

PERMEAÇÃO DE SOLUTOS DE DIFERENTES MASSAS MOLECULARES EM MATRIZES COMPOSTAS DE ALGINATO DE CÁLCIO E ACETOFITALATO DE CELULOSE

Wânia Silveira da Rocha*

Carlos Raimundo Ferreira Grosso**

RESUMO – Com o objetivo de estudar a difusão de recheios de diferentes massas moleculares (MM) em sistemas de cápsulas compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose (AC), foram utilizados glicose (180 D), limoneno (136 D) e pepsina (34500 D), como recheio. Suas difusões através de soluções ácidas (HCl 0,1 N) ou alcoólica (etanol anidro) avaliadas por determinações enzimáticas, cromatográficas e Kjeldahl. Concluindo-se que a adição de AC ao alginato de cálcio não aumentou a retenção do material de recheio em sistemas de MM baixa, porém, com MM alta, o sistema alginato-AC polimerizado em CaCl_2 acidificada com HCl resultou numa melhor retenção.

PALAVRAS-CHAVE: Difusão; Alginato; Polimerização

1. INTRODUÇÃO

A encapsulação consiste na cobertura de partículas minúsculas de ingredientes com um material visando reduzir a reatividade do material encapsulado, em relação às condições adversas do meio (como luz, oxigênio e umidade); regular a evaporação ou a taxa de transferência do material encapsulado para o meio; facilitar o manuseio e controlar a liberação do material encapsulado; algumas vezes, mascarar sabores indesejáveis e também melhorar, através da diluição, a homogeneização

*Prof. Assistente. Mestre. DTEC (UEFS). Colegiado de Engenharia de Alimentos. E-mail: waniasrocha@uefs.br

**Prof. Titular. (UNICAMP). Pós-doutor. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição. E-mail: grosso@fea.unicamp.br

Universidade Estadual de Feira de Santana – Dep. de Tecnologia. Tel./Fax (75) 3224-8056 - BR 116 – KM 03, Campus - Feira de Santana/BA – CEP 44031-460. E-mail: tec@uefs.br

do agente encapsulado em algumas preparações alimentícias (SHAHIDI; HAN, 1993). As microesferas são partículas poliméricas esféricas cujo diâmetro varia de 1 a 250 μm e constituem um sistema matricial no qual uma substância está dissolvida, dispersa ou encapsulada. Outra vantagem desses sistemas reside no fato de poderem ser administrados por diferentes vias quando utilizados para encapsular agentes ativos com atividade farmacológica (LIMA; RODRIGUES; JÚNIOR, 1999).

Polímeros naturais e sintéticos são utilizados como suporte na imobilização de inúmeros tipos de recheio incluindo proteínas, enzimas, microorganismos, aditivos alimentícios, pesticidas e compostos com atividade farmacológica (TANAKA; MATSUMURA; VELIKY, 1984).

Quanto à forma de obtenção das cápsulas, os métodos podem ser divididos em físicos, incluindo o spray drying, spray chilling, spray cooling, leite fluidizado, extrusão, co-cristalização e liofilização; químicos, através de inclusão molecular ou polimerização interfacial; e os físico-químicos incluindo coacervação, separação por fase orgânica e formação de lipossomos (JACKSON; LEE, 1991).

Alguns polímeros gelificam por gelificação iônica, gelificação térmica ou por uma combinação desses dois mecanismos. A preparação de microcápsulas através da gelificação iônica envolve a gelificação de uma solução polimérica aquosa com um íon de baixa massa molar, onde polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo (THIES, 1994). Mediante essa técnica, o material de recheio é extrusado como gota dentro de uma solução, formando uma gota gelificada (OKHAMAFE et al., 1996).

Entre os hidrocolóides utilizados como barreira na proteção de alimentos, quer na forma de filmes ou microcápsulas, encontram-se pectinas de baixo teor de esterificação, carragena e alginato de cálcio, todos requerendo um íon para a reticulação da matriz. A principal vantagem do gel de alginato é sua habilidade de ser termo-estável podendo ser armazenado à temperatura ambiente.

A matriz formada, devido às suas características de porosidade, pode determinar a difusão do recheio ao exterior e de solvente ao interior das cápsulas de gel formadas. Entretanto, a erosão

dos géis de alginato é um problema importante, uma vez que pode ocorrer a aceleração na liberação do material de recheio (SEZER; AKBUGA, 1999).

Acetofitalato de celulose (AC) tem sido utilizado na fabricação de encapsulados entéricos devido a sua insolubilidade em soluções ácidas, sendo solúveis a partir de pH 6 ou superiores. Esse material de cobertura também chamado filme entérico parece resistir ao contato prolongado com fluidos gástricos fortemente ácidos, mas incham e se desfazem facilmente em meio de baixa acidez ou neutro, condições apresentadas pelo meio intestinal (ROXIN KARLSSON; SINGH, 1998). AC tem sido adicionado ao alginato de sódio em uma tentativa de modificar a liberação do material de recheio de microesferas, pois a celulose e seus derivados aumentam o grau de aglomeração das microesferas influenciando a permeação de solutos (CHAN HENG; WAN, 1997).

O objetivo deste trabalho foi estudar as características de difusão de matrizes esféricas de alginato de cálcio e misturas alginato-acetofitalato de celulose (AC) obtidas em meio contendo ácido clorídrico ou cítrico, utilizando recheios de diferentes características de polaridade e tamanho, incluindo glicose (MM 180 Daltons), limoneno (MM 136 Daltons) e pepsina (MM 34500 Daltons). As cápsulas gelificadas de alginato de cálcio e misturas de alginato-AC, obtidas em meio ácido foram avaliadas através das características de difusão dos recheios em função do tempo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SOLUÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO E DE DIFUSÃO DOS RECHEIOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciência da Nutrição da UNICAMP.

Foram utilizados kits enzimáticos para determinação de glicose; alginato de sódio Manugel DMB, alta massa molar, alto conteúdo de grupos guluronato; acetofitalato de celulose; glicerol P.A.; solução de Cloreto de Cálcio 1,5% e Etanol Anidro, ambos

P.A.; pepsina (MM 34500 Daltons); linalol; óleo essencial de laranja contendo 95% de D-Limoneno.

Três soluções foram utilizadas para a polimerização das cápsulas: solução aquosa, solução ácida contendo HCl (0,75 N) e solução de ácido cítrico (70%), todas contendo 1,5 % de cálcio. A essas soluções foram adicionadas concentrações dos recheios nas mesmas porcentagens utilizadas para as cápsulas, evitando a difusão do recheio antes que as cápsulas estivessem totalmente formadas. Esse procedimento foi utilizado quando os recheios foram glicose e pepsina; para o caso do limoneno, a adição do recheio à solução de polimerização não foi necessária, uma vez que as polaridades são antagônicas.

Para os ensaios de difusão de recheio, foram utilizadas soluções de HCl 0,1N, quando os recheios eram glicose ou pepsina, e solução de etanol anidro contendo de 2,5 mg de linalol por mL como padrão interno, quando o recheio utilizado era limoneno.

2.2. FORMAÇÃO DAS CÁPSULAS GELIFICADAS DE GLICOSE, LIMONENO E PEPSINA

As quantidades utilizadas para a formulação de cada um dos ensaios analisados estão anotadas na **Tabela 1**. Os ensaios descritos foram realizados em triplicata à temperatura ambiente, sendo a quantificação do recheio feita em triplicata.

A dissolução dos componentes da solução encapsulante foi feita em água destilada, em seguida, o pH acertado para valores entre 7-8 para glicose e limoneno e entre 5-6 para pepsina, com HCl 0,1N ou NaOH 25%. A massa final foi acertada em balança analítica utilizando água destilada. A solução foi então agitada até completa dissolução e a saída de possíveis bolhas formadas. A seguir, procedeu-se o gotejamento, à velocidade média de 5 mL/minuto e à distância de 15 cm, da solução encapsulante nas soluções de polimerização, mantendo-se as cápsulas geleificadas em repouso nessas soluções por 30 minutos para permitir a sua maturação. Para o limoneno foi feita uma homogeneização, em liquidificador, durante 1 minuto, antes do gotejamento.

Após a maturação, as cápsulas foram recolhidas com uma peneira, sendo parte destinada à medição de diâmetro e parte, ao teste de difusão. Nos ensaios de difusão, foram utilizadas as estas relações: massa de cápsula/massa de solução (g/g): 1:19; 1:19 e 1:5 para glicose, limoneno e pepsina, respectivamente.

Tabela 1 - Formulações dos géis utilizados nos ensaios de análise de difusão (composição em massa A= 1% de alginato de sódio; 20% de glicerol; 1% de Tween 80 e B= 1% de alginato de sódio; 20% de glicerol; 1% de Tween 80; 20% de Acetofitalato de Celulose).

Solução Encapsulante	Recheio (em massa)	Solução Extrusora (em massa)
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5%
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
B	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	0,5% glicose	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
A	10% limoneno	Cálcio 1,5%
A	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
B	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	10% limoneno	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
A	1% pepsina	Cálcio 1,5%
A	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
A	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%
B	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com HCl 0,75N
B	1% pepsina	Cálcio 1,5% acidificado com ácido cítrico 70%

A adição de pepsina somente foi feita após a estabilização do pH e total dissolução da AC, para evitar sua desnaturação. Após a maturação, as cápsulas contendo pepsina foram pesadas e parte delas lavada com água destilada na relação 1:2 (g de cápsula/ml de água), utilizando-as para a quantificação da proteína total e para os testes de difusão. A água de lavagem foi coletada para posterior quantificação da proteína total da superfície das cápsulas.

2.3 TESTE DE DIFUSÃO DA GLICOSE

A difusão foi acompanhada pela migração dos recheios ao solvente (HCl 0,1N) durante 6 horas, com coletas em triplicatas

em intervalos de uma hora. As cápsulas foram colocadas em contato com o solvente através de uma malha que as protegia da ação de fricção do agitador magnético permitindo a circulação do solvente sem danificá-las. O teor de glicose foi determinado utilizando-se um kit da LABORLAB e uma curva colorimétrica padrão, em espectrofotômetro a 505 nm, de acordo com Henry, Cannon e Winkelman (1974). O experimento foi realizado sem reposição de solvente.

2.4 TESTE DE DIFUSÃO DO LIMONENO

A difusão foi acompanhada pela migração dos recheios ao solvente durante 6 horas, com coletas em triplicatas em intervalos de uma hora. Utilizou-se solução de etanol P.A., adicionado de 2,5 mg/mL de linalol como padrão interno. As cápsulas foram colocadas em contato com o solvente de forma idêntica ao item anterior. O teor de limoneno foi determinado através de cromatografia gasosa, com injeções de 2 mL diretamente do solvente, exceto nos ensaios de mistura de alginato-AC, que necessitou filtrar o solvente antes da injeção. A determinação do limoneno foi realizada em cromatógrafo Varian® 3600, com coluna capilar DB-WAX (30m x 0,252mm), fluxo da fase móvel H2 1,2 mL/min a 70° C, detector FID 250° C, com atenuação 16 e range 10, condições do FID H2 e N2 30 ml/min, ar sintético 300 ml/min, corrida de 11 minutos, com injetor isotérmico a 200°C e a seguinte programação de temperatura: 70°C /2 min, até 100°C a 6°C /min, até 130°C a 10°C /min, utilizando padrão interno 2,5mg/mL de linalol. O experimento foi realizado sem reposição do solvente.

2.5 TESTE DE DIFUSÃO DA PEPSINA

A difusão foi acompanhada pela migração da pepsina para o solvente (ácido clorídrico 0,1 N) durante 210 minutos, com coletas em intervalos de 30 minutos, seguindo procedimento descrito em 2.3. A análise de difusão foi feita, tanto nas cápsulas sem lavar como nas lavadas, utilizando-se reposição do solvente em volume igual ao retirado, conforme sugerido por Fattah et al. (1998). A análise de proteína foi realizada através

do método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 1984), utilizando uma quantidade de amostra adequada à sensibilidade do método.

2.6 ELETROFORESE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12% de acrilamida, 120V) das proteínas livre e difundida foi determinada de acordo com o procedimento de Laemmli (1970). No preparo da amostra, foram utilizados dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercapitoetanol. A amostra liofilizada teve seu pH ajustado até atingir a coloração azul.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a existência de diferença significativa entre os valores obtidos foi utilizada a análise de diferença de médias a 5%, de acordo com o teste de Tukey, com auxílio do software STATISTICA® for Windows 5.0. Diferenças entre as medidas obtidas nos ensaios foram avaliadas para cada tempo.

Inicialmente, testes preliminares indicaram que gotas de alginato fabricadas sem recheio se apresentaram translúcidas enquanto as que continham recheio se apresentaram opacas. Nos ensaios preliminares, a quantificação da proteína (pepsina), foi testada, inicialmente, pelo método do Biureto, mostrando-se esse método inviável devido à alta turbidez da solução, mesmo após filtragem e centrifugação.

Durante o processo de gotejamento, foi mantida a distância de 15 cm entre a saída da bomba peristáltica e a solução de cloreto de cálcio, possibilitando assim a total imersão das gotas nas soluções de cálcio. O gotejamento da solução de alginato de sódio muito próximo à superfície da solução de cloreto de cálcio resulta na formação de gotas deformadas ou apresentando caudas, como também observado por Lim e Moss (1981), podendo ainda ocorrer a gelificação do alginato de cálcio na saída da bomba de gotejamento, sendo, portanto, necessário manter-se uma distância mínima como recomendado por Neau e outros (1993). Após as gotas de alginato de sódio

entrarem em contato com a solução de cálcio ou cálcio acidificada com HCl 0,75 N, o suporte gelificado formou-se imediatamente. Durante os primeiros minutos, as cápsulas permaneceram na superfície. Após algum tempo, submergiram, provavelmente devido ao aumento de densidade, como também observado por Mestdagh e Axelos (1999). Esse comportamento não ocorreu na solução contendo ácido cítrico 70% e cálcio, onde as cápsulas permaneceram na superfície da solução durante todo o período de maturação, provavelmente devido à densidade dessa solução ser maior do que a solução contendo ácido clorídrico.

O período de maturação durou 30 minutos, permitindo que as ligações intercruzadas para formação do gel ocorressem lentamente, processando-se progressivamente, da superfície para o interior da cápsula (MESTDAGH; AXELOS, 1999). Imediatamente após a maturação, as cápsulas apresentaram-se frágeis e, após o experimento de difusão, pôde-se observar que as mesmas se apresentaram mais rígidas. Isto foi mais evidente nos ensaios em que a gota foi formada em solução de ácido cítrico 70% contendo cálcio.

As cápsulas formadas apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 2,0 mm, com desvio padrão de 0,3 quando recém-formadas (tempo 0) e 2 mm, com desvio padrão de 0,2 após o período de 3 a 6 horas em solução de difusão. O desvio padrão ligeiramente menor apresentado após o tempo de imersão deve-se, provavelmente, ao fato das cápsulas perderem água durante a permanência em solução, além do que o maior tempo em solução acarreta o aumento das ligações intercruzadas para a formação do gel aumentando sua rigidez, com isso, facilitando as medidas de diâmetro, efeito também observado anteriormente por Lim e Moss (1981) e por Mestdagh e Axelos (1999).

A análise da Tabela 2 contendo os resultados das medidas de diâmetros efetuadas nos diversos tratamentos, antes do experimento de difusão, demonstra que, entre os sistemas recheados com glicose, as cápsulas de alginato-AC polimerizadas com HCl contendo cálcio apresentaram maior diâmetro seguido das cápsulas fabricadas com alginato, polimerizadas em solução de CaCl_2 . Ambas diferiram, significativamente, dos sistemas de cápsulas de alginato e alginato-AC polimerizados com

ácido cítrico, que apresentaram menor diâmetro. As cápsulas de alginato contendo glicose polimerizada com HCl contendo cálcio apresentaram diâmetros intermediários, diferindo significativamente ($p < 0,05$) apenas das cápsulas de alginato-AC polimerizada em HCl contendo cálcio. Uma ordem crescente de diâmetro foi observada para os sistemas de cápsulas de alginato recheados com limoneno ou pepsina, sendo o maior diâmetro observado para as cápsulas polimerizadas em HCl contendo cálcio, seguem as polimerizadas em soluções de cálcio e as polimerizadas em ácido cítrico, porém sem apresentar diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC (mm) e respectivos desvios-padrão antes da imersão na solução de difusão.

Cápsula	Recheio	Solução de Polimerização					
		CaCl ₂		CaCl ₂ + HCl		CaCl ₂ + Ácido Cítrico	
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Alginato	Glicose	2,373 ^{ab}	0,147	2,113 ^{bc}	0,248	2,085 ^c	0,214
Alginato acetofalato de celulose	Glicose	Sem dados		2,417 ^a	0,189	2,063 ^c	0,262
Alginato	Limoneno	2,036 ^{cd}	0,154	2,102 ^{bc}	0,223	2,001 ^{cd}	0,230
Alginato	Pepsina	Sem dados		2,102 ^{bc}	0,291	1,702 ^d	0,479

Na comparação entre tipos de cápsulas, recheio e solução de polimerização, as médias com letras em comum não diferem entre si, em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Quando a solução de polimerização continha apenas cálcio em solução, no ensaio efetuado para cápsulas contendo glicose ou limoneno envoltas por alginato, foram observadas diferenças significativas a $p < 0,05$ entre seus diâmetros.

As cápsulas contendo pepsina polimerizada nas soluções ácidas de HCl e ácido cítrico não apresentaram diferenças significativas entre as cápsulas contendo limoneno ou glicose para o sistema de polimerização contendo HCl e cálcio. Diferenças significativas foram observadas para a solução de ácido cítrico entre pepsina e glicose na matriz alginato. Para esse mesmo sistema não foram observadas diferenças significativas entre os recheios limoneno e pepsina.

A avaliação das diferenças entre os diâmetros foi também realizada nas matrizes após o tempo de difusão ter sido completado (Tabela 3). Foram observadas diferenças significativas entre cápsulas de alginato-AC contendo glicose polimerizada em cálcio acidificada com HCl em relação às cápsulas recheadas com limoneno ou pepsina, independente da solução de polimerização.

Tabela 3 - Média dos diâmetros das cápsulas de Alginato e Alginato-AC (mm) e respectivos desvios-padrão após 6h de imersão na solução de difusão.

Cápsula	Recheio	Solução de Polimerização					
		CaCl ₂		CaCl ₂ + HCl		CaCl ₂ + Ácido Cítrico	
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Alginato	Glicose	1,942 ^{bc}	0,127	2,130 ^{ab}	0,240	2,133 ^{ab}	0,247
Alginato acetofitalato de celulose	Glicose	sem dados		2,328 ^a	0,184	2,142 ^{ab}	0,244
Alginato	Limoneno	2,019 ^{bc}	0,197	1,943 ^{bc}	0,216	2,025 ^{bc}	0,240
Alginato	Pepsina	sem dados		2,092 ^{bc}	0,192	1,795 ^c	0,277

Na comparação entre os tipos de cápsulas, recheio e solução de polimerização, as médias com letras em comum não diferem entre si, em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Foram também observadas diferenças significativas entre cápsulas de alginato contendo pepsina polimerizada em ácido cítrico em relação a alginato e alginato-AC contendo glicose polimerizada em HCl ou ácido cítrico.

Menores diâmetros foram observados antes e após a difusão para pepsina encapsulada em alginato polimerizado em ácido cítrico.

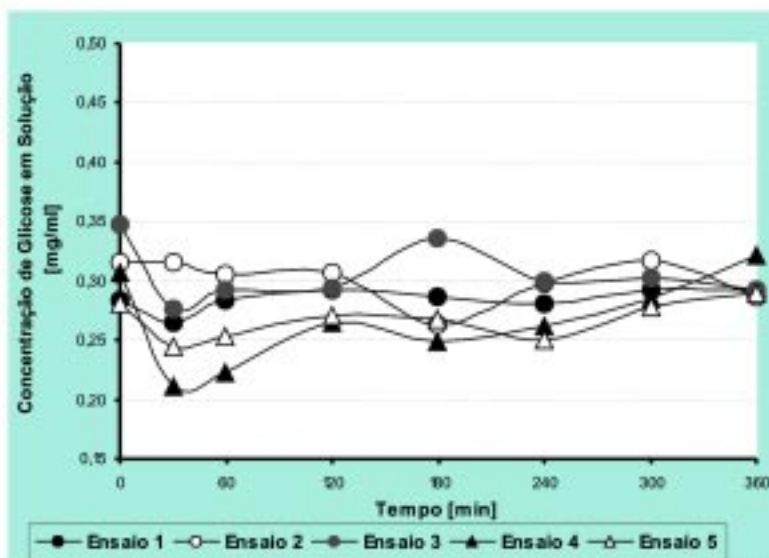
Nas soluções ácidas contendo HCl, foi observado um decréscimo no volume, provavelmente devido a sinérese* antes e após o estudo de difusão. Efeito contrário foi observado quando a solução de polimerização continha ácido cítrico. Ambos os efeitos independeram do recheio considerado.

3.1. ENSAIO DE DIFUSÃO DA GLICOSE

Com relação ao experimento contendo glicose como recheio (Figura 1), as curvas de difusão obtidas para as diferentes situações ensaiadas não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), como se pode observar na Figura

**Sinérese* – Refere-se a expulsão de líquido do gel (FENNEMA, 1996).

1 e na Tabela 4 (difusão média dos ensaios contendo glicose como recheio). Esses resultados indicaram a livre migração da glicose para o solvente imediatamente após as esferas serem colocadas para difundir, em todos os sistemas estudados. As curvas da difusão da glicose apresentaram um perfil esperado, com a tendência para formar um patamar onde a concentração de glicose difundida é constante, considerando que o experimento foi realizado sem reposição do solvente. Os resultados obtidos estão em concordância com os anteriormente observados por Tanaka, Matsumura e Veliky, (1984), onde a glicose difundia-se imediatamente após a imersão das cápsulas na solução e quase que totalmente nos primeiros 30 minutos de ensaio. Esses autores encontraram uma boa correlação dos resultados experimentais com o valor calculado através de modelagem matemática da difusão considerando que o substrato encontrou livre difusividade devido ao tamanho dos poros apresentados pelas cápsulas.



Ensaios: 1. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5%; 2. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75N; 3. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%; 4. Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N; 5. Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%.

Figura 1 - Média das concentrações em mg de glicose difundida por mL de solução de HCl 0,1 N em função do tempo (min).

Tabela 4 - Quantidade média em mg de glicose difundida por ml de solução de difusão (HCl 0,1N) em função do tempo (min).

Ensaio	Tempo (min)							
	0	30	60	120	180	240	300	360
Ensaio 1	0,283 ^a	0,265 ^a	0,284 ^a	0,293 ^a	0,286 ^a	0,280 ^a	0,293 ^a	0,292 ^a
Ensaio 2	0,315 ^a	0,315 ^a	0,305 ^a	0,307 ^a	0,264 ^a	0,298 ^a	0,317 ^a	0,286 ^a
Ensaio 3	0,348 ^a	0,276 ^a	0,292 ^a	0,294 ^a	0,336 ^a	0,300 ^a	0,302 ^a	0,292 ^a
Ensaio 4	0,307 ^a	0,211 ^a	0,223 ^a	0,265 ^a	0,249 ^a	0,262 ^a	0,285 ^a	0,322 ^a
Ensaio 5	0,281 ^a	0,244 ^a	0,253 ^a	0,270 ^a	0,267 ^a	0,250 ^a	0,278 ^a	0,289 ^a

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letra em comum indicam que os ensaios não diferiram entre si, em nível de significância 5% ($p < 0,05$). Descrição dos ensaios: conforme Figura 1.

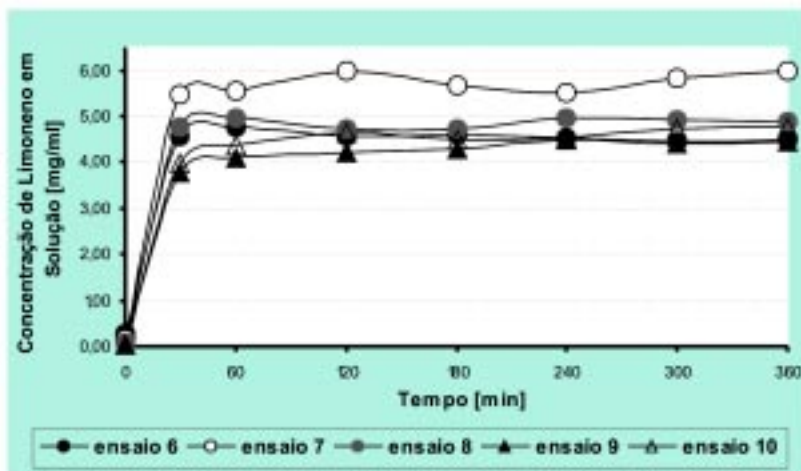
A acetofitalato de celulose foi adicionada às cápsulas de alginato no presente experimento com a finalidade de diminuir a porosidade das cápsulas, como reportado por Chan, Heng e Wan (1997), no entanto, a análise estatística dos resultados não apresentou diferença significativa em relação aos ensaios contendo somente cápsulas fabricadas com alginato de cálcio. Obteve-se novamente difusão imediata do recheio indicando que a adição de AC não diminuiu suficientemente o tamanho dos poros, o que poderia funcionar como barreira a substratos de baixa massa molar, como a glicose. Cheetham, Blunt e Bucke (1979) determinaram o coeficiente de partição para a sacarose em alginato de cálcio, de 0,84, indicando que 84% do volume interno do gel foi acessível à sacarose quando a difusão ocorria de fora para dentro da matriz evidenciando a alta porosidade da matriz utilizada.

3.2. ENSAIO DE DIFUSÃO DE LIMONENO

O etanol foi utilizado como solvente para a análise de difusão do limoneno devido ao caráter antagônico de polaridade entre o limoneno e a água. O limoneno é um monoterpene hidrofóbico (BISHOP; NELSON; LAMB, 1998) e praticamente insolúvel em água, o que foi constatado durante os ensaios preliminares onde se utilizou uma solução aquosa, HCL 0,1N,

verificou-se a não ocorrência de difusão do recheio para a solução devido às diferenças de polaridade entre recheio e solução.

Quando limoneno foi utilizado como recheio, o gráfico da difusão média (Figura 2), mostrou perfis semelhantes para as diversas combinações estudadas incluindo a utilização de alginato, mistura alginato-AC, curados em ácido clorídrico ou ácido cítrico. A quantificação do limoneno difundido indicou nos primeiros tempos de amostragem, após a primeira hora, a liberação de aproximadamente 50% do recheio inicialmente adicionado, indicando fraca retenção da matriz do gel em todos os sistemas estudados. Apesar disso, pode-se observar através da Tabela 5 que, excetuando o tempo 4 horas, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios. Foi também observado, através da Figura 2, que o ensaio 7 (Cápsula de alginato de cálcio recheadas com limoneno e extrusado em solução de cálcio adidificada com HCl 0,75N) apresentou a menor retenção durante o experimento de difusão.



Ensaios 6. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5%; 7. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75N; 8. Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%; 9. Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl 0,75 N; 10. Cápsula de mistura alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%.

Figura 2 - Média das concentrações em mg de limoneno difundido por ml de solução de etanol anidro em função do tempo (min).

Tabela 5 - Quantidade média em mg de limoneno difundido por ml da solução de difusão (etanol anidro) em função do tempo (min).

Ensaio	Tempo (min)							
	0	30	60	120	180	240	300	360
Ensaio 6	0,280 ^a	4,56 ^{ab}	4,78 ^{ab}	4,57 ^b	4,62 ^{ab}	4,54 ^a	4,45 ^b	4,50 ^b
Ensaio 7	0,157 ^a	5,46 ^a	5,55 ^a	6,01 ^a	5,68 ^a	5,52 ^a	5,85 ^a	6,00 ^a
Ensaio 8	0,064 ^a	4,75 ^{ab}	4,96 ^{ab}	4,74 ^{ab}	4,73 ^{ab}	4,95 ^a	4,93 ^{ab}	4,87 ^{ab}
Ensaio 9	0,042 ^a	3,79 ^b	4,08 ^b	4,20 ^b	4,28 ^b	4,50 ^a	4,42 ^b	4,43 ^b
Ensaio 10	0,057 ^a	3,97 ^b	4,38 ^b	4,67 ^b	4,48 ^{ab}	4,51 ^a	4,72 ^{ab}	4,77 ^{ab}

Na comparação entre os ensaios para cada tempo, as médias com letra em comum indicam que os ensaios não diferiram entre si, em nível de significância 5% ($p < 0,05$). Descrição dos ensaios, conforme Figura 2.

Uma vez que o limoneno é um composto de baixa massa molar, os resultados obtidos indicaram que a porosidade das matrizes utilizadas não foi suficiente para evitar que esse tamanho de molécula pudesse ser retido no interior da matriz. Durante a adição de AC à solução de etanol, observou-se uma pequena precipitação de partículas brancas, fazendo-se necessária uma filtragem das amostras antes de submetê-las à análise cromatográfica. Isso ocorreu, provavelmente, devido à solubilização parcial do derivado de celulose no etanol. Independente do efeito de solubilização parcial, a adição de AC não provocou melhora na retenção do recheio utilizado.

A análise da Tabela 5 confirma o resultado apresentado na Figura 2, onde o ensaio 7 (Cápsula de alginato gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com HCl 0,75N) é o que apresenta pior retenção, sendo, portanto, onde ocorre maior liberação do limoneno em todos os tempos estudados, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios 9 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com HCl 0,75N) e 10 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 acidificada com Ácido Cítrico 70%) nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Nesses tempos, os ensaios 9 e 10 tiveram maior retenção, comparativamente aos demais ensaios.

Esses resultados indicam que a porosidade das matrizes foi suficiente para permitir a difusão do limoneno através das diversas formulações estudadas. O processo de difusão do limoneno parece ocorrer passivamente através da membrana do gel, conforme também observado anteriormente por Bishop, Nelson e Lamb (1998).

3.3 ENSAIO DE DIFUSÃO DE PEPSINA

Quando a pepsina foi utilizada como recheio, duas séries de medidas de difusão foram realizadas, a primeira considerando as cápsulas diretamente removidas da solução de polimerização (sem lavar) cujos resultados de difusão se encontram na Figura 3 e a segunda, onde as cápsulas retiradas da solução de polimerização foram lavadas com água destilada (lavadas), em seguida, colocadas na solução de difusão. Os resultados da difusão estão apresentados na Figura 4. Os resultados obtidos mostraram perfis semelhantes para as curvas de difusão, considerando as diversas combinações estudadas incluindo a utilização de alginato, mistura alginato-AC e a cura em ácido clorídrico ou ácido cítrico. Os perfis apresentados nos gráficos de difusão estão coerentes com o sistema que utiliza reposição do solvente durante o experimento de difusão.

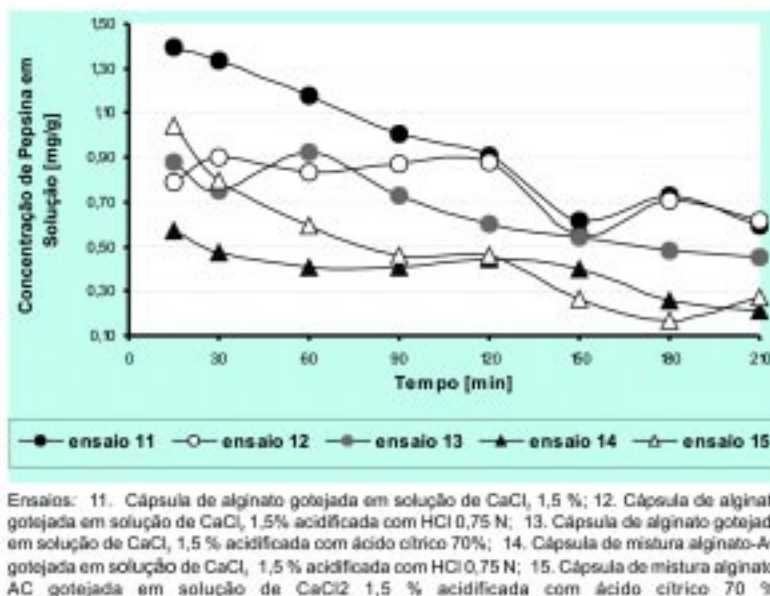


Figura 3 - Concentração média em mg de pepsina de cápsulas não lavadas por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo (min).

Observando a Figura 3, pode-se verificar que a menor retenção ocorre para o ensaio 11 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5%), que liberou 100% do valor inicialmente encapsulado, enquanto a maior retenção ocorre no ensaio 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) que liberou, aproximadamente, 51% do valor inicialmente encapsulado, uma retenção significativa. Verificou-se que os ensaios mencionados diferem significativamente ($p < 0,05$) durante todo o tempo de amostragem, exceto nos tempos de 120, 180 e 210 minutos quando não foi possível observar diferenças significativas entre os ensaios. O ensaio 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do ensaio 15 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico 70%) no primeiro tempo de amostragem (15 minutos).

Não foi possível observar diferenças significativas entre as concentrações encontradas no interior das cápsulas para qualquer um dos sistemas estudados (concentração encontrada – cápsula).

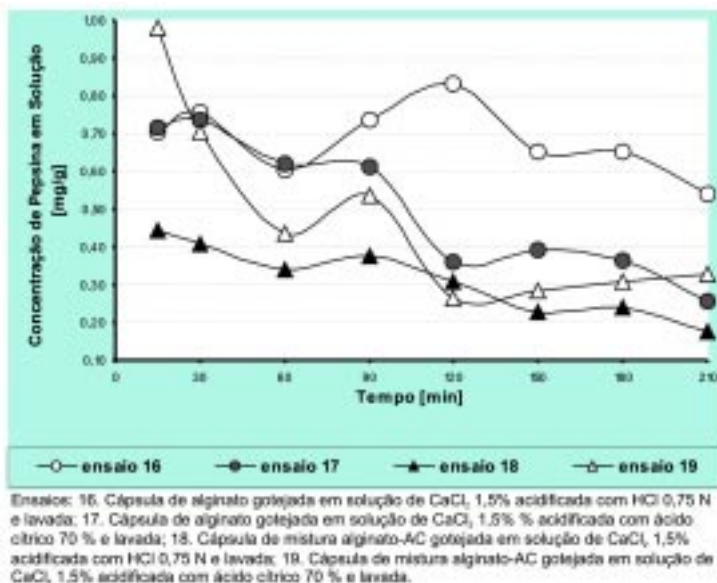


Figura 4 - Concentração média em mg de pepsina de cápsula lavada difundida por g de solução de difusão (HCl 0,1 N) em função do tempo (min).

Observando-se a Figura 4, pode-se verificar que houve menor retenção no ensaio 16 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) liberando, aproximadamente, 49% do valor inicialmente encapsulado, enquanto a maior retenção é observada no ensaio 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) que liberou cerca de 38% do valor inicialmente encapsulado (15 min). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ensaios nos tempos 15, 120, 150 e 180 minutos. Após 15 minutos de difusão, os ensaios 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) e 19 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavada) diferiram entre si ($p < 0,05$) não diferindo, no entanto, em relação aos demais ensaios. Após 120 minutos, o ensaio 16 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) diferiu, em relação aos demais ensaios ($p < 0,05$), apresentando a maior concentração média e, portanto, maior liberação. Após 150 minutos, os ensaios 16 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) e 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) diferiram entre si ($p < 0,05$) não diferindo em relação aos demais ensaios. Após 180 minutos, o ensaio 16 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada), diferiu do ensaio 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) e do ensaio 19 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavada), porém nenhum deles diferiu, em relação ao ensaio 17 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico e lavada). A quantidade de proteína vai sendo reduzida com o tempo de amostragem devido à reposição de solvente.

Embora a pepsina possa perder gradualmente sua atividade em soluções fortemente ácidas (pH 1,8 e 50 °C), a perda de atividade é paralela à perda de nitrogênio protéico e, sob essas condições, a autólise, provavelmente, também contribui para a sua perda de atividade. Em ácidos muito fortes, pode

ocorrer primeiro a desnaturação, seguida da hidrólise de ligações peptídicas, sendo a razão ou taxa de inativação diretamente proporcional a concentração de íons de hidrogênio (BOYER; LARDYM; MYRBÄK, 1960). A hidrólise da pepsina poderia acarretar uma difusão mais acentuada dos peptídeos provenientes da hidrólise. Tal ocorrência, entretanto, não foi observada nas condições dos experimentos envolvendo a pepsina, conforme pode ser observado na Figura 5. A atividade enzimática não foi avaliada uma vez que o objetivo era observar apenas a capacidade de barreira das matrizes utilizadas.

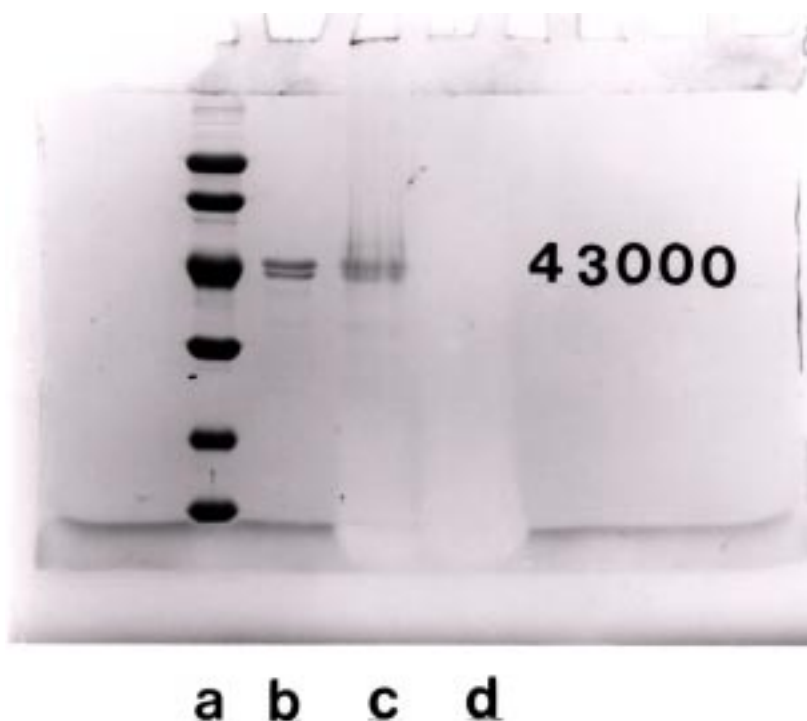


Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida SDS-PAGE: a) padrão contendo proteínas de diferentes MM; b) pepsina livre; c) pepsina difundida e liofilizada e d) solução de difusão a partir de cápsulas de alginato sem recheio.

Observou-se que a concentração de pepsina encontrada no interior das cápsulas não lavadas e lavadas difere entre si ($p < 0,05$), sendo que o ensaio 13 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com ácido cítrico) apresentou maior média, diferindo dos ensaios 14, 16, 18 e 19. O ensaio 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl) e o ensaio 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio 1,5% acidificada com HCl e lavada) apresentaram menor média durante todo o experimento não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. Após 30 minutos de difusão, o ensaio 11 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio 1,5%) diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos ensaios 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl), 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl e lavada) e do ensaio 19 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com ácido cítrico e lavada).

De modo geral observou-se que em todos os tempos considerados os ensaios 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl), e 18 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl e lavada) diferiram significativamente ($p < 0,05$) do ensaio 11 (Cápsula de alginato gotejada em solução de cálcio). Os demais ensaios, com exceção do ensaio 15, nos tempos 60, 90 e 180 minutos, apresentaram valores de liberação intermediários não diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Embora sem diferenças significativas entre si pode-se observar que o ensaio 14 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl), e seu equivalente lavado, o ensaio 18 (Cápsula de alginato de cálcio-AC recheadas com pepsina gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl e lavada), ambas apresentaram menor liberação do recheio sugerindo para esses sistemas a melhor retenção entre todos os sistemas estudados.

A acetofitalato de celulose adicionada ao alginato de sódio, com o intuito de modificar a liberação de compostos ativos mostrou-se efetiva para o caso da pepsina. As curvas de liberação, embora tenham apresentado formas semelhantes,

após 15 minutos de difusão, indicaram que os sistemas compostos pela mistura alginato-AC polimerizado em solução de cálcio acidificada com HCl retiveram 50% da quantidade de pepsina inicialmente encapsulada enquanto o sistema composto por alginato polimerizado em solução de cálcio liberou 100%. O mesmo foi observado para os sistemas lavados, porém em menor porcentagem.

Apesar do alginato ser insolúvel em meio ácido (HCl 0,1 N), Fattah e outros (1998) observaram maior liberação em meio ácido do que em meio aquoso, sendo a rápida liberação do recheio das cápsulas de alginato em meio ácido explica-se pela mudança na propriedade da matriz ao contato com o ácido. Yotsuyanagi e outros (1990) observaram que os íons de cálcio das cápsulas de alginato estavam totalmente descarregados em meio ácido enquanto os grupos carboxílicos se encontravam na forma não-ionizada, o que poderia alterar a propriedade da matriz, inclusive com relação às características de liberação de material de recheio. Fattah e outros (1998) concluíram que o comportamento de liberação de recheios de cápsulas não dependia unicamente das características iônicas do polímero e do pH do meio, mas também do tipo de cátion conjugado ao polímero.

De acordo com King (1988), géis ou filmes de alginato de cálcio são permeáveis a moléculas solúveis em água e com massa molar menor que 5000 Daltons, como as moléculas de glicose e limoneno utilizadas em nossos ensaios. Segundo o autor, moléculas com maior massa molar (MM) também podem difundir-se lentamente através do gel, enquanto que moléculas com MM acima de 10000 ou maior não poderiam difundir-se, porém isso não foi observado no experimento ora relatado, no qual a pepsina com Massa Molar de 34500 D utilizada como recheio foi parcialmente liberada das cápsulas.

A aplicação dos modelos matemáticos citados anteriormente na revisão para representar a difusão dos recheios utilizados através da cápsula não foi possível devido à liberação ocorrer quase que instantaneamente, após 15 minutos de permanência das cápsulas em solução de difusão.

De modo geral, a adição de acetofitalato de celulose com a intenção de diminuir a porosidade das cápsulas de alginato de sódio não surtiu o efeito desejado, de aumentar a retenção do material de recheio de baixa massa molar em nenhum dos sistemas estudados. Porém o uso de alginato-AC com recheios de alta massa molar, como pepsina, permitiu a retenção de quantidades consideráveis nos estudos de difusão (50% de retenção considerando a primeira retirada de amostra aos 15 minutos).

4 CONCLUSÃO

O uso de acetofitalato de celulose com a intenção de diminuir a porosidade das cápsulas de alginato de sódio não surtiu o efeito desejado, de aumentar a retenção do material de recheio com baixa massa molar, como, glicose e limoneno, com algumas poucas ressalvas sem diferença estatística nos ensaios 9 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com HCl) e 10 (Cápsula de alginato-AC gotejada em solução de CaCl_2 1,5% acidificada com ácido cítrico) recheados com limoneno. Já para recheios com massa molar alta, como pepsina, a adição de AC mostrou-se efetiva, uma vez que as curvas de liberação, embora tenham apresentado formas semelhantes para todos os sistemas demonstraram, após 15 minutos de difusão, que os sistemas compostos pela mistura alginato-AC gotejada em solução de cálcio acidificada com HCl retiveram 50% da quantidade de pepsina inicialmente encapsulada enquanto os sistemas compostos por alginato gotejado em solução de cálcio liberaram 100%, o mesmo tendo sido observado para os sistemas lavados, porém, em menor porcentagem. A adição de AC parece ter diminuído a porosidade da matriz de alginato influenciando assim na retenção de compostos de mais alta massa molecular.

A quantidade de recheio dos sistemas com cápsulas não-lavadas foi maior que os sistemas correspondentes com cápsulas lavadas, indicando que parte da pepsina se encontrava sobre a superfície das cápsulas, e que o processo de encapsulação ainda pode ser otimizado.

A aplicação dos modelos matemáticos para representar a difusão dos recheios utilizados através da cápsula não foi possível devido à liberação ocorrer quase que instantaneamente, após 15 minutos de permanência das cápsulas em solução de difusão na maioria dos sistemas utilizados.

SOLUTE PERMEATION OF DIFFERENT MOLECULAR MASSES IN SYSTEMS COMPOSED OF CALCIUM ALGINATE AND CELLULOSE ACETATE PHTHALATE

ABSTRACT — *With the objective of studying the diffusion of a core material from different molar masses (MM) in systems of gelled capsules of calcium alginate and of mixtures of calcium alginate and cellulose acetate phthalate (CAP), glucose (MM 180 D), limonene (MM 136 D) and pepsin (MM 34500 D) and their diffusion by acid solutions (HCl 0,1 N) or alcohol (ethanol) evaluated by enzymatic determinations, by chromatography and Kjeldahl. The conclusion is that the addition of CAP did not increase the retention of the core material with low molecular mass like glucose and limonene, although core material with high molecular mass like pepsin had a good retention in the system alginate-CAP acidified by hydrochloric acid.*

KEY WORDS: *Diffusion; Alginate; Polymerization.*

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 14. ed. Ed William Horwitz, 1984. 1141p.

BISHOP, J. R. P.; NELSON, G.; LAMB, J. Microencapsulation in yeast cells. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n. 6. p. 761-773, 1998.

BOYER, P. D.; LARDY, H.; MYRBÄK, K. **The enzymes**. v. 4. Academic Press. New York, London: Academic press, 1960. v. 4, 256p.

Sitientibus, Feira de Santana, n.35, p.125-148, jul./dez. 2006

CHAN, L.W.; HENG, P. W. S.; WAN, L.S.C. Effect of cellulose derivatives on alginate microspheres prepared by emulsification. **Journal Microencapsulation**, v. 14, n. 5, p. 545-555, 1997.

CHEETHAM, P. S. J.; BLUNT, K. W.; BUCKE, C. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 21, p. 2155-2168, 1979.

FATTAH, E. A. et al. Physical characteristics and release Behavior of salbutamol sulfate beads prepared with different Ionic polysaccharides. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24 n. 6, p. 541-547, 1998.

HENRY, R.J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. **Clinical chemistry principles and techniques**. 2. ed. New York: Harper and Row, 1974. 1288p.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologies**, Londres, v. 24 n. 4, p. 289-297, 1991.

KING, A. H. Flavor encapsulation with alginates. In: **Flavor Encapsulation**. Washington (DC): Risch S. J. and Reineccius G. A. Eds. American Chemical Society, 1988. Chapter 13. p. 122-125.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227. p. 680-685, 1970.

LIM, F.; MOSS, R. D. Microencapsulation of living cells and tissues. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.70 n. 4, p. 351-354. 1981.

LIMA, K. M.; RODRIGUES JÚNIOR, J. M. Poly-DL-lactice-co-glycolide microspheres as a controlled delivery system. **Brazilian Journal of Medicin and Biological Research**. v.32, n. 2, p. 171-180. 1999.

MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer science: Food and Non-food Applications**. n. 91, p. 303-314, 1999.

NEAU, S. H.; Encapsulation of a volatile oil by Ionic gelation of alginate. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 57. p. 126-129, 1993.

OKHAMAFE, A. O. Modulation of protein release from chitosan-alginate microcapsules using the pH-sensitive polymer hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate. **Journal of Microencapsulation**, v. 13 n. 5, p. 497-508, 1996.

ROXIN, P.; KARLSSON, A.; SINGH, S. K. Characterisation of cellulose acetate phthalate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24 n.11, p. 1025-1041. 1998.

SEZER, A. D.; AKBUGA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 2, p. 195-203. 1999.

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

TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion characteristics of substrates in ca-alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26. p. 53-58, 1984.

THIES, C. Gelation: how to make. microcapsules combined lecture and laboratory manual. In: **Thies Technology**. Saint Louis: Missouri, Chapter 8, p. 1-51. 1994.

YOTSUYANAGI, T.; Effects of monovalent metal-Irons and propranolol on the Calcium Association in Calcium-Induced Alginate Gel Breads. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.3, 38, n. 11, p. 3124-3126, 1990.