

# **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de vitamina E baseados em alginato**

**Dalila da Assunção Maia Vieira**

Trabalho de Projeto apresentado à

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

**Professora Doutora Filomena Barreiro**

**Professora Doutora Joana Amaral**

outubro 2014



Dedico este trabalho aos meus pais Alice e Francisco,  
à minha irmã Ana, ao Pedro, por todo o amor, compreensão  
e apoio que me deram em todos os momentos da minha vida.



# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a algumas pessoas pelo contributo que cada uma delas teve para a conclusão deste trabalho.

Agradeço imensamente às minhas orientadoras professoras doutoradas Filomena Barreiro e Joana Amaral, por me terem acompanhado na realização da dissertação dando-me apoio e esclarecendo-me dúvidas, pois sem a sua colaboração não seria possível a realização deste trabalho.

Ao departamento de química da ESTIG, pelas instalações e todo o material dispensado para a elaboração deste trabalho e aos professores que de modo direto proporcionaram a formação académica adequada.

Agradecer ao laboratório do grupo BIOCHEMCORE pela utilização do liofilizador e ao LSRE-FEUP pela aquisição das imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

Aos meus amigos de sempre, aos que presenciaram de perto esta etapa da minha vida, e que sempre tiveram uma palavra de encorajamento a dar.

Por último o meu muito obrigado a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## Resumo

A vitamina E possui propriedades reconhecidas, com particular ênfase para a atividade antioxidante, conferindo diversos benefícios para a saúde humana. Por este motivo, tem vindo a ser utilizada em suplementos e na indústria alimentar, nomeadamente no desenvolvimento de alimentos funcionais. No entanto, estes compostos de reconhecida instabilidade, podem sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados e após processos metabólicos. Neste contexto, a microencapsulação possibilita a proteção deste antioxidante natural, permitindo ainda a sua libertação controlada. O presente trabalho teve como objetivo principal a preparação de microesferas de alginato visando a avaliação dos perfis de libertação de  $\alpha$ -tocoferol quando estas são colocadas em condições que simulam o trato gastrointestinal. Para o efeito, foram preparadas microesferas de alginato utilizando uma técnica de microencapsulação por atomização seguida de coagulação. A caracterização das microesferas compreendeu a análise por microscopia ótica e eletrónica de varrimento, avaliação do resíduo seco, capacidade de reidratação, estudo da eficiência de encapsulação (método direto e método indireto) e determinação dos perfis de libertação de  $\alpha$ -tocoferol em diferentes condições (pH 1,2, 7,4 e combinação de 1,2 e 7,4). Os valores da eficiência de encapsulação obtidos pelo método direto foram de aproximadamente 84% e 88%, respetivamente para as microesferas húmidas (obtidas após produção) e microesferas liofilizadas, respetivamente. Pelo método indireto, o valor obtido para a eficiência de encapsulação foi de 99%. No que respeita à avaliação dos perfis de libertação a diferentes pH, verificou-se que para pH=1,2 (simulação das condições estomacais) a libertação foi quase nula; a pH=7,4 (simulação das condições intestinais) ocorreu uma taxa de libertação superior, tal como era esperado, sendo esta de aproximadamente 60% para as microesferas húmidas e de 70% para as liofilizadas. Quando foi utilizada a combinação dos dois pH, as microesferas apresentaram um comportamento coerente com o verificado para os perfis individuais, havendo inicialmente uma libertação mínima de  $\alpha$ -tocoferol seguida de um rápido aumento quando passaram para o meio básico. Neste caso observou-se uma libertação de cerca de 80% para as microesferas húmidas e 85% para as liofilizadas. Por último, foi feito um estudo de incorporação das microesferas num sumo de laranja. Após uma semana de armazenamento verificou-se que a libertação de  $\alpha$ -tocoferol foi quase nula,

contudo quando se alcalinizou verificou-se liberação de princípio ativo em valores similares aos obtidos nos estudos de liberação em condições de simulação do trato gastrointestinal. Tal permite inferir que as microesferas de  $\alpha$ -tocoferol demonstraram ter o comportamento desejado, apresentando-se assim como uma solução promissora e com potencial aplicação em produtos na indústria alimentar, em particular alimentos com pH ácido.

## Abstract

Vitamin E has recognized properties, with particular emphasis to the antioxidant activity, providing several benefits to human health. For this reason it has been used in supplements and food industry, especially for functional foods development. However, these compounds of known instability can suffer changes during food processing and after metabolic processes. In this context, microencapsulation provides protection of this natural antioxidant, yet allowing its controlled release. This study aimed to produce alginate microspheres to evaluate the release profiles of  $\alpha$ -tocopherol under conditions that simulate the gastrointestinal tract. To this end, alginate microspheres have been produced using a spray drying technique followed by coagulation. Characterization of the produced microspheres included optical and scanning electron microscopy analysis, dry residue, rehydration capacity, study the encapsulation efficiency (direct method and indirect method) and determination of  $\alpha$ -tocopherol release profiles under different pH conditions (1.2, 7.4 and 1.2 followed by 7.4). The encapsulation efficiency values obtained by the direct method, for the wet and lyophilized storage forms, was approximately 84% and 88% respectively. Via the indirect method, an encapsulation efficiency of around 99% was obtained. Regarding the evaluation of the release profiles at different pH, it was found that at pH 1.2 (simulation of gastric conditions) the release is almost absent, at pH 7.4 (simulated intestinal conditions),  $\alpha$ -tocopherol, as expect, was released to approximately 60% and 70%, respectively when wet and lyophilized microspheres were tested. When combined pHs were used microspheres behavior showed to be consistent with that found for the individual pH study; initially there was a minimal release of  $\alpha$ -tocopherol and then a rapid increase was achieved after microspheres being transferred to 7.4 pH. In this case a final release of 80% was achieved with wet microspheres and 85% with the lyophilized ones. Finally, the microspheres incorporation in an orange juice, was done. After one week period,  $\alpha$ -tocopherol release was almost absent, however after basified the sample, the active principle release achieved values very similar to the ones obtained in the studies where simulating gastrointestinal conditions were used. This allows inferring that the microspheres of alginate have the desired behavior, presenting itself as a promising solution to protect  $\alpha$ -tocopherol with potential to be used in the food industry, particularly in foods with acid pH.



# Índice

Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
Índice .....	xi
Lista de Figuras .....	xiii
Lista de Tabelas .....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xix
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 Relevância e Motivação.....	3
1.2 Objetivos e Organização da dissertação .....	3
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica .....	5
2.1 A vitamina E .....	7
2.1.1 Fontes dietéticas .....	9
2.1.2 Propriedades biológicas.....	11
2.1.3 Aplicações .....	13
2.2 Microencapsulação .....	17
2.2.1 Agente encapsulante .....	18
2.2.2 Alginato .....	20
2.2.3 Métodos de microencapsulação.....	23
2.3 Liberação controlada .....	25
2.4 Metodologias analíticas para a determinação de Vitamina E.....	27
Capítulo 3 – Materiais e Métodos .....	31
3.1 Materiais .....	33
3.1.1 Materiais utilizados no processo de microencapsulação.....	33
3.1.2 Materiais usados para avaliação da eficiência de encapsulação (E.E.) ....	33

3.1.3	Materiais utilizados na determinação de perfis de libertação do $\alpha$ -tocoferol	33
3.1.4	Materiais utilizados na incorporação das MIC num sumo de laranja.....	34
3.2	Métodos .....	34
3.2.1	Processo de Microencapsulação do $\alpha$ -tocoferol .....	34
3.2.2	Caracterização das MIC.....	37
3.2.3	Eficiência de Encapsulação (E.E.).....	38
3.2.4	Obtenção dos perfis de libertação de $\alpha$ -tocoferol .....	40
3.2.5	Estudo de incorporação das MIC contendo $\alpha$ -tocoferol numa matriz alimentar (sumo de laranja) .....	42
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....		45
4.1	Microencapsulação do $\alpha$ -tocoferol e caracterização das microesferas obtidas (resíduo seco, morfologia e capacidade de reidratação).....	47
4.2	Determinação da eficiência de encapsulação e perfis de libertação .....	52
4.2.1	Desenvolvimento das metodologias .....	52
4.2.2	Aplicação das metodologias .....	59
4.3	Incorporação das MIC de $\alpha$ -tocoferol numa matriz alimentar (sumo de laranja)	65
Capítulo 5 – Conclusões e perspetivas de trabalho futuro.....		69
Referências Bibliográficas.....		75
Anexos.....		87
Anexo A. Produção de MIC de alginato com e sem $\alpha$ -tocoferol.....		89
Anexo B. Registo dos resultados para os ensaios de libertação .....		121
Anexo C. Resumo do congresso 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (Porto, Setembro de 2014).....		133
Anexo D. Resumo do congresso 12º Encontro de Química dos Alimentos (Lisboa, Setembro de 2014).....		139

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis. Adaptado de (Brigelius-Flohé e Traber, 1999). .....	8
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura das micropartículas (Brasileiro, 2011). .....	17
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura química do alginato (é mostrada uma cadeia do polímero com dois monómeros de ácido gulurónico (G) e três monómeros de ácido manurónico (M), com ligações (1-4). Adaptado de (Bowey, 2009). .....	20
<b>Figura 2.4:</b> Mecanismo de interação cooperativa entre o íon cálcio e o alginato. (a): Modelo “ <i>egg-box</i> ” – interação cálcio com o bloco ácido gulurónico; (b): Associação de cadeias levando à gelificação, induzida pelo envolvimento do cálcio numa caixa de ácido gulurónico (Santos R. S., 2012). .....	21
<b>Figura 2.5:</b> Esquema básico de um equipamento para HPLC. Adaptado de (Degani <i>et al.</i> , 1998). .....	29
<b>Figura 2.6:</b> Modo de funcionamento do UV-vis. Adaptado de (Vo, 2014). .....	29
<b>Figura 3.1:</b> Processo otimizado para a produção de MIC de alginato. ....	36
<b>Figura 3.2:</b> Representação esquemática e fotografia do sistema NISCO Var J30 (Fernandes <i>et al.</i> , 2011). .....	37
<b>Figura 3.3:</b> Esquema do método direto para a obtenção da E.E. ....	39
<b>Figura 4.1:</b> Evolução da morfologia das MIC com princípio ativo (Ensaio Toc_002) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 20 h de consolidação (B). .....	48
<b>Figura 4.2:</b> Evolução da morfologia das MIC sem princípio ativo (Ensaio Alg_006) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 20 h de consolidação (B). .....	49
<b>Figura 4.3:</b> Caracterização morfológica por SEM das MIC sem princípio ativo (A) e com princípio ativo (B). .....	50
<b>Figura 4.4:</b> Processo de reidratação das MIC com $\alpha$ -tocoferol (ampliação de 40x, 100x e 400x): MIC liofilizadas (A) e Microsfers imediatamente após a reidratação (B). ....	51
<b>Figura 4.5:</b> Processo de reidratação das MIC com $\alpha$ -tocoferol (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microsfers após 24 horas reidratação (A) e Microsfers após 48 horas reidratação (B). .....	51

<b>Figura 4.6:</b> Espectro UV-vis do $\alpha$ -tocoferol com a análise na gama 200-400 nm.....	52
<b>Figura 4.7:</b> Curva de calibração do $\alpha$ -tocoferol em <i>n</i> -hexano.....	53
<b>Figura 4.8:</b> Perfil de libertação do $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC húmidas para pH=7,4 (A) e pH=1,2 (B). .....	59
<b>Figura 4.9:</b> Perfis de libertação do $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC húmidas, representação das duas réplicas e da média com o respetivo erro. (A) pH= 7,4 (B) pH= 1,2 e (C) pH=1,2 (2 horas) seguido de pH 7,4 (6 horas) .....	62
<b>Figura 4.10:</b> Perfis de libertação do $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC liofilizadas, representação das duas réplicas e da média com o respetivo erro. (A) pH=7,4, (B) pH=1,2 e pH=1,2 e 7,4. ....	64
<b>Figura 4.11:</b> Curva de calibração do $\alpha$ -tocoferol em acetonitrilo. ....	66

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1:</b> Teor de vitamina E em alguns alimentos. Adaptado de (Nutri-Facts, 2011)	10
<b>Tabela 2.2:</b> Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo a sua origem. Adaptado de Brasileiro (2011).	19
<b>Tabela 2.3:</b> Aplicações e funcionalidade do alginato (Goh <i>et al.</i> , 2012).	23
<b>Tabela 2.4:</b> Técnicas de Microencapsulação. Adaptado de (Suave <i>et al.</i> , 2006; Ghosh, 2006).	24
<b>Tabela 4.1:</b> Ensaio realizado de microencapsulação do $\alpha$ -tocoferol.	48
<b>Tabela 4.2:</b> Estudo da Eficiência de encapsulação para os diferentes ensaios.	54
<b>Tabela 4.3:</b> Estudo dos parâmetros para o método otimizado da E.E.	56
<b>Tabela 4.4:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para um dos ensaios realizados com a amostra Toc_009 em meio básico (massa inicial teórica de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).	58
<b>Tabela 4.5:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para um dos ensaios realizados com a amostra Toc_009 em meio ácido (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).	58
<b>Tabela 4.6:</b> Resultados obtidos das condições otimizadas para a quantificação da Eficiência de encapsulação através do método direto.	60
<b>Tabela 4.7:</b> Resultados obtidos das condições otimizadas para a quantificação da Eficiência de encapsulação através do método indireto.	61
<b>Tabela 4.8:</b> Quantificação de $\alpha$ -tocoferol livre no sumo após 7 dias, após aplicação de ultrassons e após alteração do pH.	67
<b>Tabela A1:</b> Registo da preparação da emulsão durante a homogeneização.	89
<b>Tabela A2:</b> Registo das MIC com princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de atomização.	102
<b>Tabela A3:</b> Registo das MIC com princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de consolidação.	107
<b>Tabela A4:</b> Registo das MIC sem princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de atomização.	112

<b>Tabela A5:</b> Registo das MIC sem princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de consolidação.....	116
<b>Tabela B1:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_003 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 22,149 mg).....	121
<b>Tabela B2:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_003 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 22,149 mg).....	121
<b>Tabela B3:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_005 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).....	122
<b>Tabela B4:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_005 a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).....	122
<b>Tabela B5:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_005 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).....	123
<b>Tabela B6:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_007 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).....	123
<b>Tabela B7:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_007 a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).....	124
<b>Tabela B8:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_007 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).....	124
<b>Tabela B9:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_009 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).....	125
<b>Tabela B10:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_009 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).....	125

<b>Tabela B11:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).....	126
<b>Tabela B12:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).....	126
<b>Tabela B13:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).....	127
<b>Tabela B14:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 liofilizadas a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg). ....	127
<b>Tabela B15:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 liofilizadas a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg). ....	128
<b>Tabela B16:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_011 liofilizadas a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg). ....	128
<b>Tabela B17:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).....	129
<b>Tabela B18:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).....	129
<b>Tabela B19:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).....	130
<b>Tabela B20:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 liofilizadas a pH=7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg). ....	130

<b>Tabela B21:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 liofilizadas a pH=1,2 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg). .....	131
<b>Tabela B22:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 liofilizadas a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg). .....	131
<b>Tabela B23:</b> Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc_013 liofilizadas a pH=1,2 e 7.4 (massa inicial de $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg). .....	132

## Lista de Abreviaturas

**$\alpha$ -TTP** Proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ApoE** Apolipoproteína E

**CCF** Cromatografia em camada delgada fina

**CG** Cromatografia gasosa

**E.E.** Eficiência de encapsulação

**FDA** *Food and Drug Administration*

**GRAS** Geralmente reconhecidos como seguros

**HPLC** Cromatografia líquida de alta eficiência

**I** Radiação transmitida após a absorção

**IU** Unidades internacionais

**I<sub>0</sub>** Radiação incidente

**LDL** Lipoproteína de baixa densidade

**LSRE-IPB** Laboratório de Processos de Separação e Reação-Instituto Politécnico de Bragança

**MIC** Microesferas

**MO** Microscopia ótica

**M<sub>p.a.t.</sub>** Massa de princípio ativo teórico

**M<sub>p.a.ne.</sub>** Massa de princípio ativo não encapsulado

**m/m** Relação massa/massa

**m/v** Massa por volume

**n.a.** Não aplicável

**O/A** Óleo em água

**PBS** Solução tampão fosfato salina

**PKC** Proteína cinase C

**PUFA** Ácidos gordos polinsaturados

**ROS** Espécies reativas de oxigénio

**rpm** Rotações por minuto

**SEM** Microscopia eletrónica de varrimento

**TE** Equivalentes de tocoferol

**UV** Ultravioleta

**UV-vis** Espectroscopia ultravioleta/visível

**v/v** volume por volume

---

# **Capítulo 1**

## Introdução

---



## 1.1 Relevância e Motivação

A vitamina E desempenha um papel de grande importância no metabolismo normal das células sendo sobejamente conhecida pela sua atividade antioxidante. As espécies reativas, como os radicais livres, estão envolvidas no desenvolvimento de processos degenerativos e relacionadas com o envelhecimento e o cancro, desta forma originou um crescente interesse no estudo da generalidade dos antioxidantes e da vitamina E em particular. A vitamina E compreende um conjunto de 8 compostos ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -tocoferóis e tocotrienóis), sendo o  $\alpha$ -tocoferol aquele que apresenta *in vitro* a maior capacidade de captação de radicais livres. No entanto, este composto é instável e sensível ao oxigénio, luz, temperatura, sendo a microencapsulação uma alternativa viável para a sua preservação permitindo simultaneamente uma libertação controlada do mesmo. Neste contexto, neste trabalho pretendeu-se levar a cabo a proteção da vitamina E através da sua microencapsulação, como forma de ultrapassar as restrições referidas. Adicionalmente, a matriz de encapsulação foi selecionada por forma a permitir a libertação de vitamina E no organismo/trato gastrointestinal de forma diferenciada a diferentes valores de pH.

## 1.2 Objetivos e Organização da dissertação

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- Preparação de microesferas (MIC) de alginato contendo vitamina E utilizando a técnica de atomização seguida de coagulação;
- Caracterização das MIC obtidas: avaliação da eficiência de encapsulação, resíduo seco e capacidade de reidratação;
- Desenvolvimento/teste de metodologias para a avaliação dos perfis de libertação do  $\alpha$ -tocoferol a diferentes valores de pH (ácido e básico) e que condições que simulam o trato gastrointestinal;
- Incorporação das MIC produzidas numa matriz alimentar, nomeadamente num sumo de laranja, e quantificação de  $\alpha$ -tocoferol libertado após armazenamento e quando submetido a pH similar ao do intestino.

A dissertação encontra-se organizada da seguinte forma:

No capítulo 2 intitulado “**Revisão Bibliográfica**” é realizada uma revisão da literatura de interesse para a fundamentação do tema sendo focados os seguintes tópicos: (i) Principais funções biológicas e aplicações da Vitamina E; (ii) Conceitos sobre processos de microencapsulação, (iii) Avaliação dos perfis de libertação e (iv) Metodologias de análise da vitamina E.

No capítulo 3, “**Materiais e Métodos**”, é feita a descrição dos reagentes utilizados nas atividades laboratoriais desenvolvidas bem como as metodologias experimentais levadas a cabo para produção e caracterização das microesferas (MIC), testes de Eficiência de Encapsulação (E.E.), ensaios de libertação, incorporação das MIC num sumo de laranja e quantificação da libertação de  $\alpha$ -tocoferol.

No capítulo 4 designado por “**Resultados e Discussão**” encontram-se descritos os principais desenvolvimentos experimentais, respetiva discussão e principais conclusões no que respeita: (i) microencapsulação do  $\alpha$ -tocoferol; (ii) testes de reidratação; (iii) metodologias de caracterização das MIC, incluindo um estudo mais detalhado para a determinação dos perfis de libertação; (iv) incorporação das MIC num sumo de laranja e correspondente quantificação da libertação do  $\alpha$ -tocoferol encapsulado.

No capítulo 5, “**Conclusões e perspectivas de trabalho futuro**” é feita uma síntese das principais conclusões do trabalho e são apresentadas algumas perspectivas de trabalho futuro.

---

## **Capítulo 2**

### Revisão Bibliográfica

---



Neste capítulo pretende-se apresentar e enquadrar de uma forma tão abrangente quanto possível, o processo de microencapsulação com base em polímeros de origem natural e a determinação de perfis de libertação, em particular no que respeita o  $\alpha$ -tocoferol.

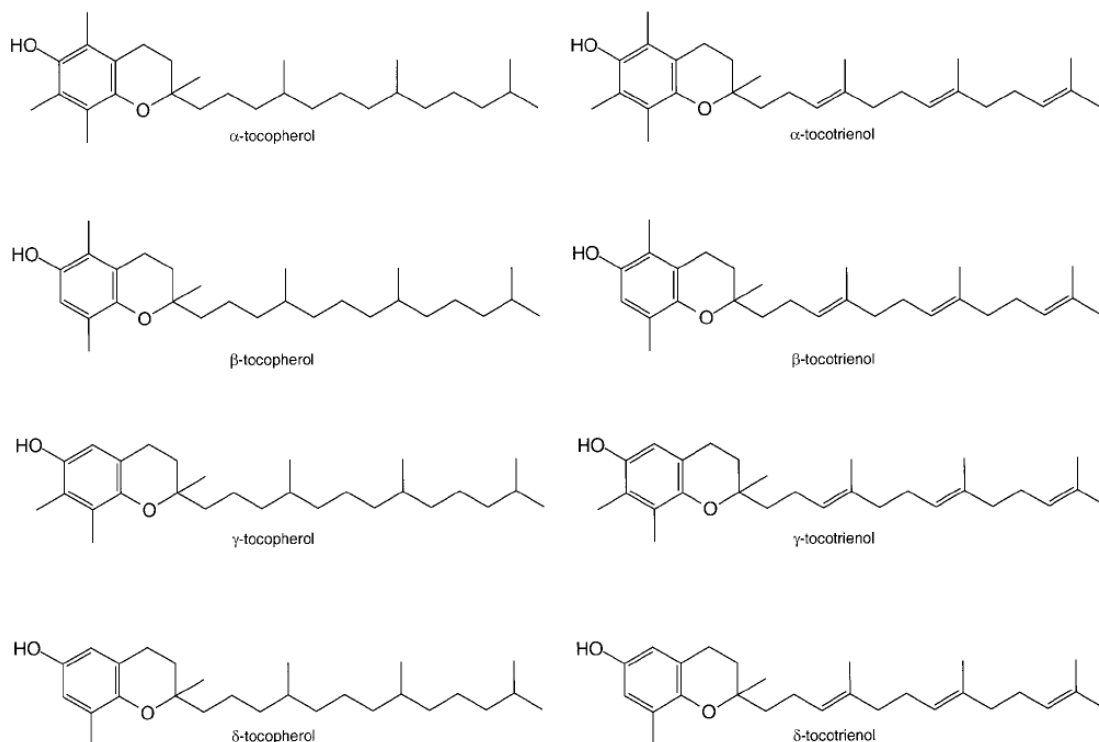
Desta forma, na revisão bibliográfica começa-se por apresentar a definição de vitamina E, clarificando quais as suas principais características, abordando as suas principais fontes dietéticas, propriedades biológicas e algumas das suas aplicações. Seguidamente apresenta-se o conceito de microencapsulação, fazendo-se referência a diferentes metodologias e tipos de agentes encapsulantes, dando particular atenção ao utilizado neste trabalho, o alginato. São também mencionados conceitos relativos a diferentes formas de libertação controlada de princípios ativos e, para finalizar, referem-se diferentes metodologias de análise de Vitamina E.

## 2.1 A vitamina E

A vitamina E é um antioxidante que possui um papel crucial na proteção do organismo contra fatores geradores de radicais livres. O termo “vitamina E” é utilizado para referir um grupo de compostos estruturalmente relacionados entre si, nomeadamente tocoferóis e tocotrienóis, que apresentam o 2-metil-6-cromanol como base estrutural. A vitamina E abrange 8 formas incluindo 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, em ambos os casos designados por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , diferenciando entre si pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Figura 2.1).

Como se pode verificar na Figura 2.1, os tocoferóis apresentam 3 estereocentros pelo que cada composto pode apresentar um máximo de 8 estereoisómeros. Na natureza, a síntese destes compostos é estereoespecífica, obtendo-se compostos que apresentam sempre a configuração *RRR*. Assim, a título de exemplo referira-se que o  $\alpha$ -tocoferol encontrado na natureza é o estereoisómero *RRR*- $\alpha$ -tocoferol, o qual foi anteriormente designado como D- $\alpha$ -tocoferol. Quando estes compostos são sintetizados em laboratório, formam-se diversos estereoisómeros. Mais concretamente, a síntese química do  $\alpha$ -

tocoferol resulta numa mistura de 8 estereoisómeros a qual é designada como DL- $\alpha$ -tocoferol. A atividade biológica da forma sintética é inferior à da forma natural.



**Figura 2.1:** Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis. Adaptado de (Brigelius-Flohé e Traber, 1999).

A vitamina E proveniente de fontes naturais pode ser obtida por destilação sendo, na maioria dos casos, posteriormente sujeita a reações de metilação e esterificação para incorporação em produtos comestíveis, tais como óleos vegetais. A vitamina E sintética é produzida a partir de material fóssil vegetal pela condensação de trimetil-hidroquinona com isopitol (Nutri-Facts, 2011).

Dos diferentes estereoisómeros que ocorrem naturalmente, o  $\alpha$ -tocoferol é o mais comum e o biologicamente mais ativo (Brigelius-Flohé e Traber, 1999; Herrera e Barbas, 2001; Rigotti, 2007). O nome “tocoferol” deriva das palavras gregas “tocos” que significa nascimento e “pherein” que significa trazer à luz. O nome foi criado para realçar o seu papel essencial na reprodução de animais de diversas espécies, incluindo ainda a terminação –ol que identifica a substância como sendo um álcool. O  $\alpha$ -tocoferol é um óleo de cor amarela, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e óleos

vegetais sendo sensível à luz, oxigénio, metais e soluções alcalinas (Bramley *et al.*, 2000).

Os tocoferóis oxidam facilmente alterando a sua cor para um tom escuro quando expostos ao ar. Apesar de várias aplicações o uso do  $\alpha$ -tocoferol é limitado, uma vez que se converte irreversivelmente em quinona por via de epoxidação quando é exposto ao oxigénio. Esta desvantagem na aplicação do  $\alpha$ -tocoferol pode ser ultrapassada pela técnica de microencapsulação pois esta é capaz de proteger os princípios ativos de um ambiente desfavorável (Schrooyen *et al.*, 2001). No caso de suplementos de vitamina E, estes são geralmente protegidos da oxidação pelo ar através da esterificação do  $\alpha$ -tocoferol, na forma de succinato ou de acetato de  $\alpha$ -tocoferol. Após a ingestão, o grupo succinato ou acetato é removido através de ação enzimática no sistema digestivo, ficando o  $\alpha$ -tocoferol disponível para ser absorvido através do intestino delgado (Rigotti, 2007).

### 2.1.1 Fontes dietéticas

As principais fontes da vitamina E são os óleos vegetais (azeite, palma, milho, cártamo, girassol, entre outros), frutos secos (nozes, amêndoas), cereais integrais e gérmen de trigo. Outras fontes adicionais são as sementes e vegetais de folhas verdes. Já o teor de vitamina E de legumes, laticínios, frutas, carne e peixe é comparativamente baixo (Mourão *et al.*, 2005). A Tabela 2.1 apresenta os teores de vitamina E presentes em alguns dos alimentos mencionados.

O teor de vitamina E nos alimentos é muitas vezes mencionado na forma de equivalentes de tocoferol (TE), em que 1 mg de  $\alpha$ -tocoferol é equivalente a 1 TE. Este termo foi estabelecido para explicitar as diferenças na atividade biológica dos vários estereoisómeros da vitamina E.

Os valores atribuídos aos outros tocoferóis e tocotrienóis na dieta são os seguintes:

- 1 mg  $\beta$ -tocoferol = 0,5 TE
- 1 mg  $\gamma$ -tocoferol = 0,1 TE
- 1 mg  $\delta$ -tocoferol = 0,03 TE

- 1 mg  $\alpha$ -tocotrienol = 0,3 TE
- 1 mg  $\beta$ -tocotrienol = 0,05 TE

**Tabela 2.1:** Teor de vitamina E em alguns alimentos. Adaptado de (Nutri-Facts, 2011).

<b>Alimentos</b>	<b>Vitamina E (mg <math>\alpha</math>-tocoferol/100g)</b>
<b>Amendoins</b>	11
<b>Avelã</b>	26
<b>Azeite</b>	12
<b>Espinafre</b>	1,4
<b>Leite</b>	0,14
<b>Maçã</b>	0,5
<b>Manteiga</b>	2
<b>Noz</b>	6
<b>Óleo de gérmen de trigo</b>	174
<b>Óleo de girassol</b>	63
<b>Óleo de soja</b>	17
<b>Tomate</b>	0,8

A atividade biológica, expressa em unidades internacionais (IU) e em TE, está igualmente definida para as várias formas sintéticas da vitamina E (essencialmente isómeros ou derivados do  $\alpha$ -tocoferol). Comparativamente com a forma natural (*RRR*- $\alpha$ -tocoferol), estas formas apresentam sempre valores inferiores de atividade biológica, o que se justifica principalmente pela seletividade das proteínas de transporte (Bramley *et al.*, 2000; Ruperez *et al.*, 2001).

Os tocoferóis são sintetizados exclusivamente nos organismos fotossintéticos, incluindo plantas de maiores dimensões. Apesar de se encontrarem quantidades significativas

de tocoferóis em todos os tecidos verdes, estes compostos ocorrem predominantemente em sementes. Assim os óleos derivados de plantas representam as principais fontes de vitamina E na dieta humana. Considerando que óleos obtidos de plantas distintas contêm os quatro tocoferóis em diferentes quantidades relativas, o consumo total de cada análogo de vitamina E depende em grande parte das preferências alimentares nos diferentes países. O principal estereoisômero de vitamina E presente no azeite é o  $\alpha$ -tocoferol e os óleos derivados de grãos de soja que contêm relativamente elevadas quantidades é o  $\delta$ -tocoferol. Os tocotrienóis são os principais componentes de vitamina E no óleo de palma, encontrando-se ainda quantidades consideráveis também, na aveia e grãos de arroz (Zingg, 2007).

### 2.1.2 Propriedades biológicas

A principal função biológica da vitamina E é a de funcionar como antioxidante lipossolúvel, prevenindo a propagação de reações de radicais livres. Os radicais livres são formados em processos metabólicos normais e após a exposição a agentes exógenos tóxicos. A vitamina E encontra-se presente nas membranas celulares, sendo a sua principal função a de defesa da célula contra processos de oxidação. Deste modo, dentro das células e organelos (por exemplo nas mitocôndrias) a vitamina E é a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica (Traber e Atkinson, 2007).

Segundo a literatura estes compostos protegem os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) bem como outros componentes das membranas celulares da oxidação provocada por ação de radicais livres. Para além de manter a integridade das membranas das células no organismo humano, protegem ainda as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que circulam na corrente sanguínea (Rigotti, 2007).

A vitamina E é absorvida no intestino e entra na circulação através do sistema linfático juntamente com os lípidos agrupados em micelas, e transportada para o fígado com as quilomicras e vestígios derivados deles. Este processo é semelhante para todas as formas de vitamina E testadas. Contudo, através da passagem do  $\alpha$ -tocoferol pelo fígado é que favorece o aparecimento do mesmo no plasma. A maior parte da ingestão de  $\beta$ -,  $\gamma$ -

e  $\delta$ -tocoferol é secretado na bÍlis não sendo absorvidos e são excretados nas fezes (Brigelius-Flohé e Traber, 1999).

Apesar de ser inquestionável a relevância da vitamina E no organismo como composto antioxidante e anti-inflamatório, com especial ênfase no envelhecimento e em algumas doenças inflamatórias relacionadas com idade, um ponto crítico é a confirmação do benefício de vitamina E em ensaios clÍnicos humanos (Mocchegiani *et al.*, 2014).

Experiências em diferentes culturas de células e modelos de animais têm mostrado claramente que a vitamina E é um composto essencial na dieta para a eficiência de muitos mecanismos de homeostasia do corpo com um foco nomeadamente, sobre o sistema imunológico. Em particular, a imunidade mediada por células e a resposta inflamatória/imune são preservadas pela formação de peróxidos de lípidos em células CD4<sup>+</sup>, tanto em casos de envelhecimento como de doenças inflamatórias relacionadas com a idade. Como consequência, a produção de IL-2 é satisfatória, com uma boa resposta imune a nocividades externas. Por outro lado, a presença de bons níveis de circulação em pessoas centenárias da Vitamina E em conjunto com satisfatória atividade antioxidante e resposta imunitária (Mecocci *et al.*, 2000), demonstram claramente a importância de Vitamina E no desempenho dos sistemas imunológico e antioxidantes necessários para alcançar um envelhecimento saudável e longevidade. No entanto, as várias isoformas da família da vitamina E não têm todas efeitos benéficos semelhantes. Em diferentes condições experimentais, a isoforma mais conhecida da vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol) é a que apresenta maior atividade como agente antioxidante ou anti-inflamatório (Mocchegiani *et al.*, 2014).

Pelo contrário, uma mistura das diversas isoformas de vitamina E e tocotrienóis (nomeados TRF e  $\gamma$ -TMT) tem maior eficácia na redução de danos no ácido desoxirribonucleico (ADN), restabelecendo a resposta inflamatória/imune protegendo desta forma as células do sistema imunológico através das espécies reativas de oxigénio (ROS) com mecanismos diretos que envolvem complexo CD3/TCR e balsas lipídicas na membrana celular. Estes resultados encorajadores em condições experimentais têm sugerido a realização de uma série de testes clÍnicos em seres humanos, tanto em pessoas idosos, co-

mo em pessoas com doenças inflamatórias onde o *stress* oxidativo e a inflamação crônica são a principal causa de seu início e progressão (Mocchegiani *et al.*, 2014). Os melhores resultados podem ser obtidos usando uma mistura das diferentes isoformas da família da vitamina E, incluindo os tocotrienóis. O uso de uma isoforma de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) em doses elevadas pode conduzir a resultados inesperados, especialmente na aterosclerose, com a ruptura da placa aterosclerótica e do risco de trombose e de mortalidade (Miller III *et al.*, 2005; Saremi e Arora, 2010; Mocchegiani *et al.*, 2014).

Atualmente tem sido evidenciado que o papel da vitamina E vai muito além da sua função antioxidante. O  $\alpha$ -tocoferol pode interagir e regular enzimas específicas e fatores de transcrição influenciando funções celulares independentemente da sua ação antioxidante (Azzi, 2007; Pedro, 2009). A primeira observação do papel do  $\alpha$ -tocoferol na sinalização celular feita por Boscoboinik *et al.*, (1991) que demonstrou que o  $\alpha$ -tocoferol inibia a proliferação de células musculares lisas pela diminuição da atividade da proteína cinase C (PKC) e pela ativação da proteína fosfatase 2A (Clément *et al.*, 1997; Ricciarelli *et al.*, 1998; Pedro, 2009). Entretanto o contrário foi observado em células da linhagem HeLa (Fazzio *et al.*, 1997), sugerindo que o  $\alpha$ -tocoferol pode atuar na proliferação celular por vias de sinalização específicas em cada tipo celular.

Um estudo recente revelou que a suplementação de  $\alpha$ -tocoferol inibe o desenvolvimento da apolipoproteína E (ApoE) na aterosclerose em ratos *knockout* somente sob condições de deficiência de vitamina E (causados pela supressão da proteína de transferência de tocoferol ( $\alpha$ -TTP)), enquanto a suplementação não teve nenhum efeito em ratos que tinham os níveis de  $\alpha$ -tocoferol basal normais (Suarna *et al.*, 2006; Reite *et al.*, 2007).

### 2.1.3 Aplicações

Seguidamente descrevem-se as principais aplicações da vitamina E na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética com intuito de compreender a importância desta vitamina no nosso cotidiano.

### 2.1.3.1 Indústria Alimentar

Algumas vitaminas, como é o caso das vitaminas C e E são adicionadas a alimentos, principalmente pelo seu poder antioxidante e não pelo seu valor nutricional agregado ao alimento. Ainda assim, muitas vezes, o fabricante ao descrever este produto ressalta o facto de o alimento ser enriquecido com vitaminas (Dionysio e Meirelles, 2010).

Além de ocorrer naturalmente nos alimentos, a vitamina E pode ser adicionada para prevenir a oxidação dos mesmos e aumentar o teor da vitamina. Refira-se ainda que este aumento pode ser feito por meio da adição da mesma à dieta de animais domésticos incrementando, conseqüentemente, o seu teor nos alimentos derivados desses animais (Flachowsky *et al.*, 2002).

A adição da vitamina E em alimentos e o seu uso em formulações comerciais ou em suplementos, utiliza a forma natural e sintética, sendo mais comumente adicionadas na sua forma esterificada, como ésteres de acetato de  $\alpha$ -tocoferol natural ou sintético, embora também possam ser utilizadas na forma de succinato (Hope e Krennrich, 2000; Batista *et al.*, 2007). As formas esterificadas de  $\alpha$ -tocoferol são utilizadas nos suplementos de vitamina E e no fortalecimento de alimentos, devido à sua relativa estabilidade e ao maior tempo de vida de prateleira (Trumbo *et al.*, 2003).

O enriquecimento da alimentação com vitamina E e com outros nutrientes, relacionados com a prevenção e o controlo de doenças crónicas não transmissíveis, ainda não é comum, até mesmo porque não há consenso sobre a dose necessária para alcançar tais efeitos. Contudo, em muitas populações é necessário ingerir alimentos enriquecidos com vitamina E para alcançar a recomendação estabelecida entre 7 a 11,1 mg/por dia (Booth *et al.*, 1997; Sichert-Heller *et al.*, 2000; Beitz *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2007; Mocchegiani *et al.*, 2014).

Stapelfeldt *et al.*, (1999) investigaram a incorporação e retenção de vitamina E no leite de vaca, após a injeção intraperitoneal de 10 g de acetato de all-rac- $\alpha$ -tocoferol no plasma. Os resultados demonstraram que, quanto maior o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, menor a concentração de radicais livres no leite.

### 2.1.3.2 *Indústria Cosmética*

Embora existam quatro tipos de tocoferóis, como referido, o mais abundante na natureza e o mais ativo é o  $\alpha$ -tocoferol, sendo o acetato de  $\alpha$ -tocoferol o produto sintético mais utilizado em formulações cosméticas.

A vitamina E é usada de duas formas na cosmetologia: esterificada e não-esterificada. A forma presente na natureza (por exemplo no óleo de gérmen de trigo e outros óleos vegetais) e mais ativa é a forma não-esterificada. Esta substância é bastante instável, ou seja, oxida-se e escurece quando exposta à luz e ao ar, como já foi referido anteriormente. Por esta razão, costuma-se fazer uma reação química do tocoferol com o ácido acético, a fim de formar o éster acetato de tocoferol, que apresenta maior estabilidade em formulações cosméticas (Thiele *et al.*, 2005).

A vitamina E atua como antioxidante protegendo e regenerando as camadas da pele. A sua principal ação está na capacidade de impedir a oxidação dos lípidos insaturados presentes na pele, retardando assim o processo de envelhecimento. Vale a pena destacar o efeito humectante, a ação benéfica em lesões provocadas pela radiação ultravioleta (UV), a ação protetora contra a fotossensibilidade, a redução da lipoperoxidase e as ações anti-inflamatória e hipoalérgica. Propicia ainda a regeneração cutânea, previne a formação de rugas e manchas senis, mantendo a pele esticada e elástica (Perfumes, 2006).

É ainda de salientar a importância da associação da vitamina E com a vitamina C. A radiação UV deixa como sequelas a formação de radicais livres que são neutralizados pela vitamina E, sendo seguidamente regenerados pela ação da vitamina C (Perfumes, 2006).

Segundo Bouchemal *et al.* (2004), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) é largamente utilizado como antioxidante em muitos cosméticos, mas apresenta uma rápida degradabilidade, devido à sua sensibilidade à luz, ao calor e ao oxigénio. Por este motivo, diferentes investigadores têm sugerido que a utilização de transportadores capazes de encapsular substâncias ativas, tais como nanocápsulas. Estes mecanismos são uma opção atraente para proteger estas moléculas contra a degradação. Este grupo de investigação produziu

nanocápsulas de  $\alpha$ -tocoferol, utilizando o polímero poliuretano e poli (éter-uretano), através de uma nova técnica que engloba a policondensação interfacial combinada com a emulsificação espontânea. Os autores verificaram que o método oferece numerosas vantagens, quando comparado à técnica clássica de policondensação interfacial (Schmaltz *et al.*, 2005). Os autores destacam que uma das vantagens destes sistemas nanométricos está em apresentar uma enorme área superficial, o que torna tais dispositivos convenientes para importantes aplicações cosméticas e farmacêuticas, bem como formulações tópicas de substâncias lipofílicas encapsuladas para uma libertação homogênea (Schmaltz *et al.*, 2005).

Nas preparações cosméticas mais variadas, como creme, gel, gel-creme, loções e até *sprays*, encontram-se princípios ativos como as vitaminas A, E, triceramidas, retinol e beta-caroteno contidos em nanocápsulas, podendo citar-se as nanocápsulas de vitamina E produzidas pela Lancôme<sup>®</sup>, que têm a capacidade de libertar uma quantidade de princípio ativo até 30 vezes maior nas camadas internas da epiderme (Schmaltz *et al.*, 2005).

### **2.1.3.3 Indústria Farmacêutica**

O uso da vitamina E continua a ser uma área de pesquisa na dermatologia. A administração tópica tem a vantagem de os fármacos poderem ser administrados facilmente e de uma forma simples para atingir um efeito sistêmico ou dérmico, numa determinada região mais abrangente ou localizada, conforme o pretendido. No entanto, a taxa de absorção de fármacos aplicados topicamente é geralmente muito mais lenta do que através do trato gastrointestinal, e alcançar níveis terapêuticos de um determinado fármaco é um desafio. Assim, tem sido feito um grande esforço no estudo da libertação tópica do fármaco de forma a aumentar a permeabilidade da pele utilizando várias abordagens, incluindo o uso de surfatantes e de co-solventes (Cevc, 2004; Pausnitz *et al.*, 2004; Constantinides *et al.*, 2006).

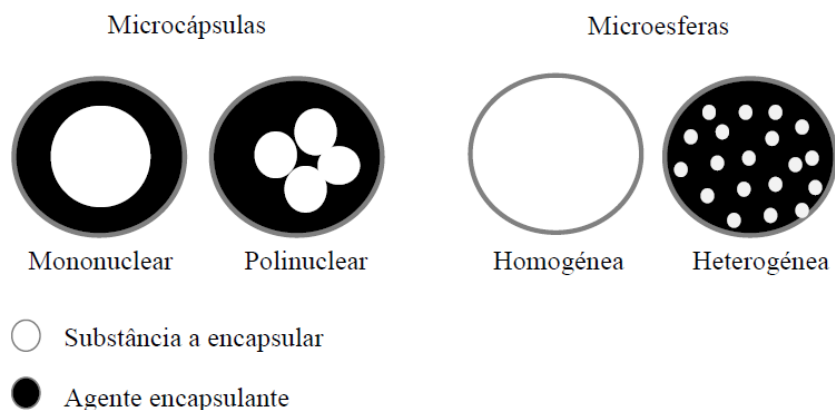
Em aplicações tópicas, a vitamina E tem sido utilizada principalmente como hidratante natural. No entanto, a aplicação tópica de vitamina E tem sido também preconizada com finalidades terapêuticas tais como o tratamento de doenças crônicas da pele, a redução de eritema e edema e a cicatrização de feridas. As formulações de creme de

Diclofenac com vitamina E e cremes que utilizam a mesma ou seus derivados na forma de acetato, linoleato, ou succinato, tem sido documentados, sendo utilizados em hidrocortisona, cetoprofeno, ibuprofeno. A vitamina E foi usada na libertação oftálmica através de administração transdérmica embora estudos nesta área tenham sido limitados (Constantinides *et al.*, 2006).

## 2.2 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver quantidades microscópicas de substâncias ativas, podendo esta apresentar-se no estado sólido, líquido ou gasoso.

As micropartículas são partículas de tamanho variável entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ , de origem biodegradável ou não. Fisicamente caracterizam-se pela sua forma esférica e pelo seu aspeto sólido. As micropartículas têm sido utilizadas para suportar a libertação de vários compostos bioativos, tais como fármacos, vitaminas, ADN, péptidos, aromatizantes, corantes, óleos essenciais, nutrientes e pesticidas (Bansode *et al.*, 2010; Brasileiro, 2011). Relativamente à sua estrutura interna e morfologia, e de acordo com os materiais e métodos envolvidos na sua preparação, as micropartículas podem ser divididas em dois tipos específicos: as microcápsulas e as MIC, como se pode visualizar na Figura 2.2 (Silva *et al.*, 2003; Brasileiro, 2011).



**Figura 2.2:** Estrutura das micropartículas (Brasileiro, 2011).

As microcápsulas são sistemas tipo reservatório, constituídas por um núcleo interno, que contém o composto a encapsular ou princípio ativo, e por uma membrana de revestimento, geralmente de natureza polimérica com uma espessura variável (Suave *et al.*, 2006). Tal como se pode observar na Figura 2.2, as microcápsulas podem ser mononucleares, quando são constituídas por uma partícula simples, ou polinucleares, quando existe um *cluster* de partículas no interior da partícula revestida (Silva *et al.*, 2003).

As MIC são sistemas que apresentam uma estrutura do tipo matricial. Neste tipo de sistema, as substâncias a encapsular podem estar adsorvidas à superfície da partícula ou encapsuladas no seu interior (Azeredo, 2005). As MIC podem ser classificadas em homogêneas ou heterogêneas, quando a substância ativa se encontra dissolvida ou em suspensão (na forma de partículas), tal como está esquematizado na Figura 2.2 (Silva *et al.*, 2003).

### **2.2.1 Agente encapsulante**

No processo de microencapsulação têm sido utilizados um número bastante vasto de agentes encapsulantes, responsáveis pelo revestimento dos compostos bioativos, dando forma à microcápsula (Azeredo, 2005). Os agentes encapsulantes podem apresentar diferentes origens podendo ser naturais, semi-sintéticos ou sintéticos (Anson, 2005), incluindo materiais poliméricos, hidrófilos ou hidrófobos, ou uma associação de ambos (Brasileiro, 2011). Na Tabela 2.2 estão referenciados alguns exemplos de agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.

Um dos principais fatores que influencia a estabilidade do composto encapsulado é o tipo de agente encapsulante utilizado na microencapsulação. A escolha do agente encapsulante deve basear-se em alguns critérios, nomeadamente nas características físicas e químicas do composto bioativo a encapsular (e.g. porosidade, solubilidade), no tipo de aplicação pretendido (e.g. fármaco, aditivo alimentar, fragância, pesticida) e no método de microencapsulação selecionado (Suave *et al.*, 2006).

**Tabela 2.2:** Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo a sua origem. Adaptado de Brasileiro (2011).

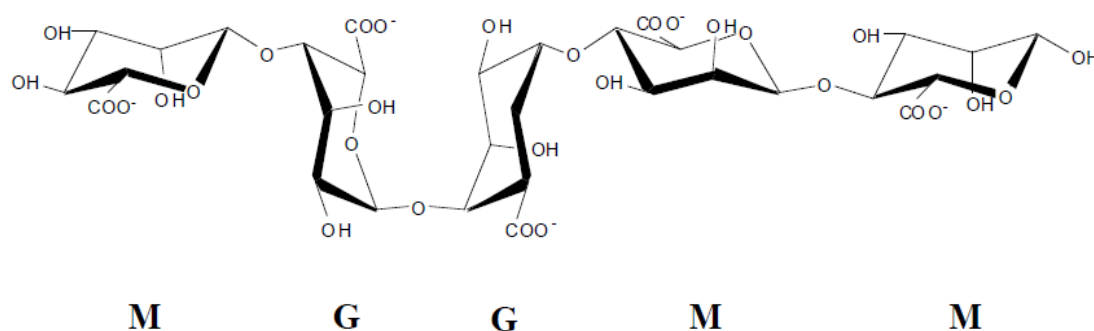
Tipos de agentes encapsulantes	Exemplos
Naturais	Gelatina, agar-agar, alginato de sódio, alginato de cálcio, dextrano quitosano, caseinato, sacarose e cera
Semi-sintéticos	Acetato de celulose, nitrato de celulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, álcool mirístico, gliceril mono ou dipalmitato e triestearato de glicerol
Sintéticos	Polímeros do ácido acrílico e co-polímeros

De acordo com Santos *et al.* (2000) existem algumas características importantes para que o agente encapsulante possa ser considerado ideal. Este deve apresentar: (i) uma baixa viscosidade para concentrações elevadas; (ii) ser fácil de manusear durante o processo de microencapsulação; (iii) apresentar baixa higroscopicidade para impedir a aglomeração facilitando a sua manipulação; (iv) ter uma boa capacidade de incorporar o material a encapsular para impedir a perda deste; (v) proteger o material a encapsular de circunstâncias adversas, como o oxigênio, luz e pH; (vi) não deve ser reativo com o composto a encapsular; (vii) proporcionar propriedades desejadas de libertação do princípio ativo, ser solúvel nos solventes usados; (viii) apresentar sabor agradável, quando administrado por via oral; (ix) ausência de aroma; (x) ser econômico.

A seleção do agente encapsulante mais adequado influencia as propriedades físicas e químicas das micropartículas obtidas. Desta forma este deve ter a capacidade de formar uma película coesa com o material do núcleo. Esta capacidade exige compatibilidade química e física, proporcionando as propriedades desejadas, tais como flexibilidade, resistência, impermeabilidade e estabilidade na preparação (Venkatesan *et al.*, 2009).

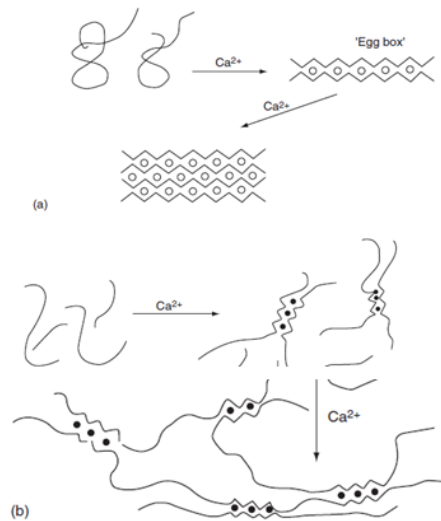
## 2.2.2 Alginato

Os alginatos são geralmente referidos como uma família de copolímeros polianiónicos que se obtêm essencialmente a partir de algas ou bactérias, tendo como fonte mais comum as algas castanhas. Têm como constituição base dois blocos ( $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G) e  $\beta$ -D-ácido manurónico (M)), que se encontram covalentemente ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo 1 $\rightarrow$ 4 (Figura 2.3) (George e Abraham, 2006; Draget e Taylor, 2011; Lee e Mooney, 2012; Goh *et al.*, 2012).



**Figura 2.3:** Estrutura química do alginato (é mostrada uma cadeia do polímero com dois monómeros de ácido gulurónico (G) e três monómeros de ácido manurónico (M), com ligações (1-4). Adaptado de (Bowey, 2009).

A característica mais importante de entre as mencionadas para o alginato é a sua capacidade de ligação seletiva com catiões polivalentes, conduzindo à formação de um gel a partir de uma solução aquosa. Este processo é designado de reticulação iónica. Os catiões polivalentes podem substituir e estabelecer uma ligação preferencial com os locais de ligação dos iões de sódio (quando se utiliza alginato de sódio) nos segmentos poliguluronato, gerando o modelo conhecido por “egg-box” (Draget e Taylor, 2011; Goh *et al.*, 2012). A Figura 2.4 ilustra o processo de formação do gel empregando o ião  $\text{Ca}^{2+}$  como agente reticulante.



**Figura 2.4:** Mecanismo de interação cooperativa entre o íon cálcio e o alginato. (a): Modelo “*egg-box*” – interação cálcio com o bloco ácido galurónico; (b): Associação de cadeias levando à gelificação, induzida pelo envolvimento do cálcio numa caixa de ácido galurónico (Santos R. S., 2012).

Em geral, íons divalentes como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  podem ser utilizados como agentes reticulantes adequados, mas não cátions monovalentes ou  $\text{Mg}^{2+}$ . A quelatação no resíduo-G das moléculas de alginato resulta numa interação iónica entre os grupos do ácido galurónico enquanto as forças de *Van der Waals* entre os segmentos de alginato resultam numa rede de gel tridimensional.

As principais propriedades que tornam o alginato amplamente utilizado em diversas áreas são as seguintes:

- **Biocompatibilidade** – O alginato é amplamente utilizado na indústria alimentar como espessante, emulsionante e como estabilizador. Os alginatos estão incluídos num grupo de compostos que são “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA). Estudos efetuados revelaram tratar-se de um composto biodegradável e não tóxico, provocando uma diminuição da resposta imunitária quando administrado oralmente (George e Abraham, 2006).
- **Biadesividade** – É uma propriedade do alginato que potencia o seu papel enquanto sistema de libertação de substâncias em diversos locais do trato gastroin-

testinal. Esta propriedade deve-se aos grupos carboxilo existentes na parte terminal das suas cadeias moleculares (George e Abraham, 2006).

- **Sensibilidade ao pH** – O comportamento do alginato varia consoante o valor de pH a que está sujeito. A libertação de moléculas a partir de cápsulas de alginato em soluções de pH baixo (como por exemplo o ambiente gástrico) é significativamente reduzida, o que pode ser vantajoso para o desenvolvimento de um sistema de libertação oral. No fluido gástrico, o alginato hidratado é convertido numa “pele” de ácido algínico poroso e insolúvel. Quando este passa para o trato intestinal, onde o pH é mais elevado, a “pele” de ácido algínico é convertida numa camada viscosa solúvel. Estes diferentes comportamentos de pH do alginato permitem a exploração de estudos de perfis de libertação (George e Abraham, 2006).

As propriedades físicas e químicas do alginato propiciam a sua aplicação comercial em diversas áreas, particularmente na indústria alimentar, farmacêutica e outras indústrias. A Tabela 2.3 resume algumas das aplicações do alginato e o seu objetivo funcional pretendido. As aplicações mais recentes incluem a sua utilização como biocatalisador capaz de quelatar metais no tratamento de águas (Goh *et al.*, 2012).

**Tabela 2.3:** Aplicações e funcionalidade do alginato (Goh *et al.*, 2012).

	<b>Aplicação</b>	<b>Função</b>
<b>Indústria Alimentar</b>	Bebidas, gelados, geleias	Estabilizante, espessante
	Produção de etanol	Material de encapsulação
<b>Indústria Farmacêutica</b>	Cultura e transplante de células	Material de encapsulação
	Material de impressão dentária	Molde
	Comprimidos	Agente adesivo, libertação controlada
	Pensos para feridas	Hemostático, absorvente
<b>Outras indústrias</b>	Tecidos	Espessante
	Papel	Agente adesivo
	Tintas	Estabilizante, agente de suspensão
	Pasta dos dentes	Estabilizante, espessante

### 2.2.3 Métodos de microencapsulação

Segundo Vila Jato (1999), o número de métodos de microencapsulação existentes superam as várias centenas. No entanto, a diferença entre estes está no envolvimento ou aprisionamento do material a encapsular pelo agente encapsulante, uma vez que, o produto final é uma suspensão de micropartículas, na qual o seu tamanho é variável.

Idealmente, o método de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e fácil de se transpor à escala industrial (Silva *et al.*, 2003).

A seleção do método de microencapsulação depende de alguns aspetos, tais como, as propriedades físico-químicas, tanto do material a encapsular como o do agente encapsulante (principalmente solubilidade), a aplicação ou finalidade das micropartículas, o

tamanho, textura e forma da micropartícula e o mecanismo de libertação de material a ser encapsulado (Bansode *et al.*, 2010).

As grandes limitações associadas aos métodos de microencapsulação são os custos elevados de todo o processamento, bem como, a falta de disponibilidade de determinados materiais encapsulantes (Suave *et al.*, 2006).

De um modo geral, o processo de microencapsulação corresponde à deposição do agente encapsulante sobre o agente a encapsular, seguindo uma série de etapas. Inicialmente, o agente encapsulante é dissolvido ou fundido, encontrando-se no estado líquido. Por sua vez, o agente a encapsular pode estar presente na forma de partículas pequenas (se for de natureza sólida) ou em gotas (se for de natureza líquida) ou até mesmo na forma de gás. O material a encapsular é colocado num meio apropriado e posteriormente, sobre este deposita-se o agente encapsulante. Por fim, o agente encapsulante sofre solidificação formando-se as micropartículas (Venkatesan *et al.*, 2009).

De acordo com o método de formação/deposição do agente encapsulante, os métodos de encapsulação podem ser divididos em: químicos, físicos ou físico-químicos, tal como listado na Tabela 2.4 (Tiwari *et al.*, 2010).

**Tabela 2.4:** Técnicas de Microencapsulação. Adaptado de (Suave *et al.*, 2006; Ghosh, 2006).

<b>Método</b>	<b>Meio de síntese</b>
<b>Físicos</b>	Extrusão, <i>Spray-drying</i> , <i>Spray-cooling</i> , Liofilização, <i>Multiple nozzle spraying</i> , Pulverização em banho térmico, Co-Cristalização
<b>Químicos</b>	Policondensação, Inclusão molecular, Polimerização interfacial
<b>Físico-químicos</b>	Coacervação ou separação de fases, Emulsificação seguida evaporação do solvente, Pulverização em agente formador de reticulação, Envolvimento lipossômico

## 2.3 Liberação controlada

Um sistema de liberação controlada é concebido para manter os níveis do composto bioativo ou fármaco entre valores máximos e mínimos desejáveis, durante um longo período de tempo com uma única aplicação (Prado *et al.*, 2012).

O perfil de liberação de um composto bioativo é muito importante sendo que o conhecimento deste pode ser crucial para o desenvolvimento de potenciais produtos e aplicações ( Kumari *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012b; Azevedo, 2013). O perfil de liberação é frequentemente determinado aquando da caracterização de micro e nanopartículas, juntamente com outros parâmetros (por exemplo, forma da partícula, tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação) (Azevedo, 2013).

Existem quatro mecanismos que podem ser responsáveis pelo perfil de liberação do composto bioativo a partir de micropartículas: difusão, inchamento da matriz do polímero, erosão e degradação do polímero. Os diferentes mecanismos dependem sobretudo do sistema em causa e das condições envolventes. O perfil de liberação depende de vários parâmetros, tais como o valor de coeficiente de difusão, o tamanho e forma dos compostos bioativos e da polaridade da matriz (Romero-Cano e Vincent, 2002; Azevedo, 2013).

Existem vários fatores que interferem na velocidade de liberação das substâncias encapsuladas, estando estes relacionados com a interação entre o núcleo e o agente encapsulante. Entre estes fatores podem referir-se, por exemplo, a volatilidade do núcleo, a proporção entre a massa de núcleo e de agente encapsulante (Zinutti *et al.*, 1994), a viscosidade e a natureza do agente encapsulante (Gouin, 2004). Em meios aquosos, quando são utilizados agentes encapsulantes hidrossolúveis, ocorre, geralmente, uma liberação do núcleo mais rápida. Contrariamente, quando são empregues agentes encapsulantes hidrófobos, a liberação torna-se mais lenta (Whorton, 1995). O mecanismo de liberação do material encapsulado pode variar também de acordo com o tipo e geometria das partículas desenvolvidas (Brasileiro, 2011).

Uma propriedade determinante na avaliação da viabilidade de um polímero para uma determinada aplicação, em particular a possibilidade de ser utilizado em microencapsu-

lação, é a forma como este se degrada, ou seja, se é ou não biodegradável (definindo-se um polímero biodegradável como aquele que sofre degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de serem metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais) (Coimbra, 2010).

Na literatura têm sido descritos vários mecanismos de libertação do princípio ativo a partir de micropartículas, nomeadamente:

- **Libertação controlada por difusão** – os sistemas de libertação controlada por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas tipo reservatório e sistemas tipo matricial. Nos sistemas de reservatório, o núcleo que está rodeado pela membrana polimérica não biodegradável, difunde-se lentamente através desta. A taxa de difusão e, conseqüentemente, a taxa de libertação dependem das propriedades químicas do núcleo interno e do agente encapsulante, bem como, das propriedades físicas do material encapsulante (e.g. dimensões dos poros). No sistema matricial, o núcleo encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de libertação controlada pela taxa de difusão do núcleo através dessa mesma matriz (Silva *et al.*, 2003; Coimbra, 2010; Brasileiro, 2011);

- **Libertação ativada por solvente** – os sistemas de libertação ativados pelo solvente encontram-se também divididos em dois tipos: sistemas de libertação controlada pela pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água (*swelling*) (Coimbra, 2010; Brasileiro, 2011). Os primeiros consistem em reservatórios de volume constante constituídos por um involucro de uma membrana polimérica semipermeável (permeável ao solvente mas não ao soluto) e com o interior cheio de substância encapsulada no estado sólido e/ou na forma de solução saturada. A pressão osmótica, gerada devido à diferença de concentrações da substância encapsulada no exterior e no interior da membrana semipermeável, leva a um fluxo de fluido (água) do exterior para o interior do dispositivo, forçando desta forma a solução saturada no interior a sair pelo orifício presente na membrana.

Quando a libertação é controlada pela absorção de água, a substância a encapsular encontra-se dispersa ou dissolvida numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma quantidade de água elevada sem se dissolverem. Nestes casos, a taxa de libertação do

princípio ativo é essencialmente controlada pela taxa de absorção de água pela matriz polimérica (Coimbra, 2010; Brasileiro, 2011).

- **Libertação controlada por biodegradação** – quando se utilizam agentes encapsulantes como proteínas ou lípidos, este material pode ser degradado por enzimas proteases e lipases, respetivamente, originando libertação dos princípios ativos encapsulados (Depypere *et al.*, 2003; (Silva *et al.*, 2003; Brasileiro, 2011);
- **Libertação controlada por alterações de pH** – baseia-se em alterações da solubilidade do material encapsulante quando este está na presença de meios com diferentes valores de pH (Reineccius, 1995; Silva *et al.*, 2003; Brasileiro, 2011);
- **Libertação ativada por variação de temperatura** – este mecanismo de libertação consiste provocar alterações da temperatura, com consequente modificação do estado físico do material encapsulante e consequentemente da velocidade de libertação. Existem duas conceções diferentes para este tipo de libertação, a libertação sensível à temperatura, que está relacionada com o material que se colapsa ou expande quando atinge uma temperatura crítica e a libertação ativada por fusão, que diz respeito à fusão do material encapsulante por aumento da temperatura (Depypere *et al.*, 2003; (Silva *et al.*, 2003; Brasileiro, 2011).

## 2.4 Metodologias analíticas para a determinação de Vitamina E

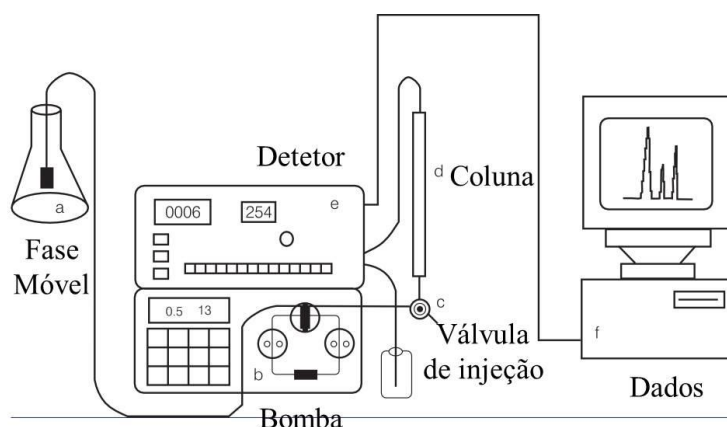
Existem várias metodologias descritas para a avaliação de vitamina E, em particular em alimentos, dependendo muito da especificidade da amostra. Não existe portanto um único método aplicável a todos os tipos de matrizes. Geralmente, as metodologias envolvem a extração da fração lipídica que contém os tocoferóis, removendo as substâncias interferentes para posteriormente proceder à determinação dos tocoferóis (Deutsch, 1995; Amin, 2001). De referir que este processo de extração pode conduzir a grandes diferenças nos resultados obtidos (Xu, 2008).

Em 1938 foi reportado, a determinação de  $\alpha$ -tocoferol por titulação potenciométrica, utilizando as propriedades redutoras do mesmo (Ermmerie e Engel, 1938). Posteriormente, em 1964, foi descrito um método para determinar tocoferóis totais baseado no

uso de tripiridiltriazina como reagente cromogénico para a determinação de vitamina E (Martinek, 1964).

Diversas técnicas têm sido aplicadas para a separação, purificação e quantificação de tocoferóis e tocotrienóis nas mais variadas matrizes orgânicas e podem ser utilizadas de acordo com os objetivos da análise e da natureza da amostra. Entre as técnicas mais frequentemente empregues para a determinação de Vitamina E podem-se citar as colorimétricas, cromatografia em camada fina (CCF), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a eletroforese capilar.

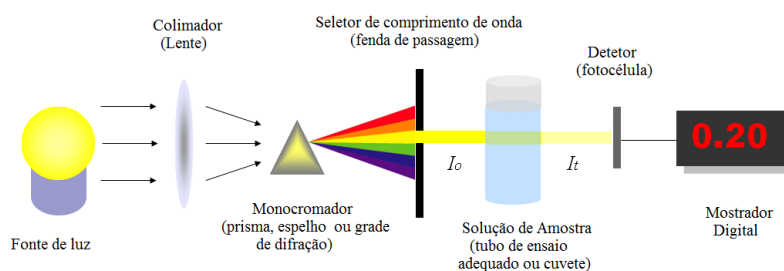
A técnica de HPLC permite realizar a separação de compostos e a determinação individual de tocoferóis e tocotrienóis, sendo frequentemente aplicada na análise de óleos vegetais, alimentos “*in natura*” e que se encontram em prateleira para consumo imediato. A grande variedade de combinações entre as fases móveis e estacionárias torna-a numa técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Nascimento, 2005). Na preparação da amostra, alguns autores referem a realização de uma reação de saponificação na presença de um antioxidante e exclusão da luz, a qual permite a recuperação quantitativa de  $\alpha$ -tocoferol podendo contudo conduzir a perdas de tocotrienóis (Brubacher *et al.*, 1985; Nollet, 2000; Jensen e Lauridsen, 2007). Desde que foi utilizada para a análise de antioxidantes lipídicos, a técnica de HPLC acoplado a diferentes tipos de detetor tem sido extensivamente aplicada, sendo preferida pela grande maioria dos investigadores da área. A Figura 2.5 mostra os componentes fundamentais de um equipamento para HPLC.



**Figura 2.5:** Esquema básico de um equipamento para HPLC. Adaptado de (Degani *et al.*, 1998).

Outra técnica bastante utilizada para a quantificação da vitamina E é a espectroscopia de absorção na região ultravioleta/visível (UV-vis) (Farias *et al.*, 2007; Somchue *et al.*, 2009). Esta é uma técnica de baixo custo, de fácil manuseamento e apresenta boa sensibilidade. Baseia-se na energia de excitação.

Um espectrofotômetro funciona basicamente como o esquema representado na Figura 2.6. A faixa de trabalho no UV é entre os 200 e 400 nm enquanto a faixa de trabalho do visível é entre os 400 e 760 nm.



**Figura 2.6:** Modo de funcionamento do UV-vis. Adaptado de (Vo, 2014).

Na literatura o  $\alpha$ -tocoferol é determinado muitas vezes por UV-vis escolhendo-se habitualmente um comprimento de onda entre 285 e 298 nm.



---

## **Capítulo 3**

### Materiais e Métodos

---



## 3.1 Materiais

### 3.1.1 Materiais utilizados no processo de microencapsulação

O cloreto de cálcio di-hidratado foi adquirido na Panreac Quimica SAV, o alginato de sódio na Fluka Chemie, o emulsionante Tween 20 na Fagron Iberica e o D-L- $\alpha$ -tocoferol (97,7% de pureza) na Alfa Aesar GmbH & KG.

### 3.1.2 Materiais usados para avaliação da eficiência de encapsulação (E.E.)

Para a avaliação da E.E. utilizou-se *n*-hexano 99% obtido na Carlo Erba Reagents e PBS (*Phosphate buffer saline*), sendo que para a preparação desta solução tampão foi utilizado cloreto de sódio e di-hidrogeno fosfato de potássio da Panreac Quimica SAV e hidrogeno fosfato di-sódico anidro da Panreac.

### 3.1.3 Materiais utilizados na determinação de perfis de libertação do $\alpha$ -tocoferol

A obtenção dos perfis de libertação do  $\alpha$ -tocoferol requereu a utilização de PBS e da solução de suco gástrico artificial. Para a preparação desta última solução utilizou-se cloreto de sódio da Panreac Quimica SAV e ácido clorídrico 1M obtido da Panreac.

Preparação PBS – pesar 0,595 g de fosfato de sódio bifásico, 0,0475 g de fosfato de potássio monobásico e 2,0 g de cloreto de sódio. Adicionar 250 mL de água destilada e agitar até que a dissolução seja completa. Medir e registrar o pH da solução final (pH=7,4).

Preparação suco gástrico artificial – pesar 2,0 g de cloreto de sódio, adicionar 80 mL de ácido clorídrico de 1 M e completar com água destilada até perfazer 1 L. Medir e registrar o pH da solução final (pH=1,2).

### 3.1.4 Materiais utilizados na incorporação das MIC num sumo de laranja

Os reagentes utilizados nesta etapa foram *n*-hexano e acetonitrilo obtidos na Carlo Erba Reagents e metanol adquirido na Fisher-Chemical, sendo a pureza do acetonitrilo e do metanol adequada para HPLC.

## 3.2 Métodos

Nesta secção são descritos os métodos utilizados para a realização deste trabalho. Para cada método é somente descrito o processo otimizado, os ensaios e processos utilizados até se chegar ao processo otimizado estão descritos no subcapítulo 4.2.1 - Desenvolvimento das metodologias adotadas para a caracterização das MIC.

### 3.2.1 Processo de Microencapsulação do $\alpha$ -tocoferol

Para o processo de microencapsulação utilizou-se uma metodologia previamente desenvolvida no LSRE-IPB (Ribeiro e Vieira, 2012). A preparação das MIC compreendeu a preparação de uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) utilizando o princípio ativo, o  $\alpha$ -tocoferol, e uma solução aquosa de alginato de cálcio (material da matriz).

O sistema químico de base é constituído pelos seguintes componentes:

- Material da microesfera: alginato (solução a 3% (m/v));
- Princípio ativo:  $\alpha$ -tocoferol;
- Emulsionante: Tween 20 (2% (v/v));
- Solução de coagulação:  $\text{CaCl}_2$  (4% (m/v)).

O volume da solução de coagulação utilizado foi de 250 mL e o tempo de coagulação de 20 h. A pressão e o caudal de atomização foram fixados em 0,1 bar e 0,3 mL/min, respetivamente. A seringa foi carregada com a emulsão preparada anteriormente, na sua capacidade máxima ( $\approx 20$  mL), tendo sido contabilizados os volumes de emulsão realmente atomizados (isto é descontaram-se os volumes mortos e outras perdas). O processo de lavagem/recuperação das MIC foi efetuado de uma forma sequencial, sendo cons-

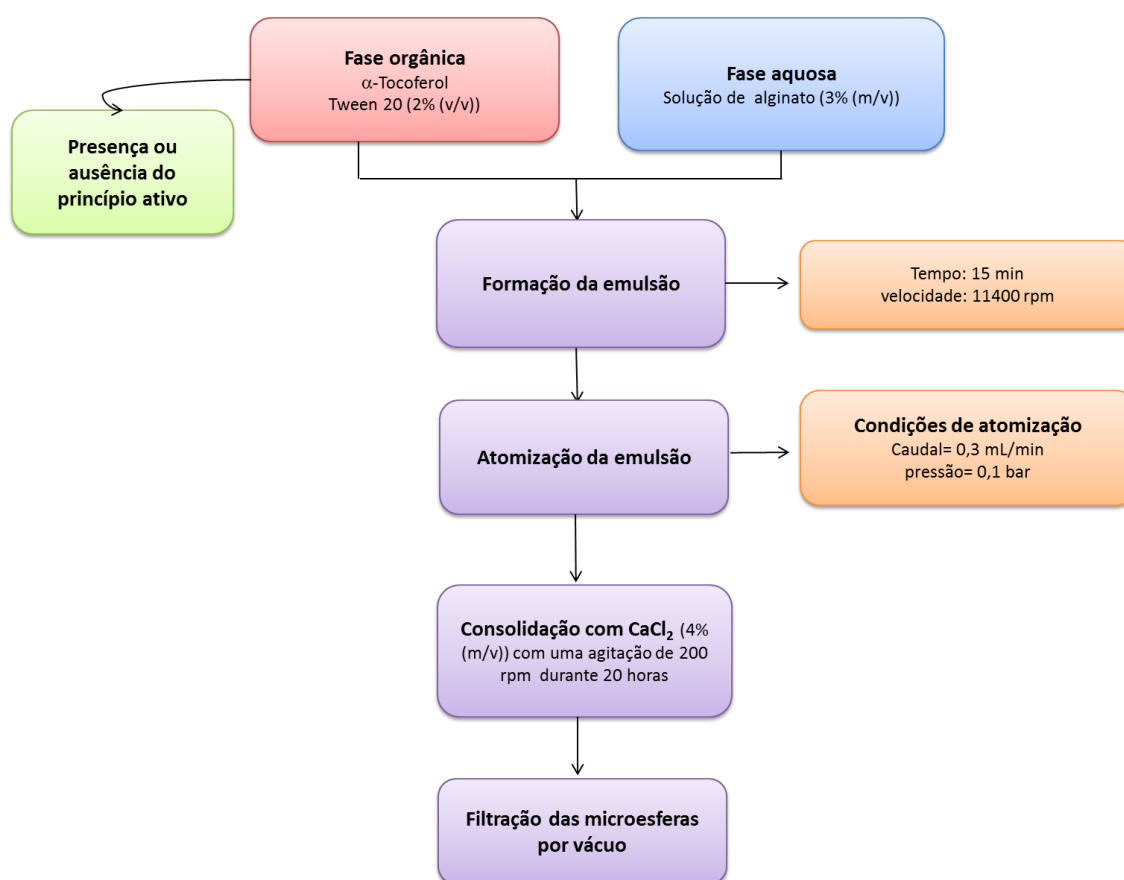
tituído pelas seguintes etapas: (i) recuperação das MIC por filtração sob vácuo; (ii) lavagem com água destilada seguido de recuperação das MIC por filtração.

Particularizando o procedimento experimental:

- Preparação da solução de alginato:
  - i. Para a preparação da solução de alginato utiliza-se alginato e água destilada. A concentração da solução de alginato é de 3% (m/v).
  - ii. A solução é colocada numa placa de agitação com aquecimento para ser homogeneizada a 55°C durante uma noite.
- Preparação da emulsão O/A:
  - i. Mede-se 10 mL de solução de alginato e coloca-se dentro de um tubo de Falcon, adiciona-se o princípio ativo (0,2 g) e o emulsionante (0,25 mL de uma solução a 2% (v/v)). Completa-se o tubo adicionando mais 20 mL da solução de alginato.
  - ii. O conteúdo do tubo é agitado no homogeneizador Cat Unidrive X 1000 durante 15 minutos a uma velocidade de 11000 rpm.
  - iii. O tamanho das gotículas formadas na emulsão foi controlado por microscopia ótica (MO) (sistema Nikon eclipse 50i equipado com uma câmara Nikon Visão Digital e o *software* NIS Elements para a aquisição de dados) de 5 em 5 minutos para confirmar o tempo final necessário para obter o tamanho desejado.
- Atomização da emulsão O/A:
  - i. Carregar a seringa com o volume máximo de emulsão possível, evitando desperdícios da emulsão preparada.
  - ii. Fixar o caudal de alimentação e a pressão do gás ao bico atomizador.
  - iii. Dispensar o máximo de volume possível de emulsão para o banho de coagulação.
  - iv. Estimar as perdas de emulsão para calcular o volume efetivamente atomizado.
- Consolidação das MIC e processo de separação/lavagem:

- i. Consolidar as MIC em 250 mL de solução de coagulação  $\text{CaCl}_2$  durante 20 horas.
- ii. As MIC obtidas são submetidas a uma etapa de filtração por vácuo e uma lavagem com 50 mL com água destilada cada. No final destas etapas, as MIC são recolhidas e armazenadas húmidas.

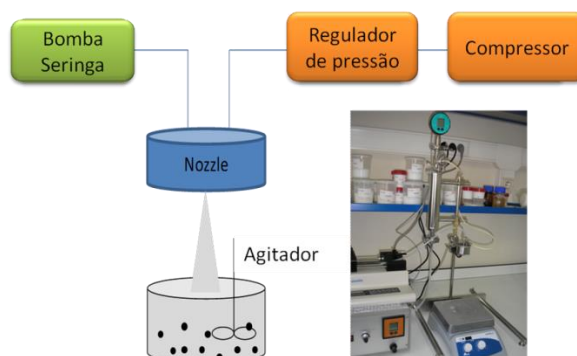
Na Figura 3.1 encontra-se representado o processo de síntese das MIC mostrando as 3 etapas principais: (i) formação da emulsão O/A; (ii) atomização da emulsão; (iii) consolidação das MIC atomizadas.



**Figura 3.1:** Processo otimizado para a produção de MIC de alginato.

Neste trabalho foi utilizado o sistema NISCO Var J30 que é composto por um controlador de pressão ligado a uma fonte de gás (azoto) e bomba de seringa para controlo do caudal da solução do material encapsulante contendo o princípio ativo. Esta solução é alimentada ao bico atomizador (*nozzle*) onde ocorre a formação do *spray*. As micro-

partículas são consolidadas logo após a sua formação por contato com a solução de agente de coagulação. A Figura 3.2 ilustra de uma forma esquemática o sistema NISCO Var J30.



**Figura 3.2:** Representação esquemática e fotografia do sistema NISCO Var J30 (Fernandes *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Caracterização das MIC

As MIC produzidas contendo o  $\alpha$ -tocoferol foram caracterizadas utilizando as metodologias descritas nos pontos seguintes.

#### 3.2.2.1 Microscopia ótica e eletrônica (MO e SEM)

As MIC foram analisadas através de microscopia ótica (MO) com recurso a um microscópio de marca Nikon eclipse 50i equipado com uma câmara Nikon Visão Digital e o *software* NIS Elements para a aquisição de dados. Foram adquiridas imagens com a ampliação total de 40, 100 e 400x. Para monitorizar o processo de produção foram registadas imagens a cada 5 minutos num total de 15 minutos, do processo da preparação da emulsão, imediatamente após a finalização da atomização e após a etapa de coagulação. Adicionalmente avaliou-se de forma qualitativa a consolidação das MIC: numa fase inicial (não consolidadas) apresentavam um aspeto de gel fino deformando-se facilmente; numa fase final (consolidadas) apresentavam uma forma regular e não se deformavam.

As MIC finais foram analisadas também por SEM utilizando o equipamento Phenom G2 Pro microscope (Phenom-World, Eindhoven, The Netherlands) existente no LSRE-FEUP.

### **3.2.2.2 Resíduo seco**

O resíduo seco foi determinado como a razão entre a massa de MIC secas e a massa de MIC húmidas e expressa em termos de percentagem. Foram adotadas duas metodologias: (i) consistiu em calcular o resíduo seco através da liofilização das MIC em que foram pesadas ainda no estado húmido e depois liofilizadas, e (ii) consistiu em secar numa estufa a 40 °C durante 3 horas seguida de pesagem até se obter um valor de massa constante.

### **3.2.2.3 Capacidade de reidratação**

A capacidade de reidratação das MIC liofilizadas foi efetuada colocando aproximadamente 20 mg em 1 mL de água destilada. Seguidamente acondicionou-se a amostra num local ao abrigo da luz durante 48 horas. Decorrido este período, procedeu-se à observação das MIC por microscopia ótica para avaliar a recuperação do volume e forma às 24 horas e às 48 horas.

### **3.2.2.4 Armazenamento**

O armazenamento foi feito de duas formas distintas: MIC húmidas e secas. No último caso foi feita a secagem em estufa (40 °C) e por liofilização.

## **3.2.3 Eficiência de Encapsulação (E.E.)**

### **3.2.3.1 Método direto**

Com esta metodologia pretendeu-se avaliar a quantidade encapsulada por destruição das MIC recorrendo à utilização de um tampão de fosfato conforme descrito em trabalhos anteriores (Ribeiro *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Tabandeh e Mortazavi, 2013). Deste modo, pesaram-se 750 mg de MIC húmidas (com e sem princípio ativo), ou o correspondente à mesma massa teórica de princípio ativo no caso das MIC liofilizadas, para dois gobelés devidamente identificados, adicionou-se 50 mL de solução de PBS a cada um dos gobelés colocando-os numa placa de agitação a 100 rpm durante 1 hora.

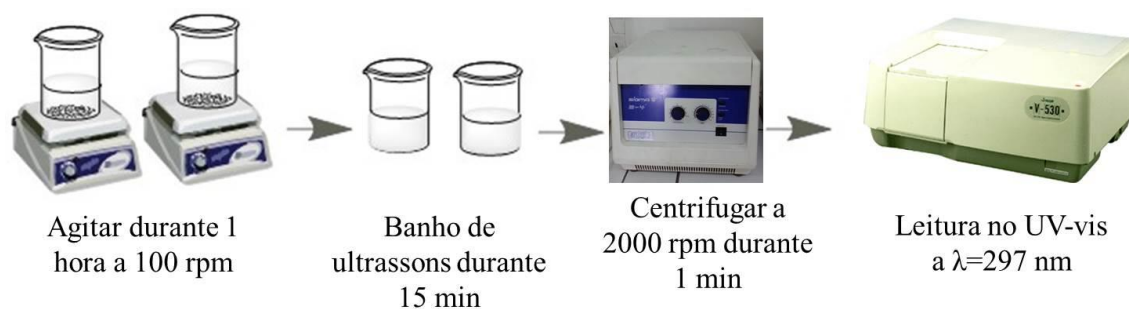
Seguidamente colocaram-se no banho ultrassons Bandelin Sonorex RK 52 durante 15 minutos, seguindo-se um período de 1 hora de agitação em placa após o que foram novamente colocados no banho ultrassons por mais 15 minutos. Por último, as amostras foram deixadas sob agitação até perfazer um total de 24h ou 48h. Após o período de agitação, foram retirados de cada gobelé 5 mL do sobrenadante da solução para tubos de Falcon e procedeu-se à sua centrifugação durante 1 minuto a 2000 rpm. Por último a quantidade de vitamina E livre no sobrenadante foi quantificada por UV-vis a 297 nm, tendo-se utilizado um espectrofótopmetro Jasco V-530.

A E.E. foi calculada de acordo com a equação 3.1:

$$E.E. (\%) = \frac{M_{p.a.e.}}{M_{p.a.t.}} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde  $M_{p.a.e.}$  é a massa de princípio ativo encapsulado (determinada experimentalmente por espectrofotometria UV-vis (Espectrofótopmetro Jasco V-530,  $\lambda=297$  nm)) e  $M_{p.a.t.}$  a teórica calculada com base na formulação utilizada.

Na Figura 3.3 apresenta-se um esquema das principais etapas do processo utilizado para a determinação da E.E. pelo método direto.



**Figura 3.3:**Esquema do método direto para a obtenção da E.E.

### 3.2.3.2 Método indireto

Neste método, a avaliação da E.E. foi determinada por quantificação do princípio ativo não encapsulado. O valor da E.E. foi determinado através da razão entre a massa do princípio ativo encapsulado e a massa de princípio ativo teórico ( $M_{p.a.t.}$ ), sendo a massa de princípio ativo encapsulado determinada pela diferença entre  $M_{p.a.t.}$  e a massa de princípio ativo não encapsulado ( $M_{p.a.ne.}$ ). A  $M_{p.a.ne.}$  foi quantificada por espectrofotometria UV-vis (Espectrofotómetro Jasco V-530,  $\lambda=297$  nm) na solução de coagulação juntamente com a solução de lavagem ( $\approx 50$  mL). A E.E. foi calculada de acordo com a equação 3.2:

$$E. E. (\%) = \frac{M_{p.a.t.} - M_{p.a.ne.}}{M_{p.a.t.}} \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.2.4 Obtenção dos perfis de libertação de $\alpha$ -tocoferol

Esta etapa teve como objetivo avaliar o perfil de libertação do  $\alpha$ -tocoferol incorporado nas MIC tendo-se selecionado para o meio de teste uma solução tampão de PBS com pH 7,4, uma solução de suco gástrico artificial com pH 1,2 e a combinação sequencial das duas soluções, tendo como objetivo simular as condições gastrointestinais.

Os testes realizados tiveram a seguinte programação para a recolha das amostras, para o caso do perfil de libertação a pH ácido ou a pH básico: nas primeiras 8 horas de 1 em 1 hora e depois às 24 horas. Para o caso da combinação sequencial dos dois pH, nas primeiras 8 horas de 30 em 30 minutos e por último às 24 horas. O procedimento adotado é descrito de seguida:

1. Pesar aproximadamente 750 mg de MIC com e sem princípio ativo;
2. Introduzir as MIC em dois frascos devidamente identificados;
3. Adicionar 50 mL de solução tampão PBS/ ou solução de suco gástrico artificial em cada um dos frascos.
4. Colocar os frascos na placa de agitação a 100 rpm;
5. Para os tempos de amostragem programados, desligar a agitação 5 minutos antes para que ocorra a deposição de MIC no fundo do gobelé e proceder recolher 5 mL da solução sobrenadante de PBS dos frascos para um tubo de Falcon de 15

mL. Centrifugar o tubo de falcon durante 1 minuto a 2000 rpm. Medir no espectrofotómetro UV-vis ( $\lambda=297$  nm) a absorvância da solução;

6. Repor a solução de sobrenadante retirada e repetir todo o procedimento para os tempos programados até à finalização do estudo de libertação.

Nota: Para o caso dos estudos de pH combinado, a experiência iniciou em meio de PBS (pH 7,4) tendo-se substituído o meio de contacto por solução de suco gástrico artificial (pH 1,2) ao fim de 2 horas de ensaio. Na transição, a solução foi centrifugada e todo o sobrenadante retirado e substituído pela nova solução.

Com base nos dados obtidos foi construído o perfil de libertação (% de  $\alpha$ -tocoferol libertado em função do tempo). Todos os testes foram realizados em duplicado.

Para a quantificação do  $\alpha$ -tocoferol por UV-VIS nas amostras recolhidas de acordo com o planeamento anterior adotou-se o seguinte procedimento:

1. Definir o comprimento de onda para 297 nm;
2. Preparar as amostras, procedendo à sua diluição se necessário (o valor da leitura deve estar dentro da gama de concentrações utilizada para a calibração);
3. Lavar a cuvete com a solução PBS ou a solução do suco gástrico artificial (conforme a amostra a analisar);
4. Fazer a leitura do branco (o branco corresponde ao ensaio de libertação realizado com as MIC produzidas sem o  $\alpha$ -tocoferol, preparadas seguindo o procedimento adotado);
5. Lavar a cuvete com a solução PBS ou a solução do suco gástrico artificial (conforme a amostra a analisar);
6. Fazer a leitura da amostra e anotar o valor da absorção;
7. Com base na curva de calibração e diluição utilizada calcular a massa de  $\alpha$ -tocoferol libertada e a correspondente % relativamente ao valor teórico.

Nota: A curva de calibração foi construída com 9 soluções padrão, com concentrações entre 0,42 mg/mL e 3,75  $\mu$ g/mL.

### 3.2.5 Estudo de incorporação das MIC contendo $\alpha$ -tocoferol numa matriz alimentar (sumo de laranja)

A incorporação das MIC contendo o  $\alpha$ -tocoferol foi testada utilizando como matriz alimentar um sumo de laranja comercial. Nesta etapa avaliou-se a percentagem de  $\alpha$ -tocoferol libertado para a matriz, relativamente a um controlo (sumo de laranja contendo MIC sem princípio ativo). O sumo de laranja selecionado correspondeu a um refrigerante (Fresky) sem a adição de  $\alpha$ -tocoferol, tal como descrito no rótulo.

De forma a garantir a homogeneidade da amostra foram colocados 150 mL do sumo num gobelé. Este volume foi dividido em três porções idênticas de 50 mL destinadas a: (A) incorporar as MIC sem princípio ativo (1 amostra – branco); (B) incorporar as MIC contendo  $\alpha$ -tocoferol (2 amostras – para análise em condições de armazenamento distintas). As amostras de sumo foram suplementadas com uma massa de MIC húmidas de aproximadamente 54 mg, tendo por base informação descrita na literatura sobre o teor recomendado de tocoferol em sumos (Marsanasco *et al.*, 2011; Economos *et al.*, 2013). As amostras foram armazenadas da seguinte forma: a 23 °C (temperatura ambiente) e protegidas da luz (branco e uma das amostras contendo as MIC com tocoferol) e a 44 °C (estufa Binder FD115) e protegidas da luz (uma das amostras contendo as MIC com tocoferol).

A quantificação do  $\alpha$ -tocoferol no sumo realizou-se por HPLC, tendo-se utilizado um cromatógrafo Varian equipado com um injetor manual Rheodyne provido com um *loop* de 20  $\mu$ L, uma bomba Varian Prostar 240, um detetor UV Varian Model 310 ( $\lambda=297$ nm) e uma coluna de fase reversa C18 Nucleosil 100-5. O eluente utilizado foi uma solução acetonitrilo/metanol (95:5, v/v), a um caudal de 0,8 mL/min. O eluente foi previamente filtrado e desgaseificado tendo-se utilizado um sistema de filtração com filtro de 0,2  $\mu$ m acoplado a uma bomba de vácuo.

A identificação do  $\alpha$ -tocoferol realizou-se por comparação com o tempo de retenção obtido por injeção de uma solução padrão nas mesmas condições de análise. Os dados foram recolhidos, registados e tratados através do *software* STAR 5.3.

Para efetuar a curva de calibração foram utilizadas 5 soluções padrão, com concentrações entre 0,45 mg/mL e 1,875  $\mu$ g/mL.

A análise por HPLC foi precedida por uma extração do  $\alpha$ -tocoferol a partir da matriz alimentar (extração líquido-líquido com hexano). Para tal, retiraram-se 5 mL da amostra a analisar para um frasco de 10 mL, adicionou-se 1 mL de *n*-hexano e agitou-se vigorosamente durante 1 minuto no vórtex. Seguidamente centrifugou-se a amostra durante 1 minuto a 4000 rpm para separação das fases retirando-se 500  $\mu$ L da fase superior. Após secagem desta amostra em corrente de azoto, adicionou-se 1mL de acetonitrilo, filtrou-se com um filtro 0,45  $\mu$ m e procedeu-se à análise por HPLC.

Esta análise foi realizada para todas as amostras preparadas. Adicionalmente estudou-se o efeito da submissão da amostra a ultrassons e após alcalinização do meio (com NaOH 1M até mudança do pH da solução para pH=7,2). Neste último caso pretendeu-se simular a ingestão do sumo e a correspondente passagem pelo intestino.



---

## **Capítulo 4**

### Resultados e Discussão

---



## **4.1 Microencapsulação do $\alpha$ -tocoferol e caracterização das microesferas obtidas (resíduo seco, morfologia e capacidade de reidratação)**

Neste trabalho procedeu-se à microencapsulação de vitamina E tendo-se selecionado como material encapsulante o alginato dado as suas propriedades gelificantes, sensibilidade ao pH e aplicabilidade na área alimentar. De realçar que, pelas suas características face a diferentes valores de pH, trata-se de um polímero que potencia a libertação do princípio ativo no trato intestinal.

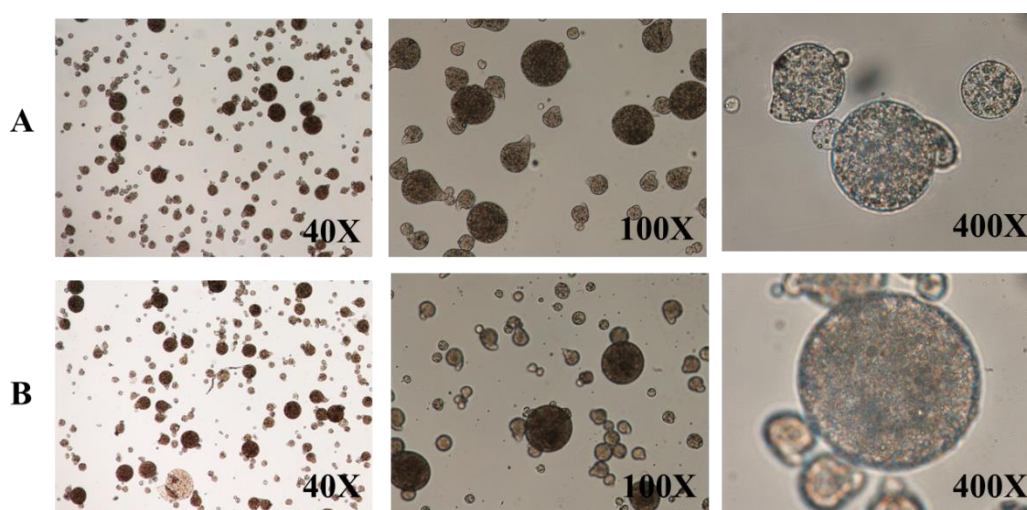
O processo de microencapsulação adotado para este trabalho foi desenvolvido anteriormente, no âmbito do trabalho da disciplina de projeto da licenciatura em Engenharia Biomédica (Ribeiro e Vieira, 2012). No total foram realizados 13 ensaios de produção de MIC, 8 ensaios com a produção de MIC com  $\alpha$ -tocoferol e 5 de MIC sem  $\alpha$ -tocoferol. A Tabela 4.1 apresenta um resumo dos ensaios de microencapsulação realizados tendo-se controlado o volume atomizado de emulsão e a quantidade de MIC produzidas. A designação de Alg diz respeito à produção de MIC vazias (sem princípio ativo) e a de Toc à produção de MIC contendo  $\alpha$ -tocoferol. O registo completo destas experiências encontra-se no ANEXO A.

**Tabela 4.1:** Ensaios realizados de microencapsulação do  $\alpha$ -tocoferol.

Ensaio	Volume atomizado (mL)	Massa de MIC húmidas (g)	Resíduo seco (%)	Estimativa da Massa de MIC secas (g)
Toc_001	n.a.	2,06	12	0,25 <sup>(1)</sup>
Toc_002	26	6,44	8	0,52 <sup>(1)</sup>
Toc_003	25	7,67	n.a.	n.a.
Alg_004	9	1,87	n.a.	n.a.
Toc_005	18	5,39	n.a.	n.a.
Alg_006	23	6,79	n.a.	n.a.
Toc_007	24	7,71	n.a.	n.a.
Alg_008	20	5,82	n.a.	n.a.
Toc_009	20	6,16	n.a.	n.a.
Alg_010	20+20	13,99	10	1,32 <sup>(2)</sup>
Toc_011	20+20	10,63	7	0,70 <sup>(2)</sup>
Alg_012	20+20	10,42	10	1,06 <sup>(2)</sup>
Toc_013	20+20	10,09	12	1,23 <sup>(2)</sup>

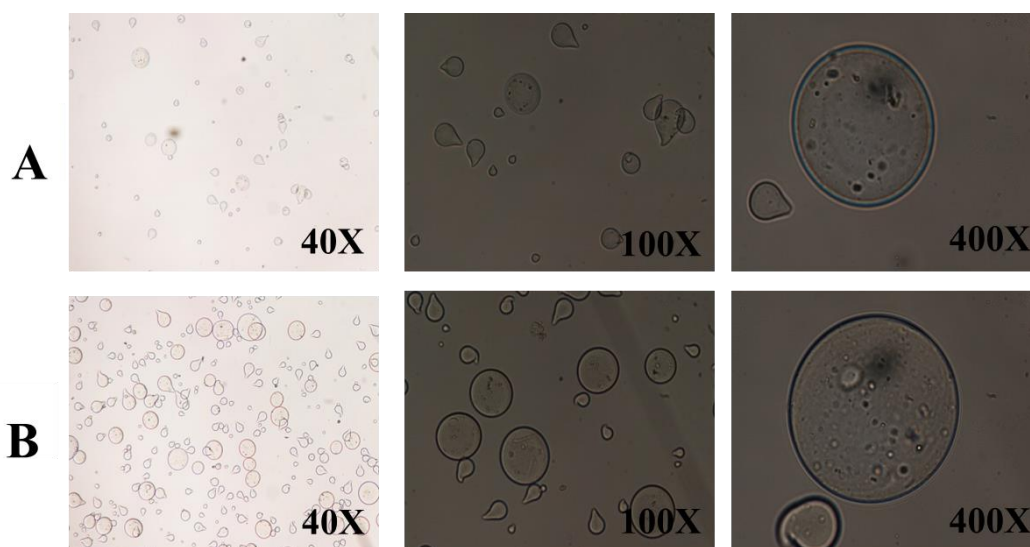
(1) Processo de secagem – na estufa a 40°C; (2) Processo de secagem – liofilização; n.a. – não aplicável

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram a análise por MO das MIC obtidas após atomização e após decorrido o período de coagulação relativas aos ensaios Toc\_002 (contendo  $\alpha$ -tocoferol) e Alg\_006 (MIC sem princípio ativo), respetivamente.



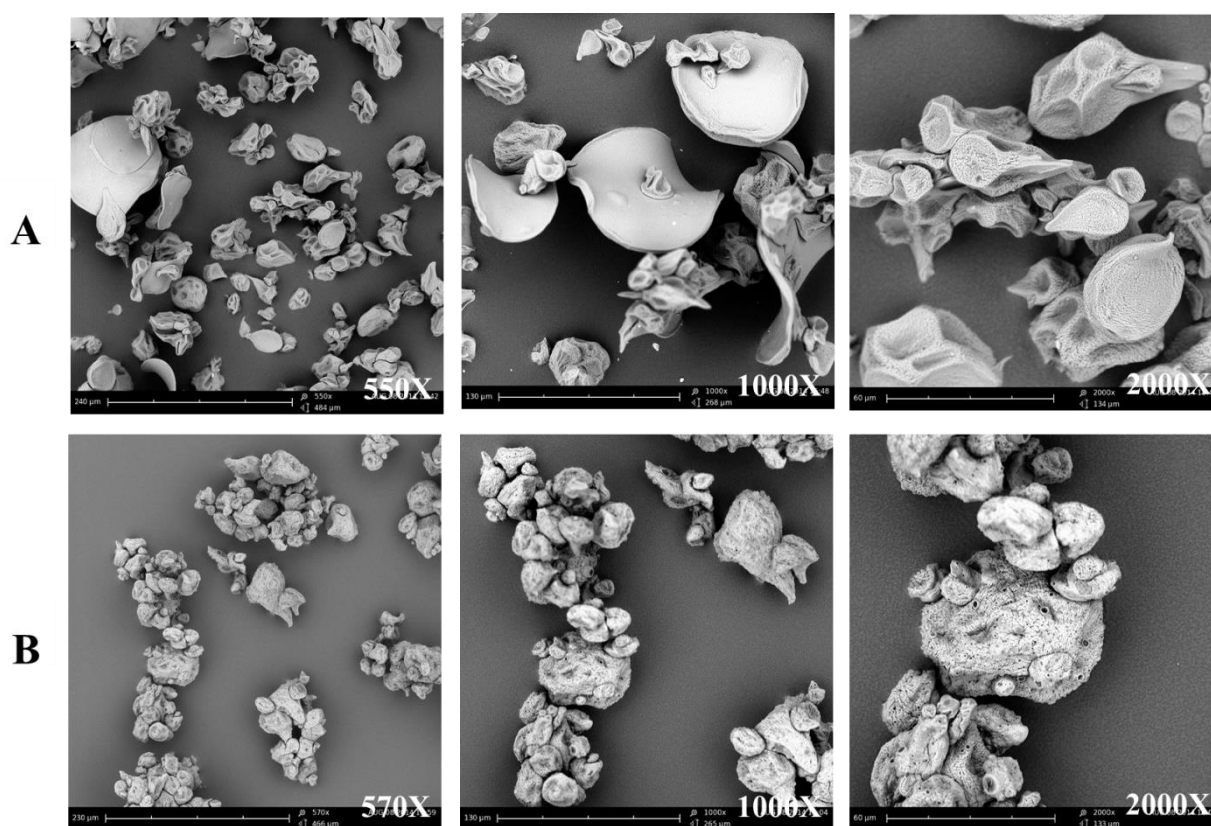
**Figura 4.1:** Evolução da morfologia das MIC com princípio ativo (Ensaio Toc\_002) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 20 h de consolidação (B).

Após atomização, um número considerável das MIC produzidas apresentavam uma ligeira deformação (forma semelhante a uma pera). Após o período de consolidação o número de MIC com morfologia esférica aumentou, comprovando que houve uma boa consolidação. A Figura 4.1 permite ainda observar que o  $\alpha$ -tocoferol ficou distribuído de forma homogênea nas MIC produzidas, verificando-se a ausência de perdas de óleo (que seriam visíveis pela presença de pequenas gotículas do mesmo, observáveis por MO).



**Figura 4.2:** Evolução da morfologia das MIC sem princípio ativo (Ensaio Alg\_006) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 20 h de consolidação (B).

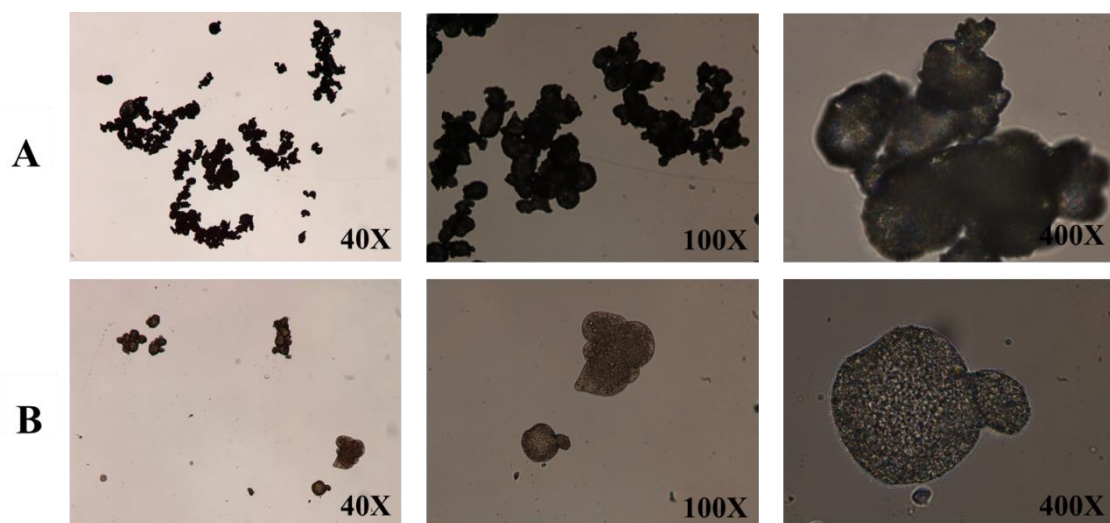
Apresentam-se na Figura 4.3 as imagens de SEM obtidas para o ensaio Alg\_012 e Toc\_013. Morfologicamente pode observar-se que o  $\alpha$ -tocoferol foi realmente encapsulado, através da comparação da morfologia das MIC com e sem princípio ativo. Visivelmente verifica-se que dos ensaios resultaram MIC de distintos tamanhos, é ainda de constatar que na Figura 4.3-A como se tratam de MIC vazias, a sua estrutura é mais enrugada adquirindo a forma de “batata frita”. Na Figura 4.3-B as MIC têm um aspeto mais compacto observando-se na sua superfície pequenos poros resultantes da perda de pequenas quantidades de  $\alpha$ -tocoferol.



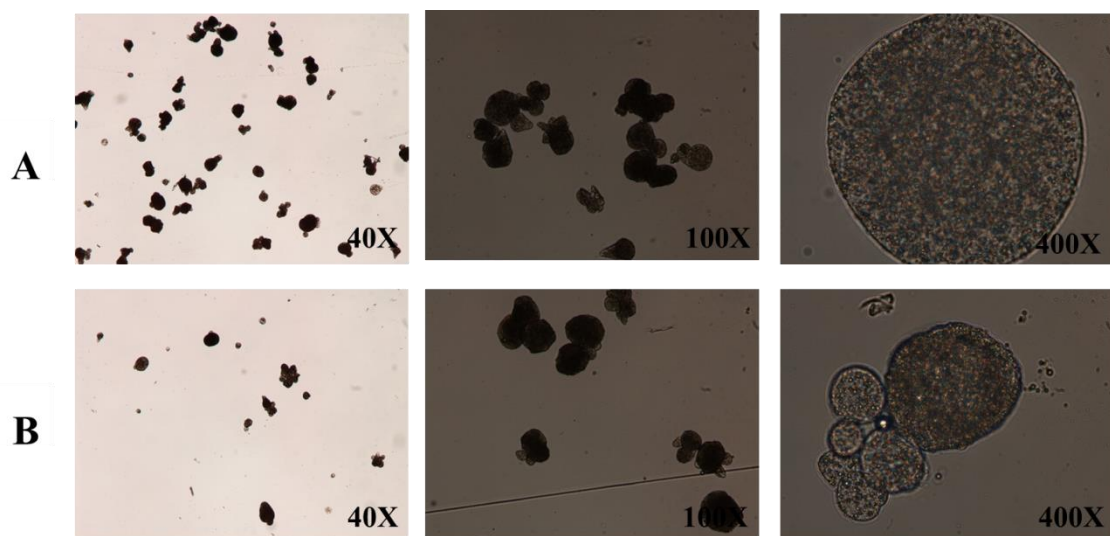
**Figura 4.3:** Caracterização morfológica por SEM das MIC sem princípio ativo (A) e com princípio ativo (B).

O processo de reidratação das MIC foi realizado utilizando as MIC preparadas com o  $\alpha$ -tocoferol. O procedimento consistiu em colocar as MIC em contacto com a água ao longo de um período de 48 horas sendo depois avaliada a quantidade de água recuperada. A Figura 4.4 mostra o registo de imagens realizado por MO antes da reidratação (MIC liofilizadas) e imediatamente após o contacto com a água (MIC reidratadas). A Figura 4.5 mostra o registo equivalente para as MIC para o tempo 24 horas e 48 horas.

Para o ensaio utilizou-se uma pequena amostra de MIC liofilizadas. Através da análise das duas figuras pode-se aferir que as MIC, passado 48 horas ou até mesmo 24 horas, recuperam quase na totalidade a sua forma original, quando estas estão húmidas. Em síntese, as partículas produzidas revelam elevada capacidade para recuperar a forma original indicando assim que a liofilização poderá ser uma boa opção de acondicionamento das MIC após produção.



**Figura 4.4:** Processo de reidratação das MIC com  $\alpha$ -tocoferol (ampliação de 40x, 100x e 400x): MIC liofilizadas (A) e Microsfemas imediatamente após a reidratação (B).



**Figura 4.5:** Processo de reidratação das MIC com  $\alpha$ -tocoferol (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microsfemas após 24 horas reidratação (A) e Microsfemas após 48 horas reidratação (B).

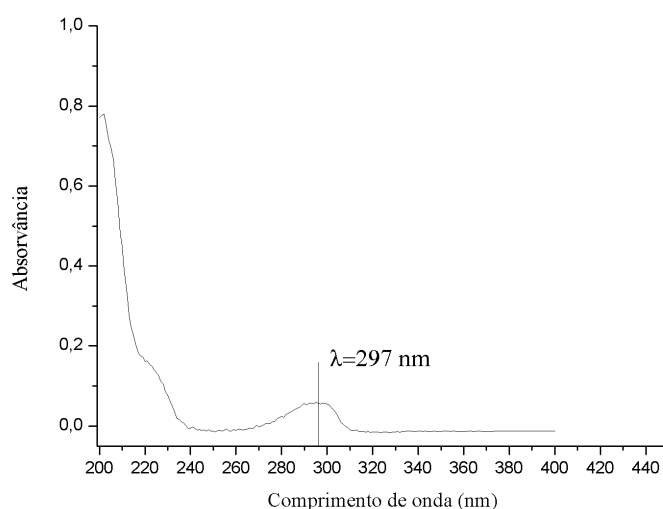
## 4.2 Determinação da eficiência de encapsulação e perfis de libertação

### 4.2.1 Desenvolvimento das metodologias

As técnicas adotadas para a determinação da eficiência de encapsulação necessitaram de desenvolvimentos visando o seu estabelecimento e a sua adequação ao sistema estudado. Assim, numa primeira fase foi feito um estudo exploratório e numa segunda fase as técnicas otimizadas foram aplicadas às amostras em estudo.

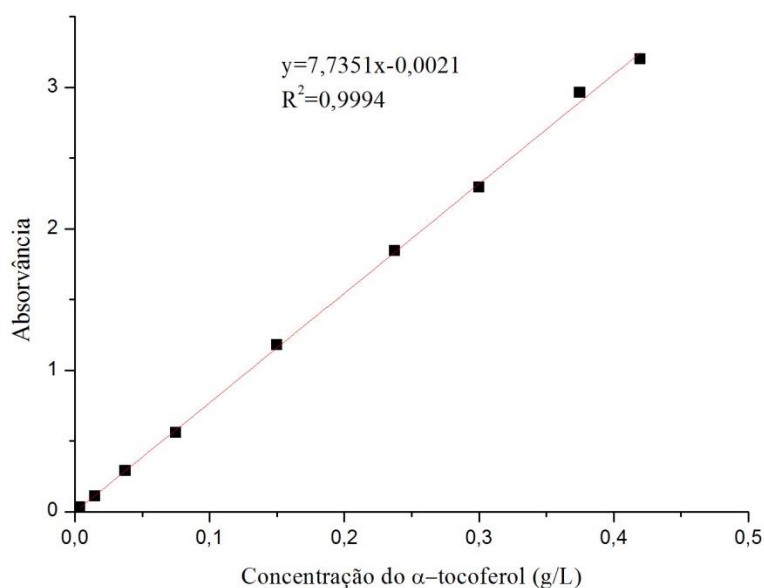
A quantificação do  $\alpha$ -tocoferol para determinação da eficiência de encapsulação e dos perfis de libertação foi realizada por UV-Vis. A técnica de espectrofotometria foi a técnica adotada neste trabalho dado as suas vantagens: é uma técnica de baixo custo, de fácil manuseamento, apresenta boa sensibilidade e é muito referenciada na literatura para a quantificação deste composto.

A Figura 4.6 mostra o espectro de absorção obtido na gama de 200 a 400 nm. Com base nesta análise foi selecionado o comprimento de onda de 297 nm para a análise do  $\alpha$ -tocoferol (máximo de absorção).



**Figura 4.6:** Espectro UV-vis do  $\alpha$ -tocoferol com a análise na gama 200-400 nm.

Previamente à análise das amostras recolhidas procedeu-se à calibração, tendo-se para tal preparado várias soluções de  $\alpha$ -tocoferol em *n*-hexano. A curva de calibração obtida está representada na Figura 4.7. O coeficiente de correlação obtido para esta curva foi de 0,9994, e a gama de linearidade se situou-se entre 0,42 g/L e 3,75  $\mu$ g/L.



**Figura 4.7:** Curva de calibração do  $\alpha$ -tocoferol em *n*-hexano.

Para o cálculo da E.E. foram testados dois métodos: método indireto (quantificando o tocoferol não encapsulado) e método direto (quantificando o tocoferol encapsulado).

No método indireto, a E.E. foi calculada tendo por base o teor de princípio ativo não encapsulado, consistindo este na quantificação direta do  $\alpha$ -tocoferol presente na solução de coagulação (solução de  $\text{CaCl}_2$  usada para consolidar as MIC), bem com a solução de lavagem.

Na Tabela 4.2 podem-se visualizar os resultados obtidos para o estudo realizado para a E.E. através do método indireto. Analisando a tabela constata-se que o valor inferior foi de aproximadamente 95% para os ensaios Toc\_001 e Toc\_005, e mais elevado cerca de 100% para o ensaio Toc\_003 o que dá indicação de que as perdas de  $\alpha$ -tocoferol são mínimas durante o processo produtivo.

**Tabela 4.2:** Estudo da Eficiência de encapsulação para os diferentes ensaios.

Ensaio	Abs	Concentração (mg/mL)	Massa (g)	E.E. (%)
Toc_001 (1)	0,0754	0,00893	9,648	95,176
Toc_002 (1)	0,748	0,0959	0,480	99,725
Toc_003 (1)	0,0221	0,00204	0,204	99,879
Toc_005 (1)	0,0247	0,00238	0,238	99,806
Toc_005 (2)	0,149	0,0185	5,549	95,491
Toc_007 (1)	0,0401	0,00546	0,546	99,687
Toc_007 (2)	0,0466	0,00630	1,889	98,916

(1) Processo de extração com *n*-hexano; (2) Processo de leitura direta

No método direto fez-se a quantificação direta do  $\alpha$ -tocoferol contido nas microsferas. Para tal, as MIC foram colocadas sob agitação numa solução com pH elevado (tampão de PBS, pH=7,4) e submetidas a tratamento com ultrassons, por forma a proporcionar a sua destruição efetiva e consequente libertação do conteúdo. Todos os ensaios foram realizados tendo o cuidado de proteger as amostras da luz para minimizar a degradação do princípio ativo.

No caso do método direto, inicialmente, a determinação do  $\alpha$ -tocoferol presente nas MIC realizou-se com base numa extração líquido-líquido em ampola de decantação utilizando *n*-hexano. Posteriormente, e dado que o método conduziu a valores muito baixos (MIC do ensaio Toc\_001 e ensaios iniciais com Toc\_002, Tabela 4.3), o que aponta para uma destruição incompleta das MIC, optou-se por fazer a extração em frascos de vidro com rolha, o que permitiu efetuar a agitação num vórtex. Desta forma a libertação do  $\alpha$ -tocoferol estaria mais facilitada esperando-se uma transferência mais eficiente deste para a fase orgânica. Para além desta modificação, testou-se ainda a utilização de diferentes tempos de agitação em banho de ultrassons, a adição de solução saturada de NaCl, a utilização de quantidades iniciais de MIC diferentes, bem como soluções alcalinas distintas. Neste último ponto, e com base na bibliografia testou-se a utilização de PBS (Ribeiro *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Tabandeh e Mortazavi, 2013) e de citrato de sódio (Ribeiro *et al.*, 1999). Dado que foram obtidos resultados similares, e

atendendo a que a maioria dos trabalhos descritos na literatura utiliza PBS, optou-se por utilizar esta solução.

No que respeita à extração com *n*-hexano esta acabou também por ser abandonada dado que o contacto deste com o alginato gerou um gel que pode contribuir para aprisionar o  $\alpha$ -tocoferol e portanto justificar os baixos valores obtidos. Assim, a quantificação do  $\alpha$ -tocoferol foi feita com base na análise direta do sobrenadante (sem realização de extração).

Adicionalmente testou-se uma possível interferência do emulsionante utilizado na leitura a 297 nm tendo-se verificado que este não apresenta qualquer interferência. Assim, esta foi a metodologia selecionada para determinar a E.E. pelo método direto: leitura direta do sobrenadante após contacto das MIC com a solução de PBS (responsável pela destruição das MIC para libertação do  $\alpha$ -tocoferol).

Na Tabela 4.3 apresentam-se os ensaios realizados para chegar ao método final.

De uma forma geral o valor obtido para a E.E. determinada pelo método direto é inferior ao valor obtido pelo método indireto o que aponta para uma libertação parcial do  $\alpha$ -tocoferol aquando da destruição das MIC pela solução de PBS. Outra das hipóteses seria ocorrer a degradação do  $\alpha$ -tocoferol durante o processo de análise. Esta hipótese foi considerada pouco provável dados os cuidados tidos, nomeadamente proteção da luz (o procedimento foi realizado todo à temperatura ambiente). Apenas foi ressalvado o fato do  $\alpha$ -tocoferol poder ser parcialmente degradado na presença do tampão de PBS.

Assim, para efeitos do presente trabalho considerou-se que o valor da E.E. do  $\alpha$ -tocoferol é próximo do valor teórico (100%). Os ensaios de libertação controlada consideram este valor de referência para determinar a % de  $\alpha$ -tocoferol libertado.

**Tabela 4.3:** Estudo dos parâmetros para o método otimizado da E.E.

Ensaio	Quantidade de MIC (mg)	Tempo (h)	Tempo de ultrassons (min)	Quantidade de n-hexano (mL)	Solução utilizada (mL)	Abs	Massa de $\alpha$ -T	E.E. (%)
<b>Toc_001</b> (1)	500	5	15+15	7	50 de PBS	0,719	0,81	≈5
	500	3+2+overnight	15+15	12	50 de PBS	3,577	n.a.	n.a.
<b>Toc_002</b> (1)	200	5	15+10+ 0+2	15	50 de PBS	1,932	n.a.	n.a.
	200	3	15+5	15	50 de PBS; citrato de sódio 0,055 M	0,615; 0,636	1,968; 2,035	35,924; 37,147
	200	3	15+5	15	50 de PBS; citrato de sódio 0,055 M	1,745; 1,651	n.a.	n.a.
	200	2+overnight	15+15+15	20	40 de PBS (duplicado)	0,1605; 0,123	1,993; 1,502	36,380; 27,417
<b>Toc_003</b> (1)	200 (duplicado)	2+overnight	15+15+15	20	50 de PBS	0,218; 0,2175	2,742; 2,730	62,177; 61,905
	1000	2+overnight	15+15	-	50 de PBS	0,350	22,235	100,390
<b>Toc_005</b> (1)	1000	2+overnight	15+15	-	50 de PBS	0,387	22,232	95,366
<b>Toc_007</b> (1)	1000	2+overnight	15+15	-	50 de PBS	1,9654	12,718	54,315
	750	2+overnight	15+15	-	50 de PBS	1,9235	12,447	72,904
	750	2+overnight	15+15	-	50 de PBS	2,000	12,942	75,804

(1) Processo de armazenamento – húmidas;  
n.a. – não aplicável

Com base na literatura, realizou-se a determinação dos perfis de libertação do  $\alpha$ -tocoferol utilizando condições de simulação do meio estomacal, tendo-se utilizado um meio com pH=1,2 (solução de suco gástrico artificial) e condições de simulação do sistema gastrointestinal, nomeadamente pela combinação sequencial de meio com pH=1,2 seguido de pH=7,4.

Inicialmente optou-se por fazer a leitura das amostras no UV-vis de 30 em 30 minutos ou de 15 em 15 minutos (conforme o meio utilizado) durante as duas primeiras horas. Contudo verificou-se que tal era pouco exequível do ponto de vista laboratorial, tendo-se optado por se alterar o intervalo de tempo de amostragem, o qual passou a ser de hora a hora até perfazer 8 horas, seguindo-se uma leitura após 24 horas. No caso de pH combinado optou-se por um tempo de amostragem de 0,5 horas até às 8 horas, seguindo-se a leitura após 24 horas.

Inicialmente, as experiências foram realizadas utilizando 1000 mg de MIC em 50 mL de meio, contudo em diversos pontos de amostragem verificou-se ser necessário proceder à diluição do sobrenadante recolhido, uma vez que os valores de absorvância obtidos não estavam na gama de linearidade da curva de calibração. Como tal, decidiu-se usar apenas 750 mg de MIC (ou uma massa de MIC liofilizadas correspondente a um teor similar de princípio ativo).

Após otimização da quantidade de MIC usadas nesta metodologia, bem como dos tempos de amostragem, a partir do ensaio Toc\_005 os ensaios de libertação utilizando MIC com princípio ativo passaram a ser feitos em paralelo com um ensaio em branco (MIC sem princípio ativo), permitindo descontar o respetivo valor de absorvância, por forma a ter em consideração a interferência da turvação verificada em alguns pontos de amostragem.

As Tabelas 4.4 e 4.5 mostram o registo experimental e valores calculados para a construção de um perfil de libertação (Figura 4.8). Os restantes resultados podem ser consultados no ANEXO B.

**Tabela 4.4:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para um dos ensaios realizados com a amostra Toc\_009 em meio básico (massa inicial teórica de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).

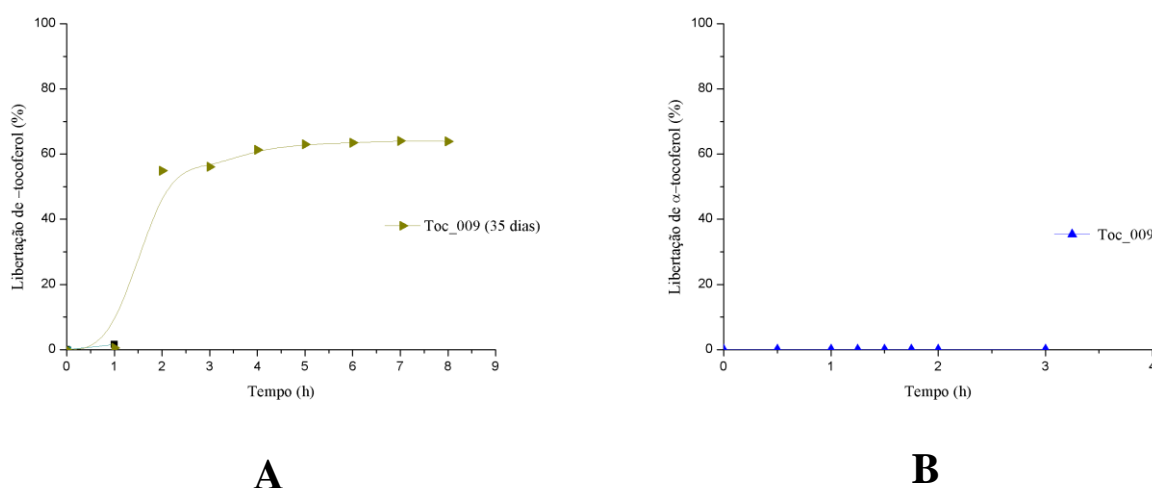
Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,026	0,011	0,015	0,002	0,002	0,112
2	1,664	0,050	1,614	0,209	0,209	10,449
3	1,719	0,070	1,649	0,213	0,213	10,670
4	1,934	0,132	1,802	0,233	0,233	11,662
5	2,038	0,187	1,851	0,240	0,240	11,978
6	2,040	0,173	1,867	0,242	0,242	12,079
7	2,085	0,202	1,883	0,244	0,244	12,185
8	2,096	0,217	1,878	0,243	0,243	12,154
24	2,101	0,268	1,833	0,237	0,237	11,863

**Tabela 4.5:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para um dos ensaios realizados com a amostra Toc\_009 em meio ácido (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0	0	0	0,000	0,014	0,071
1	0	0	0	0,000	0,014	0,071
1,25	0	0	0	0,000	0,014	0,071
1,5	0	0	0	0,000	0,014	0,071
1,75	0	0	0	0,000	0,014	0,071
2	0	0	0	0,000	0,014	0,071
3	0	0	0	0,000	0,014	0,071
24	0,035	0,026	0,009	0,001	0,069	0,360

Neste ponto realizou-se ainda um estudo da estabilidade das MIC húmidas ao longo do tempo, tendo-se observado não existirem variações significativas se estas forem armazenadas durante uma semana a 4 °C, havendo contudo modificações para períodos mais longos (35 dias). Particularizando, para a experiência em que se utilizaram as MIC do ensaio Toc\_009, observou-se que após o armazenamento prolongado estas não apresentavam o mesmo comportamento de libertação. Passado 35 dias da sua produção o

máximo de liberação que se obteve foi de aproximadamente 60%, enquanto que para um tempo de armazenamento de 9 dias o valor obtido foi de aproximadamente 70%. Este decréscimo pode estar associado a perdas ou degradação do  $\alpha$ -tocoferol, confirmado também pela observação visual das MIC, as quais apresentavam uma coloração amarelada após este período.



**Figura 4.8:** Perfil de liberação do  $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC húmidas para pH=7,4 (A) e pH=1,2 (B).

#### 4.2.2 Aplicação das metodologias

Neste subcapítulo realizou-se a determinação da E.E. e do perfil de liberação com base em 5 amostras de MIC produzidas para o efeito, entre as quais Toc\_009, Toc\_011, e Toc\_013 contém princípio ativo e Alg\_010, Alg\_012 correspondem a MIC vazias.

Os resultados obtidos para a E.E. pelo método direto estão representados na Tabela 4.6 sendo a média dos resultados obtidos de aproximadamente 85%. O máximo de E.E. alcançado foi de 97% para as MIC Toc\_013 liofilizadas enquanto o valor mais baixo foi obtido para as MIC Toc\_011 liofilizadas (cerca de 80%). Comparando os resultados obtidos com as MIC húmidas e liofilizadas os valores são muito próximos. Para as MIC armazenadas húmidas obtiveram-se valores próximos de 83-84%.

**Tabela 4.6:** Resultados obtidos das condições otimizadas para a quantificação da Eficiência de encapsulação através do método direto.

Ensaio	Quantidade de MIC (mg)	Tempo (h)	Tempo de ultrasons (min)	Solução utilizada (mL)	Abs	Massa de $\alpha$ -T	E.E. (%)
<b>Toc_009</b> (1)	750	2+overnight	15+15	50 de PBS	2,448	15,836	83,246
<b>Toc_011</b> (1)	750	2+overnight	15+15	50 de PBS	2,861	18,509	84,741
<b>Toc_011</b> (2)	50,7→750 MIC húmidas	2+overnight	15+15	50 de PBS	2,690	17,404	79,680
<b>Toc_013</b> (1)	750	2+overnight	15+15	50 de PBS	2,695	17,435	82,977
<b>Toc_013</b> (2)	91,19→750 MIC húmidas	2+overnight	15+15	50 de PBS	3,138	20,298	96,605

(1) Processo de armazenamento - húmidas; (2) Processo de armazenamento – liofilizadas

A Tabela 4.7 apresenta os resultados do método indireto. A análise desta tabela permite verificar que fica uma maior quantidade de  $\alpha$ -tocoferol na solução de coagulação do que na solução de lavagem. Tal acontece para todos os ensaios exceto para o último. O valor da E.E. alcançado através deste método varia entre 98-99%. O valor mais baixo obtido é de aproximadamente 98% para as MIC Toc\_013.

Tal como tinha sido observado no desenvolvimento método também aqui os valores obtidos pelo método direto foram sempre inferiores aos obtidos pelo método indireto.

**Tabela 4.7:** Resultados obtidos das condições otimizadas para a quantificação da Eficiência de encapsulação através do método indireto.

Ensaio	Abs		Concentração (mg/mL)		Massa (g)		E.E. (%)
	Sol. CaCl <sub>2</sub>	Sol. Lava-gem	Sol. CaCl <sub>2</sub>	Sol. Lava-gem	Sol. CaCl <sub>2</sub>	Sol. Lava-gem	
Toc_009 (1)	0,0128	n.a.	0,00193	n.a.	0,135	n.a.	99,912
Toc_009 (2)	0,0547	0,0189	0,00734	0,00271	1,836	0,136	98,717
Toc_011 (1)	0,0398	n.a.	0,00542	n.a.	0,542	n.a.	99,806
Toc_011 (2)	0,0615	0,0228	0,00822	0,00322	4,111	0,322	98,554
Toc_013 (1)	0,0206	n.a.	0,00294	n.a.	0,294	n.a.	99,895
Toc_013 (2)	0,0623	0,158	0,00833	0,0206	4,163	2,0633	97,768

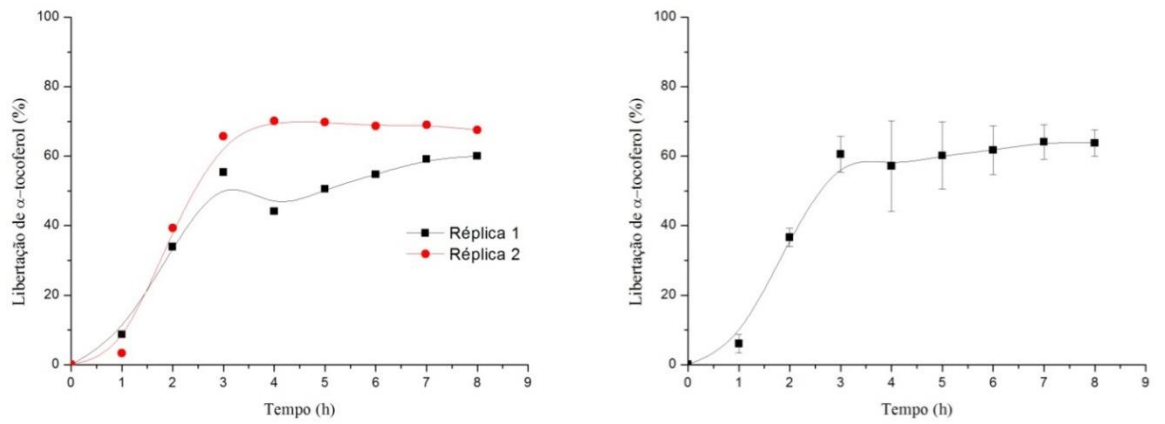
(1) Processo de extração com *n*-hexano; (2) Processo de leitura direta  
n.a. – não aplicável.

A construção dos perfis de liberação de  $\alpha$ -tocoferol realizou-se com base em ensaios realizados em duplicado, tendo-se calculando o valor médio e o erro padrão (Equação 4.1). Para uma amostra de tamanho  $N$  ( $i=1, \dots, N$ ) o erro define-se como:

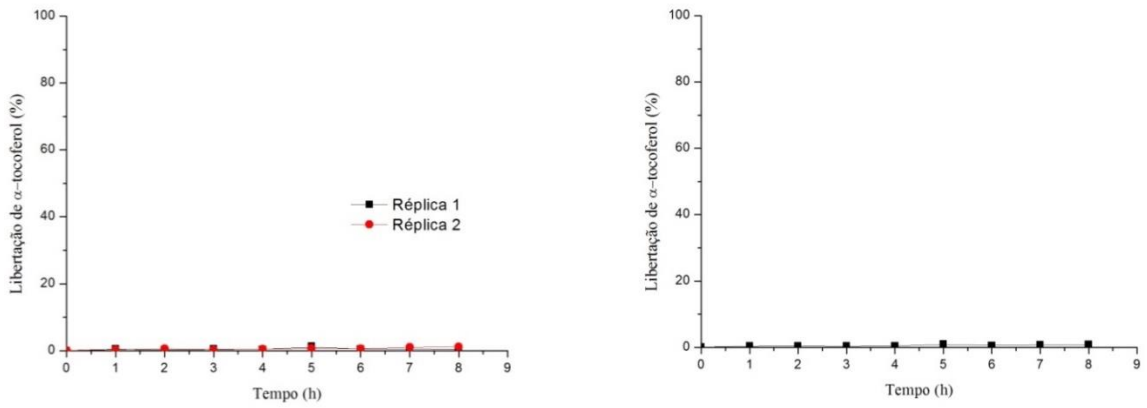
$$\text{Erro padrão} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (4.1)$$

As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam os perfis de liberação obtidos para os vários casos estudados, respetivamente para as MIC húmidas e as liofilizadas.

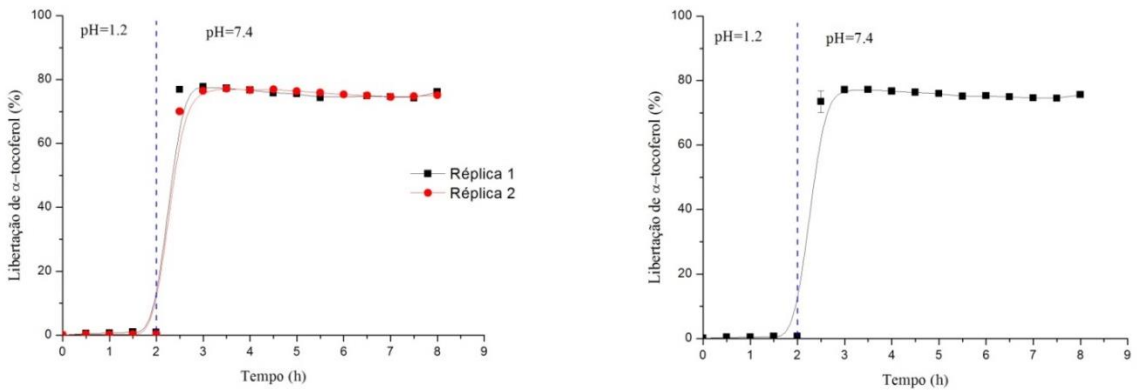
Analisando o perfil de liberação a pH=7,4 utilizando MIC húmidas (Figura 4.9-A) verifica-se que grande parte do  $\alpha$ -tocoferol se liberta nas primeiras quatro horas (aproximadamente 57% do  $\alpha$ -tocoferol incorporado). A Figura permite ainda observar a existência de alguma variabilidade de resultados para alguns dos pontos de amostragem, o que está relacionado com a dificuldade de aplicação do método. Isto é particularmente válido para o caso dos ensaios realizados a pH 7,4. Neste caso a liberação gradual e não uniforme do princípio ativo origina diferenças e perdas entre amostragens.



**A**



**B**



**C**

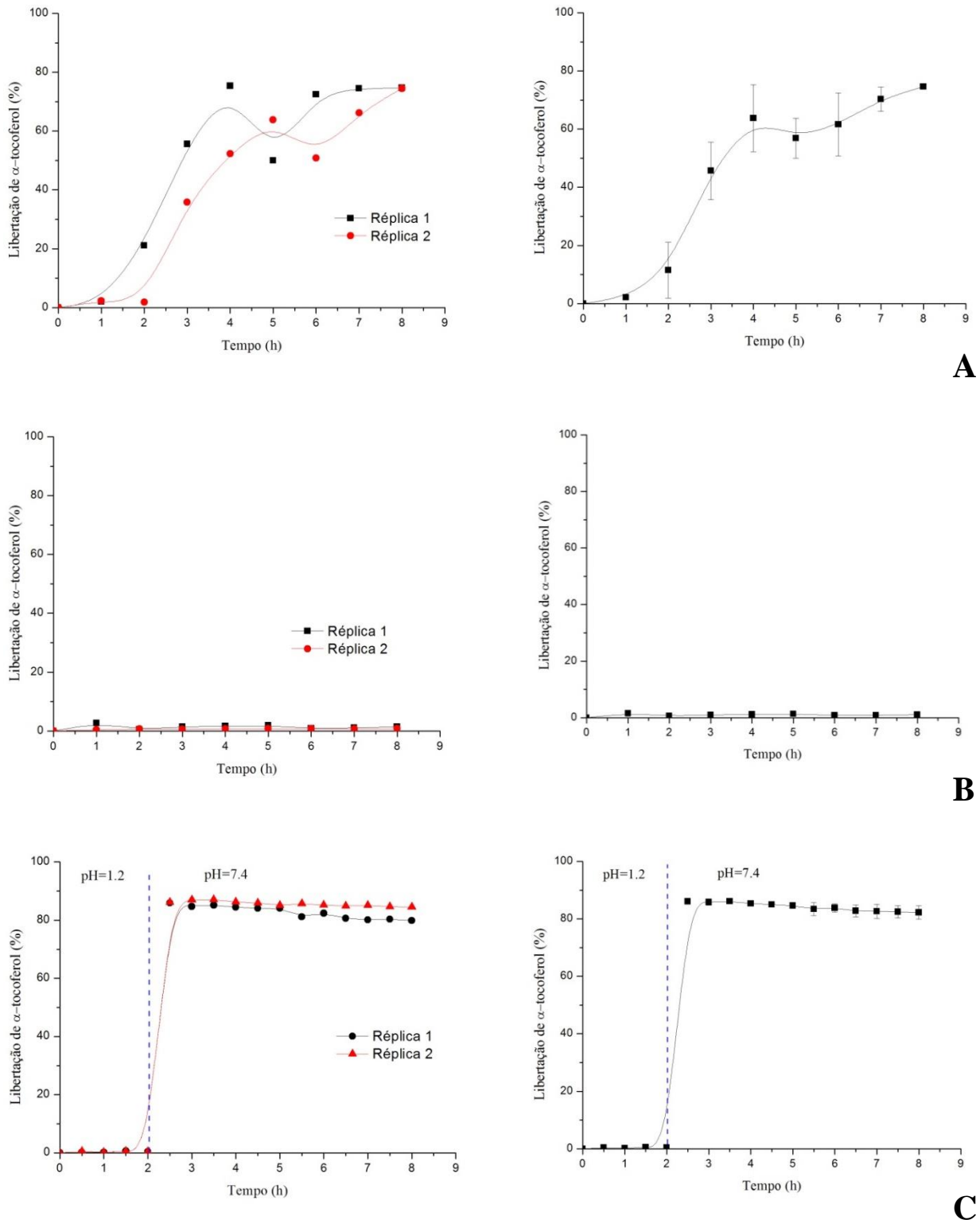
**Figura 4.9:** Perfis de liberação do  $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC húmidas, representação das duas réplicas e da média com o respetivo erro. (A) pH= 7,4 (B) pH= 1,2 e (C) pH=1,2 (2 horas) seguido de pH 7,4 (6 horas)

No caso do perfil de liberação em meio de pH=1,2 (Figura 4.9-B) verificou-se que a liberação é praticamente nula. Neste caso, obteve-se uma melhor reprodutibilidade de resultados.

O estudo com a combinação sequencial das duas soluções (solução tampão de PBS com pH= 7,4 e uma solução de suco gástrico artificial com pH= 1,2) tem com objetivo simular as condições gastrointestinais. Para o perfil de liberação com pH=1,2 seguido de 7,4 (Figura 4.9-C) a taxa de liberação é superior entre as 2 e as 3 horas iniciais (quando se dá a transição de meio ácido para meio alcalino, i.e., quando as MIC transitam do estômago para o intestino). Tal como aconteceu nos perfis individuais de pH, quando as MIC são colocadas em pH ácido a liberação é nula; quando transitam para a solução básica (pH=7,4) a taxa de liberação aumenta. De notar que no caso de as MIC testadas em meio básico, a liberação do  $\alpha$ -tocoferol se dá de forma gradual (demora cerca de 3 horas a atingir o patamar), enquanto no caso de estas passarem primeiro por meio ácido a liberação é quase instantânea (atinge-se imediatamente o patamar).

No caso das MIC liofilizadas, e comparativamente com o caso anterior (MIC húmidas), o perfil obtido é mais irregular que os anteriores, e uma vez mais este aspeto acentua-se no caso das MIC avaliadas em pH básico (Figura 4.10-A). O patamar é neste caso obtido mais tarde (4 horas). Tal observação pode estar relacionada com a necessidade de reidratação das MIC para que a liberação ocorra de forma efetiva.

De uma forma geral, e para pH ácido, os perfis de liberação usando as MIC liofilizadas apresentam o mesmo comportamento que as MIC armazenadas húmidas, sendo a sua liberação quase nula (Figura 4.10-B). A reprodutibilidade das experiências, foi neste caso, também boa, como pode ser comprovado na figura 4.10-B



**Figura 4.10:** Perfis de liberação do  $\alpha$ -tocoferol utilizando MIC liofilizadas, representação das duas réplicas e da média com o respectivo erro. (A) pH=7,4, (B) pH=1,2 e pH=1,2 e 7,4.

A Figura 4.10-C apresenta o perfil de libertação para a amostra com MIC liofilizadas quando sujeitas a pH=1,2 seguido de 7,4. Verifica-se uma vez mais que a libertação ocorre maioritariamente quando se transita de pH ácido para pH básico. O valor de  $\alpha$ -tocoferol libertado neste caso é de 85% e superior ao valor obtido para as MIC húmidas. Também de acordo com os resultados anteriormente discutidos (MIC húmidas), a passagem das MIC primeiro por meio ácido potencia a libertação do  $\alpha$ -tocoferol em meio básico. Comparativamente com o ensaio utilizando apenas meio básico, no caso das MIC húmidas verificou-se um aumento de 60% para 80% e no caso das MIC liofilizadas de 80% para 85%. A utilização da liofilização como processo a aplicar para o armazenamento das MIC revelou-se um método interessante que parece preservar melhor o  $\alpha$ -tocoferol potenciando assim a sua biodisponibilidade aquando da sua ingestão.

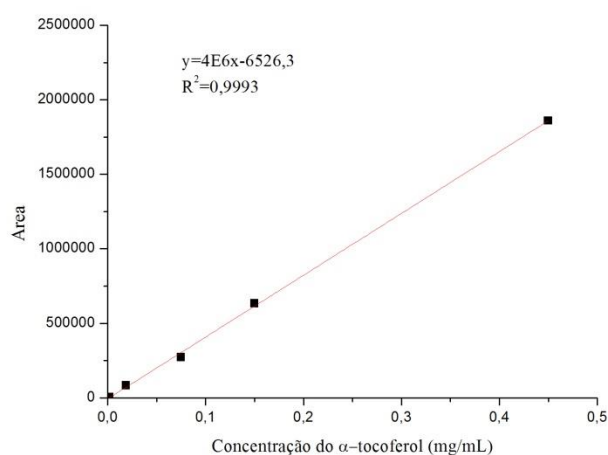
### **4.3 Incorporação das MIC de $\alpha$ -tocoferol numa matriz alimentar (sumo de laranja)**

Além de ocorrer naturalmente nos alimentos, a vitamina E pode ser adicionada para prevenir a oxidação destes e, também, com o intuito de aumentar o teor dessa vitamina, ou seja, fortifica-los. Uma vez que este composto é instável e sensível ao oxigénio, luz, temperatura existe necessidade de o proteger, nomeadamente pela utilização de técnicas de microencapsulação. Desta forma, tem vindo a ter um crescente interesse na indústria alimentar suplementar os alimentos com MIC contendo  $\alpha$ -tocoferol. É ainda de salientar que cada vez mais estudos comprovam que a suplementação de vitamina E nos alimentos contribui para benefícios na saúde, pensando-se que pode desempenhar um papel de prevenção em doenças como aterosclerose, doenças cardiovasculares e ainda de ressaltar que está a ser fortemente estudado o tratamento de doenças neuro-degenerativas através da suplementação com vitamina E.

Neste estudo foi escolhida como matriz alimentar um sumo de laranja (marca Fresky) visando o teste de incorporação das MIC contendo  $\alpha$ -tocoferol. Esta matriz foi selecionada dado apresentar um pH adequado (pH ácido 3,30-4,19), o que minimiza a libertação do princípio ativo durante a armazenagem (i.e. antes de ser consumido). Desta forma, e tal como previsto no estudo dos perfis de libertação, o  $\alpha$ -tocoferol seria maiori-

tariamente libertado após ingestão e no intestino (onde se observam as condições ótimas para a sua libertação).

Para efetuar a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol livre no sumo, foram preparados inicialmente padrões de  $\alpha$ -tocoferol em acetonitrilo para se proceder à elaboração da curva de calibração. A curva de calibração obtida (concentração vs área) está representada na Figura 4.11. O coeficiente de correlação obtido para esta curva foi de 0,9993, o que demonstra uma elevada linearidade para a gama de concentrações considerada.



**Figura 4.11:** Curva de calibração do  $\alpha$ -tocoferol em acetonitrilo.

Apesar de o rótulo do sumo utilizado não referir a adição de Vitamina E, sabendo-se que a laranja contém naturalmente esta vitamina, ainda que em baixos teores (USDA, 2011), antes de se proceder à adição de MIC ao sumo, realizou-se a determinação do teor de Vitamina E deste por HPLC (1,45 mg/L de sumo). Neste caso, a utilização de espectrofotometria UV-vis não seria viável dada a presença de outros compostos (tais como ácidos orgânicos) que absorvem no mesmo comprimento de onda, tendo-se por isso recorrido à separação e quantificação do  $\alpha$ -tocoferol por HPLC. Após adição das MIC, os sumos foram colocados à temperatura ambiente e em estufa a 44 °C, respetivamente. Contudo, após 1 semana verificou-se a ocorrência de contaminação fúngica no sumo mantido à temperatura ambiente, pelo que apenas se analisou a outra amostra. Procedeu-se ainda à quantificação de  $\alpha$ -tocoferol livre no sumo após submeter o mesmo

a um banho de ultrassons durante 15 minutos e após alcalinização da amostra para pH=7,2. Na Tabela 4.8 estão representados os resultados obtidos.

**Tabela 4.8:** Quantificação de  $\alpha$ -tocoferol livre no sumo após 7 dias, após aplicação de ultrassons e após alteração do pH.

Experiências	Área	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
Leitura após 7 dias	8007	0,00363	0,0727	0,85
Aplicação Ultrassons	22605	0,00728	0,140	5,42
Alteração do pH	1092814	0,275	0,788	63,82

Fazendo a análise dos resultados da Tabela 4.8 verifica-se que a libertação de  $\alpha$ -tocoferol atingiu valores muito baixos ao fim de 7 dias (praticamente não ocorreu libertação). Quando a amostra de sumo foi sujeita a ultrassons houve um ligeiro incremento da libertação (cerca de 5%). Já a alcalinização do sumo (pH=7,2), de forma a simular a passagem do sumo do estômago para o intestino, permitiu obter uma maior taxa de libertação de princípio ativo (cerca de 64%), tal como esperado. Desta forma, verificou-se que as MIC de  $\alpha$ -tocoferol apresentaram o comportamento desejado uma vez houve uma libertação mínima a pH ácido, mantendo-se o composto encapsulado e, como tal, protegido da luz e de reações de oxidação, ocorrendo a sua libertação por modificação de pH após ingestão do sumo, quando este atinge o intestino delgado.



---

## **Capítulo 5**

Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

---



O principal objetivo do presente trabalho consistiu na produção e caracterização de MIC contendo  $\alpha$ -tocoferol, uma vitamina lipossolúvel de elevado poder antioxidante, e posterior avaliação das vantagens da sua incorporação numa matriz alimentar (sumo de laranja). As vitaminas são conhecidas pela sua instabilidade, podendo sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados e após processos metabólicos. Neste contexto, a microencapsulação permite ultrapassar estes fatores limitantes protegendo o princípio ativo e, adicionalmente, proporcionando a sua libertação controlada e/ou localizada.

Numa primeira etapa procedeu-se à produção das MIC com e sem princípio ativo. A microencapsulação foi realizada num sistema NISCO Var J30. A técnica de atomização/coagulação foi aplicada utilizando como condições padrão uma pressão de 0,1 bar e um caudal de alimentação ao *nozzle* de 0,3 mL/min. Como material encapsulante selecionou-se o alginato (utilizou-se uma solução aquosa a 3%, m/v) e como agente de coagulação o  $\text{CaCl}_2$  (utilizou-se uma solução aquosa a 4%, m/v). Tipicamente numa experiência utilizam-se as seguintes proporções: 10 ml da solução de alginato contendo 200 mg de tocoferol para um volume de solução de coagulação de 250 mL.

As MIC produzidas foram caracterizadas relativamente ao resíduo seco, morfologia e reidratação. Adicionalmente avaliou-se a eficiência de encapsulação e determinaram-se os perfis de libertação para diferentes meios (pH=1,2, pH=7,4 e combinação de pH). No caso de pH combinados procurou simular-se a passagem das MIC pelo trato gastrointestinal. Assim as MIC foram sujeitas a um período de 2 horas em contacto com o meio ácido seguido de 6 horas em contacto com o meio básico. No caso da avaliação da E.E. foram utilizados dois métodos: método indireto (quantificando o  $\alpha$ -tocoferol por encapsular) e direto (quantificando o  $\alpha$ -tocoferol encapsulado). Realizaram-se avaliações com as MIC húmidas e secas por liofilização.

O resíduo seco determinado rondou os 10% para as MIC com e sem princípio ativo. As MIC secas em contacto a água foram reidratadas conseguindo, num período de 48 horas, recuperar a seu tamanho/forma original. Este aspeto é importante para a definição da forma de armazenamento, i.e., quando as MIC são armazenadas secas, nomeadamen-

te liofilizadas, é de esperar que recuperem a sua forma original mantendo a sua capacidade de armazenamento e libertação controlada.

O valor de E.E. obtido pelo método direto utilizando MIC foi em média de 84% e 88%, respetivamente para as MIC húmidas e liofilizadas. Através do método indireto o valor médio de E.E. obtido é de próximo de 100% para os dois casos.

Um ponto importante deste trabalho consistiu na avaliação dos perfis de libertação. Verificou-se que para pH=1,2 (simulação das condições estomacais) a libertação foi quase nula; a pH=7,4 (simulação das condições intestinais) ocorreu uma taxa de libertação superior, tal como era esperado, sendo esta de aproximadamente 60% para as MIC húmidas e de 80% para as liofilizadas. No caso da combinação de pH (simulação de passagem pelo trato gastrointestinal) verificou-se que a libertação ocorre maioritariamente quando se transita de pH ácido para pH básico. O valor do  $\alpha$ -tocoferol libertado no caso das MIC liofilizadas foi superior ao valor obtido para as MIC húmidas (85% versus 80%). A passagem das MIC primeiro por meio ácido potencia a libertação do  $\alpha$ -tocoferol em meio básico. Comparativamente com o ensaio utilizando apenas meio básico, verificou-se um aumento de 60% para 80% no caso das MIC húmidas de 80% para 85% no caso das MIC liofilizadas. A utilização da liofilização como processo a aplicar para o armazenamento das MIC revelou-se assim um método interessante que parece preservar melhor o  $\alpha$ -tocoferol potenciando a sua biodisponibilidade aquando da sua ingestão.

Numa terceira etapa do trabalho, procedeu-se à incorporação das MIC húmidas (após produção), num sumo de laranja. O principal objetivo deste estudo consistiu na avaliação do potencial de utilização das MIC de alginato para proteger o  $\alpha$ -tocoferol numa matriz alimentar real. Tendo em consideração o comportamento revelado nos estudos de libertação escolheu-se um alimento ácido (sumo de laranja comercial, Fresky). A quantificação do  $\alpha$ -tocoferol libertado para o sumo foi feita recorrendo à análise por HPLC. Foram analisadas duas amostras armazenadas durante uma semana a 23 °C (temperatura ambiente) e 44 °C protegidas da luz (branco e amostras contendo as MIC com  $\alpha$ -tocoferol). Adicionalmente avaliou-se a utilização de ultrassons e a alcalinização do meio na libertação de  $\alpha$ -tocoferol.

Decorridos 7 dias após a incorporação das MIC no sumo de laranja verificou-se que a taxa de libertação do  $\alpha$ -tocoferol foi inferior a 1%. A utilização de ultrassons originou libertações apenas ligeiramente superiores (5%), contudo a acidificação do meio facilitou a libertação do  $\alpha$ -tocoferol (65%). Tal aponta para uma capacidade protetora das MIC, a qual permite estabilizar o  $\alpha$ -tocoferol proporcionando a manutenção da sua capacidade antioxidante nas condições de realização do ensaio. Assim, perspectiva-se que no ato de ingestão do sumo a quantidade de vitamina biodisponível seja superior numa situação em que se utilize a sua forma microencapsulada.

Como trabalho futuro, e numa perspectiva de continuidade, poderão ser realizados ensaios de libertação a pH=6,8 (simulando a zona proximal (duodeno) do intestino delgado). Adicionalmente estudar a incorporação do  $\alpha$ -tocoferol microencapsulado em outras matrizes alimentares, nomeadamente outras matrizes ácidas, avaliar *in vitro* as propriedades antioxidantes do sumo tentando compreender melhor a atividade biológica deste composto quando microencapsulado e avaliar as propriedades organolépticas do sumo (cor, sabor e odor). Um ponto que beneficiaria de um maior investimento de tempo seria a repetição e aperfeiçoamento da técnica de amostragem usada nos ensaios de libertação controlada, em particular nos ensaios realizados a pH básico.

Tendo em consideração estudos disponíveis que apontam para o uso do  $\alpha$ -tocoferol em outras áreas de aplicação, realizar testes de incorporação das MIC em outras matrizes, nomeadamente cosméticas (p.ex. cremes hidratantes).



---

## **Referências Bibliográficas**

---



- Alencastre, J. B., Bentley, M. V., Garcia, F. S., Moragas, M., Viladot, J. L., e Marchetti, J. M. (2006). A study characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 69-76.
- Amin, A. (2001). Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multivitamin capsules. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 51 (3), 267-272.
- Anson, R. (2005). Microencapsulation: For enhanced textile performance. *Performance Apparel Markets*, 12, 21-39.
- Augustin, M. A., e Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38, 902-912.
- Azeredo, H. M. (2005). Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. *Alimento e Nutrição*, 16 (1), 89-95.
- Azevedo, M. A. (2013). *Development of nanostructures for encapsulation of vitamins*. Braga: Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Bioengenharia pela Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
- Azzi, A. (2007). Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic. Biol. Med.*, 43 (1), 16-21.
- Bansode, S. S., Banarjee, S., Gaikwad, D., Jadhav, S., e Thorat, R. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1 (2), 38-43.
- Batista, E. d., Costa, A. G., e Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2007). Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, 20 (5), 525-535.
- Beitz, R., Mensik, G., Fischer, B., e Thamm, M. (2002). Vitamins dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56 (6), 539-545.
- Booth, S., Tucker, K., McKeown, N., Davidson, K., Dallal, G., e Sadowski, J. (1997). Relationships between Dietary Intakes and fasting plasma concentrations of fat-soluble vitamins in human. *J. Nutr.*, 127 (4), 587-592.
- Boscoboinik, D., Szewczyk, A., e Azzi, A. (1991). Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein Kinase C activity. *Arch. Biomech. Biophys.*, 286 (1), 264-269.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H., Bonnet, I., e Zydwicz, N. (2004). Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined spontaneous emulsification. *Int. J. Pharm.*, 269 (1), 89-100.

- Bowey, K. E. (2009). *Alginate Microparticles produced by spray drying for oral insulin delivery*. Kingston: Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Engenharia) pela Queen's University.
- Braga, G. (2005). *Determinação das especificações do processo de spray drying na obtenção de microparticulas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica*. Ribeirão Preto: Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- Bramley, P., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F., Manios, Y., Roxborough, H., et al. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 913-938.
- Brasileiro, J. S. (2011). *Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas*. Porto: Dissertação apresentada para o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.
- Brigelius-Flohé, R., e Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13 (10), 1145-1155.
- Brown, B., Zhao, X., Chait, A., Fisher, L., Cheung, M., Morse, J., et al. (2001). Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N. Engl. J. Med.*, 345 (22), 1583-1592.
- Brubacher, G., Müller-Mulot, W., e Southgate, D. T. (1985). Vitamin E (Only u-Tocopherol) in Foodstuffs: HPLC Method. In G. Brubacher, W. Müller-Mulot, & D. T. Southgate, *Methods for the determination of vitamins in food* (1ª ed., pp. 97-107). London: Elsevier Applied Science.
- Cevc, G. (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 675-711.
- Clément, S., Tasinato, A., Boscoboinik, D., e Azzi, A. (1997). The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation, and activity of protein Kinase C in smooth cells after phorbol 12-myristate 13-acetate downregulation. *Eur. J. Biochem.*, 246 (3), 745-749.
- Coimbra, P. (2010). *Preparação e caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de origem natural*. Coimbra: Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Constantinides, P. P., Han, J., e Davis, S. S. (2006). Advances in the Use of Tocopherols as Drug Delivery Vehicles. *Pharmaceutical Research*, 23 (2), 243-255.
- Degani, A. L., Cass, Q. B., e Vieira, P. C. (1998). Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, 7, 21-25.

- Depypere, F., Dewettinck, K., Ronsse, F., e Pieters, J. (2003). Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*, 1 (2), 75-94.
- Deutsch, M. (1995). Vitamins and other nutrients. In P. Cunniff, *Official Methods of Analysis of International AOAC* (16° ed., pp. 830-836). Arlington: AOAC International.
- Dionysio, R. B., e Meirelles, F. V. (1 de Julho de 2010). *Coordenação Central de Educação a Distância - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro*. Obtido em 23 de Outubro de 2013, de Web site de CCEAD-PUC Rio: [http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL\\_conservacao\\_de\\_alimentos.pdf](http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_conservacao_de_alimentos.pdf)
- Draget, K. I., e Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical applications. *Food Hydrocolloids*, 25, 251-256.
- Dziezak, J. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.*, 42 (4), 136-151.
- Economos, C. D., Moore, C. E., Hyatt, R. R., Kuder, J., Chen, T., Meydani, S. N., et al. (2013). Multinutrient-Fortified Juices Improve Vitamin D and Vitamin E Status in Children: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the academy of nutrition and dietetics*, 114, 709-717.
- Ermmerie, A., e Engel, C. (1938). Colorimetric Determination of dl- $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). *Nature*, 142, 873.
- Fang, Z., e Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Farias, M. C., Moura, M. L., Andrade, L., e Leão, M. H. (2007). Encapsulation of the Alpha-tocopherol in a Glassy Food Model Matrix. *Materials Research*, 10, 57-62.
- Fazio, A., Marilley, D., e Azzi, A. (1997). The effect of alpha-tocopherol and beta-tocopherol on proliferation, protein Kinase C activity and gene expression in different cell lines. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41 (1), 93-101.
- Fernandes, I., Amaral, J., Pinto, V., Ferreira, M., e Barreiro, M. F. (2011). Chitosan microparticles loaded with essential oils having in view leather applications. In *11th International Chemical and Biological Engineering Conference* (pp. 552-553). Lisboa: CHEMPOR2011.
- Flachowsky, G., Engelman, D., Sunder, A., Halle, I., e Sallmann, H. (2002). Eggs and poultry meat as tocopherol sources in dependence on tocopherol supplementation of poultry diets. *Food Research International*, 35, 239-243.

- George, M., e Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1-14.
- Ghosh, S. K. (2006). Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In S. K. Ghosh, *Functional Coatings by Polymer Microencapsulation* (pp. 1-26). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Goh, C. H., Heng, P. W., e Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and the therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1-12.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.
- Herrera, E., e Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.*, 57 (1), 43-56.
- Hope, P., e Krennrich, G. (2000). Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic  $\alpha$ -tocopherol in the human: a dispute. *Eur. J. Nutr.*, 39 (5), 183-193.
- Jensen, S., e Lauridsen, C. (2007). Alpha-Tocopherol stereoisomers. *Vitam. E: Vitam. Horm. Adv. Res. Appl.*, 76, 281-308.
- King, A. (1995). Encapsulation of food ingredients. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius, *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (pp. 26-39). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Kissel, T., Maretschek, S., Packhauser, C., Schnieders, J., e Seidel, N. (2006). Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their applications in the pharmaceutical industry. In S. Benita, *Microencapsulation: methods and industrial applications* (p. 104). Boca Raton: CRC, Press Taylor & Francis Group.
- Kumari, A., Yadav, S. K., e Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Lee, D., Hwang, S., Park, J., e Park, H. (2003). Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. *Journal Microencapsulation*, 20, 179-192.
- Lee, K. Y., e Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106-126.
- Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. d., e Chiamoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 44, 3039-3046.

- Martinek, R. (1964). Method for the Determination of Vitamin E (Total Tocopherols) in Serum. *Clin. Chem.*, 10 (12), 1078-1086.
- Mecocci, P., Polidori, M., Troiano, L., Cherubini, A., Cecchetti, R., Pini, G., et al. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 1243-1248.
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., e Elissari, A. (2013). Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 445, 181-195.
- Miller III, E., Erlinger, T., Sacks, F., Svetkey, L., Charleston, J., Lin, P., et al. (2005). A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: Results from a randomized controlled feeding study. *Atherosclerosis*, 1, 175-182.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Piacenza, F., et al. (2014). Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Research Reviews*, 14, 81-101.
- Mourão, D. M., Sales, N. S., Coelho, S. B., e Pinheiro-Santana, H. M. (2005). Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. *Revista de Nutrição*, 18 (4), 529-539.
- Mustacich, D., Leonard, S., Devereaux, M., Sokol, R., e Traber, M. (2006). Alpha-tocopherol regulation of hepatic cytochrome P450s and ABC transporters in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, 41 (7), 1069-1078.
- Nascimento, A. P. (2005). *Desenvolvimento e Validação de metodologia para medicamentos contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e em associação*. São Paulo: Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Farmáco e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- Nollet, L. (2000). *Food Analysis by HPLC* (2º ed.). New York: Marcel Dekker.
- Nutri-Facts. (24 de Outubro de 2011). *Nutri-Facts*. Obtido em 23 de Novembro de 2013, de WEb site de Nutri-Facts: <http://www.nutri-facts.org/eng/vitamins/vitamin-e-tocopherol/at-a-glance/>
- Otadi, M., e Zabihi, F. (2011). Vitamin E Microencapsulation by ethylcellulose through emulsion solvent evaporation technique; An operational condition study. *World Applied Sciences Journal (Special Issue of Food and Environment)*, 14, 20-25.
- Pausnitz, M., Mitragotri, S., e Langer, R. (2004). Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 25 (2), 115-124.
- Pedro, A. N. (2009). *Efeitos do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) na hematopoese murina por mecanismos não-antioxidantes*. São Paulo: Dissertação apresentada para a

- obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.
- Perfumes, C. &. (4 de Abril de 2006). As vitaminas em formulações cosméticas. *Revista Cosméticos & Perfumes*, 24-45.
- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Quintas, M. A., Coimbra, M. A., e Vicente, A. A. (2012a). K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 227–232.
- Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., e Quintas, M. A. (2012b). Transport mechanism of macromolecules on hydrophilic bio-polymeric matrices-Diffusion of protein-based compounds from Chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 116, 633-638.
- Prado, A. G., Santos, A. L., Nunes, A. R., Tavares, G. W., e Almeida, C. M. (2012). Designed formulation based on alpha-tocopherol anchored on chitosan microspheres for pH-controlled gastrointestinal controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96, 8-13.
- Reineccius, G. A. (1995). Controlled Release Techniques in the Food Industry. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius, *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* (pp. 8-25). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Reiter, E., Jiang, Q., e Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 668-691.
- Ribeiro, A. J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., e Chaumeil, J. C. (1999). Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 115-123.
- Ribeiro, A. S., e Vieira, D. d. (2012). *Microencapsulação de Vitamina E para fins Médico/Alimentares*. Bragança: Projeto apresentado para a obtenção do Grau de Licenciado em Engenharia Biomédica pela Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança.
- Ricciarelli, R., Tarsinato, A., Clément, S., Ozer, N., Boscoboinik, D., e Azzi, A. (1998). Alpha-tocopherol specifically inactivates cellular protein Kinase C by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.*, 334, 243-249.
- Rigotti, A. (2007). Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E (Review). *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 423-436.
- Risch, S. J. (1995). Encapsulation: Overview of uses and techniques. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius, *Encapsulation and controlled release of food* (pp. 2-7). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Romero-Cano, M., e Vincent, B. (2002). Controlled release of 4-nitroanisole from poly (lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 82, 27–135.

- Ruperez, F., Herrera, E., e Barbas, C. (2001). Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatographic A*, 935 (1-2), 45-69.
- Santos, A., Ferreira, V., e Grosso, C. (2000). Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 26-30.
- Santos, R. S. (2012). *Estudo dos fatores que influenciam os atributos de esferas de alginato*. Aveiro: Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pela Universidade de Aveiro.
- Saremi, A., e Arora, R. (2010). Vitamin E and cardiovascular disease. *Am. J. Ther.*, 17, e56-e65.
- Schmaltz, C., Santos, J. V., e Guterres, S. S. (2005). Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: A imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, 16 (13-14), 80-85.
- Schrooyen, P., Meer, R. v., e Kruijff, C. D. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475-479.
- Sichert-Heller, W., Kersting, M., Alexy, U., e Manz, F. (2000). Ten-year trends in vitamin and mineral intake from fortified food in German children and adolescents. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54 (1), 81-86.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., e Veiga, F. (2003). Administração Oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (1), 1-20.
- Somchue, W., Sermisri, W., Shioatana, J., e Siripinyanond, A. (2009). Encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Research International*, 42, 909-914.
- Stapelfeldt, H., Nielsen, K., Jensen, S., e Skibsted, L. (1999). Free radical formation in freeze-dried raw milk in relation to its  $\alpha$ -tocopherol level. *J. Dairy Res.*, 66 (3), 461-466.
- Suarna, C., Wu, B., Choy, K., Mori, T., Croft, K., Cynshi, O., et al. (2006). Protective effect of vitamin E supplements on experimental atherosclerosis in modest and depends on preexisting vitamin E deficiency. *Free Radic. Biol. Med.*, 41 (5), 722-730.
- Suave, J., Dall'agnol, E., Pezzin, A., Silva, D., Meier, M., e Soldi, V. (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7 (2), 12-20.
- Tabandeh, H., e Mortazavi, S. A. (2013). An Investigation into some effective factors on encapsulation efficiency of alpha-tocopherol in MLVs and the release profile

- from the corresponding liposomal gel. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 21-30.
- Thiele, J. J., Hsieh, S. N., e Ekanayake-Mudiyanselage, S. (2005). Vitamin E: Critical Review of Its Current Use in Cosmetic and Clinical Dermatology. *Dermatologic Surgery*, 31, 805-813.
- Tiwari, S., Goel, A., Jha, K., e Sharma, A. (2010). Microencapsulation techniques and its application: a review. *The Pharma Research*, 3 (1), 112-116.
- Traber, M. G., e Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more - Review article. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 4-15.
- Trino, A. S. (2012). *Estudo sistemático da formação de estrutura em processos de Microencapsulação por evaporação do solvente*. Coimbra: Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica Industrial pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Trumbo, P., Yates, A., Schlicker-Renfro, S., e Sutor, C. (2003). Dietary Reference Intakes: revised nutritional equivalents for folate, vitamin E and provitamin A carotenoids. *J. Food Compos. Anal.*, 16 (3), 379-382.
- USDA. (7 de Dezembro de 2011). *Nutrient Database for Standard Reference*. Obtido em 23 de Julho de 2014, de Web site USDA: <http://ndb.nal.usda.gov/>
- Venkatesan, P., Manavalan, R., e Valliappan, K. (2009). Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1 (4), 26-35.
- Viegas, J. S. (2013). *Encapsulação de um extrato hidroalcoólico de Rosa micrantha Borrer ex Sm para fins alimentares*. Bragança: Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar pela Escola Superior Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança.
- Vila Jato, J. (1999). *Tecnología farmacéutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y oprecaiones básicas*. Madrid: Sintesis Editorial.
- Vo, K. (. (s.d.). *UC Davis ChemWiki*. Obtido em 19 de Março de 2014, de Web site de UC Davis ChemWiki: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical\\_Chemistry/Kinetics/Reaction\\_Rates/Experimental\\_Determination\\_of\\_Kinetics/Spectrophotometry](http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry)
- Whorton, C. (1995). Factors Influencing Volatile Release from Encapsulation Matrices. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius, *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* (pp. 134-142). Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Xu, Z. (2008). Comparison of extraction methods quantifying vitamin E from animal tissues. *Bioresour. Technol.*, 99 (18), 8705-8709.

- Yoo, S.-H., Song, Y.-B., Chang, P.-S., e Lee, H. G. (2006). Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38, 25-30.
- Zingg, J.-M. (2007). Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 400-422.
- Zinutti, C., Kedzieewicz, F., Hoffman, M., e Maincent, P. (1994). Preparation and characterisation of ethylcellulose micropheres containing 5-fluorouracil. *Journal of Microencapsulation*, 11 (5), 555-563.



---

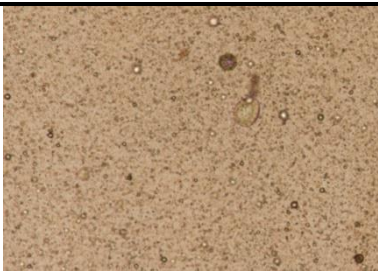
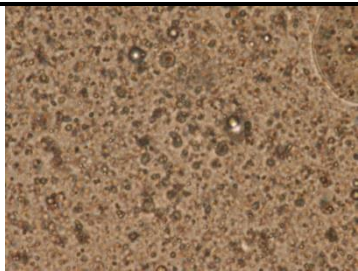

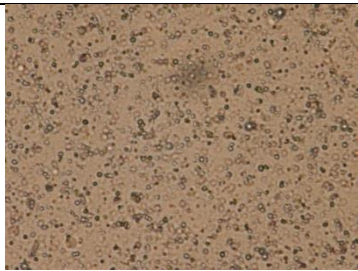
## **Anexos**





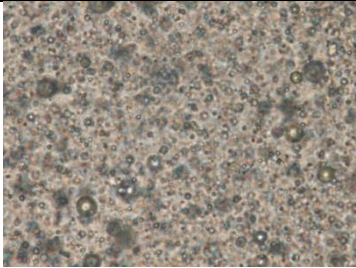


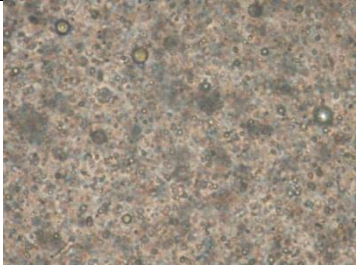
---



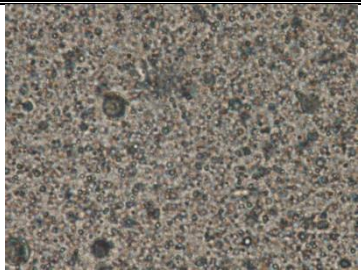

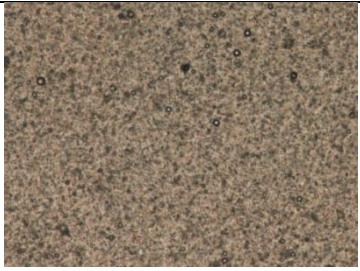
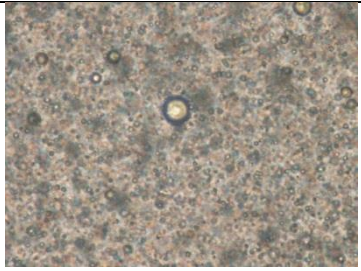










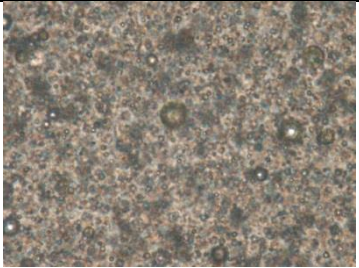
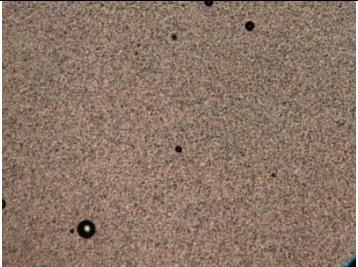


## Anexo A. Produção de MIC de alginato com e sem $\alpha$ -tocoferol






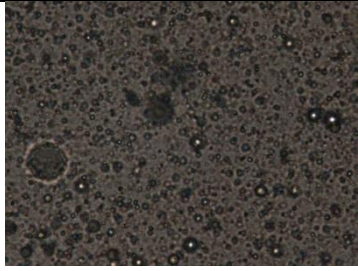



**Tabela A1:** Registo da preparação da emulsão durante a homogeneização.



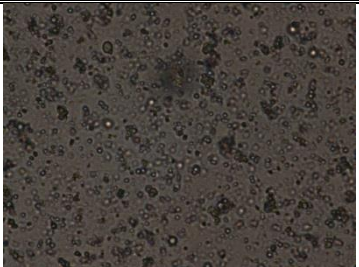

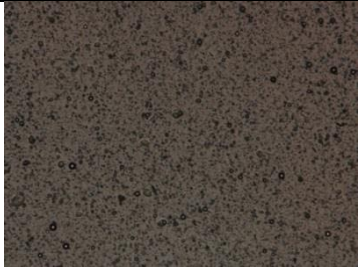
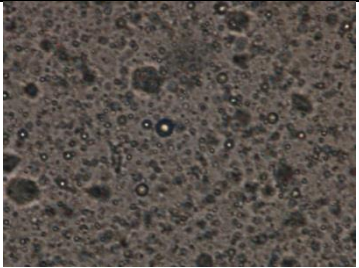


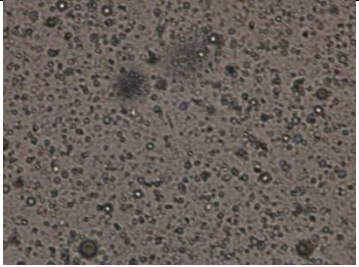
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_001	5 min	n.a.		
	10 min	n.a.		

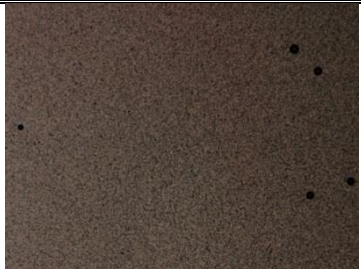




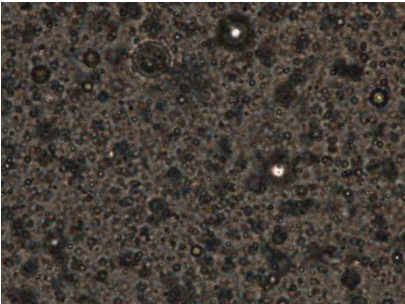
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
	15 min	n.a.		
Toc_002	5 min			
	10 min			

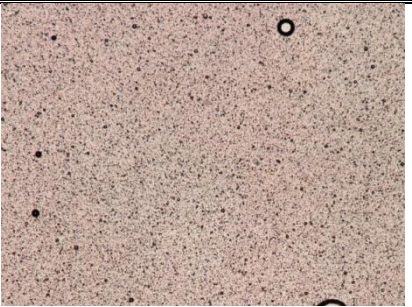

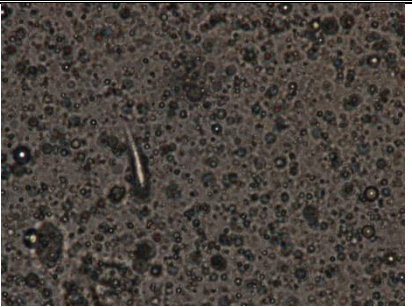
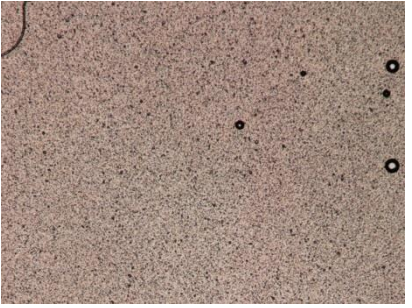
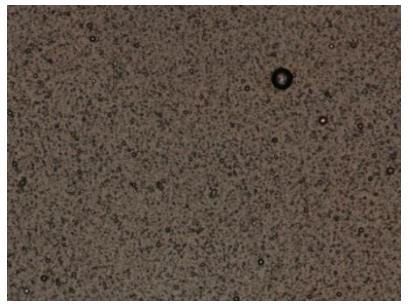
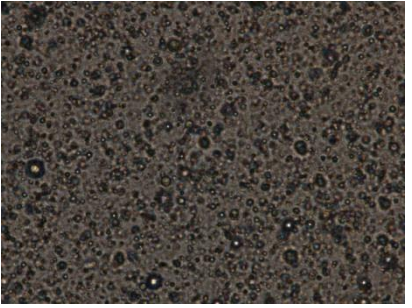
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_003	15 min			
	5 min			
	10 min			



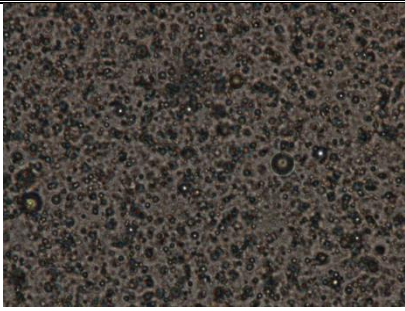



Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
	15 min			
Toc_005	5 min			
	10 min			



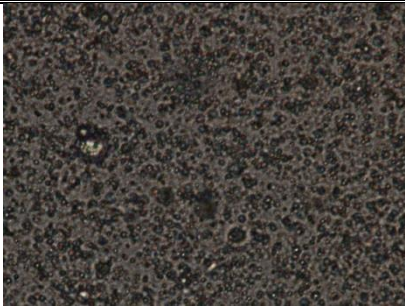
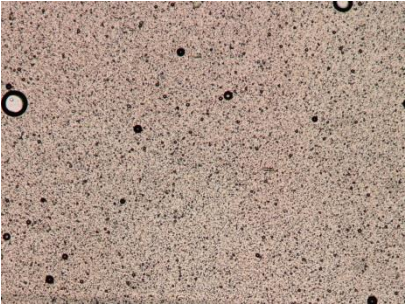
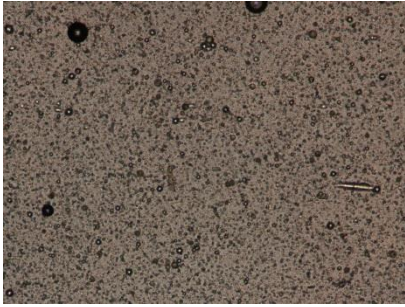
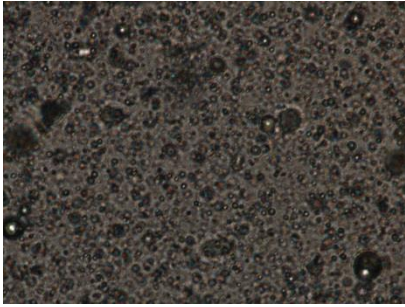
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
	15 min			
Toc_007	5 min			
	10 min			

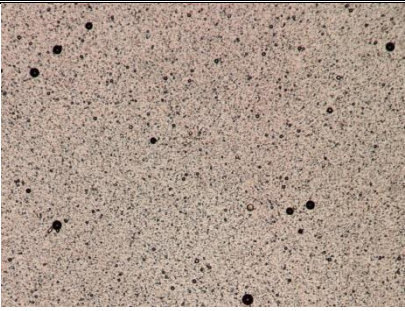
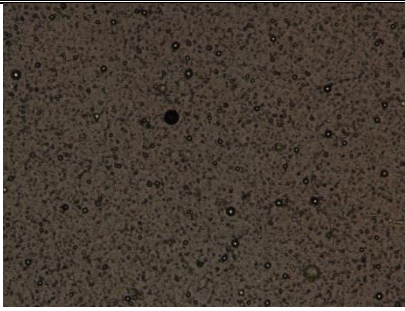
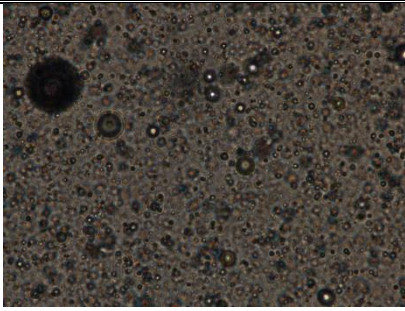


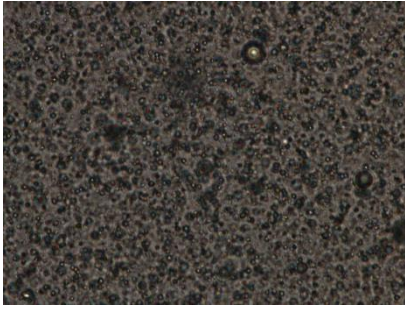
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_009	15 min			
	5 min			
	10 min			

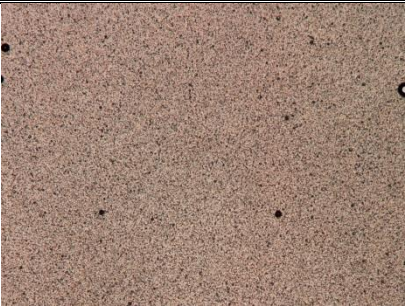

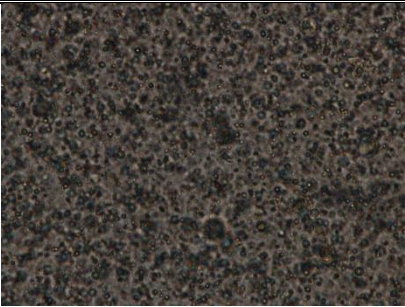


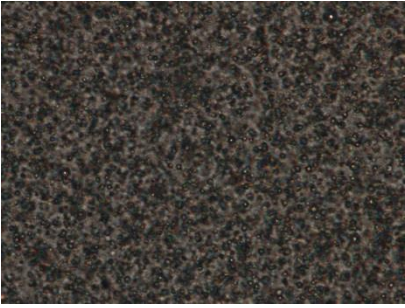
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
	15 min			
Toc_011	5 min	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>




Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				
	10 min	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				
	15 min	Batch1  Batch2	Batch1  Batch2	Batch1  Batch2

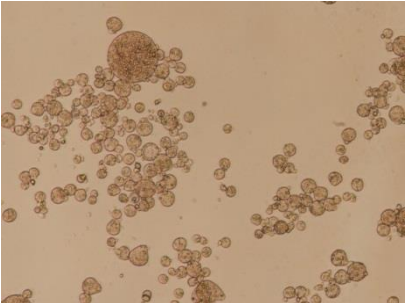
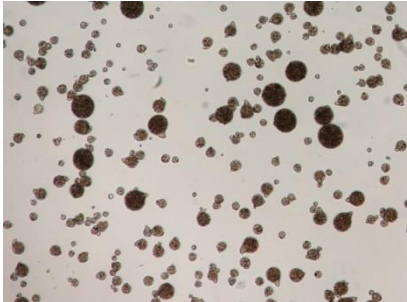
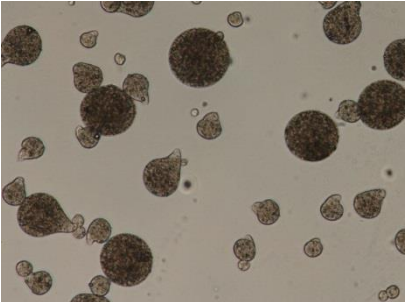
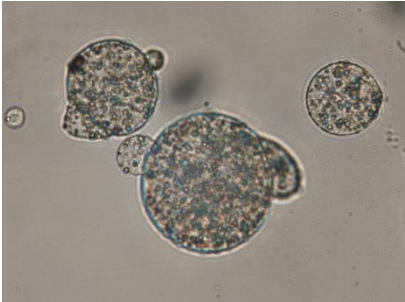
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				
Toc_013	5 min	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

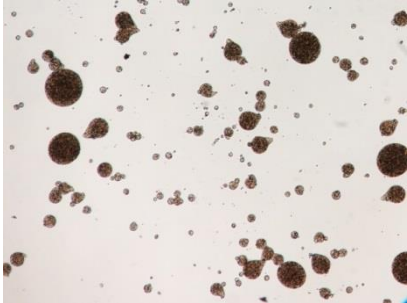
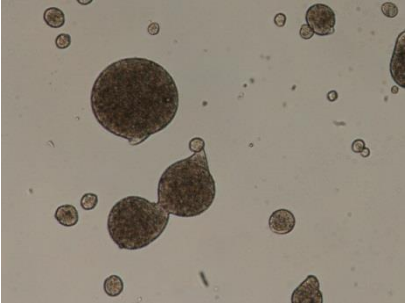
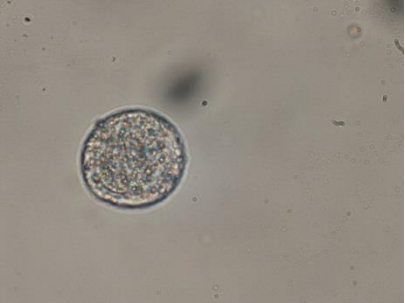
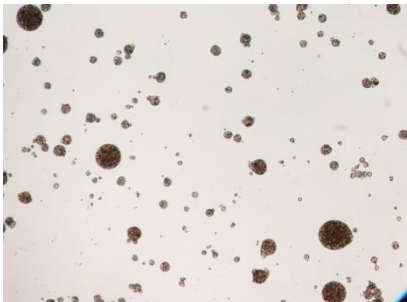
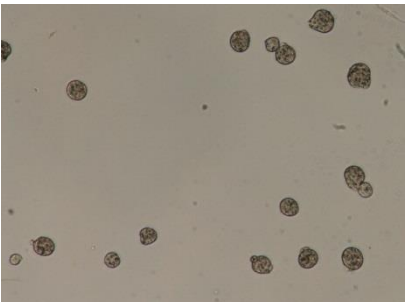

Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				
	<b>10 min</b>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

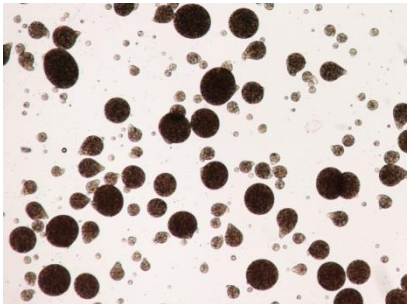
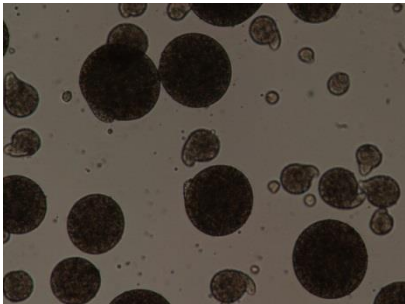
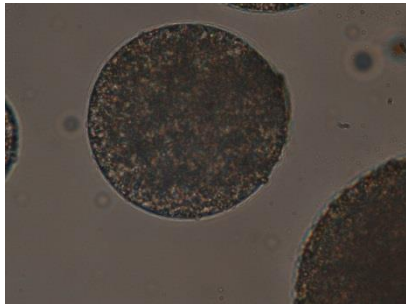
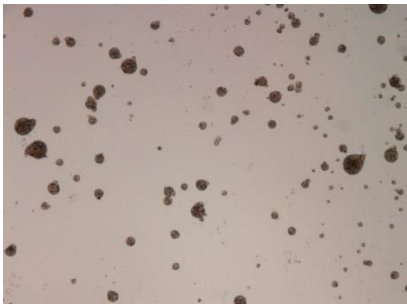
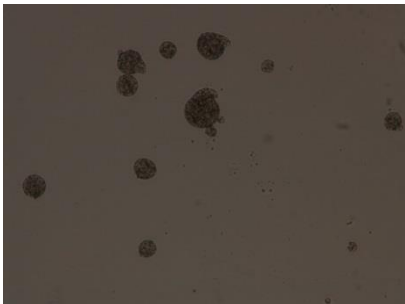
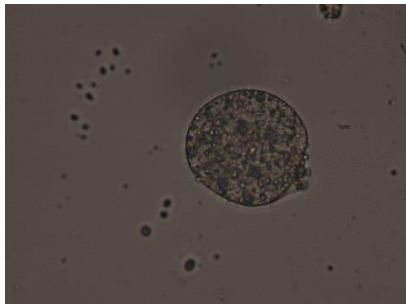
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				
	15 min	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

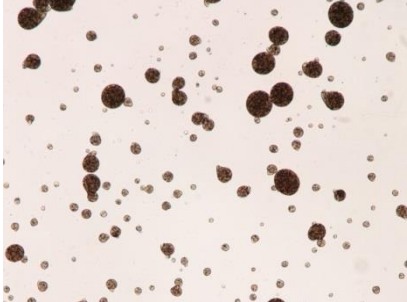
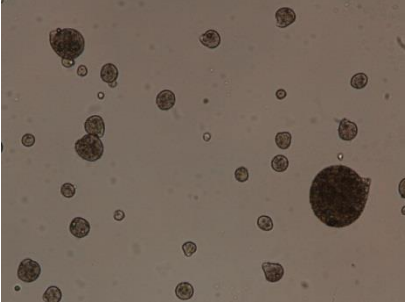
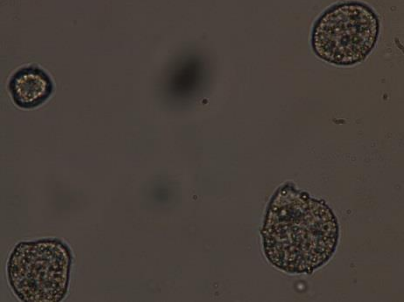
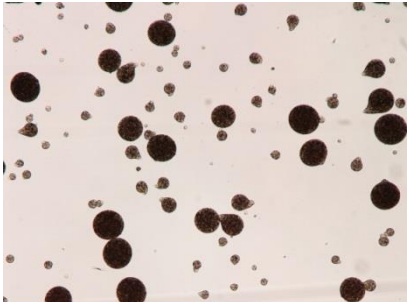
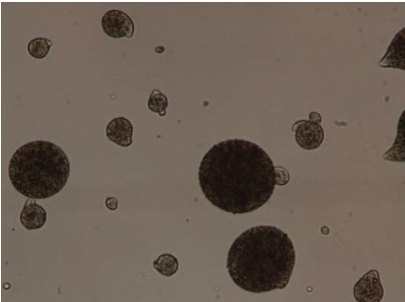
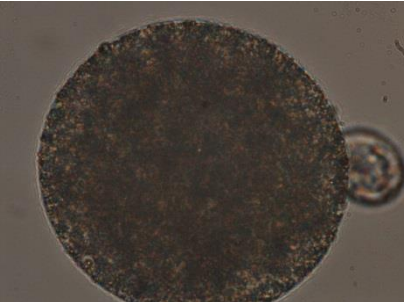
Ensaio	Tempo	Fotografia		
		Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
				

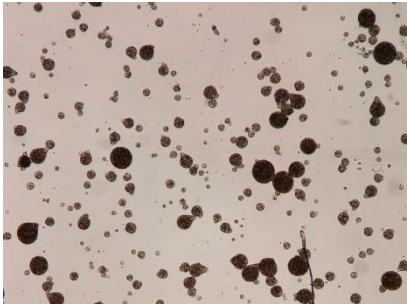
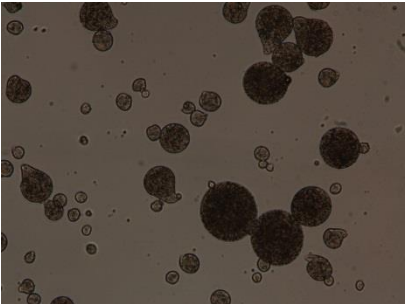
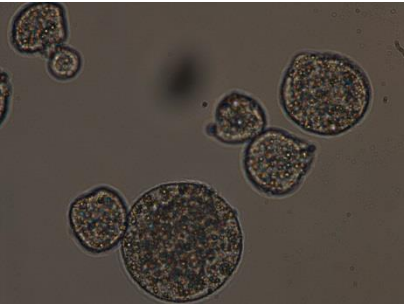
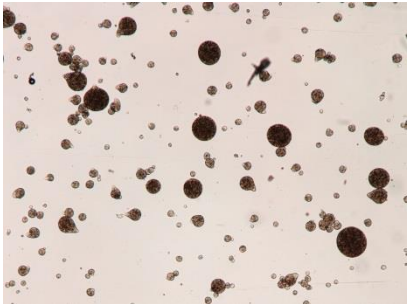
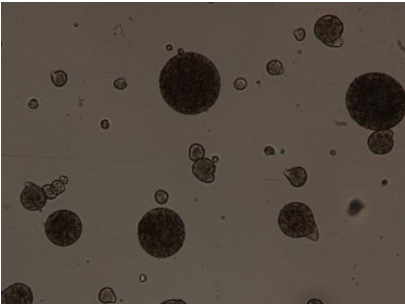
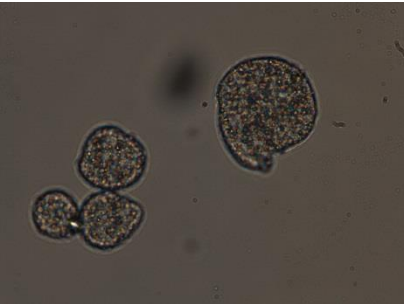
**Tabela A2:** Registo das MIC com princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de atomização.

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_001	n.a.		n.a.
Toc_002			

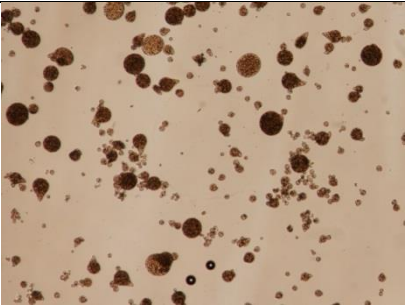
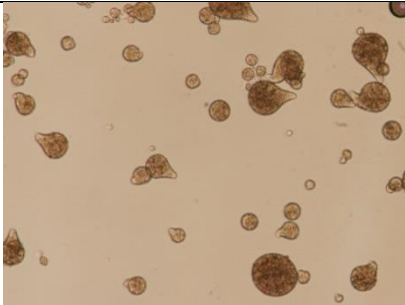
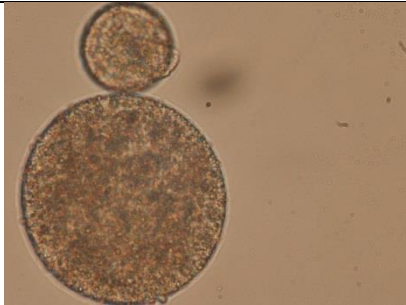
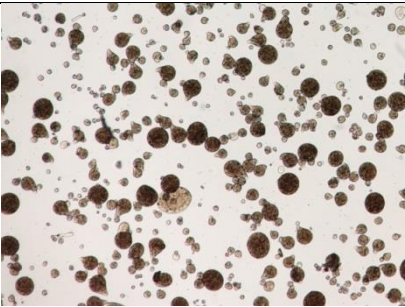
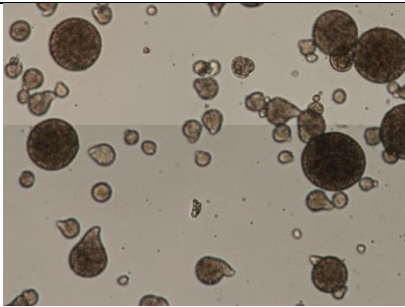
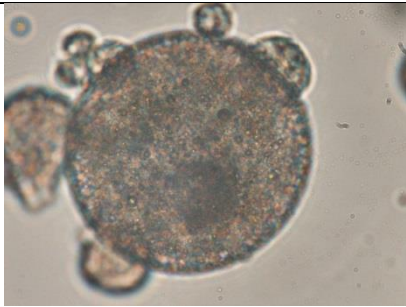
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_003			
Toc_005			

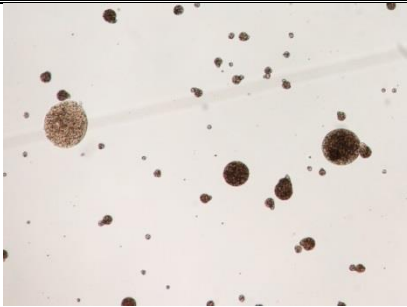
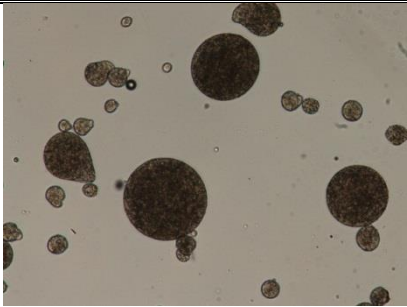
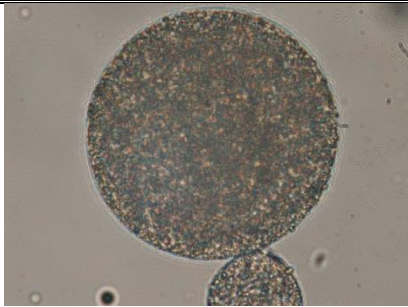
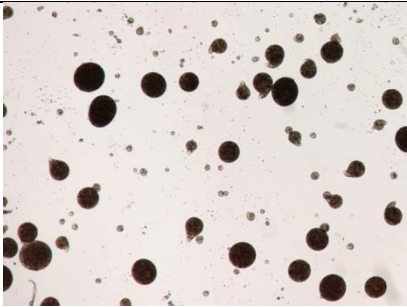
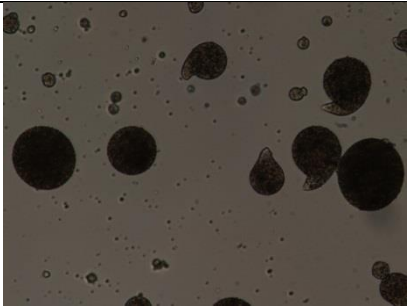
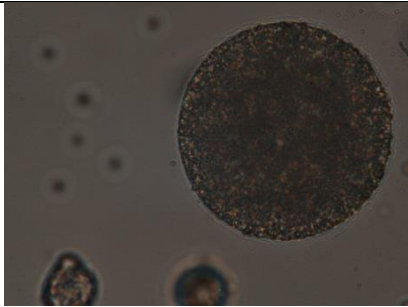
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_007			
Toc_009			



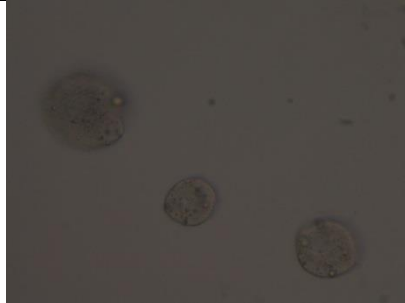
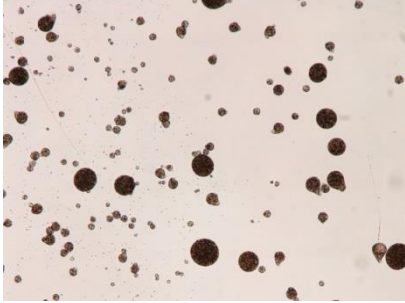
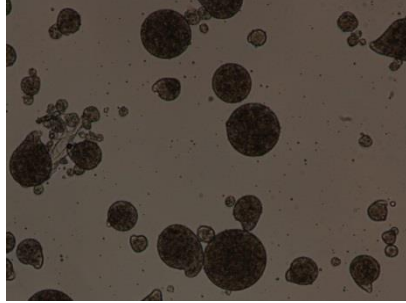
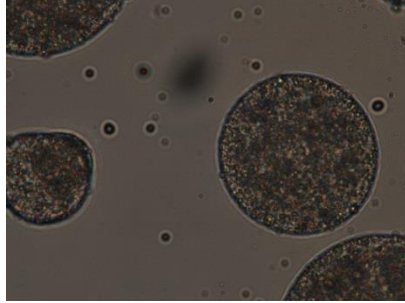
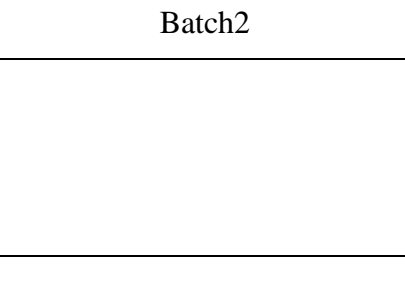
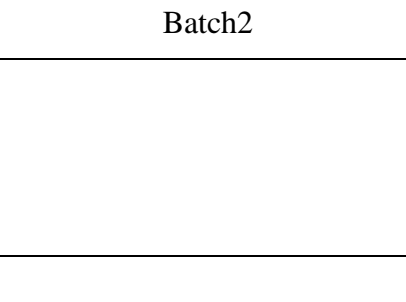
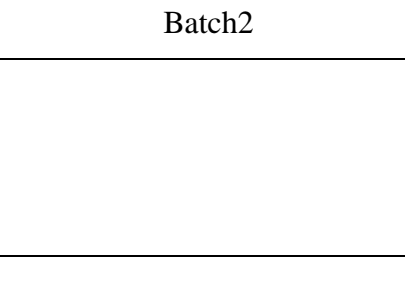
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_011	Batch1 	Batch1 	Batch1 
	Batch2 	Batch2 	Batch2 

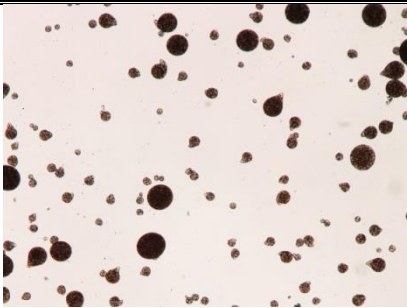
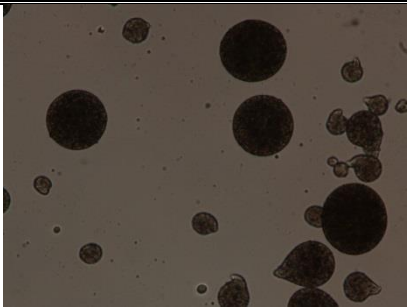
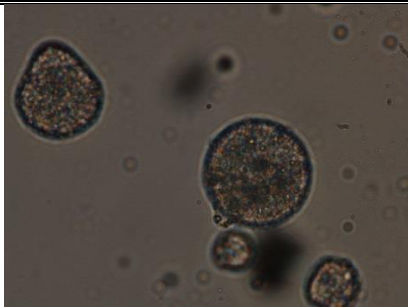
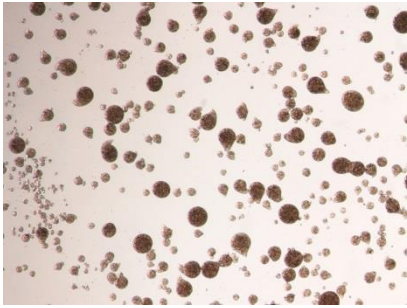
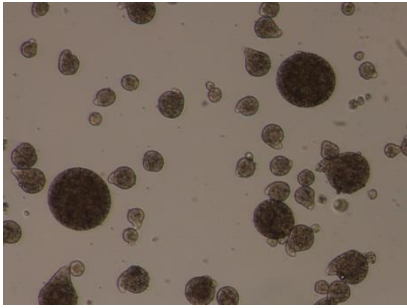
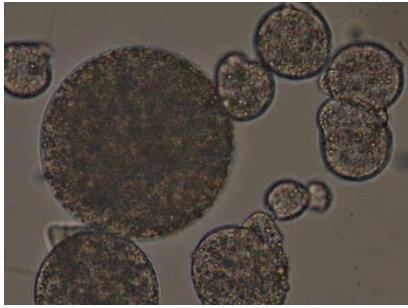
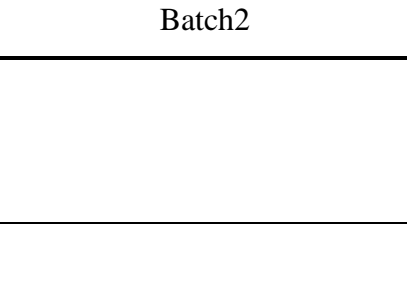
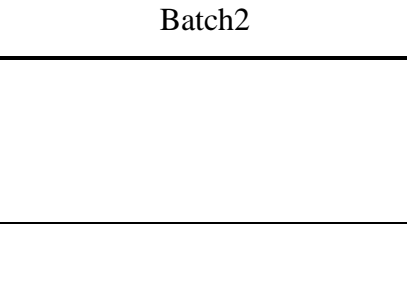
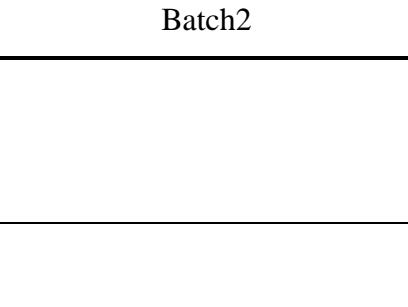
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_013	<p>Batch1</p> 	<p>Batch1</p> 	<p>Batch1</p> 
	<p>Batch2</p> 	<p>Batch2</p> 	<p>Batch2</p> 

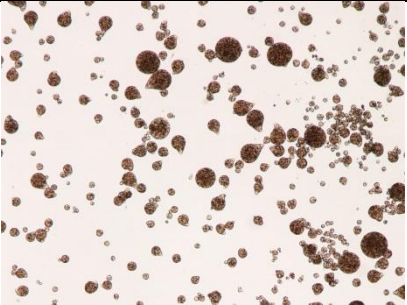
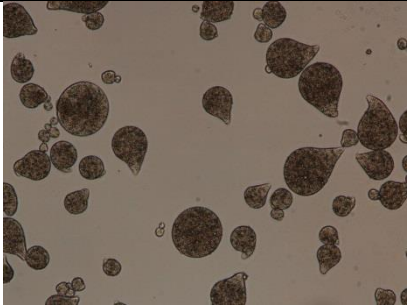
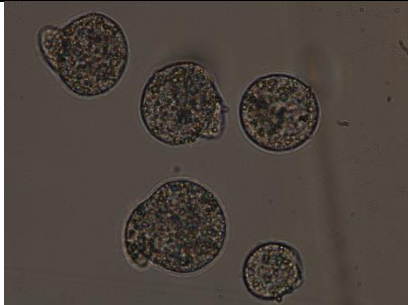
**Tabela A3:** Registo das MIC com princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de consolidação.

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_001			
Toc_002			

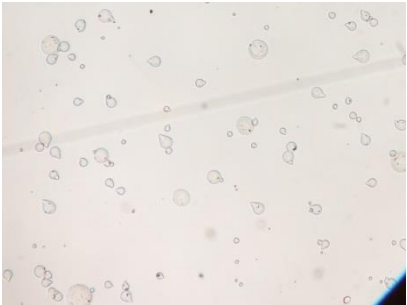
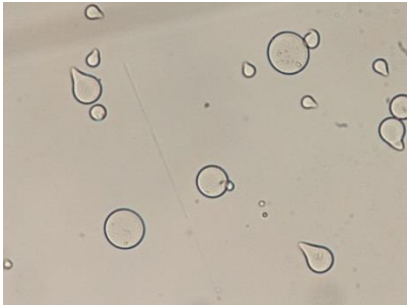

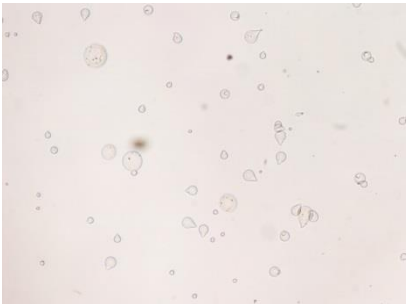
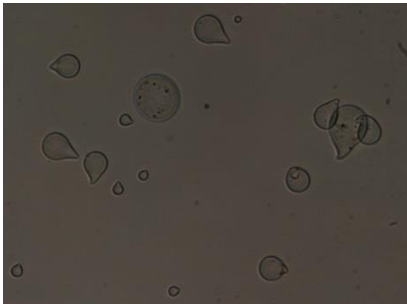
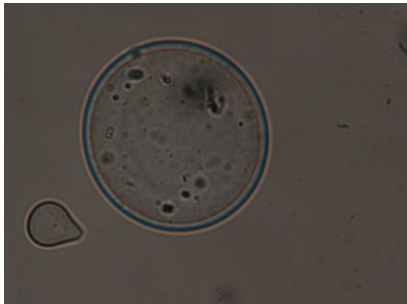
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_003			
Toc_005	n.a.	n.a.	n.a.
Toc_007			


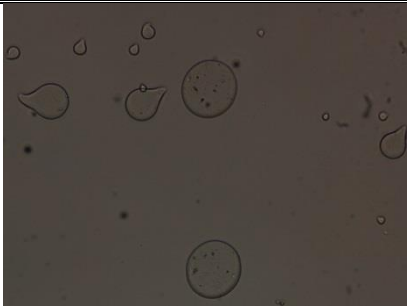
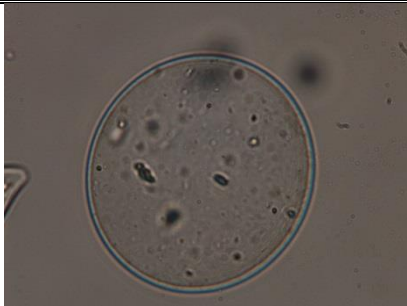
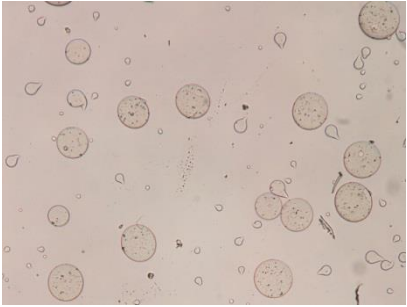
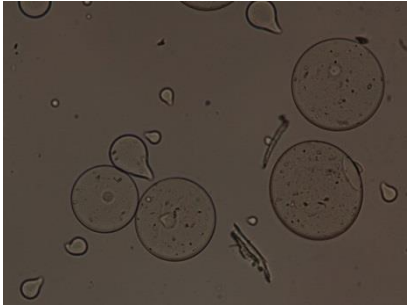
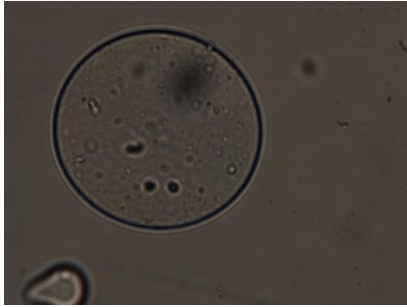
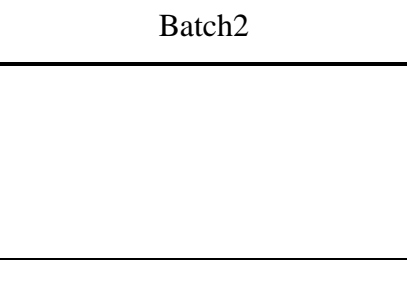
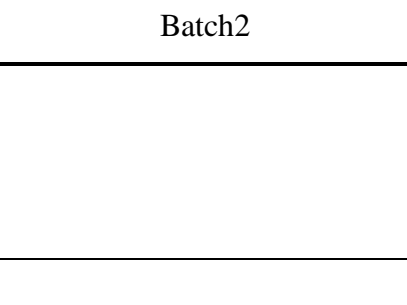
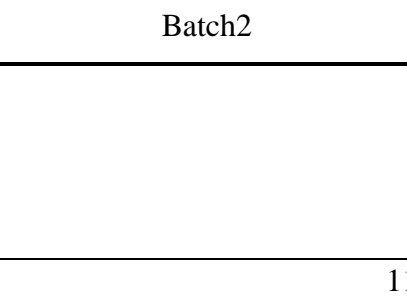
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Toc_009			
Toc_011	Batch1 	Batch1 	Batch1 
	Batch2 	Batch2 	Batch2 


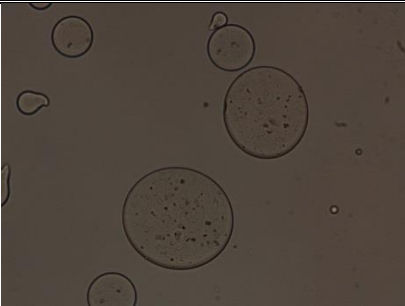

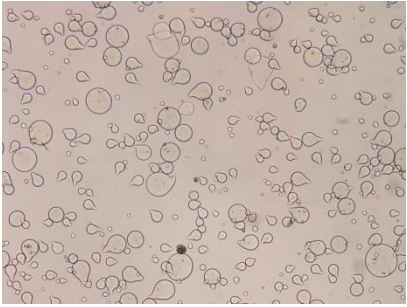
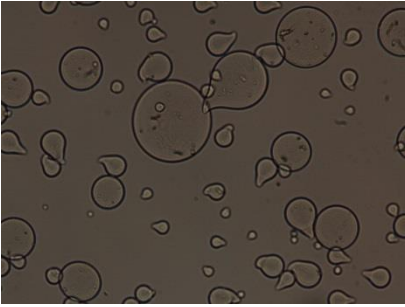
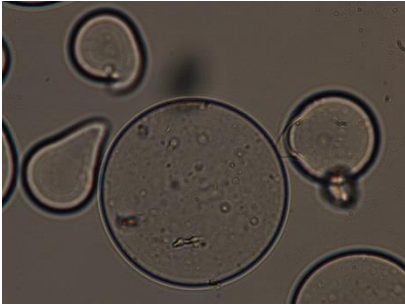
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			
Toc_013	Batch1 	Batch1 	Batch1 
	Batch2 	Batch2 	Batch2 



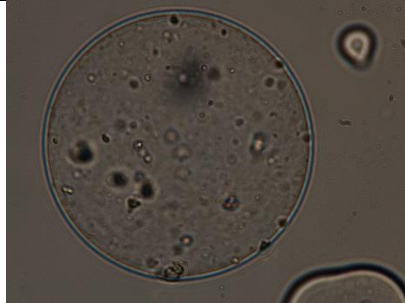
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			

**Tabela A4:** Registro das MIC sem princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de atomização.

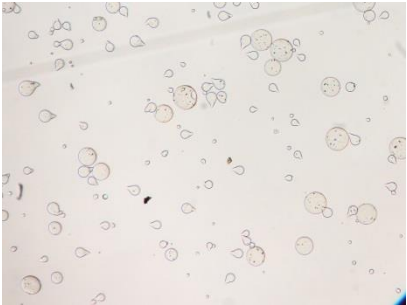
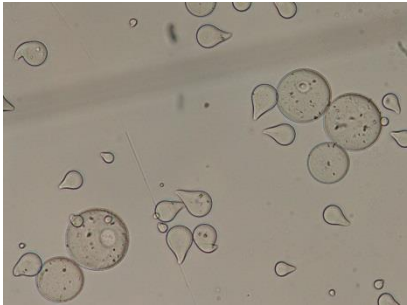

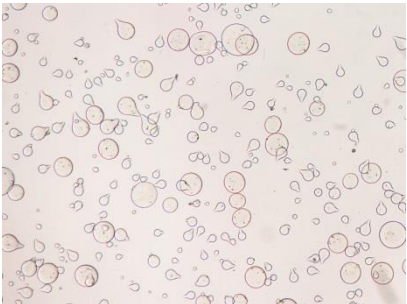
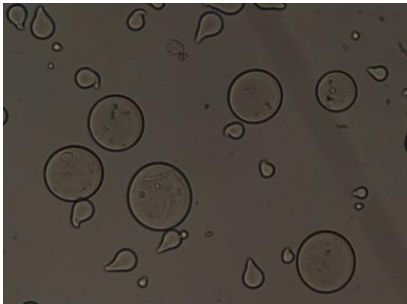
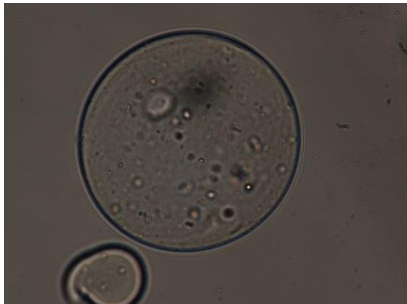
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Alg_004			
Alg_006			


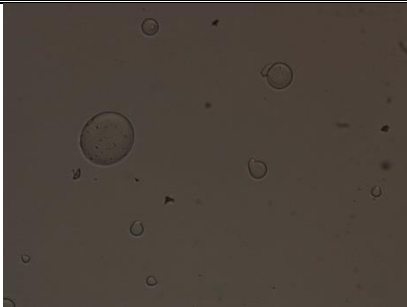
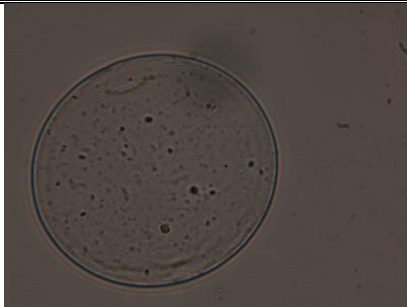
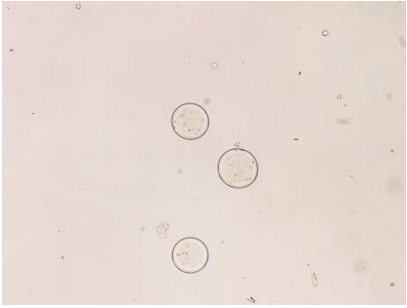
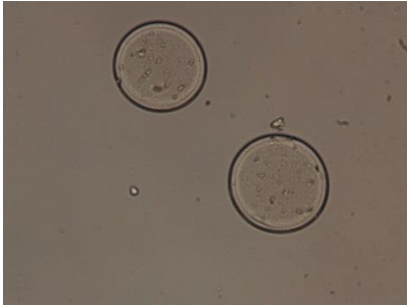
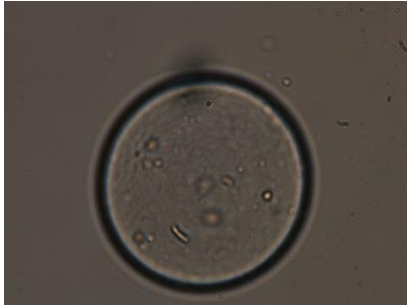
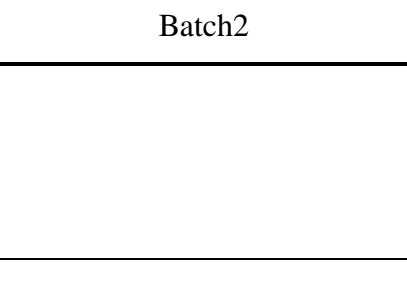
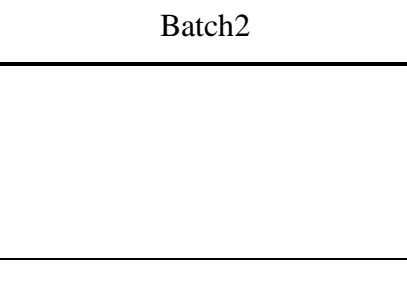
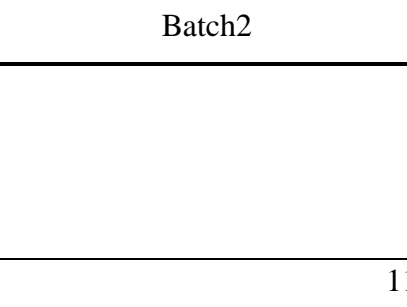
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Alg_008			
Alg_010	Batch1 	Batch1 	Batch1 
	Batch2 	Batch2 	Batch2 

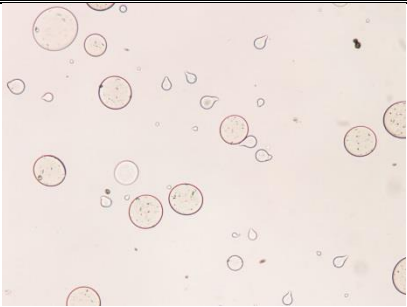
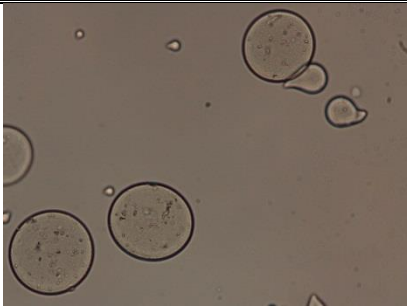
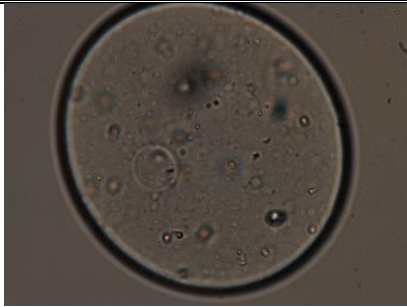
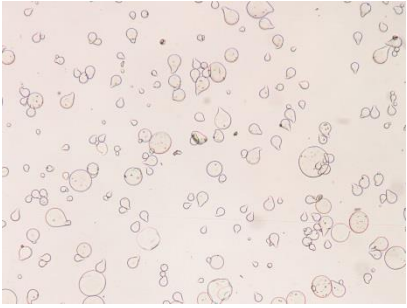
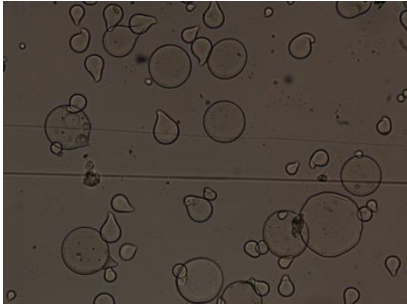
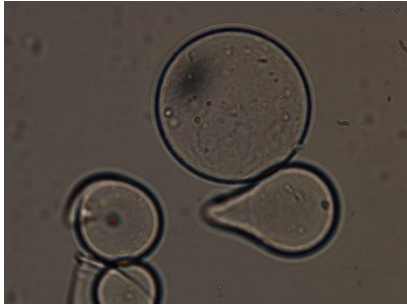
Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			
Alg_012	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

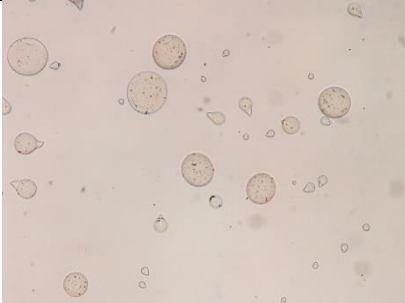
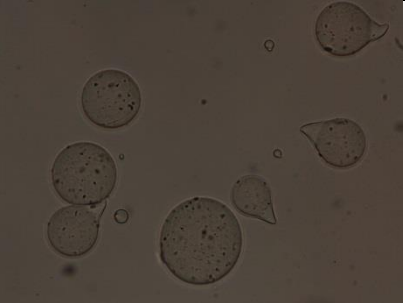

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			

**Tabela A5:** Registo das MIC sem princípio ativo para os diferentes ensaios após o processo de consolidação.

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Alg_004			
Alg_006			

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
Alg_008			
Alg_010	Batch1 	Batch1 	Batch1 
	Batch2 	Batch2 	Batch2 

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			
Alg_012	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>	<p>Batch1</p>  <p>Batch2</p>

Ensaio	Fotografia		
	Ampliação 40X	Ampliação 100X	Ampliação 400X
			



## Anexo B. Registo dos resultados para os ensaios de libertação

**Tabela B1:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_003 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 22,149 mg).

Tempo (h)	Abs1	Abs2	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,051	0,060	0,007	0,345	1,559
2	2,584	2,715	0,350	17,510	79,051
3	0,364	-	0,462	23,121	104,384

**Tabela B2:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_003 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 22,149 mg).

Tempo (h)	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,149	0,018	0,923	4,169
1	0,203	0,025	1,269	5,729
1,5	2,730	0,352	17,606	79,486
2	0,367	0,466	23,302	105,201
3,5	0,332	0,421	21,059	95,075
24	0,350	0,445	22,235	100,386

**Tabela B3:** Registro e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_005 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).

Tempo (h)	Abs-amostra	Abs-branco	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,0572	0	0,0572	0,00658	0,329	1,411
1	0,0850	0,0144	0,0706	0,00830	0,415	1,782
1,25	0,125	0,0152	0,110	0,0134	0,668	2,864
1,5	0,118	0,00643	0,112	0,0136	0,681	2,922
1,75	0,726	0,159	0,567	0,0725	3,625	15,551
2	0,245	0,0555	0,189	0,23617	11,809	50,659
3,5	0,268	0,0189	0,249	0,314	15,712	67,405
24	0,387	0,0374	0,350	0,444	22,189	95,190

**Tabela B4:** Registro e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_005 a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).

Tempo (h)	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,013	0,001	0,041	0,177
1,5	0,012	0,001	0,036	0,153
1,75	0,015	0,001	0,056	0,239
2	0,017	0,001	0,068	0,293
4	0,013	0,001	0,044	0,189
5	0,022	0,002	0,099	0,423
6	0,025	0,002	0,122	0,524
7	0,026	0,003	0,125	0,538
8	0,076	0,009	0,451	1,933
24	0,016	0,001	0,062	0,265

**Tabela B5:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_005 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 23,312 mg).

Tempo (h)	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0	0,000	0,014	0,058
1	0,006	0,001	0,050	0,214
1,5	2,110	0,273	13,654	58,576
2	2,491	0,322	16,114	69,130
2,25	2,611	0,338	16,892	72,466
2,5	2,774	0,359	17,945	76,983
2,75	2,830	0,366	18,307	78,539
3	0,457	0,594	29,702	127,423
4	0,473	0,614	30,678	131,610
24	0,399	0,519	25,947	111,311

**Tabela B6:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_007 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amos- tra</sub>	Abs- branco	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,012	0,002	0,011	0,002	0,083	0,485
1	0,022	0,005	0,017	0,002	0,123	0,719
1,25	0,018	0,062	0,000	0,000	0,014	0,080
1,5	0,019	0,013	0,006	0,001	0,052	0,307
1,75	0,018	0,005	0,013	0,002	0,096	0,564
2	0,017	0,005	0,013	0,002	0,094	0,553
3	0,184	0,011	0,174	0,023	1,138	6,665
4	1,229	0,036	1,192	0,154	7,721	45,229
24	2,518	0,348	2,170	0,281	14,042	82,260

**Tabela B7:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_007 a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0	0	0	0,0003	0,0136	0,0795
1	0,003	0,000	0,003	0,001	0,030	0,178
1,25	0,004	0,000	0,004	0,001	0,037	0,216
1,5	0,008	0,000	0,008	0,001	0,063	0,371
1,75	0,098	0,006	0,092	0,012	0,606	3,552
2	0,106	0,076	0,031	0,004	0,211	1,234
3	0,005	0,002	0,004	0,001	0,037	0,220
24	0,017	0,006	0,012	0,002	0,088	0,515

**Tabela B8:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_007 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 17,073 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,003	0,000	0,003	0,001	0,032	0,186
1	0,005	0,000	0,005	0,001	0,043	0,254
1,5	2,120	0,040	2,080	0,269	13,460	78,852
2	2,170	0,047	2,123	0,275	13,737	80,473
2,25	2,128	0,048	2,080	0,269	13,457	78,833
2,5	2,134	0,055	2,080	0,269	13,456	78,826
2,75	2,157	0,051	2,106	0,272	13,624	79,810
3	2,141	0,053	2,088	0,270	13,509	79,136
5	2,124	0,054	2,070	0,268	13,394	78,466
24	2,064	0,089	1,975	0,256	12,779	74,861
30	2,069	0,093	1,976	0,256	12,787	74,906
48	2,099	0,094	2,005	0,260	12,976	76,016
52	2,055	0,104	1,951	0,252	12,624	73,956

**Tabela B9:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_009 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,078	0,020	0,057	0,008	0,385	2,022
1	0,059	0,008	0,051	0,007	0,346	1,818
1,25	0,080	0,007	0,000	0,000	0,014	0,071
1,5	0,089	0,014	0,075	0,010	0,496	2,610
1,75	0,101	0,015	0,086	0,011	0,566	2,977
2	0,115	0,020	0,095	0,013	0,626	3,290
3	0,150	0,022	0,129	0,017	0,845	4,445
6	2,697	0,586	2,111	0,273	13,656	71,798
7	2,733	0,619	2,113	0,273	13,675	71,896
8	2,831	0,615	2,216	0,287	14,340	75,397
24	2,709	0,867	1,842	0,238	11,920	62,673

**Tabela B10:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_009 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 19,024 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,009	0,000	0,009	0,001	0,073	0,384
1	0,010	0,000	0,010	0,002	0,078	0,408
1,5	2,119	0,060	0,000	0,000	0,014	0,071
2	2,091	0,053	2,038	0,264	13,185	69,324
2,25	2,084	0,056	2,028	0,262	13,125	69,004
2,5	2,096	0,060	2,037	0,264	13,180	69,296
2,75	2,107	0,060	2,047	0,265	13,245	69,636
3	2,092	0,063	2,029	0,263	13,127	69,018
4	2,071	0,062	2,009	0,260	12,999	68,345
6	1,987	0,059	1,928	0,249	12,474	65,582
7	1,989	0,064	1,925	0,249	12,457	65,493
24	2,166	0,115	2,051	0,265	13,272	69,779

**Tabela B11:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,303	0,012	0,291	0,038	1,894	8,672
2	1,166	0,023	1,143	0,148	7,401	33,889
3	1,988	0,119	1,869	0,242	12,095	55,379
4	1,563	0,073	1,490	0,193	9,642	44,150
5	1,802	0,097	1,706	0,221	11,038	50,540
6	1,995	0,148	1,847	0,239	11,953	54,728
7	2,194	0,199	1,996	0,258	12,915	59,135
8	2,274	0,248	2,026	0,262	13,108	60,017
24	2,814	0,407	2,406	0,311	15,568	71,282

**Tabela B12:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,018	0,002	0,016	0,002	0,118	0,542
2	0,005	0,002	0,003	0,001	0,032	0,148
3	0,014	0,001	0,013	0,002	0,099	0,453
4	0,007	0,000	0,007	0,001	0,060	0,275
5	0,041	0,000	0,041	0,006	0,279	1,276
6	0,013	0,000	0,013	0,002	0,096	0,438
7	0,018	0,002	0,016	0,002	0,114	0,524
8	0,017	0,005	0,012	0,002	0,092	0,420
24	0,020	0,003	0,017	0,002	0,120	0,551

**Tabela B13:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,014	0,000	0,014	0,002	0,105	0,482
1	0,031	0,011	0,020	0,003	0,140	0,642
1,5	0,030	0,000	0,030	0,004	0,210	0,962
2	0,029	0,003	0,026	0,004	0,179	0,820
2,5	2,658	0,062	2,596	0,336	16,795	76,900
3	2,712	0,087	2,625	0,340	16,980	77,749
3,5	2,697	0,089	2,608	0,337	16,870	77,243
4	2,688	0,100	2,588	0,335	16,745	76,672
4,5	2,654	0,095	2,558	0,331	16,551	75,781
5	2,647	0,096	2,551	0,330	16,501	75,553
5,5	2,600	0,093	2,508	0,324	16,223	74,280
6	2,237	0,098	2,139	0,277	13,842	63,380
6,5	2,629	0,104	2,525	0,327	16,335	74,792
7	2,638	0,120	2,518	0,326	16,291	74,591
7,5	2,619	0,115	2,505	0,324	16,203	74,191
8	2,677	0,107	2,570	0,332	16,624	76,115
4 dias	2,567	0,098	2,470	0,320	15,977	73,153

**Tabela B14:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 liofilizadas a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,065	0,000	0,065	0,009	0,436	1,995
2	0,732	0,021	0,711	0,092	4,609	21,103
3	1,902	0,027	1,875	0,243	12,133	55,554
4	2,653	0,110	2,543	0,329	16,452	75,331
5	1,822	0,135	1,687	0,218	10,918	49,990
6	2,599	0,154	2,445	0,316	15,818	72,427
7	2,754	0,241	2,513	0,325	16,260	74,449
8	2,778	0,259	2,520	0,326	16,302	74,644
24	2,728	0,317	2,412	0,312	15,602	71,439

**Tabela B15:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 liofilizadas a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,088	0,000	0,088	0,012	0,582	2,667
2	0,017	0,000	0,017	0,002	0,123	0,562
3	0,047	0,000	0,047	0,006	0,318	1,456
4	0,059	0,007	0,053	0,007	0,355	1,625
5	0,060	0,001	0,060	0,008	0,399	1,829
6	0,033	0,007	0,027	0,004	0,187	0,855
7	0,043	0,009	0,034	0,005	0,236	1,080
8	0,057	0,012	0,045	0,006	0,303	1,385
24	0,009	0,001	0,008	0,001	0,065	0,299

**Tabela B16:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_011 liofilizadas a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,842 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0	0	0	0,000	0,014	0,062
1	0,003	0,000	0,003	0,001	0,036	0,163
1,5	0,002	0,000	0,002	0,000	0,024	0,110
2	0,002	0,000	0,002	0,001	0,027	0,121
2,5	2,165	0,051	2,114	0,274	13,679	62,631
3	2,144	0,055	2,089	0,270	13,516	61,888
3,5	2,100	0,043	2,058	0,266	13,313	60,959
4	2,149	0,045	2,105	0,272	13,619	62,358
4,5	2,145	0,046	2,099	0,272	13,584	62,199
5	2,124	0,043	2,081	0,269	13,465	61,651
5,5	2,140	0,041	2,099	0,272	13,581	62,184
6	2,126	0,042	2,084	0,270	13,483	61,737
6,5	2,171	0,051	2,120	0,274	13,716	62,802
7	2,135	0,048	2,087	0,270	13,503	61,829
7,5	2,150	0,051	2,099	0,272	13,579	62,175
8	2,147	0,045	2,102	0,272	13,602	62,279
24	2,084	0,052	2,032	0,263	13,150	60,213

**Tabela B17:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0	0	0	0	0,0003	0,0136	0,0646
1	0,1065	0,0000	0,1065	0,0140	0,7020	3,3412
2	1,3469	0,0722	1,2747	0,1651	8,2533	39,2827
3	2,3032	0,1695	2,1337	0,2761	13,8059	65,7111
4	2,6149	0,3365	2,2784	0,2948	14,7412	70,1630
5	2,4592	0,1922	2,2670	0,2934	14,6676	69,8123
6	2,5119	0,2813	2,2306	0,2886	14,4323	68,6924
7	2,5321	0,2906	2,2415	0,2901	14,5027	69,0277
8	2,5322	0,3389	2,1933	0,2838	14,1912	67,5448
24	2,6784	0,3762	2,3022	0,2979	14,8951	70,8952

**Tabela B18:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0	0	0	0	0,0003	0,0136	0,0646
1	0,0069	0,0000	0,0069	0,0012	0,0582	0,2769
2	0,0176	0,0003	0,0173	0,0025	0,1254	0,5969
3	0,0082	0,0023	0,0059	0,0010	0,0517	0,2461
4	0,0130	0,0000	0,0130	0,0020	0,0976	0,4646
5	0,0207	0,0000	0,0207	0,0029	0,1474	0,7015
6	0,0168	0,0000	0,0168	0,0024	0,1222	0,5815
7	0,0318	0,0007	0,0311	0,0043	0,2146	1,0214
8	0,0431	0,0053	0,0378	0,0052	0,2579	1,2276
24	0,0517	0,0008	0,0509	0,0069	0,3426	1,6306

**Tabela B19:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0	0	0	0	0,0003	0,0136	0,0646
0,5	0,0050	0,0000	0,0050	0,0009	0,0459	0,2184
1	0,0024	0,0000	0,0024	0,0006	0,0291	0,1384
1,5	0,0054	0,0000	0,0054	0,0010	0,0485	0,2307
2	0,0099	0,0000	0,0099	0,0016	0,0776	0,3692
2,5	2,3383	0,0630	2,2753	0,2944	14,7212	70,0676
3	2,5674	0,0826	2,4848	0,3215	16,0754	76,5132
3,5	2,5858	0,0794	2,5064	0,3243	16,2150	77,1778
4	2,5738	0,0831	2,4907	0,3223	16,1136	76,6947
4,5	2,5797	0,0832	2,4965	0,3230	16,1511	76,8732
5	2,5624	0,0815	2,4809	0,3210	16,0502	76,3932
5,5	2,5460	0,0815	2,4645	0,3189	15,9442	75,8886
6	2,5309	0,0860	2,4449	0,3164	15,8175	75,2856
6,5	2,5216	0,0847	2,4369	0,3153	15,7658	75,0395
7	2,5087	0,0871	2,4216	0,3133	15,6669	74,5688
7,5	2,5143	0,0863	2,4280	0,3142	15,7083	74,7657
8	2,5296	0,0921	2,4375	0,3154	15,7697	75,0579
24	2,5108	0,0798	2,4310	0,3146	15,7277	74,8580

**Tabela B20:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 liofilizadas a pH=7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,072	0,000	0,072	0,010	0,476	2,264
2	0,058	0,000	0,058	0,008	0,389	1,852
3	1,230	0,069	1,161	0,150	7,516	35,772
4	1,855	0,159	1,696	0,220	10,979	52,257
5	2,276	0,204	2,072	0,268	13,408	63,819
6	1,862	0,213	1,649	0,213	10,671	50,789
7	2,436	0,287	2,150	0,278	13,908	66,197
8	2,737	0,318	2,419	0,313	15,652	74,498
24	2,520	0,401	2,119	0,274	13,709	65,250

**Tabela B21:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 liofilizadas a pH=1,2 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
1	0,013	0,001	0,012	0,002	0,089	0,422
2	0,021	0,000	0,020	0,003	0,145	0,692
3	0,019	0,003	0,016	0,002	0,114	0,545
4	0,022	0,000	0,022	0,003	0,157	0,748
5	0,025	0,001	0,024	0,003	0,169	0,806
6	0,025	0,001	0,024	0,003	0,169	0,803
7	0,023	0,002	0,021	0,003	0,147	0,701
8	0,027	0,002	0,025	0,004	0,175	0,834
24	0,028	0,000	0,028	0,004	0,192	0,914

**Tabela B22:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 liofilizadas a pH=1,2 e 7,4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,007	0,005	0,003	0,001	0,030	0,142
1	0,005	0,000	0,005	0,001	0,045	0,215
1,5	0,018	0,000	0,018	0,003	0,128	0,609
2	0,010	0,000	0,010	0,002	0,079	0,375
2,5	2,859	0,067	2,792	0,361	18,061	85,965
3	2,839	0,087	2,752	0,356	17,803	84,737
3,5	2,856	0,089	2,767	0,358	17,898	85,189
4	2,828	0,085	2,743	0,355	17,746	84,463
4,5	2,813	0,083	2,731	0,353	17,665	84,079
5	2,813	0,082	2,731	0,353	17,669	84,100
5,5	2,744	0,109	2,635	0,341	17,049	81,147
6	2,762	0,086	2,676	0,346	17,313	82,405
6,5	2,704	0,085	2,619	0,339	16,942	80,636
7	2,692	0,089	2,603	0,337	16,836	80,134
7,5	2,698	0,088	2,610	0,338	16,883	80,359
8	2,694	0,099	2,595	0,336	16,787	79,901
24	2,701	0,098	2,603	0,337	16,837	80,137

**Tabela B23:** Registo e tratamento dos resultados experimentais para o ensaio realizado com a amostra Toc\_013 liofilizadas a pH=1,2 e 7.4 (massa inicial de  $\alpha$ -tocoferol incorporado = 21,012 mg).

Tempo (h)	Abs <sub>amostra</sub>	Abs <sub>branco</sub>	Abs	C (mg/mL)	m (mg)	% (m/m)
0,5	0,013	0,001	0,013	0,002	0,094	0,526
1	0,011	0,007	0,003	0,001	0,035	0,194
1,5	0,014	0,002	0,012	0,002	0,093	0,519
2	0,015	0,004	0,010	0,002	0,080	0,447
2,5	2,402	0,011	2,391	0,309	15,468	86,175
3	2,419	0,007	2,413	0,312	15,609	86,957
3,5	2,424	0,008	2,416	0,313	15,632	87,086
4	2,402	0,010	2,393	0,310	15,479	86,233
4,5	2,388	0,004	2,384	0,308	15,422	85,916
5	2,362	0,000	2,362	0,306	15,279	85,120
5,5	2,377	0,000	2,376	0,307	15,374	85,649
6	2,366	0,001	2,364	0,306	15,297	85,221
6,5	2,354	0,000	2,354	0,305	15,233	84,861
7	2,362	0,000	2,362	0,306	15,282	85,138
7,5	2,348	0,001	2,347	0,304	15,186	84,602
8	2,347	0,002	2,345	0,303	15,169	84,504
24	2,272	0,071	2,201	0,285	14,239	79,326

**Anexo C. Resumo do congresso 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (Porto, Setembro de 2014).**



**10 – 12 Sept. 2014**

**PORTO**

**PORTUGAL**



**12<sup>th</sup> International Chemical and Biological  
Engineering Conference**

**BOOK OF  
EXTENDED ABSTRACTS**



**TABLE OF CONTENTS - POSTER SESSION - BIOLOGICAL ENGINEERING**

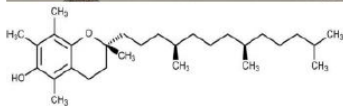
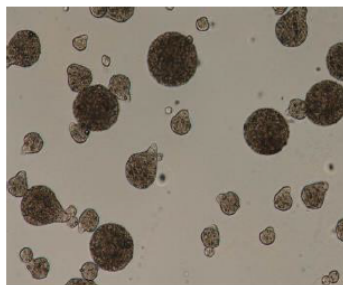
<b>10. POSTER SESSION - BIOLOGICAL ENGINEERING</b>	<b>10-1</b>
<b>Comparative study of <i>Candida guilliermondii</i> and <i>Pichia stipitis</i> fermentation on olive pruning dilute acid hemicellulosic hydrolysate</b>	<b>10-2</b>
P-BE1 J.G. Puentes, B.G. Fonseca, S. Mateo, I.C. Roberto, A.J. Moya, S. Sánchez	
<b>Bioethanol Production: Adaptation of <i>Scheffersomyces stipitis</i> to Hardwood Spent Sulfite Liquor</b>	<b>10-5</b>
P-BE2 C.J.R. Frazão, S.R. Pereira, V. Sánchez i Nogué, L.S. Serafim, M.F. Gorwa-Grauslund, A.M.R.B. Xavier	
<b>Characterisation of a Bacterium Isolated From a Minimally Processed Vegetables Plant Including its Antimicrobial Resistance</b>	<b>10-8</b>
P-BE3 A. Meireles, R. Fulgêncio, I. Machado, F. Mergulhão, L. Melo, M. Simões	
<b>Bioflocculation Assessment of Mixed Cultures of Selected Microalgae and Cyanobacteria</b>	<b>10-11</b>
P-BE4 A.L. Gonçalves, J.A. Loureiro, J.C.M. Pires, M. Simões	
<b>Immobilization of whole cells of <i>Yarrowia lipolytica</i> for citric acid production</b>	<b>10-14</b>
P-BE5 A. Gonçalves, A. Braga, P. Ferreira, I. Belo	
<b>Development of An Image Analysis Methodology For Animal Cell Cultures Characterization</b>	<b>10-17</b>
P-BE6 A.L. Amaral, D.P. Mesquita, M. Xavier, L. Rodrigues, L. Kluskens, E.C. Ferreira	
<b>Effect of Size and Oxidation in Biocompatibility of Graphene-based Materials</b>	<b>10-20</b>
P-BE8 A. Pinto, G. Carolina, D. Sousa, A. Moreira, I. Gonçalves, F. Magalhães	
<b>Biorecovery of Heavy Metals Using Vermiculite for Sediment and Water Protection</b>	<b>10-23</b>
P-BE9 C. Ferronato, B. Silva, F. Costa, L.V. Antisari, T. Tavares	

- 
- Sucrose hydrolysis by immobilized invertase in Duolite A-568 employing a packed bed reactor 10-26  
P-BE10  
B.V. Cabral, L.N.S.S. Falleiros, T.S. Carmo, L.D.S. Marquez, M.M. Resende, V.L. Cardoso, E.J. Ribeiro
- Use of Hardwood Sulphite Spent Liquor For Polyhydroxyalkanoate Production By Mixed Microbial Culture 10-29  
P-BE11  
D. Queirós, A. Fonseca, C. Rangel, S. Rossetti, L.S. Serafim
- Fermentation in Two Operation Scales of Enzymatic Hydrolysates of Industrial Lignocellulosic Materials for the Production of Bioethanol 10-32  
P-BE12  
C.V.T. Mendes, M.G.V.S. Carvalho, J.M.S. Rocha
- Influence of Different Photoperiods on Growth of the green microalgae *Chromochloris zofingiensis* 10-35  
P-BE13  
C. Silva, N. Caetano, A. Mendes
- Study of the encapsulation efficiency and release profiles of alginate microspheres containing  $\alpha$ -tocopherol** 10-38  
P-BE14  
D. Vieira, J.S. Amaral, M.F. Barreiro
- Game *tabulae* at the Convento de Cristo in Tomar – study of biological colonization 10-40  
P-BE15  
D.M.R. Mateus, S. da Ponte, J.P.F. Coroado, F.J.F.T. Rocha
- Study of Ni (II) and Diethylketone Removal from Aqueous Solutions Using a Biofilm of *Streptococcus equisimilis* Supported on Vermiculite 10-43  
P-BE16  
F. Costa, B. Silva, C. Quintelas, T. Tavares
- Effects of the Temperature and Broth Composition on Ethanol Production from Sugarcane Bagasse and Crude Enzymatic Extract 10-46  
P-BE17  
J. Fischer, V. dos S. Lopes, E.F.Q. Santos, E.J. Ribeiro, U.C. Filho, V.L. Cardoso, C.M.A. Galvão, J.C. Teodoro
- Ethanol production via crude enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse treated with a pressurized batch hot water reactor 10-49  
P-BE18  
J. Fischer, E.F.Q. Santos, V. dos S. Lopes, E.J. Ribeiro, U.C. Filho, V.L. Cardoso

## Study of the encapsulation efficiency and release profiles of alginate microspheres containing $\alpha$ -tocopherol

P-BE14

*D. Vieira<sup>1</sup>, J.S. Amaral<sup>2</sup>, M.F. Barreiro<sup>1,\*</sup> (1) LSRE, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857, Bragança, Portugal, (2) ESTiG, Polytechnic Institute of Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857, Bragança, Portugal and REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-31, Porto, Portugal \*barreiro@ipb.pt.*



Vitamin E, a lipophilic natural antioxidant comprising different vitamers ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocopherols and tocotrienols), is frequently used in food supplements and added in different products, such as foodstuffs and cosmetics, to prevent lipid oxidation processes. Due to solubility and stability issues,  $\alpha$ -tocopherol is generally administrated as succinate or acetate derivatives, which have lower bioavailability. In this work, alginate microspheres containing  $\alpha$ -tocopherol were produced and evaluated for encapsulation efficiency and release profiles at different pH conditions during 24h. In vitro release tests showed that alginate microspheres maintain its integrity under simulated gastric conditions. By the contrary, under simulated intestinal conditions, an almost complete release is achieved during 24h, with a major portion (70%) being released after 2h.

### Introduction

Vitamin E is a known lipophilic natural antioxidant since it has the capacity of scavenging free radicals, being particularly important in the prevention of lipid oxidation processes. Vitamin E encompasses different compounds presenting a chromanol ring and a saturated ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherols) or unsaturated ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienols) phytol side chain. These compounds are believed to be involved in a diversity of physiological and biochemical functions, mainly due to their action as antioxidants but also because they can act as membrane stabilizers, thus generating different health benefits. The recommended ingestion of Vitamin E varies among the countries and according to criteria such as sex and age. In the USA, the recommended daily allowance (RDA) for an adult is 15 mg/day, whereas in Europe it is 4-15 and 3-12 mg  $\alpha$ -tocopherol/day for man and women, respectively. Among the referred compounds, much attention has been given to  $\alpha$ -tocopherol since it is considered as the one presenting the highest capacity of free radicals uptake [1].  $\alpha$ -Tocopherol is naturally present in several foods, such as vegetable oils, tree nuts, seeds, among others. Owing to its antioxidant capacity it is frequently included in supplements and used in the food industry being added to several foodstuffs in order to extend its shelf-life. Nevertheless, due to  $\alpha$ -tocopherol instability and sensitivity towards oxygen and light, vitamin E, either present in supplements or added in foods, is generally administered in the most stable form of  $\alpha$ -tocopherol, namely as acetate or succinate.

However, these forms are considered to have a lower intestinal absorption compared to  $\alpha$ -tocopherol [2]. In this way, microencapsulation could be an interesting approach, protecting the compound from its surrounding environment, avoiding its degradation, and allowing the incorporation of  $\alpha$ -tocopherol in its natural form.

In this study, microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol was tested using alginate as a polymeric matrix. This polymer, a linear polysaccharide obtained from brown algae consisting of  $\beta$ -mannuronic acid and  $\alpha$ -guluronic acid units, was chosen due to its biocompatibility, biodegradability and non-toxicity. Moreover, it presents a high stability at acidic pH, being easily swollen under mild alkali conditions [3]. In this work, alginate microspheres (ME) loaded with  $\alpha$ -tocopherol were produced using a NISCO Var J30 atomization unit, following a previously optimized methodology [4]. The produced microspheres were then evaluated for encapsulation efficiency and active principle release profile at different pH values (pH=1.2 and pH=7.4) simulating stomach and intestinal conditions.

### Materials and Methods

#### Alginate microspheres preparation

Sodium alginate solution (3%, w/v) was prepared by dissolving alginate in deionised water and stirring overnight (200 rpm at 50°C). Subsequently, an oil-in-water (o/w) emulsion was prepared as follows: 10 mL of alginate solution were measured into a Falcon conic test tube, added with 0.2 g of  $\alpha$ -tocopherol, 0.25 mL of an emulsifier solution (Tween 20 (HLB=16.7) at 2%,

v/v) and additional 20 mL of the alginate solution. The prepared mixture was homogenized at 11400 rpm during 15 min using a CAT Unidrive ultraturax resulting in a fine divided emulsion which was then atomized using a NISCO Var J30 unit operating at a pressure of 0.1 bar and a flow rate of 0.3 mL/min. The obtained ME were consolidated upon contact with 250 mL of a CaCl<sub>2</sub> (4%, w/v) coagulation solution during 20h. After consolidation, ME were recovered by filtration, washed with deionised water and observed by optical microscopy (OM).

#### Encapsulation Efficiency

The encapsulation efficiency (E.E.) was determined by the indirect method, based on the quantification of the nonencapsulated  $\alpha$ -tocopherol present in the coagulation solution and in the wash solution.  $\alpha$ -Tocopherol was quantified by spectrophotometry by measuring the absorbance at 297 nm. The amount of encapsulated  $\alpha$ -tocopherol was calculated by difference, considering the maximum theoretical amount of  $\alpha$ -tocopherol in the atomized emulsion volume.

#### Release profiles of $\alpha$ -tocopherol

$\alpha$ -Tocopherol release into simulated gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 7.4) media [5,6] was determined by mixing 1 g of ME into 50 mL release media. The suspension was stirred at 100 rpm to ensure good contact between microspheres and media, and samples were periodically collected during a total of 24h. Each sample (5 mL) was centrifuged at 2000 rpm for 1 min and the amount of  $\alpha$ -tocopherol in the supernatant was determined by spectrophotometry. After reading the absorbance, the sample was gently homogenized and reintroduced in the flask containing the ME suspension.

#### Results and Discussion

The produced ME were individualized and had a spherical shape when visualized by MO (data not shown). Table 1 presents the encapsulation efficiency results obtained for different assays.

#### Acknowledgements

Financial support was provided by FCT and FEDER under Programme COMPETE (Project PEst-C/EQB/LA0020/2013).

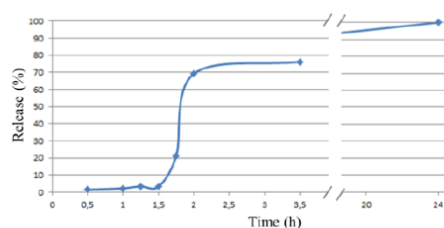
#### References

- [1] W. Dayong, M. Meydani, A.A. Beharka, M. Serafini, K.R. Martin, S.N. Meydani, *Free Radical Biology & Medicine*, 28 (2000) 643-651.
- [2] E. Herrera, C. Barbas, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57 (2001), 43-56.
- [3] F. Acarturk, S. Takka, *Journal Microencapsulation*, 16 (1999) 291-301.
- [4] A. Ribeiro, D. Vieira, I.P. Fernandes, J.S. Amaral, F. Barreiro, *CD de atas do 11º Encontro de Química dos Alimentos*, Bragança, Portugal (2012).
- [5] S.H. Yoo, Y.B. Song, P.S. Chang, H.G. Lee, *International Journal of Biological Macromolecules*, 38 (2006) 25-30.
- [6] W. Somchue, W. Sermsri, J. Shiowatana, A. Siripinyanond, *Food Research International*, 42 (2009) 909-914.

**Table 1.** Encapsulation efficiency (E.E.) of alginate microspheres (ME).

Assay	Atomized Emulsion (mL)	ME (g)	Non-encapsulated Tocopherol (mg)	E.E. (%)
I	26	6.44	0,42	99.79
II	25	7.67	0,20	99.90
III	18	5.39	0,24	99.88

The results showed that a very high E.E. was attained, probably due to the high hydrophobicity of the encapsulated substance. Release profiles of  $\alpha$ -tocopherol, showed that within 24h a maximum of 2% was released (data not shown) while under intestinal simulated conditions a complete release (100%) was attained. As can be observed in Fig.1 after two hours, approximately 70% of the active substance was released.



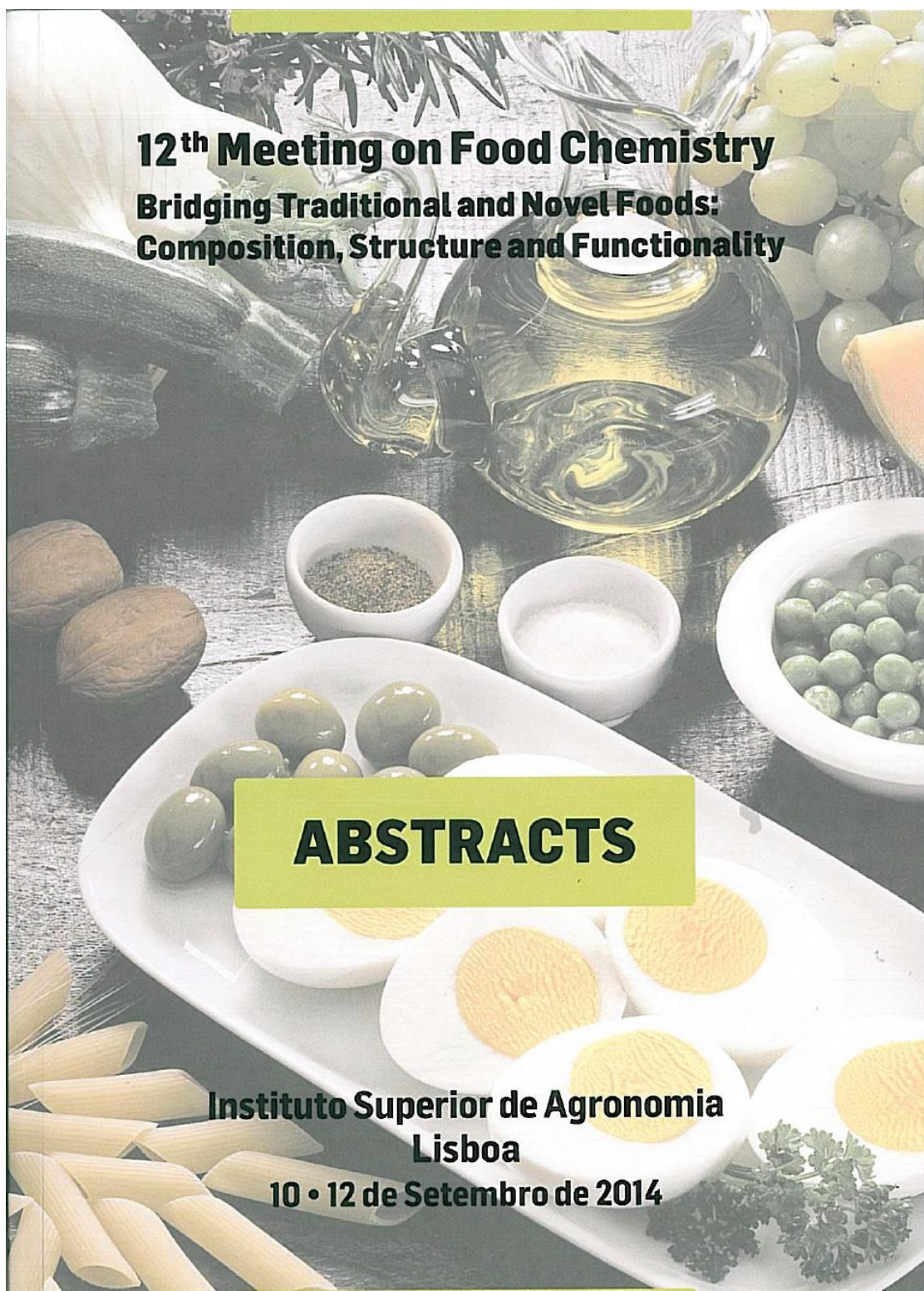
**Figure 1.** Release profile under simulated intestinal conditions (pH = 7.4)

#### Conclusion

The proposed ME process allowed achieving a very high encapsulation yield of  $\alpha$ -tocopherol. As expected, the release of the active substance from the ME was very low at acidic pH and much higher at pH 7.4, attaining almost a complete release under simulated intestinal conditions. Thus, the proposed microencapsulation process can constitute an interesting solution to protect  $\alpha$ -tocopherol, allowing its release under gastrointestinal conditions.



**Anexo D. Resumo do congresso 12º Encontro de Química dos Alimentos (Lisboa, Setembro de 2014).**



## **12º Encontro de Química dos Alimentos**

**Composição Química, Estrutura e Funcionalidade:  
A Ponte Entre Alimentos Novos e Tradicionais**

## **12<sup>th</sup> Meeting on Food Chemistry**

**Bridging Traditional and Novel Foods:  
Composition, Structure and Functionality**

# **Abstracts**

**Sociedade Portuguesa de Química  
Divisão de Química Alimentar**

**Instituto Superior de Agronomia  
10 a 12 de Setembro de 2014**



## In-vitro release profile of microencapsulated $\alpha$ -tocopherol under simulated gastrointestinal conditions

Dalila Vieira <sup>a</sup>, Joana S. Amaral <sup>a,b</sup>, M. Filomena Barreiro <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>ESTiG/Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal <sup>b</sup>REQUIMTE, Dep. of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal <sup>c</sup>LSRE, Polytechnic Institute of Bragança, Bragança, Portugal

\* barreiro@ipb.pt

Alpha-tocopherol, the most common form of Vitamin E in nature, is a well-known antioxidant compound for its effective inhibition of lipid oxidation both in food and biological systems. Additionally, due to its preventive action against reactive oxygen species (ROS),  $\alpha$ -tocopherol has been associated with risk decreasing of diseases associated with oxidative stress, such as cardiovascular disease and cancer [1]. The recommended ingestion of Vitamin E varies among the countries and according to criteria such as sex and age. In the USA, the recommended daily allowance (RDA) for an adult is 15 mg/day, whereas in Europe it is 4-15 and 3-12 mg  $\alpha$ -tocopherol/day for man and women, respectively. Although  $\alpha$ -tocopherol is naturally present in several foods, such as vegetable oils and tree nuts, owing to its antioxidant capacity it is frequently included in food supplements and used in the food industry to extend the shelf-life of several products. Nevertheless, due to  $\alpha$ -tocopherol instability and sensitivity towards oxygen and light and its poor aqueous solubility, it is generally administered in the acetate or succinate form. However, these forms are considered to have a lower intestinal absorption compared to  $\alpha$ -tocopherol [2]. To overcome these problems, the encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protective matrixes to avoid its oxidation and increase shelf life has been suggested. In fact, during the last years, encapsulation technology has been increasingly important in the food industry as it permits the formation of a physical barrier between the external medium and sensitive core materials, being also used for controlled release of active molecules, formulation stability enhancement, and flavor and taste masking. In this context, it is important to assess  $\alpha$ -tocopherol release pattern from microparticles as it can restrain its different applicability.

In this work,  $\alpha$ -tocopherol microspheres were produced using alginate as a polymeric matrix. This polymer, a linear polysaccharide obtained from brown algae consisting of  $\beta$ -mannuronic acid and  $\alpha$ -guluronic acid units, was chosen due to its biocompatibility, biodegradability and non-toxicity. Moreover, it presents a high stability at acidic pH, being easily swollen under mild alkali conditions. Alginate microspheres (ME) loaded with  $\alpha$ -tocopherol were produced using a NISCO Var J30 atomization unit, following a previously optimized methodology. The produced microspheres were evaluated for encapsulation efficiency and  $\alpha$ -tocopherol release profile by measuring the absorbance at 297 nm using a spectrophotometer. The encapsulation efficiency was calculated both by directly measuring the maximum content released after ME disruption and by quantifying the nonencapsulated  $\alpha$ -tocopherol present in the CaCl<sub>2</sub> coagulation solution and in the wash solution.  $\alpha$ -Tocopherol in-vitro release profiles were determined under simulated gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 7.4) media during a period of 24 hours. Additionally, a sample of ME were mixed in gastric media during 1h and then transferred to intestinal media until a total of 24h to simulate gastrointestinal conditions. During the testing period samples of the supernatant were periodically taken to determine the amount of released  $\alpha$ -tocopherol. Results evidence a very low % of  $\alpha$ -tocopherol release under acidic conditions while an almost complete release is achieved when ME were submitted to simulated intestinal conditions suggesting that the proposed approach can constitute an interesting solution to protect  $\alpha$ -tocopherol, allowing for its release in the intestine after ingestion. The next steps in this work in progress will include the evaluation of release profiles of ME added to different food matrices.

### Acknowledgments:

The authors thank FCT for the financial support LSRE (PEst-C/EQB/LA0020/2011 strategic project).

### References:

- [1] A Brigelius-Flohé, M Traber, J Fed Am Soc Exp Biol (FASEB) 1999, 13, 1145–1155.
- [2] E Herrera, C Barbas, J Physiol Biochem, 2001, 57, 43-56.