; WAGNER, J. R.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of α -3 fatty acids. **Journal of Food Engineering**, v. 162, p. 48–55, 2015.

KABLAN, T.; CLEMENT, Y. Y.; FRANÇOISE, K. A.; MATHIAS, O. K. Determination and modeling of moisture sorption isotherms of chitosan and chitin. **Acta Chimica Slovenica**, v. 55, p. 677–682, 2008.

KANE, R. S.; STROOCK, A. D. Nanobiotechnology: Protein–Nanomaterial Interactions. **Biotechnology Program**, v. 23, p. 316–319, 2007.

KARACA, A. C.; NICKERSON, M.; LOW N. H. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. **Food Chemistry**, v. 139, p. 448–457, 2013.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 563–576, 2009.

KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, v. 187, p. 92–105, 2016.

KAYA, S.; KAHYAOGU, T. Moisture sorption and thermodynamic properties of safflower petals and tarragon. **Journal of Food Engineering**, v.78, p. 413–421, 2007.

KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y. W. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1133–1139, 2008.

KRALOVEC, J. A.; ZHANG, S.; ZHANG, W.; BARROW, C. J. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. **Food Chemistry**, v. 131, p. 639–644, 2012.

KOŁODZIEJSKA, I; SKIERKA, E; SADOWSKA, M; KOŁODZIEJSKI, W.; NIECIKOWSKA, C. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. **Food Chemistry**, v. 107, p. 700–706, 2008.

KOMAIKO, J.; SASTROSUBROTO, A.; McCLEMENTS D. J. Encapsulation of α -3 fatty acids in nanoemulsion-based delivery systems fabricated from natural emulsifiers: Sunflower phospholipids. **Food Chemistry**, v. 203, p. 331–339, 2016.

LAGO, C. C.; NOREÑA C. P. Z. Thermodynamic analysis of sorption isotherms of dehydrated yacon (*Smallanthus sonchifolius*) bagasse. **Food Bioscience**, v. 12, p. 2628–33, 2015.

LARANJEIRA M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LEE, S. J.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein–stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 560–569, 2010.

LEFFLER, J. E. The enthalpy entropy relationship and its implications for organic chemistry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 20, p. 1202–1231, 1955.

LEWICKI, P. P. The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, n. 6, p. 553–557, 1997.

LEYVA–RAMOS, R.; OCAMPO–PEREZ, R.; MENDOZA–BARRON, J. External mass transfer and hindered diffusion of organic compounds in the adsorption on activated carbon cloth. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 141–151, 2012.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The buchi Nano Spray Dryer B–90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 404–310, 2010.

LI, J.; HWANG, I. C.; CHEN, X.; PARK H. J. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano–emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 138–147, 2016.

LIM, J.; YEAP, S. P.; CHE, H. X.; LOW, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, p. 381, 2013.

LIU, S.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 203–209, 2006.

LIU, Z.F.; ZENG, G.M.; ZHONG, H.; YUAN, X.Z.; JIANG, L.; FU, H.Y.; MA, X.L.; ZHANG, J.C. Effect of saponins on cell surface properties of *Penicillium simplicissimum*: Performance on adsorption of cadmium(II). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 364–369, 2011.

LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine–based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 311–317, 2012.

LOMAURO, C. J.; BAKSHI, A. S.; LABUZA, T. P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 111–117, 1985.

MATSUNO, R.; ADACHI, S. Lipid encapsulation technology – Techniques and applications to food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, 1993.

METCALFE, L. D.; SCHIMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 510, 1966.

McCLEMENTS, D. J. Colloidal basis of emulsion color. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 451–455, 2002.

McCLEMENTS D. J.; WEISS, J. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, Sixth Edition, Six Volume. John Wiley & Sons, Inc., 2005

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719–1729, 2012.

McCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 47, n. 2–3, p.165–196, 2001.

MEINDERS, M. B. J.; VLIET, T. V. The role of interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** v. 108–109, p. 119–126, 2004.

MORTOLA, V. B.; MEILI, L.; SILVA, R. R.; PINTO, L. A.A. Determinação das isotermas de equilíbrio para cebola, gelatina e farinha de pescado: análise dos modelos de GAB, BET e Henderson. **Vetor**, v. 13, n. 2, p. 79–91, 2003.

MONTE, M. L. **Cinética e termodinâmica da secagem convectiva de filmes de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

MPA. **Plano de desenvolvimento da aquicultura brasileira**. Brasília, 2015. Disponível em: http://seafoodbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/09/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf. Acesso em: 18 de jul. 2017, 20:14:00.

MOREIRA, R.; CHENLO, F.; TORRES, M. D.; SILVA, C.; PRIETO, D. M.; SOUSA, A. M. M.; HILLIOU, L.; GONÇALVES, M. P. Drying Kinetics of Biofilms Obtained from Chestnut Starch and Carrageenan with and without Glycerol. **Drying Technology**, v. 29, p. 1058–1065, 2011.

MORARU, C. I.; PANCHAPAKESAN, C. P.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. L. Nanotechnology: A New Frontier in Food Science. **Food Technology**, v. 57, n. 12, p. 25, 2003.

MUJUMDAR, A. S. **Handbook of industrial drying**, 3^a Ed. USA: CRC PRESS, 2006.

MULIK, R. S.; MÖNKKÖNEN, J.; JUVONEN, R. O.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, p. 190-203, 2010.

MÜLLER, R.H.; MAËDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**. v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.

MUZZARELLI, C.; STANIC, V.; GOBBI, L.; TOSI, G.; MUZZARELLI, R.A.A. Spray drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 73–82, 2004.

NANOCOMPOSIX. **Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis**, v. 1.4, p. 1–8. San Diego, 2015.

NEDOVIC, V.; KALUSEVICA, A.; MANOJLOVICB, V.; LEVICA, S.; BUGARSKIB, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–815, 2011.

NEJADMANSOURI, M. HOSSEINI, S. M. H. NIAKOSARI, M. YOUSEFI, G. H. GOLMAKANI M. T. Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 821–832, 2016.

NUCHI, C. D., McCLEMENTS, D. J., & DECKER, E. A. Impact of tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4912–4916, 2001.

OETTERER, M.; REGITANO–D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1ª edição. Barueri, SP: Editora Manole Ltda., 2006.

ORDOÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos, Vol. 1 Componente dos alimentos e processos**. 1ª edição. Porto Alegre, RS: Editora Artmed, 2005.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid–based oil–in–water emulsions. **Food Chemistry**, v. 84, p. 451–456, 2004.

PAIM, R. M.; MONTE, M. L.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus carpio*) utilizando o método da complexação com ureia. **Vetor**, v.22, n.1, p. 18–37, 2012.

PARK, K. J. B.; PARK, K. J.; ALONSO, L. F. T.; CORNEJO, F. E. P.; FABBRO, I. M. D. Secagem: fundamentos e equações, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.16, n.1, p.93–127, 2014.

PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; CHEN, L.; ZHAO, Q. Methoxy poly(ethylene glycol) – grafted–chitosan based microcapsules: Synthesis, characterization and properties as a potential hydrophilic wall material for stabilization and controlled release of algal oil. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 113–119, 2010.

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Chemical engineers' handbook – international student edition**. Fifth Edition. Blacklick, Ohio: Ed. McGraw–Hill, 1983.

PIACENTINI, E., GIORNO, L., DRAGOSAVAC, M. M., VLADISAVLJEVIĆ, G. T., HOLDICH, R. G., Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. **Food Research International**, v.53, p. 362–372, 2013.

PICCIN, J. S.; DOTTO, G.L.; VIEIRA, M. L. G.; PINTO, L.A.A. Kinetics and mechanism of the food dye FD&C red 40 adsorption onto chitosan. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, p. 3759–3765, 2011.

PIORKOWSKI, D.T.; McCLEMENTS D.J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2014.

POKORNY, J., N. V. YANISHLIEVA, et al., Eds. Antioxidants in **Food: practical applications**. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltda. 2001.

POOLE Jr., C. P; OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology**. New York: Ed. Wiley, 2003.

PRIETO, C., CALVO, L. The encapsulation of low viscosity omega–3 rich fish oil in polycaprolactone by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 227–234, 2017.

QADIR, A.; FAIYAZUDDIN, M. D.; HUSSAIN, M. D. T.; ALSHAMMARI, T. M.; SHAKEEL, F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. **Journal of Molecular Liquids**, v. 214, p. 7–18, 2016.

RAO, J.; McCLEMENTS D.J. Food–grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1413–1423, 2011.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 8, p. 1195–1236, 1998.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug–loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8–21, 2006.

REY, F. J.; CHAMORRO, O.; MARTIN GIL F. J.; MARTIN GIL, J. Characterization of fatty acid methyl esters by thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis**, v. 40, p. 463–473, 1993.

- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**. v. 31, p. 603–632, 2006.
- RIZVI, S. S. H. **Thermodynamic properties of foods in dehydration, engineering properties of foods**. New York, USA: Marcel Dekker Inc., p. 223–309, 1986.
- ROBERTS, G. A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscosimetric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, p. 374–377, 1982.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85–94, 2003.
- ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Moisture sorption properties of chitosan. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 415–420, 2010.
- ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. **Adsorption by powders and porous solids – principles, methodology and applications**. London: Academic Press, 1999.
- RUKTANONCHAI, U.; LIMPAKDEE, S.; MEEJOO, S.; SAKULKHU, U.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Nanotechnology**. v. 19, n. 9, 2008.
- RUTHVEN, D.M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York, USA: John Wiley & Sons. 1984.
- SAHOO, N.; SAHOO, R. K.; BISWAS, N.; GUHA, A.; KUOTSU K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 317–331, 2015.
- SALMINEN, H.; HELGASON, T.; KRISTINSSON, B.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS, J. Formation of solid shell nanoparticles with liquid α -3 fatty acid core. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2934–2943, 2013.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS D. J. Influence of an anionic polysaccharide on the physical and oxidative stability of omega-3 nanoemulsions: Antioxidant effects of alginate. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 690–698, 2016.
- SATHIVEL, S. Thermal and flow properties of oils from salmon heads. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 2, p. 147–152, 2005.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SCHULMAN, J. H., COCKBAIN, E. G. Molecular interactions at oil/water interfaces. Part I. Molecular complex formation and the stability of oil in water emulsions. **Transactions of the Faraday Society**, v. 36, p. 651–661, 1940.

SCOTT, R. P. W. **Principles and practice of chromatography**. USA: Chrom-Ed Book Series, Book 1, Library for Science, 2003.

SEEMAN, N. C. DNA in a material world. **Nature**, v. 421, p. 427–431, 2003.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. **Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils**. In Akoh, C. C.; Min D. B. (Eds.), *Food lipids—chemistry, nutrition, and biotechnology*, (2nd ed.) p. 465–487. New York: Marcel Dekker, Inc. 2002.

SHARMA, P.; SINGH, R.R.B.; SINGH, A.K.; PATEL, A.A.; PATIL, G.R. Sorption isotherms and thermodynamics of water sorption of ready-to-use Basundi mix. **Food and Science Technology**, v. 42, 441–445, 2009.

SILVA, R.S.G; BANDEIRA, S.F; PETRY, F.C; PINTO, L.A.A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeça de carpa comum. **Ciência Rural**, v.41, n. 5, p. 904–909, 2011.

SILVA, R. S. G., BANDEIRA, S. F., PINTO, L. A. A. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 580–585, 2014a.

SILVA, E. K.; FERNANDES, R.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A.; QUEIROZ, F. Water adsorption in rosemary essential oil microparticles: kinetics, thermodynamics and storage conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 140, p. 39–45, 2014b.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7ª edição. Rio de Janeiro, RJ: Editora LTC, 2007.

SINGH, R. R. B., RAO, K. H., ANJANEYULU, A. S. R., & PATIL, G. R. Moisture sorption properties of smoked chicken sausages from spent hen meat. **Food Research International**, v.34(2–3), p. 143–148, 2001.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102–110, 2005.

SPADA, J. C. **Uso do amido de pinhão como agente encapsulante**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SURH, J., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 596–606, 2006.

STORLIEN, L. H.; HIGGINS, J. A.; THOMAS, T. C. Diet composition and insulin action in animal models. **British Journal of Nutrition**, v. 83 p. S85–S90, 2000.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENAB, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108 –109, p. 303–318, 2004.

TAITANO, L.Z.; SINGH1, R.P.; LEE, J.H.; KONG, F. Thermodynamic analysis of moisture adsorption isotherms of raw and blanched almonds. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, p. 840–850, 2011.

TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; PATHAN, S. A.; KHAN, Z. I. Microemulsions: A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery, **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, p. 238–257, 2008.

TIMMERMANN, E. O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H. A. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs BET or GAB parameters? **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 19–31, 2001.

TOMÁS, M. S. J.; GREGORIO, P. R.; TERRAF, M. C. L.; NADER–MACÍAS, M. E. F. Encapsulation and subsequent freeze–drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 87–95, 2015.

ULUATA, S.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Riboflavin–induced oxidation in fish oil–in–water emulsions: Impact of particle size and optical transparency. **Food Chemistry**, v. 213, p. 457–461, 2016.

VELÁZQUEZ–GUTIÉRREZ, S. K.; FIGUEIRA, A. C.; RODRÍGUEZ–HUEZO, M. E.; ROMÁN–GUERRERO, A.; CARRILLO–NAVASE, H.; PÉREZ–ALONSO, C. Sorption isotherms, thermodynamic properties and glass transition temperature of mucilage extracted from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 411–419, 2015.

VISHNU K.V.; CHATTERJE, N. S.; AJEESHKUMAR, K. K.; LEKSHMI, R. G. K.; TEJPAL, C. S.; MATHEW, S.; RAVISHANKAR, C. N. Microencapsulation of sardine oil: Application of vanillic acid grafted chitosan as a bio-functional wall material. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 540–548, 2017.

VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, v. 4, n. 10, p. 1964–1980, 2008.

VONGSVIVUT, J.; HERAUD, P.; ZHANG, W.; KRALOVEC, J. A.; MCNAUGHTON, D.; BARROW C. J. Quantitative determination of fatty acid compositions in micro–encapsulated fish–oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Food Chemistry** 135 (2012) 603–609.

VYAS, T. K.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. M. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 93–101, 2008.

WALKER, R.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Development of food–grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega–3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. **Food & Function**, v. 6, p. 42–55, 2015a.

WALKER, R. M. DECKER, E. A. McCLEMENTS D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 164, p. 10–20, 2015b.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3–polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, p. 41–49, 1999.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. Materials for Encapsulation. In: ZUIDAM N. J.; NEDOVIĆ V.A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, Cap. 3, ed. Springer Science+Business Media, p. 31–100, 2010.

WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, 2007.

XU, P.; ZHANG, X.; XUMIN, W.; LI, J.; LIU, G.; KUANG, Y.; XU, J.; ZHENG, X.; REN, L.; WANG, G.; ZHANG, Y.; HUO, L.; ZHAO, Z.; CAO, D.; LU, C.; LI, C.; ZHOU, Y.; LIU, Z.; FAN, Z.; SHAN, G.; LI, X.; WU, S.; SONG, L.; HOU, G.; JIANG, Y.; et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. **Nature Genetics**, v. 46, p. 1212–1219, 2014.

YANG, J., CIFTCI, O. N. Encapsulation of fish oil into hollow solid lipid micro– and nanoparticles using carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 231, p. 105–113, 2017.

YOGENDRARAJAH, P.; SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F.; DE SAEGER, S.; DE MEULENAER, B. Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of whole black peppercorns (*Piper nigrum* L.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, p. 177–188, 2015.

YOSHII, H.; FURUTA, T.; SIGA, H.; MORIYAMA, S.; BABA, T.; MARUYAMA, K. Autoxidation kinetic analysis of docosahexaenoic acid ethyl ester and docosahexaenoic triglyceride with oxygen sensor. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 749–753, 2002.

YOUN, D. K.; NO, H. K.; PRINYAWIWATKUL, W. Physicochemical and functional properties of chitosans affected by sun drying time during decoloration. **LWT –Food Science and Technology**, v. 42, p. 1553–1556, 2009.

YU, S. C.; BOCHOT, A.; LE BAS, G.; CHERON, M.; GROSSIORD, J.L.; SEILLER, M.; DUCHENE, D. Characteristics of o/w emulsions containing lipophilic molecules with cyclodextrins as emulsifiers. **STP Pharma Sciences**, v. 11, n.5, p. 385–391, 2001.

YU, H. Y., LEE, S. J., LEE, S. Y., LEE, S. K., HU, J. Effect of dietary bioactive compounds and biopolymer encapsulated lipids on metabolism of lipids in high fat diet–fed mice. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 19, p. 1–6, 2017

YUAN, F.; GAO, Y.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS D. J. Modulation of physicochemical properties of emulsified lipids by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 1–7, 2013.

ZEEB, B.; HERZ, E.; McCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Impact of alcohols on the formation and stability of protein-stabilized nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 433, p. 196–203, 2014.

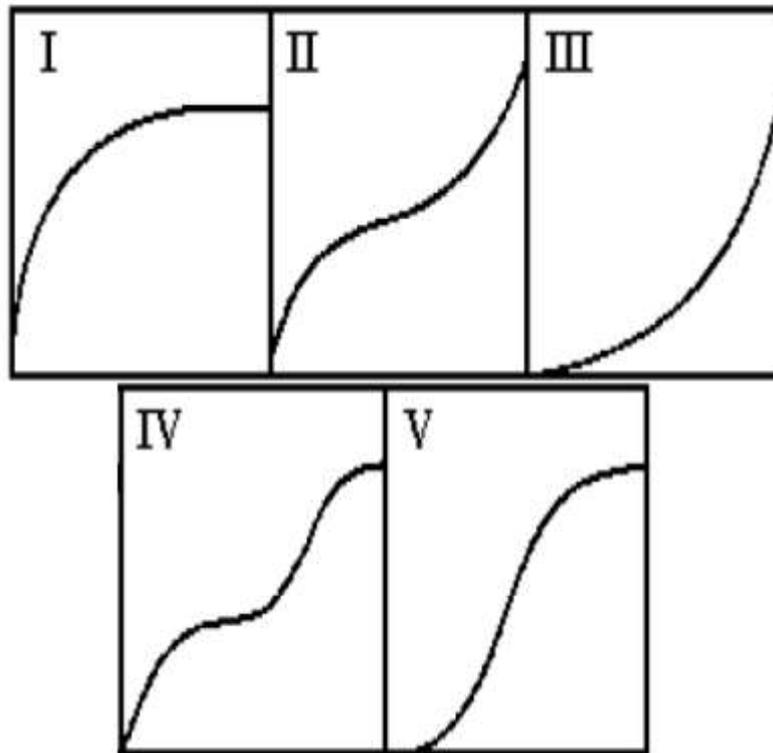
ZHANG, Y.; TAN, C.; ABBAS, S.; ERIC, K.; ZHANG, X.; XIA, S.; JIA, C. The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.120, p. 63–70, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Tipos de Isotermas de Sorção

O entendimento dos tipos das curvas de isotermas é de fundamental importância em alimentos, pois as mesmas retratam as características destes produtos. As características de cada curva são dependentes do tipo de alimento e da temperatura. A maioria das isotermas de sorção pode ser agrupada em cinco classes, de acordo com a classificação proposta por Brunauer et al. (1940) (Figura A1). O formato das curvas indica o tipo de forças existentes na ligação da água com a superfície do material higroscópico (ALVES, 2014).

Figura 1A – Classificação das isotermas



Fonte: Adaptado de Brunauer et al. (1940).

I – A água está fortemente ligada ao produto. Sua forma é atribuída aos adsorventes microporosos, devido ao tamanho dos poros do sólido. Pode ser limitada a poucas camadas moleculares onde os poros excedem um pouco o diâmetro molecular do adsorvente (ALVES, 2014).

II e III – As isotermas dos tipos II e III procedem de adsorventes onde existe uma ampla variação de tamanho de poros. Esta variação permite ao adsorvente a capacitação de avançar de forma contínua de uma adsorção em monocamada para multicamada, sendo a do tipo II a mais comum. Materiais como farinha de trigo, amido, entre outros apresentam

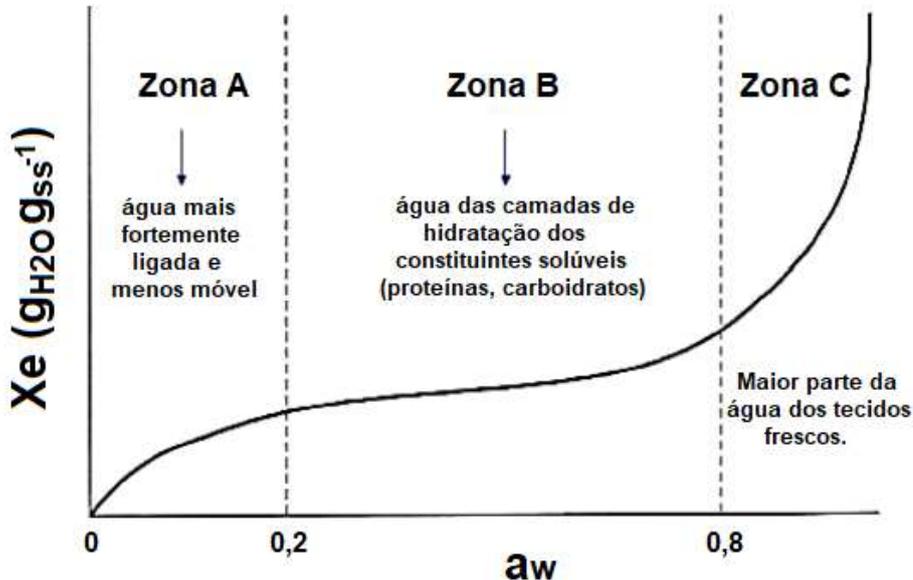
isotermas de sorção do tipo II, cuja forma é sigmoïdal. As isotermas do tipo III representam alimentos com bastante umidade, como por exemplo as frutas (ALVES, 2014).

IV – As curvas do tipo IV são relativas à adsorção em multicamadas via condensação em mesoporos, em que o diâmetro do adsorvente é bem maior que o diâmetro molecular do sorbato. Essa isoterma é caracterizada pela formação de duas camadas desiguais, onde uma é sobre a superfície plana e a seguinte sobre a parede do poro (ALVES, 2014).

V – As curvas do tipo V descrevem comportamento similar ao tipo IV, considerando interações fortes e/ou fracas entre o adsorvente e o adsorbato (ALVES, 2014).

APÊNDICE 2: Isoterma de sorção sigmoide.

Figura 2A – Isoterma de sorção sigmoide.



De acordo com a Figura 2A, é possível observar três zonas pouco delimitadas que indicam a forma como a água está ligada aos alimentos. As linhas tracejadas entre as zonas não possuem um valor determinado, sendo definidas por vários fatores como: estado físico, composição da amostra, temperatura, metodologia, etc.

Zona A – representa a umidade mais fortemente ligada ao produto e menos móvel. É denominada como água da monocamada, a qual é fixa aos grupos polares de certos compostos como amido, fibras, entre outros. A entalpia de vaporização dessa água é maior que a da água pura, não atua como solvente e apresentam propriedades de sólido. Essa umidade constitui uma pequena fração de água no alimento, e corresponde a uma atividade de água inferior a 0,2 até 0,3.

Zona B – corresponde a umidade das camadas de hidratação dos constituintes solúveis do alimento. Denominada umidade da multicamada, sendo ligada por pontes de hidrogênio e ligações dipolo–dipolo, ou retirada fisicamente por microcapilares dos alimentos, com diâmetro inferior a 0,1 μm . A atividade de água nessa zona da isoterma varia entre 0,25 e 0,8 aproximadamente.

Zona C – compreende a umidade mais fracamente ligada aos alimentos e mais móvel, sendo denominada água livre, com a mesma entalpia de vaporização da água pura. É congelável e está disponível como solvente, sendo suficiente para permitir o desenvolvimento de microrganismos, reações químicas e enzimáticas. Equivale a atividade de água de 0,8 a 0,9.

APÊNDICE 3: Produção técnico-científica do período de permanência no curso

1. Produção bibliográfica vinculada à Tese

Artigos completos publicados em periódicos

ESQUERDO, V. M.; SILVA, P. P.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. Nanoemulsions from unsaturated fatty acids concentrates of carp oil using chitosan, gelatin and their blends as wall materials. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, 2017. DOI: 10.1002/ejlt.201700240

ESQUERDO, V.M.; DOTTO, G.L.; PINTO, L.A.A. Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate–chitosan capsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.445, p.137–142, 2015. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.12.094

ESQUERDO, V.M.; SILVA, J. B.; AMARAL, P. R.; DOTTO, G.L.; PINTO, L.A.A. Preparation of Unsaturated Fatty Acids/Chitosan Microcapsules: Influence of Solvent. **Macromolecular Symposia**, v. 343, p. 39–44, 2014. DOI: 10.1002/masy.201300186

Capítulo de livro publicado

ESQUERDO, V. M.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A. **Nanoemulsions containing unsaturated fatty acids concentrates** In: Emulsions. Ed.: Elsevier, 2016, v.3, p. 71–106. ISBN: 9780128043066.

Trabalhos publicados em anais de eventos

BOTELHO, D. L.; SILVA, P. P.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Efeito da adição de gelatina em emulsões preparadas com quitosana para encapsular concentrados de ácidos graxos insaturados de óleo de pescado. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, São Carlos, 2017.

BOTELHO, D. L.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Emulsões poliméricas contendo óleo de pescado rico em ácidos graxos insaturados. **XXVI Congresso de Iniciação Científica**, Pelotas, 2017.

BOTELHO, D. L.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Cápsulas de óleo de pescado com quitosana: efeito da adição de gelatina como co-surfactante. **16ª Mostra da Produção Universitária**, Rio Grande, 2017.

ESQUERDO, V. M.; BOTELHO, D. L.; ENGELMANN, J. I.; IGANSI, A. V.; CADAVAL JR, T. R. S. ; PINTO, L. A. A. Emulsões para nanoencapsular concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos de óleo de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*). **International meeting on fats and oils**, Campinas, 2017.

ESQUERDO, V. M.; QUINTANA, T. M.; COELHO, A. F. S.; SANTOS, N. S.; LARROSA, A. P. Q.; PINTO, L. A. A. Elaboração de emulsões de nanocápsulas de ácidos graxos insaturados com quitosana: efeito do tempo de homogeneização. **54º Congresso Brasileiro de Química**, Natal, 2014.

2. Trabalhos desenvolvidos durante o doutorado

Artigos completos publicados em periódicos

SANTOS, J. P.; ESQUERDO, V. M.; MOURA, C. M.; PINTO, L. A. A. Crosslinking agents effect on gelatins from carp and tilapia skins and in their biopolymeric films. **Colloids and Surfaces A**, v. 539, p. 184–191, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.12.018>

Trabalhos publicados em anais de eventos

MOURA, J. M.; GRUNDMANN, D. D.; FARIAS, B. S.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Elaboração de filmes à base de gelatina de pescado: efeito da adição de concentrados de ácidos graxos insaturados. **13º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Natal, 2015.

QUINTANA, T. M.; POZZADA, J. S.; BEHLING, M. B.; HOFFMANN, P. H.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Obtenção de gelatina de peles de carpa húngara (*Cyprinus carpio*) e sua modificação. **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica**, Campinas, 2015.

QUINTANA, T. M.; POZZADA, J. S.; BEHLING, M. B.; HOFFMANN, P. H.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Obtenção de gelatina de peles de carpa húngara (*Cyprinus carpio*): extração, secagem e caracterização. **14ª Mostra da Produção Universitária**, Rio Grande, 2015.

POZZADA, J. S.; BEHLING, M. B.; HOFFMANN, P. H.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Obtenção de gelatina modificada utilizando peles de carpa húngara (*Cyprinus carpio*): extração, modificação e produção de filme biopoliméricos. **XVII Encontro de Pós-Graduação**, Pelotas, 2015.

POZZADA, J. S.; BEHLING, M. B.; HOFFMANN, P. H.; QUINTANA, T. M.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Extração e caracterização de gelatinas obtidas de peles de carpa húngara (*Cyprinus carpio*). **13ª Mostra da Produção Universitária**, 2014, Rio Grande, 2014.

SILVA, P. P.; COELHO, A. F. S.; SANTOS, N. S.; ESQUERDO, V. M.; PINTO, L. A. A. Extração, refino e caracterização de óleo de carpa (*Cyprinus carpio*) e comparação com o óleo de pescado comercial. **13ª Mostra da Produção Universitária**, 2014, Rio Grande, 2014.