



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA**

Aluna: Flávia Noeli de Souza

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

CAMPINAS, 2012



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

FLÁVIA NOELI DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, NA
ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E APLICADA À TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Flávia Noeli de Souza, aprovada pela comissão julgadora em 26/03/2012 e orientada pelo Prof^o. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso.

Assinatura do Orientador

**Carlos Raimundo Ferreira Grosso
ORIENTADOR**

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE

ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

So89p Souza, Flávia Noeli de, 1985-
Produção e caracterização de micropartículas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática / Flávia Noeli de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Microencapsulação. 2. Gelificação iônica. 3. Interação eletrostática. 4. Pectina. 5. Concentrado proteico do soro do leite. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production and characterization of microparticles obtained by ionic gelation associated with electrostatic interaction

Palavras-chave em inglês:

Microencapsulation

Ionic gelation

Electrostatic interaction

Pectin

Whey protein concentrate

Área de concentração: Nutrição experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]

Ana Sílvia Prata

Mirna Lúcia Gigante

Data da defesa: 26/03/2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Profº. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Orientadora)

Dra. Ana Silvia Prata Soares
(Membro)

Dra. Mirna Lucia Gigante
(Membro)

Dra. Maria Helena Andrade Santana
(Suplente)

Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
(Suplente)

Campinas, 26 de março de 2012

DEDICATÓRIA

**A minha mãe Neusa Moreira de Sousa
e a meu noivo Rodrigo Infante,
essa conquista também é de vocês.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida e por permitir que eu chegasse até aqui. Tudo acontece conforme a tua vontade;

Ao Professor Carlos, pela dedicação com meu trabalho, ensinamentos e orientação;

A minha mãe, por me apoiar em cada decisão da minha vida, por estar comigo nas tristezas e nas alegrias, mas principalmente por me apoiar em meus sonhos e desejos. Amo você e essa é uma conquista nossa;

A minha família que compreendeu minha ausência em vários momentos para que este trabalho pudesse ser concluído, especialmente a minha irmã Valéria, a Emily e a meu tio Santo, obrigada pelo apoio, companhia e compreensão;

A Rodrigo Infante, mais que um noivo, um companheiro fiel e leal. Obrigada pelas diversas caronas, vidrarias lavadas, lanchinhos, paciência, tranquilidade, etc. Estar aqui seria difícil sem sua ajuda, seria difícil expressar isso em palavras. Serei eternamente grata a você;

Aos professores que com dedicação corrigiram este trabalho: Ana Silvia Prata, Mirna Lúcia Gigante, Maria Helena Andrade Santana e Semíramis Martins Álvares Domene. De modo especial a Semíramis por ter me indicado ao professor Carlos;

A Graziela, nossa querida estagiária. Pessoa mais que especial. Com ela aprendi na prática o que era produzir partículas. Você é uma pessoa muito especial e não tenho palavras para lhe agradecer. Deus te abençoe por tudo que fez por mim.....inúmeros Kjedahl, umidades, soros, etc;

A Juliana Bürger Rodrigues, minha irmã siamesa..... Ju obrigada pela companhia, pela ajuda profissional e pessoal. Tenho um carinho enorme por você, algo que é difícil de explicar. Saiba que sentirei MUITA saudade de você. Obrigada por acreditar em mim e me mostrar que eu era capaz....Divido com você o sucesso do meu trabalho;

A Alena Fernandes Sant'Anna.....minha eterna dupla, amiga mais que leal.....obrigada por me ouvir nos momentos tristes e alegres....;

A Yara e Eliana, técnicas queridas. Não conseguiria sem o suporte de vocês. Obrigada

Aos companheiros de laboratório Bia, Joelma, Gi, Talita e aos estrangeiros Anaïs, Nallely e Fernando “Peruano” a vida com vocês foi bem mais alegre, divertida e feliz. Aos companheiros de DTA, Cecília, Clarisse, Karina e Guilherme...obrigada.

Aos meus queridos amigos de Unicamp: Fernanda, Erick e Geina. Vocês tornaram tudo mais divertido e feliz. Obrigada pela amizade ... sentirei saudades e torço pelo sucesso de vocês.

Aos queridos EJNS....amigos fortes em Cristo...obrigada pelas orações e torcida. Dom Filipe, muito obrigada;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

A CPKelco pela doação da pectina utilizada neste trabalho;

E a todos que de maneira direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor”

(Madre Tereza de Calcutá)

"O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra"

(Aristóteles)

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas capazes de resistir ao ambiente gástrico e liberar o material encapsulado em ambiente intestinal. As partículas foram produzidas pela gelificação iônica da pectina de baixo teor de esterificação amidada com íons cálcio e posteriormente recobertas com proteínas utilizando soluções de diferentes concentrações de concentrado proteico do soro do leite (WPC), submetidas ou não a tratamento térmico. A condição de adsorção das proteínas sobre a superfície das partículas de pectina foi definida a partir da análise da carga livre total das soluções de proteína e polissacarídeos e assim a definição de pH e a relação entre eles foi usada para produção das micropartículas. As micropartículas obtidas foram caracterizadas com relação a sua carga elétrica de forma a se obter as condições de pH e a relação de concentração de polissacarídeo : proteína em solução em que a interação eletrostática entre os biopolímeros fosse possível. Foram testados 5 níveis de proteína em soluções (2, 4, 6, 8 e 12%) associados a proteína sem tratamento térmico (STT) e tratada termicamente (TT), desnaturação a 80°C por 15 minutos, sendo que as partículas obtidas foram caracterizadas com relação a morfologia, teor de proteína e conteúdo de umidade. A partir deste estudo preliminar foram selecionados dois tipos de partículas, uma partícula recoberta com proteína STT e outra partícula recoberta com proteína TT, utilizando como critério de seleção as soluções proteicas onde foram obtidas partículas com o maior teor de proteína adsorvida. As partículas selecionadas foram avaliadas com relação à resistência ao ambiente gástrico e capacidade de liberação do material encapsulado em ambiente intestinal, sendo que, para isso, as micropartículas foram submetidas a uma simulação das condições gastrointestinais *in vitro*, avaliando sua integridade nestas condições e quantificando-se o teor de proteína solubilizada em ambiente gástrico simulado. Também foi avaliada a estabilidade das partículas em diferentes pHs, tamanho médio, morfologia interna e externa e capacidade de reidratação pós liofilização. As

concentrações de proteína em solução em que foram obtidos os mais altos valores de proteína adsorvida foram de 4 a 6%, com adsorção de $49,2 \pm 1,0$ % para partículas com WPC - STT e $27,6 \pm 1,8$ % para solução de WPC - TT. Variações de tamanho das micropartículas após sua inserção em diferentes pHs assim como em suco gástrico artificial, foram de 224,8 μm a 342,9 μm . As partículas liofilizadas e reidratadas readquiriram forma e tamanho original após uma hora de inserção em água além de apresentarem estabilidade às variações de pH. As partículas permaneceram íntegras em ambiente gástrico e desintegraram-se em meio intestinal, entretanto durante a simulação das condições gástricas houve uma alta solubilização da proteína em suco gástrico quando o pH foi ajustado a 1,2 com a presença de pepsina, enquanto menor solubilização foi observada quando o pH do suco gástrico foi ajustado para 3, também em presença de pepsina.

Palavras-chave: microencapsulação, gelificação iônica, interação eletrostática, pectina de baixo teor de esterificação amidada, concentrado proteico do soro do leite.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce microparticles able to resist the gastric environment and after releasing the encapsulated material in the gut environment. Particles were produced by ionic gelling using low methoxyl amidated pectin with calcium ions and coated with protein using solutions of different concentrations of whey protein concentrated (WPC), submitted or not submitted to thermal treatment. The condition of the protein adsorption on the surface of pectin particles was defined as the analysis of free charge total protein and polysaccharide solutions and thus defining the relationship between pH and ratio used for the production of particles. The particles obtained were characterized with to their electrical change so as to obtain conditions of pH and the concentration of polysaccharide to protein in solution in which the electrostatic interaction between the biopolymer possible. Five levels of protein in solution (2, 4, 6, 8 e 12%) associated with non-denatured (STT) and denatured (TT) protein in a water bath at 80°C for 15 minutes were tested, and the resulting particles were characterized with respect to their morphology, protein and moisture content. From this preliminary study were selected two types of particles, one particle with STT protein and another with TT protein, using as a standard the conditions of protein in solution which produced the highest level of protein adsorbed. The particles selected were evaluated with respect to resistance to the environment of the stomach and ability to release encapsulated material in intestinal environment, and for that, the microparticles were subjected to a simulated gastrointestinal conditions in vitro evaluating its integrity in these conditions and the protein solubilized in the simulated gastric environment quantified. The stability of the particles at different pHs, average size, internal and external morphology and capacity to rehydration after freeze drying were also evaluated. The concentration of protein in solution where the highest values of protein adsorbed was obtained was 4 – 6%, with adsorption of $49.2 \pm 1.0\%$ for particles with WPC - STT and $27.6 \pm 1.8 \%$ for the solution contained WPC - TT. The size of the microparticles after their insertion at

different pHs as well as in artificial gastric juice, ranging from 224,8 μm to 342,9. The microparticles freeze dried and rehydrated regained the shape and original size after one hour of insertion in water and were stable against changes in pH. The particles remained intact in the environment of the stomach and disintegrated at the intestinal environment, however during the simulation of gastric conditions there was a high concentration of protein in gastric juice while the pH was adjusted to 1.2 with the presence of pepsin while smaller solubilization was observed then the pH of gastric juice was adjusted to 3, also in the presence pepsin.

Keywords: Microencapsulation, ionic gelation, electrostatic interaction, low methoxyl amidated pectin, whey protein concentrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1: Fluxograma da produção das micropartículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite.	32
Figura 2.2. Potencial zeta das soluções de WPC e pectina a concentração de 0,2% (m/m) em função do pH.....	35
Figura 2.3. Influência da concentração de WPC na aparência visual e potencial zeta das misturas de SPec e SPro (WPC) na concentração de 0,2% a pH 4. Seqüência A para WPC – STT e seqüência B para WPC - TT	38
Figura 2.4. Influência da concentração de WPC na aparência visual e potencial zeta de misturas de PPec e SPro. Seqüência A para WPC - STT e seqüência B para WPC – TT, pH 4. Imagens após 8 horas de repouso.....	42
Figura 2.5. MEV de micropartículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite (WPC - STT), para concentrações de proteínas em solução de 4% (A); 6% (B) e 12% (C).	48
Figura 3.1. Morfologia de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática em soluções de WPC – STT em diferentes concentrações de proteína (%).	66
Figura 3.2. Morfologia das micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática em soluções de WPC - TT com diferentes concentrações de proteína (%).	67
Figura 3.3. Microscopia confocal de partículas produzidas por gelificação iônica recobertas com WPC – STT coradas com FIT C (imagem A) e com WPC - TT coradas com Rhodamina (imagem B).	68
Figura 3.4. Partículas de gelificação iônica com manteiga marcada com corante fluorescente Nile Red. A – confocal; B- DIC (sobreposição)	69
Figura 3.5. Tamanho das micropartículas recobertas (úmidas) em função dos diferentes teores de proteína em solução, a pH 4.....	71
Figura 3.6. Micropartículas liofilizadas e reidratadas após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.	74

Figura 3.7. Morfologia das micropartículas durante da simulação gastrointestinal (2 horas, 37°C, pH 1,2, com pepsina e 5 horas, pH 7, 37°C com pancreatina). 81

Figura 3.8. Morfologia das micropartículas durante da simulação gastrointestinal (2 horas, 37°C, pH 3,0, com pepsina e 5 horas, pH 7, 37°C com pancreatina). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Tamanho das micropartículas obtidas entre misturas de PPec e SPro.	45
Tabela 2.2. Teor de proteína (base seca) de partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite por interação eletrostática.	46
Tabela 2.3. Teor de umidade de partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite por interação eletrostática.....	47
Tabela 3.1. Teor de proteína adsorvido (base seca) nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).	61
Tabela 3.2. Teor de umidade (%) nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução.	63
Tabela 3.3. Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas úmidas (μm) após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.....	73
Tabela 3.4. Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas liofilizadas e reidratadas (μm) após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.....	75
Tabela 3.5. Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas (μm) após a simulação gástrica (2 horas) em pH 3, na presença de pepsina.....	77
Tabela 3.6. Solubilidade média (%) das micropartículas após 2 horas de simulação gástrica, em diferentes pHs de suco gástrico artificial. Micropartículas produzidas com 4% de proteína em solução.	79
Tabela A 1. Teores de proteína (%)de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática, reaproveitando a SPro.	103
Tabela A 2. Teores de umidade (%) de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática, reaproveitando a SPro.	103
Tabela A 3. Teor de proteína nas soluções de WPC após as interações eletrostáticas seqüenciais.	104

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
INTRODUÇÃO	1
APRESENTAÇÃO.....	3
OBJETIVOS	4
1. Objetivo geral	4
1.1 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 1	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Microencapsulação	6
2. Gelificação iônica	8
3. Pectina	11
4. Interação eletrostática	15
5. Proteínas do soro do leite.....	17
6. Resistência entérica	21
CAPÍTULO 2	24
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE PECTINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E SEU EFEITO SOBRE A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE PARTÍCULAS DE PECTINA	24
1. Introdução	25
2. Materiais e Métodos	28

2.1 Materiais	28
2.2 Métodos	28
2.2.1 Caracterização dos biopolímeros	28
2.2.2 Potencial zeta.....	28
2.2.2.1 Potencial zeta das soluções dos biopolímeros	29
2.2.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de SPec: SPro.....	29
2.2.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de PPec : SPro.....	30
2.2.3 Produção de micropartículas de pectina por gelificação iônica e avaliação da adsorção de proteína sobre a superfície das partículas por interação eletrostática	31
2.2.3.1 Produção de partículas de pectina por gelificação iônica (PPec).....	31
2.2.3.2 Recobrimento com proteínas por interação eletrostática.....	31
2.2.4 Caracterização das micropartículas	32
2.2.4.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura	32
2.2.4.2 Tamanho médio das micropartículas	33
2.2.4.3 Conteúdo de proteína e umidade	33
2.2.5 Análise estatística	34
3. Resultados e Discussão	34
3.1 Caracterização dos materiais	34
3.2 Potencial zeta	35
3.2.1 Soluções de biopolímeros	35
3.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de SPec : SPro	36
3.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de PPec : SPro	41
3.2 Produção de micropartículas para avaliação da adsorção proteica	46
4. Conclusões.....	49
CAPÍTULO 3	50
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ENTÉRICA DE MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO E INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA.....	50

1. Introdução	51
2. Materiais e Métodos	54
2.1 Materiais	54
2.2 Métodos	55
2.2.1 Produção de micropartículas.....	55
2.2.2 Conteúdo de proteína e umidade das micropartículas	56
2.2.3 Caracterização das micropartículas	56
2.2.3.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura	56
2.2.3.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	56
2.2.4 Tamanho médio das micropartículas	57
2.2.5 Capacidade de inchamento.....	57
2.2.6 Avaliação da solubilidade protéica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais	58
2.2.7 Análise estatística	59
3. Resultados e Discussão.....	59
3.1 Conteúdos de proteína adsorvida e umidade das micropartículas	59
3.2 Morfologia e microestrutura das micropartículas	64
3.3 Tamanho das micropartículas.....	69
3.3.1 Tamanho das micropartículas úmidas.....	69
3.3.2 Tamanho das partículas úmidas ou reidratadas em diferentes pHs.72	
3.3.3 Tamanho das partículas úmidas submetidas às simulações das condições gastrointestinais	76
3.4 Solubilidade das micropartículas úmidas submetidas às condições gastrointestinais.....	77
4. Conclusões.....	83
CONCLUSÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO.....	102

INTRODUÇÃO

A microencapsulação é uma técnica que viabiliza a proteção de compostos, sendo empregada em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. O principal objetivo da técnica é proteger o material encapsulado das condições adversas do meio e liberá-lo em seu sítio de ação em quantidade e no momento adequado para exercer a função desejada (SHAHIDI & HAN, 1993; GIBBS, 1999).

Os materiais encapsulados podem ser de diferentes naturezas incluindo defensivos agrícolas, células vivas, ácidos graxos essenciais e microorganismos probióticos (CHANDRAMOULI *et al.*, 2004; DE VOS *et al.*, 2006; PATTEN *et al.*, 2009; RAMÓN-AZCÓN *et al.*, 2010). Diversas técnicas de microencapsulação e materiais têm sido utilizados no desenvolvimento das micropartículas e variam conforme o meio onde serão inseridas, determinando a forma de liberação do material. Entre os principais gatilhos de liberação se encontram a solubilidade, o pH, o rompimento mecânico, a temperatura e o ataque enzimático (GOUIN, 2004; MAESTRELLI *et al.*, 2008).

Para compostos aplicados na área de alimentos é imprescindível que o material utilizado na produção das partículas seja seguro para o consumo humano, potencializando o uso de biopolímeros naturais como pectinas, alginatos, quitosanas e proteínas do soro do leite. O uso destes materiais para a produção de micropartículas é relatado na literatura há anos e bons resultados foram obtidos (HEELAN & CORRIGAN, 1998; BRACCINI & PÉREZ, 2001; CHEN & SUBIRADE, 2005a; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007; JONES & MCCLEMENTS, 2010b; PATEL *et al.*, 2011).

Uma das técnicas de microencapsulação onde biopolímeros como a pectina e o alginato são utilizados é a gelificação iônica. A gelificação iônica é uma técnica simples e branda, onde micropartículas são produzidas pelo gotejamento de uma solução polimérica em uma solução catiônica, normalmente cálcio, sob agitação constante (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

Uma das características das partículas de gelificação iônica é a porosidade da matriz que permite a difusão de compostos de baixo peso molecular (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997; SRIAMORNSAK, 1998; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007; OVODOV, 2009). A resistência mecânica e a permeabilidade das partículas podem ser melhoradas pela adição de outro polieletrólito de carga oposta sobre a superfície das mesmas (YEO, BAEK & PARK, 2001; SRIAMORNSAK, SUNGTHONGJEEN & PUTTIPIPATKHACHORN, 2007; GBASSI *et al.*, 2009; PATIL *et al.*, 2010; HUMBLET-HUA *et al.*, 2011).

Partículas que sejam resistentes às condições gástricas estão sendo cada vez mais estudadas pela necessidade de se aperfeiçoar o mecanismo de liberação do ativo em seu sítio de ação (KOSARAJU, 2005; CHAMBIN *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006; MAESTRELLI *et al.*, 2008; ALHNAN *et al.*, 2010; PAWAR, PAWAR & PATEL, 2011; WONG, COLOMBO & SONVICO, 2011). A indústria farmacêutica e de alimentos vem estudando partículas que liberem o ativo em áreas específicas do trato gastrointestinal especialmente intestino delgado e cólon (GUZEY & MCCLEMENTS, 2006; KRISHNAMACHARI, MADAN & LIN, 2007; PATTEN *et al.*, 2009; WONG, COLOMBO & SONVICO, 2011).

Partículas resistentes ao ambiente gástrico que possam liberar o ativo em ambiente intestinal e que sejam produzidas com materiais seguros permitem a microencapsulação de compostos destinados ao consumo humano, reduzindo a quantidade de composto adicionado e garantindo sua viabilidade em seu local de ação, potencializando sua absorção. Assim, é possível desenvolver partículas utilizando biopolímeros naturais, resistentes a parte superior do trato gastrointestinal e que liberem o material encapsulado em ambiente intestinal. Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver micropartículas pelas técnicas de gelificação iônica utilizando pectina de baixo teor de esterificação amidada com posterior recobrimento com proteínas do soro do leite por interação eletrostática avaliando, *in vitro*, a resistência das partículas ao ambiente gástrico e desintegração em ambiente intestinal.

APRESENTAÇÃO

A utilização da microencapsulação para produção de partículas resistentes as condições gástricas vem sendo extensivamente estudada, especialmente para a veiculação de compostos funcionais e fármacos. A utilização de biopolímeros naturais é de grande valia, uma vez que, esses materiais são classificados como seguros, e podem ser destinados ao consumo humano. Este trabalho representa a continuidade de vários trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ/DEPAN/FEA/UNICAMP), onde micropartículas são desenvolvidas e aplicadas nas mais diversas áreas. Neste estudo, especificamente, trabalhou-se em parceria com o Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/FEA/UNICAMP) onde micropartículas contendo microorganismos probióticos vêm sendo aplicadas em produtos lácteos, como iogurte e queijo.

A dissertação está estruturada da seguinte maneira:

- Capítulo 1: Apresenta uma revisão bibliográfica sobre os tópicos abordados no presente trabalho;
- Capítulo 2: Reúne os ensaios preliminares para a obtenção das condições de pH e concentrações de proteína que viabilizem a interação entre os biomateriais utilizados na produção das partículas. Avaliou-se também a possibilidade de partículas de pectina obtidas por gelificação iônica, serem recobertas com proteínas do soro do leite. Nesta avaliação foi utilizada manteiga, em baixa concentração, como material de recheio;
- Capítulo 3: O foco principal foi avaliar o comportamento das partículas submetidas à simulação das condições gastrointestinal, *in vitro*. Nesta avaliação a quantidade de manteiga, utilizada como recheio, foi aumentada;
- Anexo: O Anexo I avaliou a adsorção de proteínas utilizando-se quatro inclusões de partículas de pectina sucessivamente. O teor de proteína adsorvida e o teor de proteína remanescente nas soluções foi determinado.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir partículas por gelificação iônica utilizando pectina de baixo teor de esterificação amidada e recobri-las com proteínas do soro do leite, sem e com tratamento térmico, por interação eletrostática e avaliar sua resistência quando submetidas às condições gastrointestinais.

1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a carga líquida dos materiais utilizados na produção de micropartículas e a relação de quantidades entre pectina e proteína necessárias para a produção de micropartículas;
- Avaliar o efeito do tratamento térmico e da concentração de proteína em solução sobre a adsorção de proteína sobre a superfície de micropartículas de pectina;
- Avaliar a morfologia interna e externa das micropartículas produzidas;
- Avaliar a estabilidade e capacidade de hidratação das micropartículas úmidas e liofilizadas, respectivamente, frente a diferentes pHs;
- Avaliar a resistência das micropartículas recobertas em condições simulando o ambiente gástrico e intestinal.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é uma técnica versátil, o que permite sua aplicação em diversas áreas, tais como: farmacêutica, alimentícia, agrícola, cosmética, sistemas de fixação de tintas automotivas e fotocopiadoras, dentre outras (DESAI & JIN PARK, 2005; KRISHNAMACHARI, MADAN & LIN, 2007; BADILA *et al.*, 2008; RAMÓN-AZCÓN *et al.*, 2010; DOHERTY *et al.*, 2011; LEE & KIM, 2011).

Desde seu primeiro relato na década de 30 e sua aplicação na década de 50, a microencapsulação evoluiu muito e houve uma grande expansão nas áreas de aplicação. As áreas de maior pesquisa e investimento são, atualmente, a farmacêutica e a cosmética. Relatos recentes mostram a aplicação das micropartículas na área de biotecnologia, microencapsulando células vivas, como ilhotas pancreáticas para a produção de insulina (GOUIN, 2004; DESAI & JIN PARK, 2005; DE VOS *et al.*, 2006; RE, 2000).

Tais partículas podem ser projetadas para a proteção, liberação controlada e empacotamento de vários ingredientes para alimentos, tais como lipídios, compostos bioativos, minerais, enzimas, peptídeos, fibras dietéticas, dentre outros (GOUIN, 2004; CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007). Essas partículas, ao serem inseridas em alimentos, não devem alterar negativamente suas características físicas além de, liberar o material encapsulado nos locais de ação desejados (como por exemplo: boca, estômago, intestino delgado e cólon), modular as propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos, como aparência, textura, estabilidade e sabor (CHEN, 2007; FOEGEDING & DRAKE, 2007; VAN DEN BERG *et al.*, 2008).

A microencapsulação consiste no empacotamento de materiais sólidos e líquidos em pequenas cápsulas que podem liberar seu conteúdo a taxas

controladas e em condições específicas ao longo do tempo (CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007). O conceito da técnica foi idealizado a partir do modelo celular, no qual a membrana protege o citoplasma, sendo que para as microcápsulas, uma camada externa, normalmente um material polimérico, chamado de material de parede atua como um filme protetor, isolando o composto a ser encapsulado (gotículas líquidas ou partículas sólidas) denominado núcleo ou recheio, do meio externo (ANAL & STEVENS, 2005; ANAL & SINGH, 2007).

As micropartículas podem ser produzidas em diferentes tamanhos, formas e estruturas, dependendo da natureza dos materiais e do tipo de técnica usada para sua produção. O tamanho das micropartículas, que geralmente varia entre 0,01 a 1000 μm , é importante, pois afeta tanto as propriedades físico-químicas como os atributos sensoriais, quando aplicados à área de alimentos (MCCLEMENTS, 2005; VAN DEN BERG *et al.*, 2008).

Dependendo das propriedades físico-químicas do núcleo, o tipo de material de parede e a técnica de microencapsulação utilizada, diferentes tipos de partículas podem ser produzidas, tais como: simples esferas recobertas por uma camada de espessura uniforme; partículas contendo vários núcleos de forma irregular; partículas multinucleadas inseridas em uma matriz contínua do material de parede; vários núcleos distintos dentro de uma mesma partícula e partículas de multicamadas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Vários métodos podem produzir partículas esféricas, porém outras formas também são possíveis como esferóides, fibras, ovulares ou aglomerados. A estrutura interna de uma partícula é um ponto importante para determinar suas características funcionais, como a eficiência de encapsulação, a capacidade de retenção do composto encapsulado, a permeabilidade, a integridade e a digestibilidade. Ingredientes encapsulados em matrizes porosas podem ser liberados mais rápido que matrizes densas e íntegras (JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

A escolha do material de parede deve levar em consideração as características físico-químicas do material de recheio, o meio de inserção das cápsulas e a técnica de microencapsulação. O material de parede deve ser

capaz de formar uma camada coesa com o material de recheio, ser compatível, porém imiscível ao material encapsulado, além de fornecer propriedades de revestimento desejado tais como: resistência, impermeabilidade, flexibilidade e estabilidade (ANAL & SINGH, 2007).

As microcápsulas podem ser projetadas para liberar o material encapsulado em quantidades gradativas e em condições de meio específicas (como por exemplo, em diferentes partes do corpo). Diferentes tipos de “gatilho” podem ser utilizados para a liberação do material encapsulado tais como alteração de pH, ruptura mecânica, temperatura, ação enzimática, força osmótica, dentre outras (GOUIN, 2004; MAESTRELLI *et al.*, 2008).

A escolha do método de microencapsulação depende do tipo de material a ser encapsulado, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado. As principais técnicas são: *spray drying*, *spray cooling*, leito fluidizado, co-cristalização, liofilização, coacervação simples e complexa, gelificação iônica e a produção de lipossomas. A diferença entre as técnicas está na natureza química, física ou físico-química das mesmas (JACKSON & LEE, 1991; JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

Na indústria de alimentos diversos polissacarídeos e proteínas são utilizados na fabricação de microcápsulas. A utilização de proteínas e/ou polissacarídeos depende de alguns fatores, como a capacidade dos biopolímeros em formar partículas, serem atóxicos e moduláveis a ponto de se produzir partículas com as características desejadas, com tamanho, estrutura, carga, permeabilidade e estabilidade desejados (ANAL & SINGH, 2007; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; JONES & MCCLEMENTS, 2010b; PATEL *et al.*, 2011).

2. GELIFICAÇÃO IÔNICA

Partículas de biopolímeros podem ser formadas por diferentes técnicas de gelificação (iônica, aquecimento ou resfriamento) e métodos de processamento (extrusão ou atomização), sendo alginato e pectina os

biopolímeros mais utilizados (HILLS *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2006; BUREY *et al.*, 2008). Uma das técnicas de microencapsulação na qual hidrocolóides são utilizados é a gelificação iônica (RACOVITĂ *et al.*, 2009).

Existem dois tipos de gelificação iônica: a interna e a externa. A gelificação iônica interna produz partículas por meio da adição de sais de cálcio insolúveis em uma solução polimérica contendo material de recheio. A solução é emulsificada em uma fase oleosa contendo surfactante. Para que a gelificação ocorra, adiciona-se uma solução ácida para redução do pH a fim de liberar os íons cálcio, permitindo a complexação do cálcio com os grupos carboxílicos. A gelificação iônica externa é uma técnica em que partículas são produzidas pelo gotejamento de uma solução polimérica em uma solução catiônica, normalmente cálcio, sob agitação constante (CHAN, LEE & HENG, 2006; REIS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

A gelificação iônica externa é um método de encapsulação simples e brando. A produção de micropartículas sem a utilização de solventes orgânicos torna esta técnica crescente e promissora, especialmente para a encapsulação de fármacos, células vivas imobilizadas e para inclusão de compostos de interesse em alimentos (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA & AMINABHAVI, 2004; PATIL *et al.*, 2010).

A técnica é baseada na habilidade de vários hidrocolóides tornarem-se gel na presença de íons, normalmente cátions divalentes. A interação de íons, como o Ca^{2+} , com os grupos carboxilas das cadeias poliméricas de polissacarídeos resulta na formação de géis insolúveis. Portanto, a adição gota a gota de uma dispersão de polissacarídeo contendo o material a ser encapsulado sobre uma solução de íons, leva a formação de partículas. As gotículas ao entrarem em contato com os íons formam, instantaneamente, estruturas de gel contendo o material a ser encapsulado disperso por toda a matriz de polissacarídeo (SMRDEL *et al.*, 2008).

No estágio inicial de formação das partículas de gel, é produzida uma camada de cálcio/pectina na parte externa da partícula. A parte interna também será complexada com íons cálcio que migram para o interior da cápsula,

formando cápsulas rígidas e estáveis, após poucos minutos de contato com a solução iônica. À medida que aumenta o tempo de contato das micropartículas com a solução gelificante, aumenta-se a espessura da parede das micropartículas e conseqüentemente a resistência à ruptura mecânica. Após aproximadamente 20 minutos de contato com o banho iônico, as micropartículas atingem sua estabilidade máxima e a resistência mecânica torna-se constante. Além do tempo, a concentração de cálcio também pode influenciar na rigidez da partícula (RACOVITĂ *et al.*, 2009).

Partículas de gelificação iônica podem ser preparadas por três sistemas distintos, dependendo do tamanho desejado da partícula, podendo ser produzidas por extrusão, atomização por ar comprimido e por pulverização eletrostática. No processo de extrusão, a solução, com o material de parede e recheio, é gotejada em uma solução iônica por meio de uma agulha, com ou sem velocidade controlada. Na atomização por ar comprimido, o ar comprimido é insuflado, misturando-se a solução a ser encapsulada, pressionando a passagem da solução por um orifício de tamanho controlado. Recentemente, tem-se utilizado um pulverizador eletrostático para a produção e neste caso, o princípio básico do equipamento é o uso de uma força eletrostática para puxar gotas de uma agulha para um banho iônico. O grande diferencial da técnica é produzir partículas com pequenas variações de tamanho (BUREY *et al.*, 2008; PATIL *et al.*, 2010; DOE *et al.*, 2011).

A vantagem da gelificação iônica está na praticidade de execução, uma vez que a técnica pode ser conduzida em ambientes estéreis e praticamente qualquer ingrediente pode ser encapsulado, seja ele hidrofóbico ou hidrofílico sensível à temperatura, líquido, sólido ou viscoso. A principal característica das partículas de gelificação iônica produzidas por hidrocolóides é a matriz de gel porosa, o que permite a difusão rápida e fácil da água e/ou outros fluídos para dentro e para fora da matriz da cápsula. Tais características podem ser vistas como uma vantagem da técnica quando utilizada para imobilização de células vivas e enzimas, mas torna-se desvantajosa quando se está tentando proteger ou segregar um ingrediente de seu ambiente, especialmente para compostos

de baixo peso molecular, que podem ser removidos por lixiviação (GOUIN, 2004).

A qualidade das partículas produzidas por gelificação iônica pode ser melhorada pela técnica de complexação de polieletrólitos. A resistência mecânica e a permeabilidade das partículas de gelificação iônica (porosidade da matriz) podem ser melhoradas pela adição de outro polieletrólito de carga oposta sobre a superfície da partícula. Micropartículas de alginato e pectina vêm sendo recobertas por policátions (quitosana e proteínas do soro do leite), que formam uma membrana na superfície das partículas e retardam a liberação do ativo (YEO, BAEK & PARK, 2001; SRIAMORNSAK, SUNGTHONGJEEN & PUTTIPIPATKHACHORN, 2007; GBASSI *et al.*, 2009; PATIL *et al.*, 2010; HUMBLET-HUA *et al.*, 2011).

Pectina e proteínas podem interagir entre si por meio de diferentes interações físicas e químicas. O sinal, magnitude, força e direção sofrem influência das condições ambientais e composição das soluções, como pH, força iônica, temperatura e solvente. Essas interações são responsáveis pela formação de partículas e possíveis alterações de morfologia, tais como integridade, inchamento, corrosão e desintegração (MCCLEMENTS, 2005; JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

3. PECTINA

Hidrocolóide é um grupo heterogêneo de polímeros de cadeia longa (proteínas e polissacarídeos) caracterizados por suas propriedades de formar géis e alterar a viscosidade quando dispersos em meio aquoso. Os principais hidrocolóides gelificantes são o alginato, pectina, carragena, gelatina, goma gellana e agar (SAHA & BHATTACHARYA, 2010). Dentre eles, destaca-se a pectina, um polissacarídeo natural presente na parede celular das plantas e nas camadas intercelulares (lamela média) de células vegetais, conferindo rigidez estrutural às plantas (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997).

Na indústria de alimentos a pectina é muito empregada como agente gelificante, estabilizante e/ou espessante, especialmente na fabricação de géis e geléias. Na área da saúde é usada como fibra solúvel, auxiliando na redução dos níveis de colesterol e tratamento de câncer e no aumento da resposta do sistema imunológico. Mais recentemente, tem-se utilizado pectina na área de biotecnologia na produção de dispositivos biomédicos (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997; GUILLOTIN *et al.*, 2005; INNGJERDINGEN *et al.*, 2007; JACKSON *et al.*, 2007; MOHNEN, 2008).

Quimicamente, a pectina é um polissacarídeo composto por uma cadeia linear de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações α 1,4 em que os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar esterificados por grupamentos metil. Resíduos de açúcares neutros como ramnose, D-arabinose e D-galactose estão presentes ao longo da cadeia da pectina e a fonte de extração da pectina vai determinar a quantidade e o tipo desses açúcares o que influencia suas características físico-químicas (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997; RALET *et al.*, 2003).

As principais fontes comerciais de extração da pectina são o albedo de frutas cítricas e a polpa da maçã, sendo que a maçã tem sido cada vez menos utilizada. Fontes alternativas de extração como tomate, beterraba, girassol, manga e grão de bico também vêm sendo pesquisadas (ROLIN, 1990; RIDLEY, O'NEILL & MOHNEN, 2001; URIAS-ORONA *et al.*, 2010; SRIVASTAVA & MALVIYA, 2011). O número de fontes de pectina é limitado, uma vez que, a habilidade em formar gel depende do peso molecular e do grau de esterificação e estes são afetados pela fonte de extração (SRIVASTAVA & MALVIYA, 2011).

Devido à sua conformação química, os tipos de ligações presentes na molécula de pectina não são hidrolisados pelas enzimas gástricas e a pectina permanece intacta no estômago e no intestino delgado, sendo degradada apenas pelas bactérias presentes na microbiota do cólon (KOSARAJU, 2005).

Em relação à carga da pectina reporta-se o valor de pKa de 2,9, estando carregada negativamente em pHs acima deste valor e neutra abaixo

deste, caracterizando-se como um polissacarídeo aniônico (RALET *et al.*, 2001). A carga líquida total é controlada pelo número de grupos carboxílicos metil esterificados e a distribuição dos grupos metil esterificados controla a variação de carga pela cadeia da pectina (SPERBER *et al.*, 2009b).

O grau de metoxilação (grupos carboxílicos metil esterificados) é importante na determinação da solubilidade da pectina e nas suas propriedades gelificantes e formadora de filmes (LIU, FISHMAN & HICKS, 2007). A pectina é classificada com relação ao grau de grupos carboxílicos esterificados, como: a) pectina de alto grau de metoxilação (HMP): pectinas que contém mais que 50% dos grupos carboxílicos esterificados, variando de 55 a 80%, sendo esta a forma encontrada na natureza, b) pectina de baixo teor de esterificação (LMP): pectinas que contém menos que 50% dos seus grupos carboxílicos esterificados, variando entre 25 a 50% (MAY, 1990; ROLIN, 1990).

A redução do grau de metoxilação pode ser realizada por diferentes maneiras, dentre elas os métodos enzimático e químico. O procedimento químico é o mais comum, utilizando ácidos ou bases, resultando na remoção aleatória de ésteres metílicos. Quando a pectina é demetoxilada sob condições alcalinas, alguns ésteres metílicos são transformados em grupamentos amida, originando pectinas de baixo teor de esterificação amidada (FRAEYE *et al.*, 2010).

Além do grau de esterificação, as propriedades funcionais da pectina também são influenciadas pelo grau de amidação (número de grupos carboxílicos esterificados com grupamento amina) e por seu peso molecular (KIM *et al.*, 2008).

A principal propriedade da pectina é formar gel, seja na presença de açúcares e ácidos ou na presença de íons cálcio, em concentrações acima de 1% (MAY, 1997; THAKUR, SINGH & HANDA, 1997). Durante a formação do gel é produzida uma rede tridimensional de ligações entre as cadeias dos polímeros que pode envolver ligações colaventes simples, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997).

Pectinas de alto teor de metoxilação são um excelente agente gelificante, entretanto, necessitam de concentrações específicas (normalmente altas) de açúcar e ambiente ácido para formar gel. O baixo pH reduz a força de repulsão enquanto o açúcar reduz a interação com a água. As concentrações de açúcar e pH devem ser ajustadas, uma vez que para concentrações maiores de açúcar é possível trabalhar com valores de pH não tão baixos (ROLIN, 1990; THAKUR, SINGH & HANDA, 1997).

Pectinas de baixo teor de metoxilação gelificam pela formação de ligações entre grupos carboxílicos da pectina e cátions divalentes, normalmente cálcio (RALET *et al.*, 2001). A estrutura tridimensional do gel envolve uma seqüência de dois ácidos galacturônicos dispostos paralelamente, formando pontes entre os íons e os grupos carboxilas livres. O modelo usado para descrever essa interação é o modelo “egg-box”, que descreve zonas de junção entre os íons e a pectina, promovendo a formação de uma rede (GRANT *et al.*, 1973).

A força do gel de LMP eleva-se com o aumento da concentração de cálcio e uma redução da temperatura (CLARK & FARRER, 1996; MAY, 1997). Pectinas de baixo teor de metoxilação amidadas formam géis mais rígidos pela ação de cálcio quando comparado à pectina de baixo teor de metoxilação (SRIAMORNSAK, 1998). Fatores como peso molecular, o número e a distribuição dos grupos carboxílicos e distribuição de açúcares neutros ao longo da cadeia, presença de grupos acetil, concentração de pectina, a força iônica e a temperatura, também afetam o processo de formação do gel (MAY, 1990; THAKUR, SINGH & HANDA, 1997).

LMP quando comparadas à HMP além da estabilidade em uma ampla faixa de pH, apresentam a vantagem de não depender de açúcar para gelificar, necessitando apenas de cálcio (CARDOSO, COIMBRA & LOPES DA SILVA, 2003).

A habilidade dos polissacarídeos em formar gel tem grande importância na formação de partículas de biopolímeros (WILLIAMS, 2007). Matrizes de pectina têm sido utilizadas na produção de partículas para microencapsulação

de fármacos (SRIAMORNSAK, 1998). Alguns derivados de pectina, como pectina amidada são utilizados em partículas para liberação de substâncias no cólon devido à sua biodegradabilidade, alta tolerância a variações de pH e floculação, podendo ser utilizadas como matriz ou como material de recobrimento (SINHA & KUMRIA, 2001).

Um dos obstáculos para o uso da pectina na área farmacológica está na alta capacidade de inchamento da pectina em condições fisiológicas (LIU, FISHMAN & HICKS, 2007). Várias técnicas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em matrizes de pectina, especialmente a gelificação iônica, por ser uma técnica simples e segura do ponto de vista de toxicidade (SRIVASTAVA & MALVIYA, 2011).

4. INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA

Uma das alternativas para melhorar a proteção das micropartículas e aumentar sua estabilidade é o recobrimento de partículas de gelificação iônica com biopolímeros através de interações eletrostáticas. A utilização de solventes orgânicos para a reticulação passa a ser uma alternativa inviável para produtos destinados ao consumo humano (PATIL *et al.*, 2010). Interações eletrostáticas ocorrem entre biopolímeros carregados com cargas opostas que interagem entre si. A carga elétrica de um cátion (quitosana ou proteínas do soro do leite) ou ânion (alginato, pectina ou carragena) depende do pH da solução em relação aos valores de pKa ou pI dos grupos ionizáveis (JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

Interações entre proteínas e polissacarídeos desempenham um papel importante na estrutura e estabilidade de alimentos. O controle e a manipulação dessas interações macromoleculares são essenciais para o desenvolvimento de novos produtos e processos na área de alimentos (YE, 2008).

Mistura de biopolímeros (proteínas e polissacarídeos) podem permanecer em uma única fase ou separar fases. A separação de fases pode

ocorrer por segregação devido à incompatibilidade dos materiais ou pela complexação devido a cargas opostas. No caso de proteínas e polissacarídeos serem incompatíveis, pode ocorrer segregação (separação termodinâmica de fases), exibindo nitidamente duas fases, uma de polissacarídeo e outra de proteína, serem co - solúveis e apresentarem uma única fase ou complexaram por apresentarem cargas opostas. No caso de proteínas e polissacarídeos que exibem cargas opostas pode ocorrer interações eletrostáticas, coacervação complexa ou separação de fases associativa, dando origem a complexos de proteína/polissacarídeo. Neste caso as misturas exibem duas fases distintas, uma proteína/polissacarídeo e a outra do solvente (TOLSTOGUZOV, 1995; COOPER et al., 2005; YE, 2008).

Proteínas apresentam carga líquida negativa acima do ponto isoelétrico (pI) e carga líquida positiva abaixo do pI. Polissacarídeos aniônicos tem carga negativa máxima em valores de pH bem acima do pKa, mas perdem progressivamente essa carga a medida que o pH é reduzido (JONES, DECKER & MCCLEMENTS, 2010).

A formação de complexos e/ou coacervados entre proteínas e polissacarídeos é de extrema importância em processos industriais especialmente no processamento de micro e nanopartículas e estrutura de multicamadas (AI, JONES & LVOV, 2003; MCCLEMENTS, 2005; TURGEON, SCHMITT & SANCHEZ, 2007; SCHMITT & TURGEON, 2011).

A aplicação de uma camada externa protetora sobre micropartículas para agir como uma barreira protetora além da barreira física vem sendo pesquisada há alguns anos (ROSENBERG & LEE, 2004; TEOH et al., 2011). Diversos materiais podem ser utilizados para o recobrimento de micropartículas e tanto as características da matriz como as da partícula revestida devem ser estudadas. Quitosana, proteínas do soro do leite (especialmente β -lactoglobulina), poli-L-lisina, caseína e lactoferrina, são alguns dos materiais utilizados no recobrimento de partículas (SULTANA *et al.*, 2000; SAGIS *et al.*, 2008; GBASSI *et al.*, 2009; BENGOCHEA, PEINADO & MCCLEMENTS, 2011).

A adsorção de proteínas depende das características físico-químicas das superfícies e podem variar em quantidade, densidade, conformação e orientação. O tempo e a concentração também são fatores que podem afetar a adsorção (ROACH, FARRAR & PERRY, 2005). A interação eletrostática em partículas pode ser controlada pela variação de cargas de superfície e pode ser determinada pelo potencial zeta das partículas. Fatores como pH e concentração de eletrólitos em solução têm um forte impacto na força e no tipo de cargas eletrostáticas sobre a adsorção em superfície (PATIL *et al.*, 2007).

Além das interações eletrostáticas outras ligações também estão envolvidas no processo de adsorção de proteínas na superfície de micropartículas, como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas, porém o mecanismo de interações químicas não foi entendido completamente (ROACH, FARRAR & PERRY, 2005; ASKER, WEISS & MCCLEMENTS, 2011; THORNE, VINE & SNOWDEN, 2011). Partículas produzidas por interações eletrostáticas têm mostrado resistência à ação das enzimas da parte superior do trato gastrointestinal, mostrando-se um bom veículo para fármacos e compostos bioativos (KOSARAJU, 2005; KRASAEKOOPT, BHANDARI & DEETH, 2006; LIU *et al.*, 2006).

5. PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

A utilização de proteínas do soro do leite na produção de micropartículas tem se mostrado uma boa estratégia, uma vez que são materiais classificados como seguros e permitem a encapsulação de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos (CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006).

As proteínas do soro do leite apresentam-se como uma fonte nutricional versátil, sendo classificadas como ingredientes funcionais (SMITHERS, 2008). Estudos recentes descrevem os benefícios à saúde da ingestão de proteínas do soro do leite e a importância de uma maior ingestão destas proteínas (KRISSENSANSEN, 2007; PURWANTI *et al.*, 2011).

Por suas características nutricionais e tecnológicas, as proteínas do soro do leite vêm sendo utilizadas em diversos produtos, em especial: pães, sorvetes, cremes, bebidas em geral, energéticos, barra de cereais, fórmulas infantis, dentre outros (MISTRY, 2002; ZHOU, LIU & LABUZA, 2008; TORRES *et al.*, 2011)

As proteínas do soro do leite são um subproduto da indústria de laticínios, especialmente da produção do queijo e da caseína. São obtidas da fase aquosa do leite após a precipitação da caseína e remoção da gordura (MULVIHILL, 2003; CONSIDINE *et al.*, 2011). São de relativa importância pelo grande volume de matéria gerado, pois para cada 1 a 2 Kg de queijo produzido, são produzidos de 8 a 9 Kg de soro. Estima-se que 180 a 190 milhões de toneladas de soro de leite sejam produzidas por ano no mundo, sendo que apenas 50% são processadas (BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011).

Representam cerca de 20% do total das proteínas presentes no leite, contendo 0,6 a 0,7% de proteína e 93% de água, podendo ter seu teor de proteína concentrado por secagem simples, remoção de lactose, minerais e lipídeos (ATRA *et al.*, 2005; BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011)

As principais formas de comercialização das proteínas do soro do leite são os concentrados ou isolados protéicos (PEREIRA, DIAZ & COBOS, 2002; PESIC *et al.*, 2011). O concentrado protéico do soro do leite (WPC) é definido como um produto lácteo obtido comercialmente por ultrafiltração, diafiltração e evaporação térmica (*spray dryer*), que pode conter de 25 a 80 % de proteína. Já o isolado, deve apresentar mais que 90% de proteína (FOEGEDING *et al.*, 2002; BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011; CONSIDINE *et al.*, 2011).

As principais aplicações das proteínas do soro do leite são como agentes gelificantes, estabilizantes, emulsificantes e formadores de espuma. Diversos produtos são adicionados de proteínas do soro do leite, seja para aumentar o valor nutricional do produto, seja para fins tecnológicos. A capacidade de emulsificação das proteínas está relacionada ao seu caráter anfifílico (KIM, CORNEC & NARSIMHAN, 2005; EL-SAYED & CHASE, 2011; PEREZ *et al.*, 2011).

Em relação a sua conformação química as proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular com grupos hidrofóbicos localizados no interior da estrutura, contendo algumas ligações dissulfeto (ZHOU, LIU & LABUZA, 2008). A principal proteína do soro do leite é a β -lactoglobulina (β -lg), representando cerca de 50 a 70% do total de proteínas presentes no soro do leite. Também estão presentes outras proteínas como a α -lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, enzimas, proteínas presentes nos glóbulos de gordura, dentre outros (KIM, CORNEC & NARSIMHAN, 2005; EL-SAYED & CHASE, 2011; PEREZ *et al.*, 2011). Contém aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada além de serem boas fontes de aminoácidos sulfurados, especialmente cistina e metionina (SMITHERS, 2008).

A β -lactoglobulina é uma proteína globular que contém duas pontes dissulfeto e um grupo triol livre, sendo a principal responsável pelo processo irreversível de desnaturação. A α -lactoalbumina possui quatro pontes dissulfeto e nenhum grupo triol livre, por isso possui baixa agregação térmica e é extremamente sensível ao cálcio (HOFFMANN & VAN MIL, 1997; SCHMITT *et al.*, 2011).

As propriedades físico-químicas do WPC estão diretamente relacionadas à β -lg e à ALA, por serem as proteínas em maior quantidade no WPC. À temperatura ambiente e em pH fisiológico, apresentam-se na forma de dímeros e pequenos oligômeros, dissociando-se para monômeros com o aumento da temperatura (HOFFMANN & VAN MIL, 1997; NICOLAI, BRITTEN & SCHMITT, 2011)

Em relação à carga livre total, as proteínas apresentam-se carregadas positivamente abaixo do seu ponto isoelétrico e negativamente para valores de pH acima do seu ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico ou pI, é o valor de pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína. A β -lactoglobulina, uma das proteínas presentes no soro do leite, apresenta ponto isoelétrico entre 4,7 a 5,1

(FOX & KELLY, 2003; COOPER *et al.*, 2005; SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008; JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

A conformação globular e os resíduos sulfurados presente nas principais proteínas do WPC fazem com que este seja mais suscetível à desnaturação térmica e à agregação (MORR & HA, 1993; SAWYER, KONTOPIDIS & WU, 1999). De maneira geral, as proteínas do soro do leite são facilmente desnaturadas pelo calor. Temperaturas acima de 60°C levam à alteração de cargas e mudanças estruturais, sendo esse processo irreversível, dependendo do pH utilizado (PARRIS *et al.*, 1997; BRITTEN & GIROUX, 2001; FANG *et al.*, 2011). A temperatura crítica para a desnaturação da β -lg é de 90°C e para a α -la é de 80°C, tornando-se completamente desdobradas após a desnaturação (DE WIT, 2009).

No processo de desnaturação térmica ocorre uma alteração conformacional das proteínas, rompendo especialmente as estruturas terciárias e as pontes de hidrogênio das estruturas secundárias das proteínas. Os grupos hidrofóbicos, que na forma nativa estão protegidos, são expostos, especialmente os grupamentos CO e NH, cadeias laterais de grupo amida e aminoácidos hidrofóbicos (CHEN & SUBIRADE, 2005a; KIM, CORNEC & NARSIMHAN, 2005).

A desnaturação aumenta a reatividade da proteína com outras proteínas, facilita a ligação com o cálcio além de interações hidrofóbicas. A força de reação depende da concentração do soro, temperatura, tempo de desnaturação, pH e força iônica (PURWANTI *et al.*, 2011).

As proteínas do soro do leite vêm sendo estudadas, concentradas ou isoladas, na produção e recobrimento de micropartículas devido à sua resistência à ação das enzimas gástricas, aumentando a resistência e melhorando a estabilidade química e enzimática das micropartículas (DE WIT, 1998; CHANDRAMOULI *et al.*, 2004).

6. RESISTÊNCIA ENTÉRICA

A via oral é um dos principais meios para a administração de alimentos e uma das vias mais utilizadas para a administração de fármacos. A liberação de compostos bioativos em locais específicos do trato gastrointestinal é de extrema importância na terapia de diversas doenças, como doença de Crohn ou colite ulcerativa, bem como para vitaminas, minerais, microorganismos e compostos alimentares bioativos (KRISHNAMACHARI, MADAN & LIN, 2007; PATTEN *et al.*, 2009; ALBERTINI *et al.*, 2010).

A produção de micropartículas para entrega de compostos no trato gastrointestinal (TGI) vem sendo estudada há vários anos. Um dos obstáculos para a produção destes sistemas são as condições adversas do meio, mecanismos de liberação e a manutenção da viabilidade do composto até o local de ação (ASHFORD *et al.*, 1994; VANDAMME *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003).

O trato gastrointestinal (TGI) é o um tubo muscular que se estende pelo corpo, sendo responsável pela digestão e absorção de nutrientes, eletrólitos e fluidos, além de atuar como barreira impedindo à absorção de substâncias nocivas a saúde. É composto por regiões como cavidade oral, estômago, intestino delgado e intestino grosso ou cólon todas com funções específicas no processo de digestão e absorção. Possui de 6 a 9 metros de comprimento e o tempo de permanência em cada parte varia conforme o composto ingerido, sendo que, de maneira geral, o alimento permanece no estômago de 1 a 3 horas, no intestino delgado de 3 a 4 horas e no cólon de 12 até 30 horas, porém isso varia individualmente (DANGELO E FATINI, 1998).

As diferentes partes do trato gastrointestinal possuem características específicas com relação a enzimas, movimentos e pHs. Na cavidade oral o pH varia de 6,2 a 7,4, no esôfago de 5 a 6, no estômago pode variar entre 1,5 a 3, no intestino delgado de 5 a 7,4 e no cólon de 6 a 7,6. Os microorganismos que colonizam o cólon são extremamente sensíveis as variações de pH. Outro ponto importante é a presença de enzimas no estômago e no intestino. Durante

o trânsito no sistema gástrico, ações mecânicas como mastigação, movimentos peristálticos e pressão gástrica são importantes (DANGELO E FATINI, 1998).

As micropartículas que apresentam a finalidade de liberar o ativo em meio intestinal devem ser resistentes aos movimentos peristálticos, tempo de residência no TGI superior, pressão mecânica do estômago, variações de pH e ação das enzimas gástricas. O conceito básico de micropartículas entéricas é que a partícula permaneça íntegra no ambiente ácido do estômago, mas dissolva-se rapidamente em ambiente neutro como o do intestino delgado (SONAJE *et al.*, 2010).

Alguns materiais, como os polissacarídeos, não são digeridos pelas enzimas no TGI, sendo fermentados pela microbiota do cólon, e apresentam-se como bons materiais de parede para desenvolvimento de micropartículas com resistência entérica, dentre eles pectina, inulina, quitosana, amilose e gomas vêm sendo investigados (KOSARAJU, 2005; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007; ANNAN, BORZA & HANSEN, 2008; LAMBERT, WEINBRECK & KLEEREBEZEM, 2008).

Micropartículas produzidas por biopolímeros como pectina e alginato não são digeridos pelas enzimas gástricas e permanecem intactas na parte superior do TGI, sendo desfeitas após fermentação das enzimas no cólon, necessitando de um tempo maior de permanência em ambiente intestinal para liberação do composto encapsulado (LIU *et al.*, 2003; HOAD *et al.*, 2009; RAYMENT *et al.*, 2009).

Compostos como carotenóides, ácidos graxos essenciais, vitaminas, antioxidantes e minerais cujo local de ação e absorção seja o intestino delgado necessitam estar disponíveis assim que atingem a primeira parte do intestino, sem depender da ação da microbiota do cólon para liberação do composto (CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007; MCCLEMENTS, DECKER & PARK, 2009; MCCLEMENTS *et al.*, 2009). Estudos têm sido realizados para produção de partículas com resistência entérica e que liberem o ativo ao atingirem o intestino. A associação de materiais, como proteínas e polissacarídeos, para

produção de micropartículas com resistência entérica vem sendo intensamente estudadas (CHEN & SUBIRADE, 2005a; LIU *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE PECTINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E SEU EFEITO SOBRE A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE PARTÍCULAS DE PECTINA

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE PECTINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E SEU EFEITO SOBRE A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE PARTÍCULAS DE PECTINA

1. INTRODUÇÃO

Micropartículas estão sendo cada vez mais utilizadas para a proteção e liberação controlada de substâncias funcionais como fármacos, aromas, compostos nutracêuticos dentre outros (KRISHNAMACHARI, MADAN & LIN, 2007; ANNAN, BORZA & HANSEN, 2008). Para sua produção, existe um grande interesse no uso de biopolímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos, uma vez que, são materiais classificados como seguros e podem ser utilizados e veiculados em produtos destinados para o consumo humano (ASHFORD *et al.*, 1994; CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007).

Biopolímeros como pectina, quitosana e proteínas do soro do leite são alguns dos materiais naturais utilizados na produção das micropartículas, seja individualmente ou associados (CHAMBIN *et al.*, 2006; ANNAN, BORZA & HANSEN, 2008; DOHERTY *et al.*, 2011). Micro e nanopartículas podem ser produzidas pela desnaturação térmica das proteínas do soro do leite ou serem aplicadas como material de recobrimento de matrizes de alginato e pectina (CHEN & SUBIRADE, 2006; JONES & MCCLEMENTS, 2010a). Uma das técnicas de microencapsulação na qual hidrocolóides são utilizados é a gelificação iônica (RACOVITĂ *et al.*, 2009). A técnica é baseada na habilidade de vários hidrocolóides em formar gel na presença de íons, normalmente cátions divalentes. A interação de íons, como o Ca^{2+} , com os grupos carboxilas das cadeias poliméricas de polissacarídeos resulta na formação de géis insolúveis (SMRDEL *et al.*, 2008).

Misturas entre proteínas e polissacarídeos podem ser utilizadas na produção de partículas de biopolímeros baseado nas características físico-

químicas de cada biopolímero ou da mistura entre eles formada (TOLSTOGUZOV, 1995; MCCLEMENTS, 2005). Proteínas e polissacarídeos podem associar-se quando estão carregados com cargas opostas, por interação eletrostática (NORTON & FRITH, 2001; JONES & MCCLEMENTS, 2010a).

Forças atrativas e repulsivas entre polissacarídeos e proteínas podem levar à formação de complexos ou a incompatibilidade dos biopolímeros (TURGEON, SCHMITT & SANCHEZ, 2007). Quando os polímeros apresentam o mesmo sinal de carga, macromoléculas solúveis são formadas, e o sistema exibe apenas uma fase. Complexos insolúveis são formados quando os biopolímeros apresentam sinal de carga opostos, a proteína se liga ao polissacarídeo e forças atrativas os estabilizam. Neste caso, ocorre separação das fases e complexos entre proteína e polissacarídeo são formados atingindo a neutralidade. A formação de complexos depende da proporção do polissacarídeo e da proteína e quando a interação entre proteína e polissacarídeo atinge a neutralidade não há repulsão nos sistemas, ocorrendo precipitação (WEINBRECK, MINOR & DE KRUIF, 2004; COOPER *et al.*, 2005; SPERBER *et al.*, 2009b).

Polissacarídeos aniônicos como a pectina, apresentam-se carregados negativamente em uma grande faixa de pH. A pectina é um polissacarídeo complexo extraído do albedo de frutas cítricas e da polpa da maçã. Apresenta ponto isoelétrico de aproximadamente 2,9, estando carregada negativamente em valores de pH acima deste valor e não dissociada em pH abaixo deste valor (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997; RALET *et al.*, 2003).

As proteínas do soro do leite fazem parte do grupo de proteínas globulares obtidas durante o processo de fabricação de queijos. O uso destas proteínas é crescente devido a suas propriedades funcionais e nutricionais. Proteínas, como as do soro do leite, estão carregadas negativamente em pHs abaixo do seu ponto isoelétrico (pI) e positivamente acima deste valor (FOEGEDING *et al.*, 2002; FARRELL JR *et al.*, 2004).

Interações físicas e químicas podem ocorrer entre pectina e proteínas do soro do leite. O sinal, magnitude, força e direção sofrem influência das condições ambientais e composição das soluções, como pH, força iônica, temperatura e solvente. Essas interações são responsáveis pela formação de partículas e possíveis alterações de morfologia, tais como integridade, inchamento, corrosão e desintegração (MCCLEMENTS, 2005; JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

A agregação entre proteína e polissacarídeo e a adsorção de proteínas sobre superfícies carregadas depende das características físico-químicas da superfície e pode variar em quantidade, densidade, conformação e orientação. O tempo e a concentração também são fatores que podem afetar a adsorção (ROACH, FARRAR & PERRY, 2005). A interação eletrostática em partículas pode ser controlada por variações de carga de superfície que podem ser determinadas pelo potencial zeta das partículas. Fatores como pH e concentração de eletrólitos em solução tem um forte impacto na força e no tipo de cargas eletrostáticas na superfície das partículas e assim pode levar a diferentes intensidades de adsorção de proteínas quando diferentes condições são utilizadas (PATIL et al., 2007).

A utilização das proteínas do soro do leite e da pectina na produção de micropartículas apresenta-se como uma estratégia viável. Conhecer as cargas e as condições de concentração, pH e relação polissacarídeo: proteína onde os materiais podem interagir entre si faz-se necessário, para utilizá-los na produção de micropartículas. Com base nisso, o objetivo deste capítulo foi avaliar o perfil de cargas das soluções de pectina e proteínas do soro do leite, determinar as condições de interação entre eles e com isso avaliar a possibilidade de produção e recobrimento de partículas de pectina com proteínas do soro do leite.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: pectina GENU[®] de baixo teor de metoxilação amidada (CP Kelco, Limeira-SP, Brasil); Concentrado protéico do soro do leite (Lacprodan - Arla Foods Ingredients, Argentina, lote: 80 4A12701); Cloreto de Cálcio (Dinâmica, Diadema - SP, Brasil, P.M: 110,99, lote 36308); Manteiga comum comercial sem adição de sal (Aviação, São Sebastião do Paraíso – MG, Brasil); Ácido clorídrico a 0,2 N (Merck, Alemanha); Hidróxido de sódio a 50% (Nuclear, Diadema - SP, Brasil, P.M: 40); Ácido sulfúrico (Synth, Diadema – SP) e os demais reagentes utilizados foram de grau analíticos.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização dos biopolímeros

A pectina utilizada nos experimentos foi caracterizada com relação ao grau de esterificação (DE), grau de amidação (DA) e teor de ácido galacturônico (GA), usando o método de titulação (FAO, 2009) além do teor de nitrogênio (AOAC, 2006). O concentrado proteico do soro do leite (WPC) foi caracterizado com relação ao teor de proteína e umidade segundo metodologia da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2006). Utilizou-se a metodologia de Kjeldahl para a determinação de nitrogênio total adotando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio em proteína.

2.2.2 Potencial zeta

Inicialmente foi determinado o potencial zeta das soluções de pectina (SPec) e também das soluções de proteína (SPro). Posteriormente foram

avaliados os potenciais zetas para diferentes relações de SPec : SPro e finalmente o potencial zeta de diferentes relações de partículas de pectina (PPec) : SPro foram avaliados. Todas as determinações do potencial zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.). O potencial zeta é uma medida de carga da superfície e pode ser determinada através de instrumentos com princípio eletroforético onde ocorre a aplicação de uma diferença de potencial elétrico na célula contendo a amostra a ser avaliada. A determinação ocorre pela direção e velocidade das gotas (emulsões, soluções ou partículas) que se movimentam nesse campo elétrico, calculando o potencial zeta através da mobilidade eletroforética (GUZEY, KIM & MCCLEMENTS, 2004).

2.2.2.1 Potencial zeta das soluções dos biopolímeros

Para se avaliar o potencial zeta dos biopolímeros foram preparadas SPec a 2% (m/m), solução de WPC - STT a concentração de 4% (m/m) de proteína e solução de WPC - TT também a concentração de 4% (m/m) de proteína, diluídas com água destilada e deionizada. A solução de WPC – TT foi desnaturada termicamente em banho a 80°C por 15 minutos. As soluções foram diluídas a concentração final de 0,2% (v/v) e avaliadas com relação ao seu potencial zeta, variando seu pH de 3 a 7, por meio de um titulador automático. Antes das leituras as soluções permaneceram 4 horas sob agitação constante a temperatura ambiente e as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de SPec : SPro

Foram preparadas misturas entre SPec e SPro, utilizando-se soluções de pectina, WPC – STT e WPC - TT à concentração de 0,2% (m/m). As soluções permaneceram 12 horas sob agitação magnética para completa dissolução e tiveram seu pH ajustado para 4, antes das misturas. Foram

preparadas misturas, volumetricamente, nas seguintes relações de SPec : WPC - STT - 1:1; 1:1.5; 1:2.3; 1:4; 1:6; 1:9; 1:10 e 1:12 e SPec : WPC - TT nas relações 1:1; 1:1.5; 1:2.3; 1:4; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; 1:10 e 1:12. Após a preparação, as misturas permaneceram em repouso por 4 horas para posterior determinação do potencial zeta. As séries foram preparadas em triplicatas independentes e cada relação medida em duplicata, desta forma o potencial zeta apresentado representa a média de seis valores medidos. As amostras foram agitadas manualmente imediatamente antes de cada determinação.

2.2.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de PPec : SPro

Para esse experimento PPec foram produzidas sem adição de lipídeos, conforme descrito no item 2.2.3.1. As partículas produzidas foram suspensas em água a pH 4, de modo que, o equivalente a uma concentração de 0,2% (m/m) de SPro fosse obtida. Soluções de WPC - STT ou WPC - TT foram preparadas de acordo com procedimento descrito acima. Foram produzidas misturas volumétricas entre PPec e SPro, utilizando-se as mesmas relações entre os biopolímeros avaliados no item anterior. Os sistemas foram mantidos em agitação durante 1 hora, em homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) e após as misturas entre PPec : SPro, os tubos permaneceram em repouso por 8 horas para posteriores análises de potencial zeta. As séries foram preparadas em duplicatas independentes e cada relação medida em duplicata, desta forma o potencial zeta apresentado representa a média de quatro valores. As amostras foram devidamente homogeneizadas antes de cada determinação.

2.2.3 Produção de micropartículas de pectina por gelificação iônica e avaliação da adsorção de proteína sobre a superfície das partículas por interação eletrostática

2.2.3.1 Produção de partículas de pectina por gelificação iônica (PPec)

Foi preparada uma solução aquosa de pectina a 2% (p/p de solução) adicionada de manteiga fundida (2% p/p de sólidos totais - 50°C) e a solução foi emulsificada em agitador Turrax a 14000 rpm / 3 min (IKA, Works do Brasil, RJ). A emulsão foi atomizada sobre uma solução de cloreto de cálcio (2% m/m) com pH ajustado para 4, a agitação constante. Para isso, foi utilizado um bico atomizador duplo fluido de 1 mm de diâmetro, altura de 12 cm entre o bico atomizador e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 0,125 kgf/cm² e velocidade de atomização de 555 mL/hora, sendo que a solução foi conduzida até o bico com o auxílio de uma bomba peristáltica, conforme otimizado anteriormente (MUKAI-CORREA *et al.*, 2004). Durante a atomização, a emulsão permaneceu sob agitação constante a uma temperatura de 40°C, para que a manteiga se mantivesse fluida.

Após a atomização, as micropartículas foram mantidas por mais 30 minutos em banho iônico (cloreto de cálcio) para cura das mesmas. Posteriormente, foram escorridas em peneiras de malha de aço, diâmetro de 125 µm, imersas durante 5 minutos em água deionizada pH ajustado para 4, novamente escorridas e lavadas com água também a pH 4.

2.2.3.2 Recobrimento com proteínas por interação eletrostática

As PPec foram então transferidas para soluções de WPC em diferentes concentrações de proteína: 4, 6, 8 e 12% (p/p) nos dois tipos de tratamento térmico (STT e TT) com pH das soluções corrigido para 4, onde foram mantidas por 30 minutos, sob agitação magnética. Novamente as partículas

foram escorridas em peneira de mesmo diâmetro, lavadas com água deionizada a pH 4 até que todo o WPC que não estava adsorvido na superfície das micropartículas fosse removido. Os conteúdos de umidade e proteína adsorvida das micropartículas recobertas foram determinados em triplicata. O processo de produção pode ser observado no fluxograma da Figura 2.1. Uma parte das partículas produzidas foram liofilizadas.

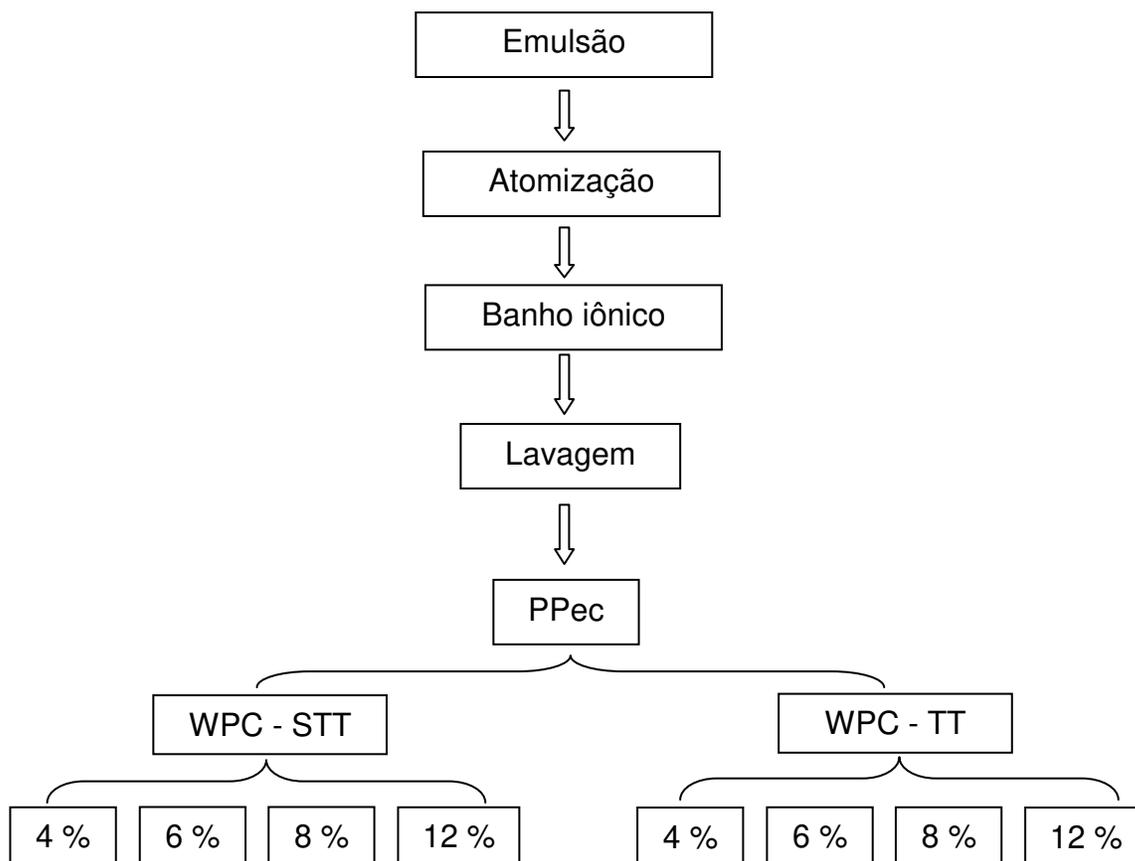


Figura 2.1: Fluxograma da produção das micropartículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite.

2.2.4 Caracterização das micropartículas

2.2.4.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A morfologia das micropartículas recobertas com proteínas do soro do leite (úmidas) foi observada em microscópio ótico JENAVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 1 e 1,25 x. A captação das imagens foi realizada, com a utilização do software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

As micropartículas liofilizadas (secas) foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (180 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Áustria). Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo JMS – T300 Jeol, com uma aceleração de voltagem de 15 e 20 kV.

2.2.4.2 Tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio ($d_{0,5}$) dos coacervados e das micropartículas úmidas foi medido no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Alemanha). O equipamento determina o tamanho das partículas por difração de luz laser e o material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água destilada e deionizada com pH corrigido para 4. A leitura foi realizada adicionando amostra dentro da unidade de amostragem, que já estava preenchida de água com pH ajustado para 4. A quantidade de amostra adicionada variou de amostra para amostra, sempre atingindo a faixa de obscuração de 3 a 20%, conforme recomendação do fabricante.

2.2.4.3 Conteúdo de proteína e umidade

As micropartículas produzidas para avaliação da adsorção de proteína foram caracterizadas em relação ao teor de proteína e umidade, segundo

metodologia descrita pela AOAC – *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2006).

A umidade foi determinada por gravimetria após secagem em estufa à temperatura de 105°C, por 15 horas. Para determinar o teor de proteína presente nas partículas, utilizou-se a metodologia de Kjeldahl, com fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38. O teor de nitrogênio presente na pectina utilizada na produção das micropartículas foi determinado previamente e descontado do teor de nitrogênio total presente nas micropartículas recobertas.

2.2.5 Análise estatística

Diferenças significativas entre as médias para os valores obtidos foram avaliadas usando ANOVA e teste de Tukey com o auxílio do programa SAS, em nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos materiais

Foram encontrados valores de $81,3\% \pm 1,22$ de ácido galacturônico, sendo que destes $30,4\% \pm 1,57$ estavam esterificados com $10,4\% \pm 1,04$ para o grau de amidação e $3,1\% \pm 0,18$ de nitrogênio. O teor de proteína no concentrado proteico do soro do leite foi de $73,3\% \pm 0,92$ de proteína e $6\% \pm 0,02$ de umidade. Os valores encontrados estão dentro dos valores recomendados para uma pectina comercial de baixo teor de esterificação amidada e coerentes com os relatados na literatura. Os valores determinados para o concentrado proteico do soro do leite encontravam-se dentro dos valores preconizados para concentrados que variam de 25 a 80% de proteína (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997; FOEGEDING *et al.*, 2002; GUILLOTIN *et al.*, 2007; FAO, 2009; BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011).

3.2 Potencial zeta

3.2.1 Soluções de biopolímeros

Os valores de potencial zeta das SPec e SPro (WPC - STT e WPC - TT) estão apresentados na figura abaixo (Figura 2.2).

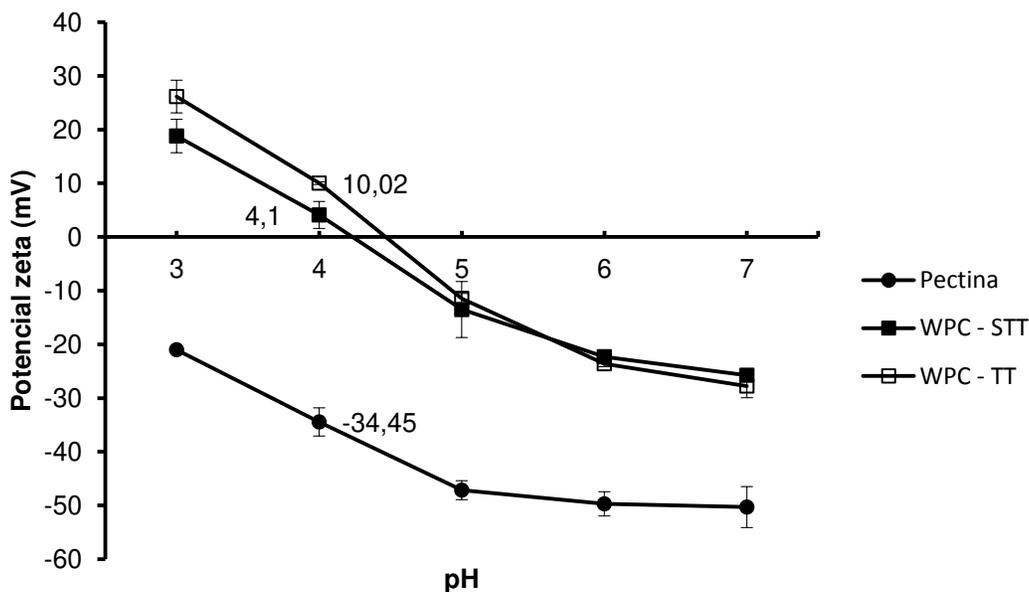


Figura 2.2. Potencial zeta das soluções de WPC e pectina a concentração de 0,2% (m/m) em função do pH.

A SPec apresentou potencial zeta negativo em toda a faixa de pH estudada, tendo sua eletronegatividade aumentada com a elevação do pH variando de -21 mV (pH 3) a -50,3 mV (pH 7). A carga líquida negativa da pectina é consequência dos grupamentos carboxila não protonados (COO^-) para soluções com pH acima de seu pKa, sendo que a medida que este pH aumenta, maior é a eletronegatividade (Figura 2.2). Não foi possível avaliar o potencial zeta das soluções de WPC em valores de pH abaixo de 3 em função da alta viscosidade das soluções, o que impedia a estabilização da leitura das amostras.

De maneira geral, as SPro (WPC – STT e WPC – TT) apresentaram o mesmo comportamento com ligeiras variações em pHs inferiores a 5. As soluções de WPC – STT e TT apresentaram potencial zeta positivo em pHs 3 e 4, sendo que WPC – STT apresentou pI (ponto isoelétrico – carga nula) e mudança de carga de positivo para negativo em $pH\ 4,36 \pm 0,13$ enquanto que solução de WPC – TT apresentou pI de $4,51 \pm 0,02$, sendo que não houve diferença significativa entre as médias para soluções de WPC STT ou TT, valor muito próximo ao anteriormente determinado para β -lactoglobulina, 4,7 (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008).

O perfil da curva do potencial zeta da pectina encontrado neste trabalho é similar ao relatado na literatura. Um estudo realizado por Opanasopit *et al* (2008) avaliando o potencial zeta de soluções de pectina de baixo teor de metoxilação amidada a 0,1% encontrou valores que variaram de -4 a -54 mV, quando o pH variou de 2 a 5,5, valor este onde foi obtida a maior eletronegatividade. Segundo estudo de Jones *et al.* (2010) avaliando o potencial zeta das soluções de pectinas não amidadas de alto e de baixo teor de esterificação, foram encontrados valores negativos para as soluções de pectina na faixa de pH 3 a 7.

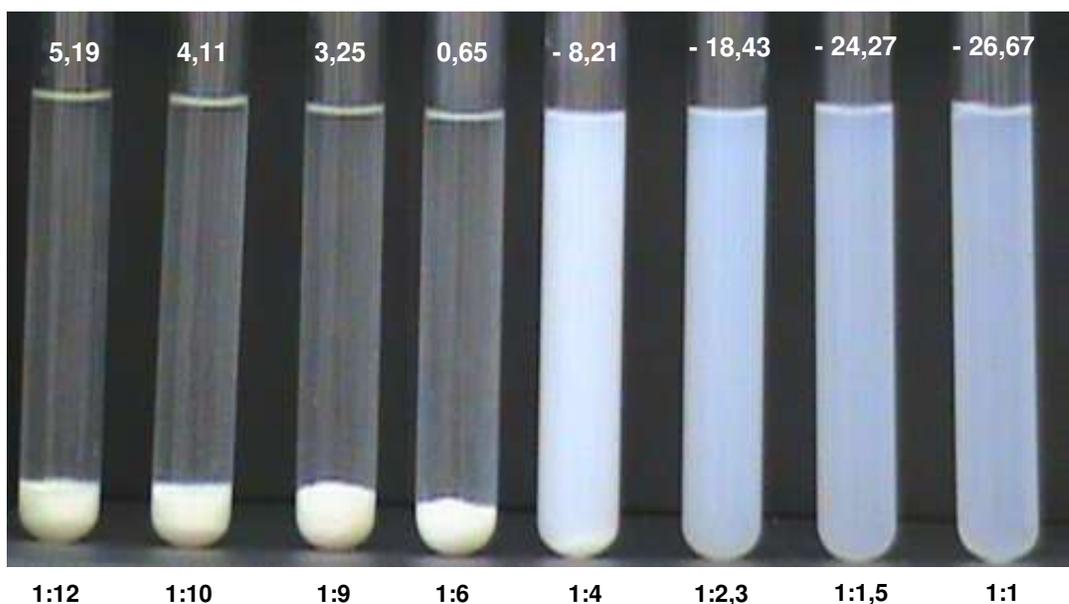
O potencial zeta das soluções permitiu observar que para os biopolímeros utilizados, é possível ocorrer interação eletrostática entre pectina e proteínas do soro do leite em valores de pH abaixo de 4,5. Em função dos resultados apresentados acima, para os testes seguintes, o pH das soluções foi ajustado para 4. Este pH foi anteriormente utilizado para avaliar interações entre pectina de beterraba e proteínas do soro do leite (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008).

3.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de SPec : SPro

Diferentes relações entre SPec : SPro foram testadas e os resultados apresentados na Figura 2.3 (A – WPC - STT e B – WPC - TT) onde na parte

superior da figura tem-se os valores de potencial zeta, expressos em milivoltes (mV) e na parte inferior as relações volumétricas utilizadas de SPec : SPro.

A (WPC - STT)



B (WPC - TT)

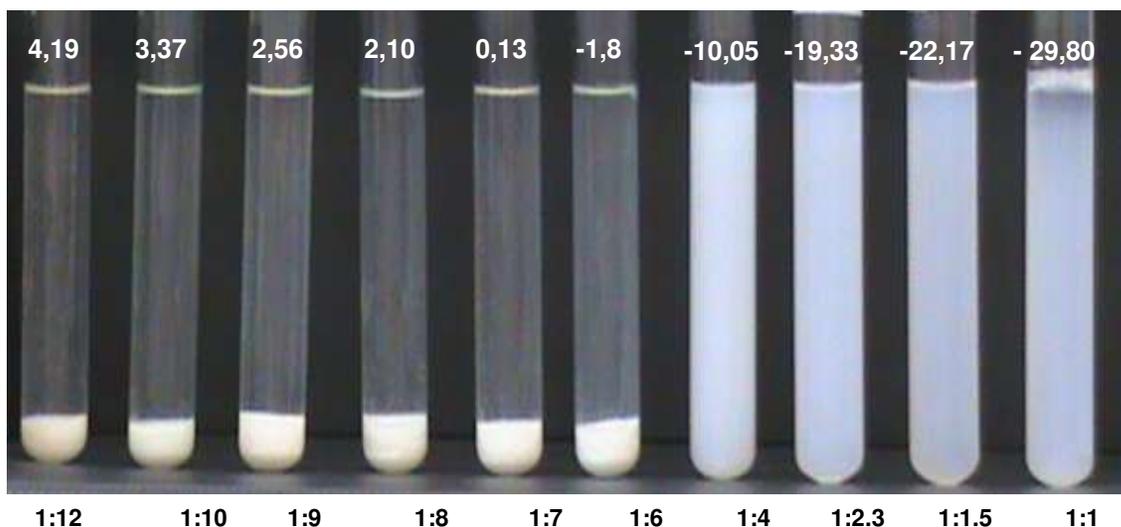


Figura 2.3. Influência da concentração de WPC na aparência visual e potencial zeta das misturas de SPec e SPro (WPC) na concentração de 0,2% a pH 4. Seqüência A para WPC – STT e seqüência B para WPC - TT

É possível observar nas imagens que os sistemas apresentaram mudanças físicas e elétricas a medida em que a quantidade de proteína aumentava em relação a pectina. Em pH 4, a SPec a 0,2% (m/m) apresentou

potencial zeta de $-34,45 \text{ mV} \pm 2,60$ enquanto à solução de WPC – STT também a 0,2% (m/m) apresentou potencial zeta de $4,10 \text{ mV} \pm 2,50$ e a solução de WPC – TT apresentou potencial zeta de $10,02 \text{ mV} \pm 0,25$ (Figura 2.2).

A carga elétrica mudou de positiva para negativa a partir da relação 1:6 para soluções de WPC - STT e 1:7 para WPC - TT (Figura 2.3). As mudanças físicas acompanharam as mudanças elétricas, observando-se que os precipitados se formaram no fundo dos tubos em valores de potencial zeta que tendiam a zero. Para os sistemas com menores quantidades de pectina (1:12; 1:10; 1:9; 1:8 e 1:7) as misturas apresentaram carga líquida positiva, indicando que nestas relações já ocorria um excedente de cargas positivas, provenientes das proteínas.

A partir da relação 1:6, independente da proteína utilizada (WPC - STT ou TT) as misturas precipitaram no fundo dos tubos indicando o equilíbrio de cargas e a formação de complexos coacervados insolúveis. A partir dessa relação, os valores do potencial zeta tornaram-se positivos, porém muito baixos e próximos a medida que a quantidade de proteína aumentou. Um estudo avaliando o potencial zeta de diferentes relações entre pectina e β -lactoglobulina também apresentou pequenas variações de carga a medida que a quantidade de proteína aumentava com valores de 3,5 mV em uma relação de 1 : 2 pectina : β -lactoglobulina e 2 mV em uma relação de 1:10 (GIRARD, TURGEON & GAUTHIER, 2002). Em um estudo onde soluções de proteína a 0,5% e soluções de pectina a 0,25% foram misturadas e partículas foram obtidas, valores de -44 mV de potencial zeta foram obtidos, quando o pH foi ajustado para 4,75 (JONES, DECKER & MCCLEMENTS, 2010). Misturas entre pectina e β -lactoglobulina apresentaram valores de potencial zeta próximos de 10 mV, em pH 4, para misturas de proteína a 0,25% (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008).

A medida em que a proporção entre pectina e WPC atingiu um equilíbrio de cargas, próximo a neutralidade, coacervados insolúveis formaram-se e precipitaram no fundo do tubo de ensaio. Segundo Sperber *et al* (2009b),

a separação de fases ocorre quando a carga dos complexos formados entre proteína-polissacarídeo atinge a neutralidade. A falta de repulsão eletrostática entre os polímeros, permite a agregação, resultando em uma separação de fases macroscópica.

Para proteínas e polissacarídeos que exibem cargas opostas, como nesse caso, podem ocorrer interações eletrostáticas ou separação de fases associativas, dando origem a complexos de proteína/polissacarídeo. Nesse caso, as misturas exibem duas fases distintas, uma proteína/polissacarídeo e a outra rica em solvente, nesse caso a água (TOLSTOGUZOV, 1995; COOPER et al., 2005; YE, 2008). Diversos trabalhos apresentados na literatura relatam a formação de coacervados e/ou nanopartículas formadas entre pectina e proteínas onde coacervados precipitam (GIRARD, TURGEON & GAUTHIER, 2002; SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008; BENGOCHEA *et al.*, 2011).

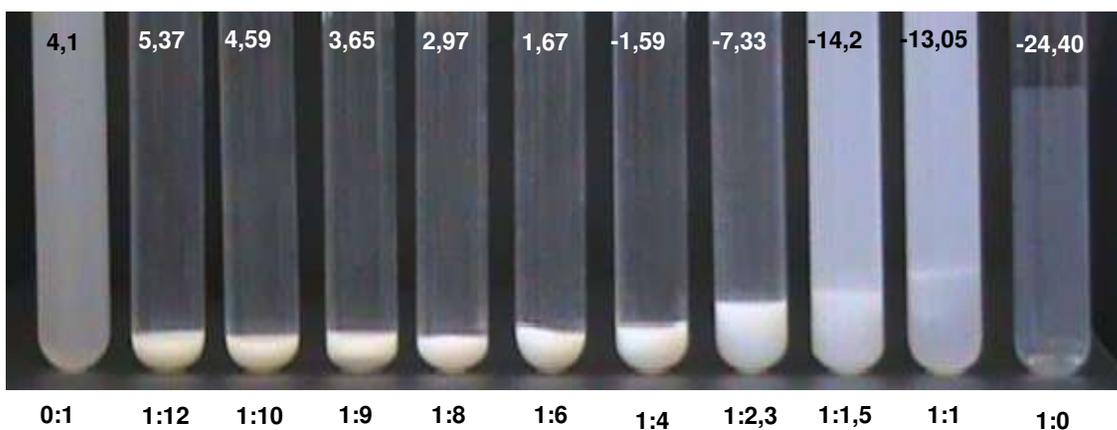
Em relação ao tamanho dos coacervados, estes variaram entre 8 μm a 21 μm para sistemas com WPC - STT, ressaltando que não foi possível avaliar o tamanho dos coacervados nas proporções 1:1 e 1:1,5. Nestas duas proporções, coacervados insolúveis não foram formados e a presença de partículas nas soluções formadas pela mistura das duas soluções não foi detectada pelo aparelho. Para os sistemas com WPC - TT, os tamanhos variaram de 3 μm a 23 μm . Partículas produzidas por coacervação complexa entre pectina e proteínas do soro do leite apresentam pequenos tamanhos, como pode ser observado na literatura. Coacervados produzidos com β -lactoglobulina e goma arábica apresentaram tamanho entre 1 μm a 30 μm (SCHMITT *et al.*, 2001). Já partículas produzidas por coacervação complexa entre pectina de beterraba e β -lactoglobulina apresentaram tamanhos, em pH 4, próximos de 12 μm , valor este próximo ao encontrado neste estudo (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). Sistemas entre lactoferrina e pectina apresentaram tamanhos um pouco inferiores, que variaram entre 100 a 950 nanômetros (BENGOCHEA *et al.*, 2011).

3.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de PPec : SPro

Os dados das condições de coacervação avaliados no item anterior fornecem informações de carga livre quando os polímeros estão em solução. Ao se produzir partículas, parte das cargas da pectina são complexadas com íons cálcio e a superfície da partícula, terá menor carga disponível para complexação. Assim, todo o sistema (SPro + PPec) quando ajustados para o pH ótimo de interação entre os polímeros livres (pH 4), podem também formar complexos. A concentração das soluções de WPC – STT, WPC - TT e partículas de gelificação iônica utilizadas foi de 0,2% (m/m).

Na Figura 2.4, os valores de potencial zeta estão apresentados na parte superior da imagem (expressos em mV) e na parte inferior as relações entre PPec : SPro. Como descrito em materiais e métodos as quantidades de partículas de gelificação iônica utilizadas foram calculadas de forma a se trabalhar com os mesmos volumes de solução de pectina utilizadas para avaliar os potenciais zetas das misturas entre soluções e portanto poder comparar os dois sistemas considerando que eles continham as mesmas quantidades de pectina (solução ou partículas) e de WPC TT ou STT.

A (WPC - STT)



B (WPC - TT)

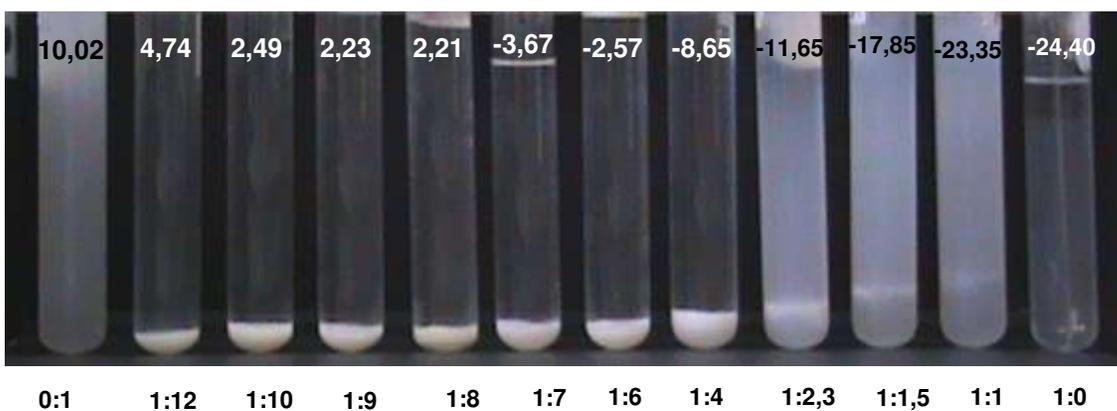


Figura 2.4. Influência da concentração de WPC na aparência visual e potencial zeta de misturas de PPec e SPro. Seqüência A para WPC - STT e seqüência B para WPC - TT, pH 4. Imagens após 8 horas de repouso.

Para os sistemas contendo solução de WPC - STT, observou-se precipitação no fundo dos tubos de ensaio a partir da relação 1:2,3, porém o potencial zeta passou de negativo para positivo apenas a partir da relação 1:6 (Figura 2.4 A), enquanto que os sistemas que utilizaram solução de WPC - TT a precipitação ocorreu a partir de 1:4 e a carga se alterou de positiva para negativa a partir de 1:8 (Figura 2.4 B), sendo uma das causas para esta precipitação a proximidade com a neutralidade das cargas pois os valores encontram-se próximos a zero. Pode-se observar também que após a precipitação, duas fases distintas foram formadas nos tubos de ensaio: uma na

parte inferior correspondente à associação entre PPec e WPC e outra na parte superior correspondente à água, o solvente utilizado nos ensaios. A partir das relações PPec : SPro em que a precipitação ocorreu, a fase superior tornou-se transparente e incolor.

A diferença de carga líquida gerada pelo tratamento térmico nas soluções de WPC – STT e WPC – TT, com valores de potencial zeta de $10,02 \text{ mV} \pm 2,5$ e $4,1 \text{ mV} \pm 0,25$ (Figura 2.2) afetou a interação entre as soluções de WPC e as PPec. Os sistemas com essas soluções tiveram comportamentos distintos, sendo que, para o sistema em que foi utilizada solução de WPC - TT foi necessário uma maior quantidade de WPC para que precipitados fossem formados no fundo do tubo, quando comparado ao sistema com WPC - STT. Uma das causas para a diferença de cargas entre as soluções e a necessidade de uma maior quantidade de proteínas nos sistemas, deve-se ao fato que o processo de desnaturação aumenta a reatividade entre as moléculas de proteína e interações hidrofóbicas, podendo influenciar na interação entre proteínas e partículas obtidas gelificação iônica (PURWANTI *et al.*, 2011).

Para as PPec em suspensão (Figura 2.4), a carga elétrica disponível para interagir com a proteína foi menor, quando comparada à carga da SPec à 0,2% (m/m) (Figura 2.2). A redução foi próxima de 30%, confirmando que durante o processo de gelificação iônica ocorre uma redução do total de carga livre disponível do sistema. Essa redução de cargas faz com que uma menor quantidade de proteína seja necessária para a neutralização das cargas do sistema. Valores similares aos encontrados neste estudo também foram relatados em um estudo realizado por Opanasopit *et al* (2008) utilizaram pectina de baixo teor de metoxilação amidada encontrando valores de potencial zeta de -30 mV para uma solução de pectina a 0,1% em pH 4 e valores de $-10,4 \text{ mV} \pm 0,8$ para partículas de pectina obtidas por gelificação iônica, no mesmo pH. Estudo realizado com partículas de quitosana obtidas por gelificação iônica também apresentou uma redução considerável de carga líquida, quando soluções e nanopartículas foram preparadas. As nanopartículas apresentaram uma redução próxima de 50% do valor de

potencial zeta quando comparado à quitosana em solução (SADEGHI *et al.*, 2008).

A redução da carga negativa nos sistemas influenciou a relação PPec : WPC, fazendo com que, para este novo sistema, a partir da relação 1:4, para ambos os tipos de WPC – STT e TT ocorressem a precipitação de complexos insolúveis entre partículas e proteínas.

Diversos estudos avaliaram a interação entre pectina e proteínas do soro do leite e a formação de complexos (CROGUENNOG *et al.*, 2001a; CROGUENNOG *et al.*, 2001b; KAZMIERSKI, WICKER & CORREDIG, 2003; NEIRYNCK *et al.*, 2004; NEIRYNCK *et al.*, 2007). A formação de complexos insolúveis entre pectina de beterraba de alto teor de metoxilação não amidada e proteínas do soro do leite em pH 4 foram obtidas para relação WPC : pectina de 3,84 (NEIRYNCK *et al.*, 2007) enquanto Girard *et al.* (2002) observaram alta adsorção de β -lactoglobulina (96%) na formação de complexos com pectina de baixo teor de esterificação utilizando pH 4,5 e relação proteína : pectina de 4:1, relação esta igual a encontrada neste trabalho.

Comparando estes sistemas (Figura 2.4) com os sistemas anteriores (Figura 2.3), pode-se afirmar que a interação entre pectina e íons cálcio, durante o processo de gelificação iônica, reduziu o total de carga livre da pectina, necessitando assim, de uma menor quantidade de proteína para interação, independentemente do tipo de tratamento térmico utilizado, para as condições estudadas. A ligação dos grupos carboxílicos e dos íons cálcio reduziu o total de carga disponível no sistema e assim foi necessária uma menor quantidade de proteína no sistema, para a neutralização das cargas e precipitação das partículas coacervadas.

Em relação ao tamanho das partículas (Tabela 2.1) obtidas nos sistemas da Figura 2.4 pode-se observar que a partir da relação 1:4 para partículas com WPC - STT e 1:6 para sistemas com WPC - TT, ocorre uma redução significativa do tamanho das partículas (Tabela 2.1). A partir destas relações, pode-se pressupor que ocorreu uma forte interação entre PPec e SPro o que levou a redução do tamanho das partículas. A força e a intensidade

da interação eletrostática entre PPec e SPro podem produzir alterações de morfologia e afetar o inchamento das partículas (MCCLEMENTS, 2005; JONES & MCCLEMENTS, 2010b), podendo ser uma das causas para a redução do tamanho a partir da relação onde os coacervados são formados. Em relações inferiores (1:1; 1:1,5 e 1:2,3), os valores encontrados foram similares aos tamanhos das micropartículas de gelificação iônica, indicando que a interação entre pectina e proteína ainda não estava completa.

Tabela 2.1. Tamanho das micropartículas obtidas entre misturas de PPec e SPro.

Relação PPec : SPro	WPC - STT Média (µm)	WPC - TT Média (µm)
1:12	135,1 ± 13,4 Da*	114,8 ± 10,0 Da
1:10	140,9 ± 6,6 Da	136,8 ± 25,7Da
1:9	140,5 ± 13,5 Da	111,1 ± 13,5 Db
1:8	145,2 ± 15,3 Da	138,0 ± 7,6 Da
1:6	102,6 ± 13,0 Da	160,8 ± 26,7 Db
1:4	160,0 ± 33,3 Ca	349,6 ± 53,2 CBa
1:2,3	320,3 ± 29,9 Ba	344,0 ± 28,7 CBa
1:1,5	312,2 ± 20,4 Ba	316,2 ± 13,4 CBa
1:1	337,8 ± 19,5 ABa	369,6 ± 10,2 ABa
1:0	355,4 ± 33,0 Aa	413,4 ± 69,3 Aa

* Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05).

Segundo Kazmierski *et al* (2003) variações no tamanho de agregados obtidos pela mistura entre β-lactoglobulina e pectina, indicam que diferentes interações podem ocorrer entre as misturas, dependendo da temperatura de

desnaturação o que levaria a diferentes tamanhos de partículas.

3.2 Produção de micropartículas para avaliação da adsorção proteica

Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, realizaram-se testes para se avaliar a possibilidade e quantificar o teor de proteína adsorvida sobre a superfície de PPec. Foram produzidas partículas conforme descrito no item 2.2.3 recobertas com proteínas do soro do leite. Utilizou-se a proporção de uma parte de PPec para duas partes de solução de WPC, relação esta equivalente a relação PPec : SPro 1:4 (Figuras 2.3 e 2.4), onde para ambos os tratamentos (WPC - STT e WPC - TT) ocorreu à precipitação dos sistemas. Os teores de proteína adsorvida e umidade determinados encontram-se nas Tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2. Teor de proteína (base seca) de partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite por interação eletrostática.

SPro	Proteína (%)	
	WPC - STT	WPC - TT
4%	65,1 ± 1,3 ^{Aa*}	38,2 ± 0,9 ^{Ab}
6%	65,9 ± 1,7 ^{Aa}	44,8 ± 0,5 ^{Ab}
8%	55,9 ± 1,1 ^{AB}	-
12%	57,8 ± 0,7 ^B	-

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 2.3. Teor de umidade de partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite por interação eletrostática.

SPro	Umidade (%)	
	WPC - STT	WPC - TT
4%	92,0 ± 0,3 _{Ca}	96,9 ± 0,1 _{Cb}
6%	91,5 ± 0,5 _{CDa}	98,2 ± 0,5 _{Ca}
8%	90,2 ± 0,4 _D	-
12%	88,0 ± 0,6 _E	-

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Não foi possível realizar testes com soluções de WPC – TT nas concentrações de 8 e 12%, pois as soluções ficaram muito viscosas, o que impedia a imersão, correta dispersão e homogeneização das partículas nas soluções protéicas.

As partículas com WPC - STT apresentaram maior adsorção de proteína quando comparadas às produzidas com WPC - TT. Uma das possíveis explicações para a diferença é que a adsorção de proteínas em superfícies é extremamente sensível a estrutura da proteína, que é alterada no processo de desnaturação térmica (FOEGEDING *et al.*, 2002) aumentando a interação entre as moléculas de proteínas e reduzindo a interação entre PPEC e SPro.

Para partículas com WPC – STT as adsorções máximas foram atingidas nas concentrações de 4 e 6%, sem diferença estatística entre as médias ($p > 0,05$). Quando as concentrações de proteína em solução foram aumentadas para 8 e 12% o teor de proteína adsorvida foi reduzido em relação às concentrações de 4 e 6%. Uma das explicações para essa redução da adsorção de proteína nos níveis mais concentrados pode ser por uma maior interação entre as moléculas de proteína em solução, reduzindo a interação com a PPEC. Para as partículas produzidas com WPC - TT, maior quantidade de proteína adsorvida foi observada para solução contendo 6% em relação à

solução contendo 4%, entretanto os resultados não apresentaram diferença significativa entre as médias. Além de possibilitar uma maior adsorção de proteína (base seca) quando soluções de WPC - STT foram utilizadas, as partículas produzidas com esse sistema também apresentaram maior facilidade na lavagem para a completa remoção da proteína não adsorvida na superfície das partículas.

As partículas apresentaram grande quantidade de proteína adsorvida, independentemente do tipo de WPC utilizado, com valores variando entre 44,8% a 66,0%. Essas partículas também apresentaram alto teor de umidade, superiores a 88%, onde, partículas contendo WPC - TT apresentaram maior conteúdo de umidade quando comparadas as produzidas com WPC – STT.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 2.5) mostram que as partículas recobertas com WPC - STT apresentam rugas na superfície (Figuras 2.5B e 2.5C). Também é possível observar que as partículas são resistentes ao processo de secagem (liofilização) permanecendo íntegras após o processo e mantendo geometria esférica. A presença de estrias sobre a superfície das partículas está associada à camada proteica adsorvida. No estudo de XIE *et al* (2009) partículas de alginato recobertas com quitosana apresentaram rugosidade quando diferentes concentrações de alginato foram utilizadas na produção das partículas, como decorrência da carga de superfície das mesmas.

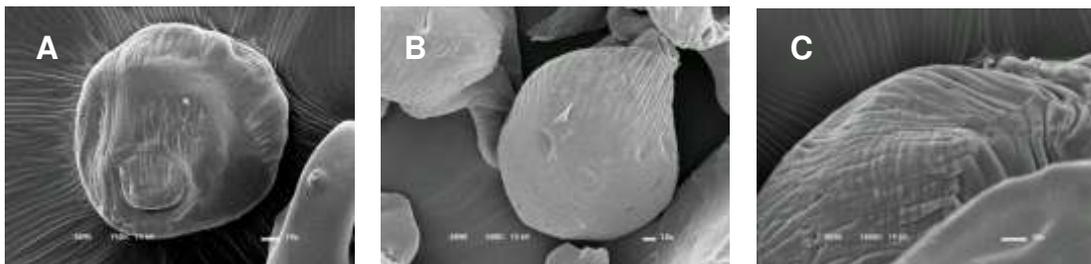


Figura 2.5. MEV de micropartículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite (WPC - STT), para concentrações de proteínas em solução de 4% (A); 6% (B) e 12% (C).

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, SPec e SPro (soluções de WPC – STT e WPC – TT) apresentam cargas opostas podendo interagir entre si, em valores de pH abaixo de 4,5.

Misturas de SPec e SPro (WPC – STT e WPC – TT) formam coacervados a partir da relação 1:6.

A interação entre pectina e íons Ca^{2+} durante a produção de PPec por gelificação iônica reduz o total de carga livre na superfície da PPec em comparação à carga observada na SPec. Em função disto, sistemas onde foram utilizadas PPec e SPro houve a necessidade de uma menor quantidade de proteína para neutralizar o total de cargas livre das PPec. Quando partículas são utilizadas esse efeito é observado a partir da relação PPec : SPro de 1:4.

Foi possível obter altas quantidades de proteína adsorvida sobre a superfície de PPec, independente de se utilizar WPC - STT ou WPC - TT. No entanto, maiores quantidades foram adsorvidas quando WPC - STT foi utilizado. Maiores adsorções foram obtidas a 4 - 6% para WPC - STT e 4 - 6% para WPC - TT.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ENTÉRICA DE MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO E INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ENTÉRICA DE MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO E INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA

1. INTRODUÇÃO

A microencapsulação vem sendo utilizada em diferentes áreas, tais como: farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (DESAI & JIN PARK, 2005; KRISHNAMACHARI, MADAN & LIN, 2007; BADILA *et al.*, 2008; RAMÓN-AZCÓN *et al.*, 2010; DOHERTY *et al.*, 2011; LEE & KIM, 2011)

Micropartículas são desenvolvidas para proteger o material encapsulado de condições adversas do meio, como pH, luz, oxigênio e/ou condições gastrointestinais (pH, enzimas e temperatura). Compostos como antioxidantes naturais, ácidos graxos essenciais, enzimas e microorganismos probióticos são susceptíveis a alterações quando expostos a estas condições, reduzindo sua atividade ou inviabilizando sua utilização (GBASSI *et al.*, 2009; ZIMET & LIVNEY, 2009; YOKSAN, JIRAWUTTHIWONGCHAI & ARPO, 2010; LI *et al.*, 2011)

Diversos métodos e materiais têm sido investigados para produção de micropartículas, dentre elas a gelificação iônica utilizando polissacarídeos naturais, como alginato e pectina, associados à complexação iônica com íons cálcio (KRASAEKOOPT, BHANDARI & DEETH, 2004; DEGEN, LEICK & REHAGE, 2009; BENGOCHEA *et al.*, 2011). Pectinas de baixo teor de esterificação amidada são utilizadas na produção de micropartículas, uma vez que formam géis mais rígidos quando comparados a pectinas de alto teor de esterificação (FRAEYE *et al.*, 2010).

A gelificação iônica apresenta vantagens por não necessitar de temperatura controlada e solventes orgânicos, caracterizando-a como um método brando (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA & AMINABHAVI, 2004; PATIL *et al.*, 2010). Apresenta-se como uma excelente técnica para encapsular

emulsões e neste sentido propicia a encapsulação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (MCCLEMENTS, 2005; GUZEY & MCCLEMENTS, 2006). Entretanto, apresenta limitações uma vez que se constitui de uma matriz de gel porosa podendo inviabilizar a proteção desejada ou a liberação controlada do composto encapsulado. Além disso, estudos relatam que podem existir problemas na transposição da técnica para a escala industrial, problema esse que vem sendo solucionado com o desenvolvimento de novos equipamentos (PICOT & LACROIX, 2004; BUREY *et al.*, 2008).

Na interação entre os grupos carboxílicos e os íons cálcio durante a gelificação iônica nem todos os grupos interagem entre si, remanescendo cargas livres na superfície da partícula possibilitando assim que as mesmas possam ser submetidas a uma interação eletrostática com um polieletrólito de carga oposta formando uma camada protetiva na superfície da partícula (DEVOS *et al.*, 2007).

A interação eletrostática depende de vários fatores incluindo a concentração, razão polissacarídeo/proteína, pH, força iônica e a natureza dos polieletrólitos (YE, 2008). A fixação de uma camada proteica sobre a partícula de gelificação iônica depende da interação de cargas opostas. A interação entre proteínas e polissacarídeos é possível, uma vez que, polissacarídeos apresentam carga livre negativa em valores de pH acima de seu pKa, enquanto que proteínas apresentam cargas positivas abaixo de seu ponto isoelétrico (pI). É possível, portanto, fazer ajustes de forma a se conseguir um balanço de cargas opostas entre estes materiais e recobrir partículas gelificadas com uma capa proteica (GIRARD, TURGEON & GAUTHIER, 2003; SCHMITT *et al.*, 2011).

A interação entre pectina de beterraba ou alginato com proteínas do soro do leite forma complexos que podem ser associados ou não a gelificação iônica para produção de partículas protetivas (JONES & MCCLEMENTS, 2008; SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008; JONES, DECKER & MCCLEMENTS, 2010; JONES *et al.*, 2010; BENGOCHEA *et al.*, 2011). A redução da permeabilidade aumenta a ação protetiva da partícula independentemente do constituinte da

camada protetiva, seja ele polissacarídeo ou proteína (ROSENBERG & LEE, 2004; GBASSI *et al.*, 2009).

Micropartículas contendo proteínas do soro do leite produzidas com o propósito de resistir à ação do trato gastrointestinal superior para a liberação controlada de fármacos, compostos bioativos e microorganismos vêm sendo estudadas (PICOT & LACROIX, 2004; WEINBRECK, MINOR & DE KRUIF, 2004; GUNASEKARAN, KO & XIAO, 2007; LAMBERT, WEINBRECK & KLEEREBEZEM, 2008).

As proteínas do soro do leite representam cerca de 20% das proteínas totais do leite sendo a β -lactoglobulina o maior constituinte, representando 50 – 70 % das proteínas do soro do leite (HILL, LEDWARD, MITCHELL, 1998). Essa proteína é compacta e globular, seus resíduos ácido-básicos hidrofóbicos-hidrofílicos são distribuídos uniformemente ao longo da cadeia polipeptídica e apresentam inúmeras ligações dissulfídicas (HEELAN & CORRIGAN, 1998; CHEN & SUBIRADE, 2006).

A β -lactoglobulina é uma proteína pequena, globular, desnaturada com o calor e que pode formar agregados, dependendo do pH e da concentração de cálcio. Em pH neutro, a uma temperatura superior a 30°C produz dímeros e em pHs muito baixos, se encontra em posição compacta, inibindo ou impossibilitando ligações. Já em pHs elevados, a sua estrutura encontra-se aberta, permitindo que ligantes penetrem e se associem a seus sítios hidrofóbicos (KONTOPIDIS, HOLT & SAWYER, 2004).

O aquecimento do concentrado protéico de soro de leite é crítico, pois pode causar a desnaturação das proteínas, alterando as suas propriedades funcionais. Em temperatura ambiente, as moléculas de β -lactoglobulina nativa encontram-se como monômeros, dímeros e octômeros, dependendo do pH da solução e da composição iônica. Quando a β -lactoglobulina é aquecida, os oligômeros tendem a se dissociar a monômeros; quando este aquecimento é superior a 70°C, há uma exposição dos grupos hidrofóbicos e dos resíduos

internos de cisteína protegidos na forma nativa da proteína (MISHRA, MANN & JOSHI, 2001; JONES, DECKER & MCCLEMENTS, 2010).

A utilização de proteínas do soro do leite e pectina na produção de micropartículas propicia a veiculação de compostos e aumenta o efeito protetivo. Partículas estáveis a agregação e dissociação, resistentes as variações de pH e com alta incorporação de proteína podem ser obtidas utilizando estes biopolímeros o que possibilita sua aplicação para fins nutricionais (JONES & MCCLEMENTS, 2010a).

A modulação da produção de partículas com tamanho de 1 - 1000 μm possibilita a veiculação de microorganismos e células vivas (DE VOS *et al.*, 2006; JONES & MCCLEMENTS, 2010b), reduz a agregação e sedimentação de partículas e permite a incorporação de grandes quantidades de material de recheio em um pequeno volume de partícula.

O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas por técnicas combinadas (gelificação iônica e interação eletrostática), utilizando pectina de baixo teor de metoxilação amidada e proteínas do soro do leite. Avaliou-se a influência do tratamento térmico e da concentração das proteínas em solução sobre a adsorção protéica. As partículas foram caracterizadas quanto aos teores de proteína adsorvida e umidade, tamanho, morfologia e capacidade de inchamento frente a diferentes pHs. A solubilidade protéica foi avaliada simulando as condições gastrointestinais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Pectina GENU[®] de baixo teor de esterificação amidada (CP Kelco, Limeira-SP, Brasil); Concentrado protéico do soro do leite (Lacprodan - Arla Foods Ingredientes, Argentina, lote: 80 4A12701); Cloreto de Cálcio (Dinâmica, Diadema - SP, Brasil, P.M: 110,99, lote 36308); Manteiga comum comercial sem adição de sal (Aviação, São Sebastião do Paraíso – MG, Brasil); Ácido

clorídrico fumegante a 37% (Merck, Alemanha); Hidróxido de sódio (Nuclear, Diadema - SP, Brasil, P.M: 40); Ácido sulfúrico (Synth, Diadema - SP, Brasil P.M: 98,08,); Sulfato de cobre anidro (Synth, Diadema - SP, Brasil, P.M: 249,68); Sulfato de potássio anidro (Ecibra, São Paulo –SP, Brasil, P.M: 174,26, lote 18308); Vermelho de metila (Berzog, P.M: 269,3); Azul de metileno (Difco laboratórios, Surrey); Álcool Metílico P.A (Cetus, Santo Amaro – SP, Brasil, P.M: 32,04), Sulfato de sódio P.A. (Dinâmica, Diadema - SP, Brasil, P.M: 142,04); Pepsina suína da mucosa gástrica (Sigma Aldrich); Pancreatina do pâncreas suíno (Sigma – Aldrich) e Mucina extraída do estômago suíno (Sigma – Aldrich), água destilada e deionizada e os demais reagentes utilizados foram analíticos.

2.2 Métodos

2.2.1 Produção de micropartículas

As micropartículas foram produzidas pela combinação de duas técnicas de microencapsulação: inicialmente gelificação iônica com posterior recobrimento das micropartículas por interação eletrostática, conforme descrito no item 2.2.3 do Capítulo 2, com algumas alterações. Com base nas informações obtidas no capítulo anterior as partículas foram produzidas em pH 4, mantendo a proporção de 1 parte de PPec para 4 partes de SPro. A quantidade de fração lipídica representada pela manteiga foi bastante aumentada, sendo utilizada 2% (m/m de solução), uma vez que a quantidade de manteiga era muito pequena e para a utilização das partículas na área de alimentos avaliou-se que seria necessário uma matriz com maior teor lipídico. Novamente foram utilizados WPC - STT e WPC - TT (80°C/15 min). Os níveis de proteína, em solução, utilizados foram para WPC - STT: 2, 4, 6, 8 e 12% (m/m) enquanto para WPC - TT foram de 2, 4 e 6% (m/m).

2.2.2 Conteúdo de proteína e umidade das micropartículas

As micropartículas foram caracterizadas com relação ao teor de umidade e proteína (KJELDAHL, fator de conversão de nitrogênio em proteína 6,38).

2.2.3 Caracterização das micropartículas

2.2.3.1 Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A morfologia das micropartículas úmidas e reidratadas foram observadas em microscópio ótico JENAVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 1 e 1,25 x. A captação das imagens foi realizada, utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

As micropartículas liofilizadas (secas) foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (180 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Áustria). Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo JMS – T300 Jeol, com uma aceleração de voltagem de 15 e 20kV.

2.2.3.2 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

A microscopia confocal foi baseada em Lamprecht *et al* (2000) com algumas adaptações. As micropartículas foram produzidas com materiais corados previamente. As soluções de WPC foram coradas com dois tipos de corante diferentes: Isotiocianato de fluoresceína (FIT C) e a Rhodamina B Isotiocianato (RBITC) e a manteiga corada com Nile Red (Sigma Aldrich). A morfologia das micropartículas úmidas produzidas com os biopolímeros e a manteiga associados aos corantes foi observada em microscópio confocal modelo Zeiss LSM780 – NLO (Carl Zeiss, Alemanha), objetiva EC Plan –

Neofluar 40x/1.3 Oil DIC. As imagens foram coletadas utilizando lasers com comprimentos de onda 488 e 543 nm para excitação do FIT C e da Rhodamina, respectivamente e 528 nm para o Nile Red. As imagens foram adquiridas na metade da altura das partículas.

2.2.4 Tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio ($d_{0,5}$) das micropartículas úmidas (recém-processadas), reidratadas (pós liofilização) e após simulação gástrica *in vitro* foram avaliados no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Germany), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Germany). O equipamento determina o tamanho das partículas por difração a laser e o material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água destilada e deionizada. As partículas úmidas/reidratadas foram suspensas em água pH 4, mesmo pH usado para as leituras e as amostras reidratadas e pós simulação *in vitro* foram medidas com água em seus respectivos pHs. A leitura foi realizada adicionando-se a amostra dentro da unidade de amostragem, que já estava preenchida com água e a quantidade de amostra adicionada variou, sempre atingindo a obscuração de 3 a 20% conforme sugestão do fabricante.

2.2.5 Capacidade de inchamento

As micropartículas liofilizadas foram avaliadas com relação a sua capacidade de adsorção e retenção de água e quanto à capacidade de retornar ao formato observado para as partículas úmidas. Foram testados três diferentes valores de pH: 1,2, 4 e 7. Aproximadamente 0,5 g de pó (micropartículas produzidas com WPC STT e TT a concentração de 4% de proteína) foi hidratado com 12 mL de água deionizada com o pH já ajustado. O tubo foi agitado durante 2 minutos e posteriormente transferido para um homogenizador de soluções rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara,

Brasil) onde permaneceu por 1 hora. As leituras de tamanho foram realizadas em seguida.

2.2.6 Avaliação da solubilidade protéica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais

Para avaliar a resistência das partículas submetidas às condições gastrointestinais simuladas, foram testados dois diferentes valores de pHs (1,2 e 3,0). Partículas úmidas recém-processadas foram usadas na simulação das condições gastrointestinais, a fim de se avaliar a resistência das partículas ao ambiente gástrico. Em um tubo plástico de 30 mL, foram adicionados 2 gramas de micropartículas úmidas e 20 mL de suco gástrico artificial (SGA) com o pH já ajustado e incubados a 37°C, em banho maria com agitação, por 2 horas. O suco gástrico artificial (SGA) utilizado foi elaborado a partir de: 1,12 g/L KCl; 2 g/L NaCl; 0,11CaCl₂; 0,4 g/L KH₂PO₄ g/L; 3,5 g/L de mucina e 0,26 g/L de pepsina e HCl para ajuste de pH (SULTANA *et al.*, 2000; MOZZI *et al.*, 2009). Posteriormente, alterou-se o pH para 7 com solução de NaHCO₃ na concentração de 20% (p/v) e adicionou-se pancreatina na concentração de 1,95g/L, e novamente se incubou as amostras por mais 5 horas. Após intervalos de tempo de uma, duas, três e sete horas amostras foram retiradas para avaliação da morfologia e tamanho médio das partículas.

Após 2 horas de simulação das condições gastrointestinais, foi quantificado o teor de proteína que se despreendeu das micropartículas e ficou solúvel no SGA. Foram utilizadas micropartículas produzidas com WPC STT e TT a concentração de 4% de proteína. Após as duas horas de incubação em banho maria com SGA, os tubos foram transferidos para banho de gelo e permaneceram imersos por 15 minutos para inativação das enzimas. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 34540 G (centrífuga modelo RC-5C Sorvall Instruments, Wilmington, USA). Em seguida, quantificou-se o teor de nitrogênio total do sobrenadante por Kjeldahl (fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38). Foi preparado um branco,

contendo apenas SGA para descontar o nitrogênio proveniente de enzimas, quantificando dessa forma a quantidade de proteína que foi solubilizada durante a simulação gástrica, do total inicialmente adsorvido sobre as partículas. A produção das PPec e o recobrimento protéico com posterior avaliação da resistência gástrica através da medida de solubilidade protéica foi realizada em três ensaios independentes e em cada condição avaliada determinações feitas em triplicatas.

2.2.7 Análise estatística

Diferenças significativas entre as médias para os valores obtidos foram avaliadas usando ANOVA e teste de Tukey com o auxílio do programa SAS, em nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdos de proteína adsorvida e umidade das micropartículas

A avaliação da adsorção das proteínas sobre a superfície das partículas já havia sido testado no capítulo anterior, entretanto, considerando a alteração da quantidade da manteiga presente na matriz da partícula de pectina foi necessário repetir o processo. Foi observada uma redução na adsorção de proteína sobre a superfície de PPec que será discutido no decorrer do capítulo.

Foram avaliadas cinco diferentes soluções de WPC, variando a concentração de proteína (2 a 12%) e o tratamento térmico (WPC - STT e WPC - TT) com o objetivo de avaliar se soluções de proteína mais concentradas produziram partículas com maior teor de proteína adsorvida e se o tratamento térmico afetaria o processo. Observou-se que independente da concentração da solução utilizada ou do tratamento térmico, para todas as condições estudadas houve adsorção de proteína sobre a superfície das partículas de

pectina e que a concentração de proteína em solução influenciou na adsorção de proteína (Tabela 3.1).

Com relação às características físicas (aspecto visual) das partículas essas não foram afetadas pela concentração de proteína em solução, mas sim pelo tipo de tratamento térmico. As partículas sem tratamento apresentaram uma coloração mais amarelada, similar a cor do WPC em pó, um aspecto mais seco e um rendimento ligeiramente inferior. Já as partículas com tratamento térmico apresentam uma coloração mais clara, aspecto mais “flácido” similar a de um gel e um rendimento ligeiramente superior. Soluções de WPC em concentrações de 3 a 5% aquecidas formaram géis fracos, translúcidos e elásticos, assim como foi observado nas partículas do presente trabalho e de acordo com os autores isso ocorreu devido ao baixo número de ligações intermoleculares formadas entre as moléculas de proteína desnaturada (MORR & HA, 1993).

O teor de proteína adsorvido na superfície das PPec foi alto, atingindo 50,3% para WPC – STT e 27,6% para WPC – TT. Para micropartículas produzidas com WPC - STT a adsorção foi superior quando comparada as micropartículas recobertas com WPC - TT (Tabela 3.1). A adsorção de proteína pode variar em quantidade, densidade, conformação e orientação e também é influenciada pelas características físico-químicas da superfície (ROACH, FARRAR & PERRY, 2005).

Um maior teor de proteína em solução não produziu partículas com maior teor de proteína adsorvida para ambas as soluções de WPC, atingindo adsorção máxima em SPro a 4%. Quando micropartículas foram recobertas com WPC – STT, os valores obtidos, quando soluções contendo 4, 6, 8 e 12% de proteína foram utilizadas não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Foi possível observar diferença significativa entre médias somente quando solução contendo 2% de WPC foi utilizado, indicando que a quantidade de proteína disponível ainda não era suficiente para interagir eletrostaticamente com todos os grupos carboxílicos disponíveis na superfície da PPec. Esse resultado já era esperado, uma vez que, uma SPro a 2% corresponde a uma

relação de PPec : SPro de 1: 2, citada nos estudos preliminares no Capítulo 2, e para esta relação as partículas sedimentaram, entretanto esta sedimentação não havia sido completa e o potencial zeta ainda estava negativo (Figura 2.3) e um pouco distante de zero.

Para partículas recobertas com SPro submetidas à tratamento térmico (WPC - TT) pode-se observar um máximo de adsorção para o nível de 4% de proteína em solução, quantidade significativamente diferente ($p < 0,05$) das obtidas para os níveis 2 e 6% de proteína em solução.

Tabela 3.1. Teor de proteína adsorvido (base seca) nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).

SPro	WPC - STT	WPC - TT
2	37,5 ± 2,9 Ba*	20,6 ± 1,9 Bb
4	49,2 ± 1,0 Aa	27,6 ± 1,8 Ab
6	50,3 ± 1,0 Aa	20,2 ± 1,2 Bb
8	49,6 ± 1,7 A	-
12	48,5 ± 1,5 A	-

* Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Uma das possíveis explicações para a diferença de adsorção observada entre proteínas com (WPC - TT) e sem tratamento térmico (WPC - STT) que também foi observada no Capítulo 2, deve-se ao fato de que, quando as proteínas globulares são desnaturadas por tratamento térmico, as mesmas se desenrolam, mudando sua conformação e expondo grupos hidrofóbicos inicialmente protegidos, possivelmente desfavorecendo a interação eletrostática entre as proteínas globulares desnaturadas e a pectina, produzindo assim uma menor adsorção (JONES & MCCLEMENTS, 2010a). Além disso, a desnaturação térmica de proteínas globulares como a β -lactoglobulina também forma agregados (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008)

que podem ter desfavorecido o contato físico entre as cargas opostas das proteínas : partículas de pectina.

Estudo realizado com micropartículas de alginato imersas em diferentes concentrações de quitosana mostrou que o aumento de adsorção de quitosana sobre a superfície das partículas foi maior em soluções onde a concentração de quitosana também era maior. Entretanto nesse estudo as concentrações de quitosana utilizadas eram muito baixas, em função da alta viscosidade produzida pela quitosana em solução (XIE *et al.*, 2009). O total de cargas livres disponíveis influenciou diretamente a capacidade de adsorção em superfícies, sendo que micropartículas com maior potencial zeta apresentaram uma maior adsorção de quitosana em sua superfície (XIE *et al.*, 2009).

Algumas estratégias como a adição de lipídeos e o recobrimento, têm sido empregadas para melhorar as características de liberação de partículas de gelificação iônica (LANGDON *et al.*, 1984; ANNAN, BORZA & HANSEN, 2008). Adicionalmente, as partículas produzidas por gelificação iônica apresentam grande quantidade de água retida no gel, e a adição de lipídeos pode ajudar a manter a integridade das partículas durante o processo de secagem (MUKAI-CORREA *et al.*, 2004).

O aumento da quantidade lipídica emulsionada nas PPec apresentou um efeito negativo no teor de proteína adsorvida independente de se utilizar WPC - STT ou WPC - TT (Tabela 3.1), quando comparadas às adsorções obtidas com partículas que continham baixas quantidades de manteiga (Tabela 2.2). No caso de partículas contendo WPC - STT, que apresentou maior adsorção proteica para os dois níveis lipídicos avaliados, a adsorção variou de 65,1% a 57,8% quando as concentrações de proteína em solução variaram de 4 a 12%, respectivamente para partículas contendo baixo conteúdo lipídico, enquanto partículas contendo alto teor lipídico apresentaram adsorção proteica variando de 37,5% a 48,5% quando as concentrações de proteína variaram de 2 a 12%. A adição lipídica parece diminuir a disponibilidade de grupos carregados negativamente na superfície da partícula, impedindo uma maior adsorção proteica.

O teor de umidade das micropartículas variou entre 85,8% a 91,1% para as partículas produzidas com WPC - STT e entre 96,3% a 97,1% para as produzidas com WPC - TT (Tabela 3.2). O tratamento térmico afetou o teor de umidade das micropartículas, onde micropartículas produzidas com WPC - TT foram mais úmidas que as partículas produzidas com WPC - STT. As micropartículas produzidas com WPC - TT não apresentaram diferença significativa para os teores de umidade quando diferentes níveis de proteína em solução foram utilizados. Para as micropartículas com WPC - STT os teores de umidade variaram entre 85,8% a 91,1% com uma tendência a diminuição do teor de umidade com o aumento da quantidade de proteína adsorvida.

Tabela 3.2. Teor de umidade (%) nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução.

SPro (%)	WPC - STT	WPC - TT
2	90,1±1,2 Ab*	96,3 ± 0,5 Aa
4	90,7 ±0,9 Ab	96,3 ± 0,4 Aa
6	87,3 ±0,7Bb	97,1 ± 0,5 Aa
8	91,1 ±0,8 A	-
12	85,8 ±0,4 B	-

* Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p>0,05$).

Um maior conteúdo de umidade observado para partículas recobertas com WPC - TT pode também estar relacionado à capacidade de gelificação que as proteínas do soro do leite apresentam após tratamento térmico, aprisionando uma maior quantidade de água, uma vez que ao ter sua estrutura alterada, as proteínas do soro do leite tendem a ocupar uma maior área e possivelmente reter mais água (BRITTEN & GIROUX, 2001).

3.2 Morfologia e microestrutura das micropartículas

Independentemente da concentração de proteína em solução e do tipo de tratamento térmico, nas condições estudadas, a morfologia das partículas úmidas foi semelhante e o recobrimento das PPec com WPC não alterou sua forma. As partículas apresentaram formato esférico, em sua maioria, porém também foram encontradas formatos ovulares, especialmente para as produzidas com WPC - TT. A maioria das partículas produzidas por biopolímeros apresentam formato esférico, porém podem se apresentar na forma de fibras, esferóides ou aglomerados (JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

Com relação a estrutura interna das partículas, o material encapsulado (manteiga) se difundiu por toda a matriz, caracterizando uma distribuição homogênea do recheio emulsificado. O estudo da estrutura interna faz-se necessário uma vez que influencia as características funcionais da partícula como a eficiência de encapsulação, permeabilidade, integridade e digestibilidade (JONES & MCCLEMENTS, 2010b). Para micropartículas carreadoras de fármacos tanto o formato quanto a distribuição do ativo pela matriz é muito importante, influenciando a cinética de liberação da droga. Para partículas carreadoras de microorganismos e células vivas a forma e a distribuição do ativo na matriz são menos importantes (TALEI FRANZESI *et al.*, 2006; TEOH *et al.*, 2011).

Nas imagens obtidas por MEV (Figura 3.1F-J; Figura 3.2 D-F) pode-se observar que as partículas não suportaram integralmente o processo de secagem perdendo parcialmente sua forma esférica original, para todos os níveis de concentração de proteína estudados, mesmo contendo uma maior quantidade de lipídeos emulsificados na solução de pectina. Diversos fatores podem ter levado a maior fragilidade das partículas durante o processo de secagem, dentre eles a matriz de pectina de baixo teor de esterificação que contém uma grande quantidade de água. Segundo Albertini *et al* (2010) micropartículas produzidas com alginato mostraram alteração de sua forma, apresentando rugas em sua superfície, em decorrência do processo de

secagem. Entretanto, em um outro estudo realizado com isolado protéico do soro do leite recobrando partículas de pectina de alto teor de esterificação observou-se que partículas recobertas suportaram o processo de secagem, mantendo formato original após secagem (SAGIS *et al.*, 2008).

Nas micropartículas desidratadas é possível observar a presença de irregularidade na superfície das partículas, com ondulações por grande parte da mesma, em decorrência, principalmente, das vesículas de gordura e da camada de proteína adsorvida presentes na partícula (Figura 3.1F e Figura 3.2 D - F). Na microscopia ótica (Figura 3.1E e Figura 3.2 A-C) é possível observar que as partículas são próximas a esféricas, com contorno bem definido, muito parecidas e com a emulsão lipídica bem distribuída por toda a matriz. As gotas de gordura são mais visíveis nas partículas com WPC - TT, possivelmente pelo menor teor de proteína adsorvida (Figura 3.2). Após a secagem, as partículas não conseguem reter a morfologia esférica apresentada pelas partículas úmidas, embora estejam recobertas com uma camada proteica. Segundo Gbassi *et al.* (2009), o recobrimento de partículas de alginato com polications pode melhorar a estabilidade química e mecânica das micropartículas e assim efetivamente a microencapsulação.

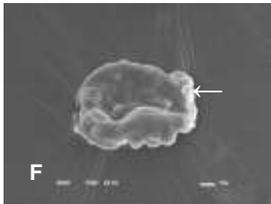
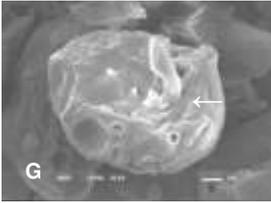
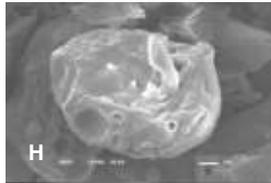
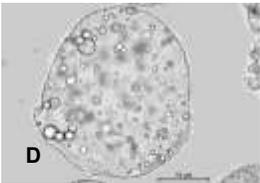
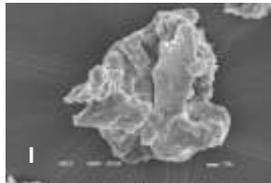
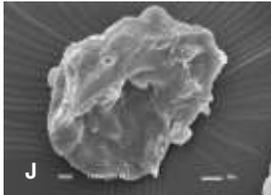
SPro (%)	Microscopia Ótica	Microscopia eletrônica de varredura
2		
4		
6		
8		
12		

Figura 3.1. Morfologia de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática em soluções de WPC – STT em diferentes concentrações de proteína (%).

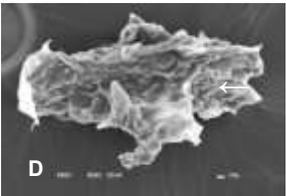
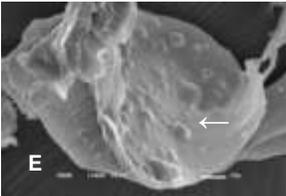
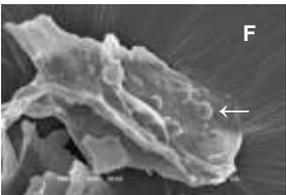
SPro (%)	Microscopia Ótica	Microscopia eletrônica de varredura
2		
4		
6		

Figura 3.2. Morfologia das micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática em soluções de WPC - TT em diferentes concentrações de proteína (%).

A adsorção de proteína nas PPec também pode ser confirmada por meio da microscopia confocal (Figura 3.3). Foram produzidas partículas com formas definidas, esféricas ou ovulares. A topografia na altura observada indica que as partículas apresentam um contorno contínuo sem poros visíveis. A presença das proteínas adsorvidas nas partículas e também difundidas na matriz de gelificação iônica pode ser observada através da coloração verde do corante FIT C associado à solução WPC - STT ou através da coloração vermelha do corante Rhodamina associada à solução WPC - TT.

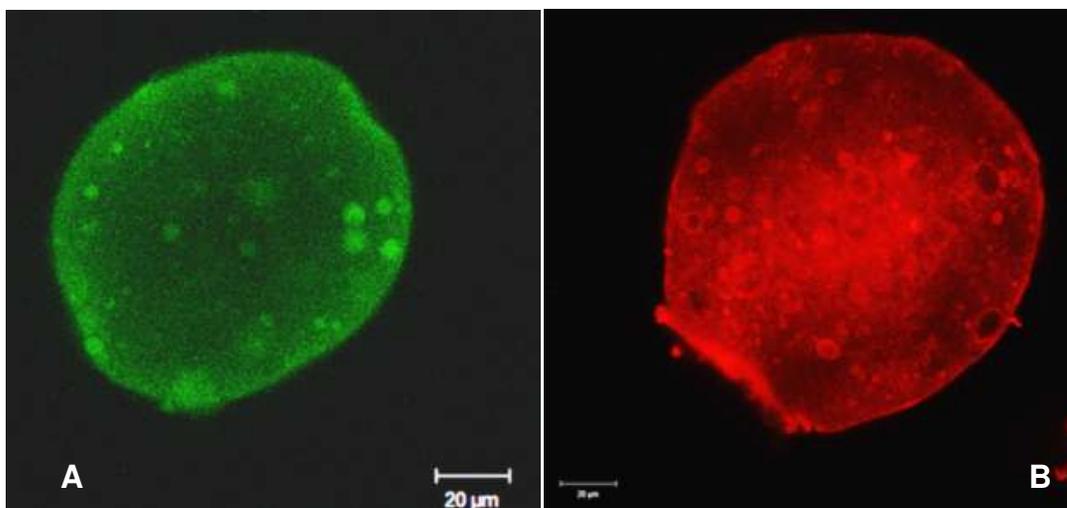


Figura 3.3. Microscopia confocal de partículas produzidas por gelificação iônica recobertas com WPC – STT coradas com FIT C (imagem A) e com WPC - TT coradas com Rhodamina (imagem B).

Na Figura 3.4, pode-se observar a localização física das gotas lipídicas coradas com Nile Red. Nesse caso, foram produzidas somente partículas de gelificação iônica sem cobertura protéica. É possível observar que as partículas são esféricas e com boa distribuição das gotas lipídicas. No entanto, também é possível observar que as gotas lipídicas apresentam uma ampla distribuição de tamanho, indicando que o processo de emulsificação pode ser melhorado.

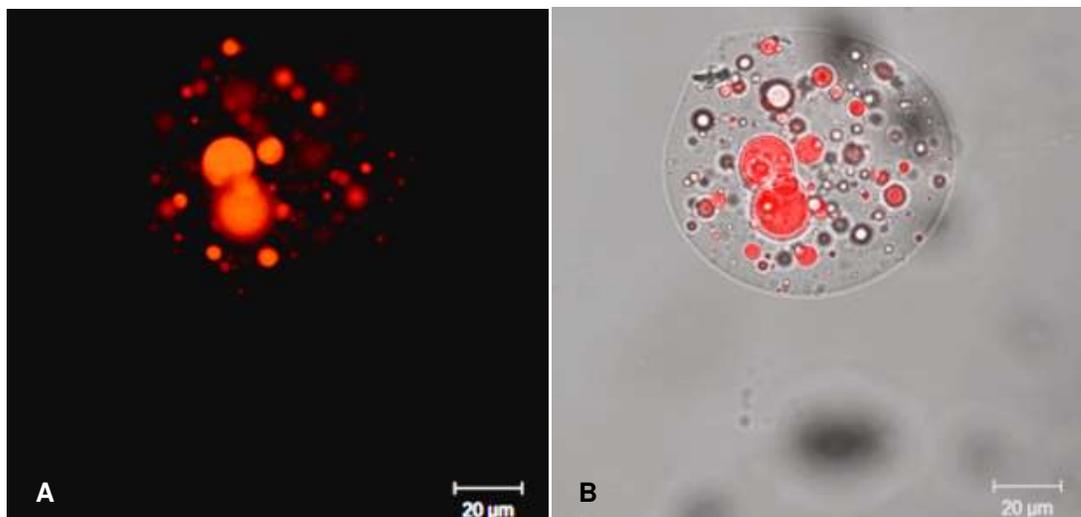


Figura 3.4. Partículas de gelificação iônica com manteiga marcada com corante fluorescente Nile Red. A – confocal; B- DIC (sobreposição)

3.3 Tamanho das micropartículas

3.3.1 Tamanho das micropartículas úmidas

O tamanho das micropartículas úmidas recém produzidas em diferentes concentrações de proteína variou entre $188,1 \pm 8,8 \mu\text{m}$ a $231,3 \pm 25,8 \mu\text{m}$ para partículas produzidas com WPC – STT quando a concentração de proteínas em solução cresceu de 2 a 12%, sem diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$). Com relação ao recobrimento com WPC - TT os valores médios situaram-se entre $226,6 \pm 7,8 \mu\text{m}$ a $252,6 \pm 12,9 \mu\text{m}$, também sem diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$), conforme pode ser observado na Figura 3.5, onde também podem ser observados os tamanhos médios obtidos para as PPec (pH 4) que variaram entre $253,4 \pm 23,9 \mu\text{m}$ a $285,2 \pm 21,1 \mu\text{m}$. Os resultados apresentados na Figura 3.5 mostram claramente que as Pec originalmente são maiores que as partículas recobertas, independente da utilização de WPC – STT ou WPC - TT, indicando que a proteína ao interagir eletrostaticamente com os grupos carboxílicos negativos da partícula de pectina pressiona a partícula reduzindo seu tamanho, possivelmente

expulsando parte da água presente na partícula. Ainda independente das concentrações de proteína estudadas, partículas ligadas eletrostaticamente à WPC - TT apresentam tamanhos médios superiores as partículas produzidas com WPC - STT. A ordem decrescente foi: $d_{0,5}$ (PPec) > $d_{0,5}$ (partículas recobertas com WPC – TT) > $d_{0,5}$ (partículas recobertas com WPC – STT).

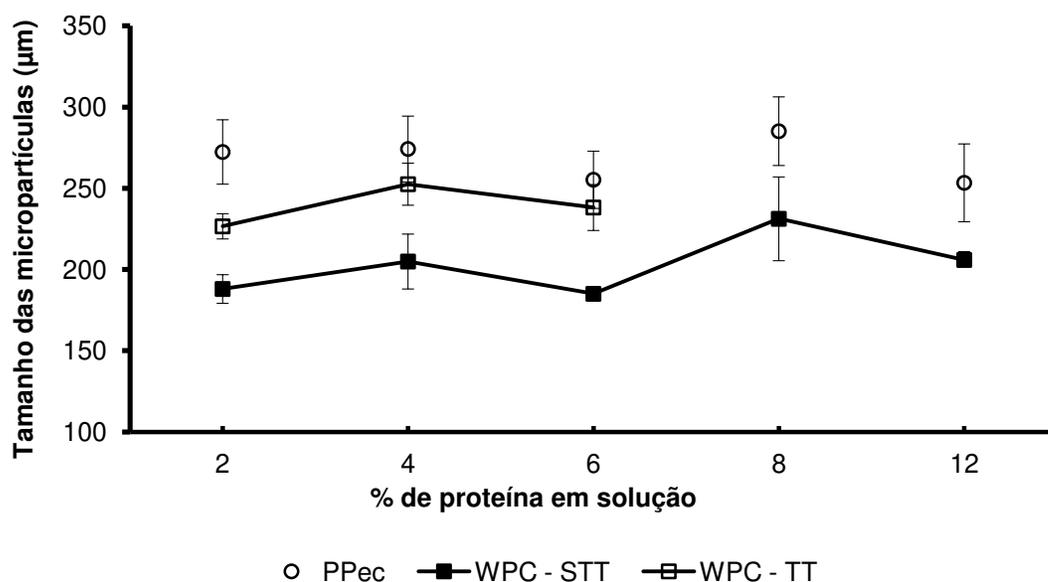


Figura 3.5. Tamanho das micropartículas (úmidas) em função dos diferentes teores de proteína em solução, a pH 4.

O tamanho das micropartículas recobertas é influenciado pelo tamanho das PPec que têm por sua vez seu tamanho controlado pelo diâmetro da agulha ou do bico de atomização utilizado, pressão do ar, viscosidade da solução, taxa de fluxo, concentração de cloreto de cálcio no banho iônico e concentração do polissacarídeo gelificante (BUREY *et al.*, 2008). Diferentes tamanhos podem ser obtidos com a escolha correta das variáveis citadas acima. Partículas produzidas apenas com isolado protéico do soro do leite apresentaram tamanhos próximos ao encontrado neste estudo, variando entre 150 a 400 µm (DOHERTY *et al.*, 2011), enquanto partículas produzidas por extrusão apresentam tamanho entre 500 µm a 600 µm (BUREY *et al.*, 2008).

Proteínas globulares, como as proteínas do soro do leite apresentam a capacidade de desnaturar, dissociar e agregar em diferentes condições de pH, força iônica e temperatura para formar partículas com diferentes tamanhos, incluindo nanopartículas e partículas de até 2 mm. Estas propriedades podem ser exploradas para a formulação otimizada de partículas carreadoras de compostos bioativos (CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006). O tamanho

das micropartículas também influencia os processos difusivos do material de recheio podendo também melhorar a viabilidade do material encapsulado como, por exemplo, na encapsulação de células vivas, onde uma redução no tamanho das partículas permite um melhor acesso de nutrientes, além de reduzir o volume de micropartículas a ser utilizado, o que vai determinar diferentes taxas de difusão (DE VOS *et al.*, 2006).

O tempo de cura também pode afetar o tamanho de micropartículas de gelificação iônica, em decorrência das ligações químicas que ocorrem na partícula (SMRDEL *et al.*, 2008). Segundo Racovitã *et al* (2009) a partir de 20 minutos em contato com o banho iônico, partículas de gelificação iônica atingem sua estabilidade máxima, não alterando seu tamanho ao permanecerem mais tempo em contato com a solução iônica.

3.3.2 Tamanho das partículas úmidas ou reidratadas em diferentes pHs

Inicialmente partículas úmidas pós produção foram submetidas às soluções aquosas ajustadas em diferentes pHs (1,2, 4 e 7). Após uma hora de imersão o tamanho médio das partículas foi medido e os resultados apresentados na Tabela 3.3. Independente da utilização de WPC - STT ou WPC - TT o comportamento observado indicou pequenas variações de tamanho quando as partículas foram transferidas de pH 4 para pH 1,2 ou pH 7. Quando as partículas foram colocadas em pH fortemente ácido (1,2), observou-se um decréscimo no tamanho médio das partículas, com diferença significativa para o tamanho das partículas de WPC - TT em relação as mesmas partículas obtidas em pH 4 ($p < 0,05$), resultado não esperado considerando que nesse pH os grupos carboxílicos da pectina deveriam estar não dissociados, uma vez que, o pKa da pectina se situa em torno de 2,9 (RALET *et al.*, 2001) enquanto a proteína deveria estar carregada positivamente o que deveria provocar repulsão eletrostática e aumento no tamanho médio, conforme observado anteriormente na literatura para nanopartículas produzidas por coacervação complexa entre pectina extraída de beterraba e β -lg (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). É possível que a

interação eletrostática responsável pela adsorção da proteína na superfície das PPec tenha sido intensa e estável e desta forma suficientemente resistente à difusão de grupos H⁺ e a mudança de carga nas regiões de interação pectina – WPC, efeito observado por Rosenberg & Lee (2004). Quando as partículas recobertas com WPC - TT são transferidas para pH neutro (7) ocorre um pequeno aumento no tamanho das partículas quando comparado ao pH 1,2, como esperado, indicando repulsão eletrostática, uma vez que ambos os polímeros vão estar carregados negativamente, efeito também observado anteriormente na literatura (ROSENBERG & LEE, 2004).

Tabela 3.3. Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas úmidas (µm) após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.

pH	WPC - STT	WPC - TT
1,2	193,17 ± 8,13 Aa*	187,48 ± 13,97 Ba
4	207,10 ± 12,75 Aa	221,10 ± 13,46 Ca
7	214,10 ± 8,94 Aa	228,43 ± 19,63 Ca

* Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05).

Apesar de perderem sua forma durante o processo de secagem (Figuras 3.1 e 3.2), as partículas readquiriram sua forma original após reidratação em água ajustada a diferentes pHs (1,2, 4 e 7), confirmando que o processo de secagem não destruiu a partícula, apenas alterou sua forma, conforme pode ser observado nas microscopias óticas apresentadas na Figura 3.6. As partículas reidrataram e readquiriram morfologia esférica e aparentemente com mesma distribuição das gotas lipídicas observadas nas partículas úmidas recém produzidas (Figuras 3.1 e 3.2), independente do tipo de proteína utilizada (WPC - STT e WPC - TT).

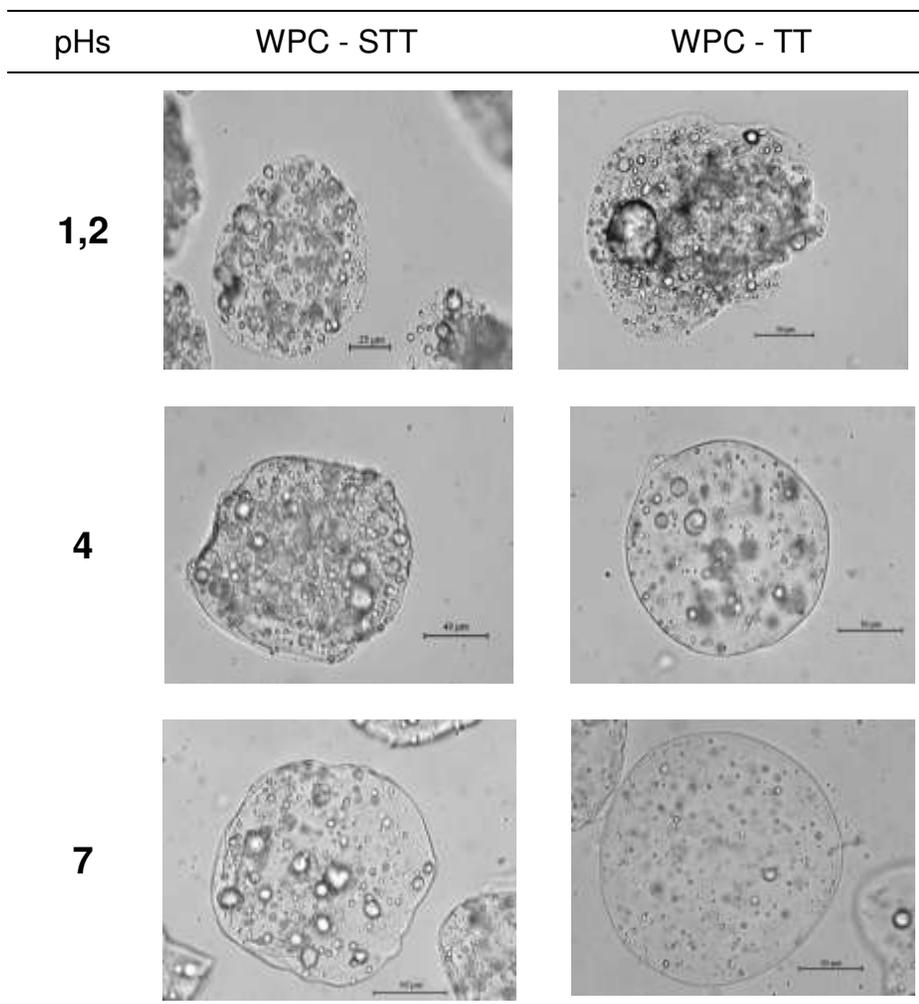


Figura 3.6. Micropartículas liofilizadas e reidratadas após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.

Partículas de gelificação iônica, em decorrência de sua matriz porosa, apresentam facilidade de inchamento/reidratação após imersão em água e as partículas recobertas sofrem a influência dessas características da PPec. O inchamento das partículas de gelificação iônica é controlado pela intensidade de *cross link* entre a pectina e cálcio (LIU *et al.*, 2003). Proteínas do soro do leite podem formar complexos com a superfície de partículas de polissacarídeos gelificantes, obtendo-se uma partícula com uma membrana semi-permeável que pode apresentar comportamento diferenciado em relação as partículas de gelificação iônica (GBASSI *et al.*, 2009).

Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostram que as partículas secas e posteriormente reidratadas voltam a adquirir um tamanho médio semelhante ao obtido para partículas úmidas recém processadas (pH 4) e pode-se também observar que os tamanhos médios das partículas reidratadas em pHs 1,2 e 4 não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao tamanho médio das partículas frescas em pH 4, quando solução de WPC - STT ou WPC- TT a concentração de 4% de proteína foram utilizados para o recobrimento.

Tabela 3.4. Tamanho médio ($d_{0,5}$) das micropartículas liofilizadas e reidratadas (μm) após 1 hora de imersão em água em diferentes pHs.

	pH	WPC - STT	WPC - TT
Úmidas	4	208,20 \pm 19,23 ^{Ba*}	221,64 \pm 10,14 ^{Ba}
	1,2	199,81 \pm 7,2 ^{Bb}	232,41 \pm 10,65 ^{Ba}
Reidratadas	4	210,40 \pm 11,06 ^{Ba}	245,13 \pm 4,90 ^{ABa}
	7	256,47 \pm 9,26 ^{Aa}	259,16 \pm 17,87 ^{Aa}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em pH 1,2, as partículas foram suficientemente resistentes para impedir o acesso de grupos H^+ mantendo a interação eletrostática pectina – WPC - STT e WPC - TT efeito não esperado caso fosse possível a protonação dos grupos carboxílicos da pectina e portanto uma repulsão eletrostática das proteínas carregadas positivamente nesse pH. Comportamento semelhante foi observado anteriormente por Rosenberg & Lee (2004), que produziram partículas utilizando WPC recobertas com uma camada de alginato. Esses autores observaram que as micropartículas dispersas em pH 2,5 apresentaram a menor taxa de inchamento quando comparado ao inchamento observado em pHs 4,5, 6 e 7. Os autores trabalharam com WPC desnaturado por calor e sugeriram que forças repulsivas entre WPC e alginato foram relativamente pequenas comparadas ao efeito de ligações dissulfídicas intercruzadas na matriz das partículas (ROSENBERG & LEE, 2004).

Para ambas as partículas recobertas com WPC - STT ou WPC - TT observa-se o mesmo comportamento (Tabela 3.4), onde os tamanhos médios das partículas reidratadas em pH 7 foram estatisticamente superiores aos observados nos outros pHs, indicando neste caso, repulsão eletrostática pectina – WPC por apresentarem ambas cargas negativas, conforme esperado. Com o aumento no pH para 6 e 7 as cargas negativas da superfície da proteína e a dissociação de grupos carboxílicos das moléculas de alginato aumentaram as forças repulsivas e como consequência aumentaram a taxa de inchamento nesses valores de pH (ROSENBERG & LEE, 2004). Por outro lado, aumento no diâmetro em baixos pHs (3 – 3,5) foram obtidos usando pectina de beterraba e β -Lg desnaturada (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). Neste caso, o aumento de tamanho em baixo pH foi também justificado através da forte repulsão eletrostática entre a pectina e a proteína.

3.3.3 Tamanho das partículas úmidas submetidas às simulações das condições gastrointestinais

Partículas úmidas produzidas com WPC - STT e WPC - TT foram submetidas à condição gástrica simulada em pH 3 na presença de pepsina conforme descrito em materiais e métodos. Após 2 horas de simulação os tamanhos médios foram determinados e os resultados apresentados na Tabela 3.5. Nesse experimento independente da utilização de WPC - STT ou WPC - TT a redução do pH na presença da enzima produziu o inchamento das partículas, com aumento do tamanho médio, diferente da estabilidade observada para as partículas quando somente o efeito do pH foi avaliado (Tabela 3.4), indicando algum grau de enfraquecimento das partículas devido a ação proteolítica da pepsina. Aumento no tamanho das partículas em pHs bastante ácidos e inferiores ao pKa da pectina indicando repulsão eletrostática pectina – proteína foram observados na literatura (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). Deve-se considerar que o meio utilizado além da enzima proteolítica continha sais (NaCl e CaCl_2) e portanto a força iônica vai ser alterada

contribuindo para o enfraquecimento e conseqüente inchamento das partículas (JONES & MCCLEMENTS, 2010a).

Tabela 3.5. Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas (μm) após a simulação gástrica (2 horas) em pH 3, na presença de pepsina.

	Sem tratamento (pH 4)	pH 3
WPC - STT	208,2 \pm 19,2 Aa*	224,8 \pm 20,1Aa
WPC - TT	221,6 \pm 10,1 Ab	342,9 \pm 73,8Aa

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

3.4 Solubilidade das micropartículas úmidas submetidas às condições gastrointestinais

As partículas úmidas recobertas com WPC - STT ou WPC - TT a concentração de 4% de proteína em solução foram submetidas a uma simulação sob condições gastrointestinal *in vitro* e a solubilidade protéica, avaliada após 2 horas, apresentada na Tabela 3.6. Os valores de pHs gástrico escolhidos foram baseados na literatura (MOURA & REYES, 2002; CORCORAN *et al.*, 2005; GBASSI *et al.*, 2009).

Uma alta solubilidade da cobertura protéica para a solução foi observada independente da utilização de WPC - STT ou WPC - TT, com porcentagens superiores a 40% para a situação de pH inicial mais drástica (1,2), indicando que as partículas foram extremamente frágeis à associação pH muito ácido em presença de pepsina. Partículas revestidas com WPC - STT apresentaram solubilidade significativamente superior às partículas revestidas com WPC - TT. A perda de uma alta quantidade de proteína observada para os dois tipos de partículas não se reflete, entretanto, em perda de tamanho, como pode ser observado na Tabela 3.5.

Quando o pH inicial foi mais alto e portanto menos drástico (pH 3), as solubilidades observadas foram muito menores após duas horas de

experimentos, onde partículas revestidas com WPC – STT mostraram uma solubilidade de 5,6%, com diferença estatística para a solubilidade de 18,6% apresentada pelas partículas recobertas com WPC – TT (Tabela 3.6). Esse comportamento é reportado na literatura. Proteínas do soro do leite em sua forma nativa são menos susceptíveis à hidrólise enzimática, e isso pode ser alterado por tratamento térmico, alta pressão, alteração de polaridade, dentre outros fatores (MORR & HA, 1993; KANANEN *et al.*, 2000; FOEGEDING *et al.*, 2002).

Os resultados de solubilidade observados a pH 3 foram anteriormente observados por Kitabatake & Kinekawa (1998), em um estudo clássico comparando a resistência a hidrólise proteolítica *in vitro* e *in vivo*, mostrando que proteínas do soro do leite em seu estado nativo não são digeridas pelas enzimas presentes no suco gástrico, entretanto, ao serem desnaturadas pelo calor, tornam-se mais digeríveis. Cabe ressaltar que esses autores realizaram seus experimentos com soluções protéicas e não com partículas.

Adicionalmente um estudo bastante recente com partículas contendo proteínas do soro do leite, na forma nativa, recobrando partículas de alginato, indicou a hidrólise de algumas frações protéicas do soro de leite, incluindo α -lactoalbumina e albumina do soro, entretanto mostrando que β -lactoglobulina manteve-se intacta, quando as partículas foram submetidas às simulações com TGI com pepsina (GBASSI *et al.*, 2009), sendo o experimento realizado com técnicas eletroforéticas. Em um estudo realizado com partículas produzidas com quitosana e β -lactoglobulina, na forma nativa, submetidas a uma simulação das condições gástricas, *in vitro*, foi encontrado uma maior resistência a ação das enzimas gástrica para partículas produzidas com β -lactoglobulina na forma nativa, em pH 1,2 (CHEN & SUBIRADE, 2005b).

Tabela 3.6. Solubilidade média (%) das micropartículas após 2 horas de simulação gástrica, em diferentes pHs de suco gástrico artificial. Micropartículas produzidas com 4% de proteína em solução.

pH	WPC - STT	WPC - TT
1,2	65,3 ± 6,2 Aa*	41,2 ± 5,3 Ab
3,0	5,6 ± 0,1Ba	18,6 ± 2,3Bb

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

Além da medida da solubilidade determinada nas condições gastrointestinal simuladas, a morfologia das partículas e sua integridade foram acompanhadas por microscopia ótica (Figura 3.7, pH 1,2 - 7 e Figura 3.8, pH 3,0 - 7). Pode ser observado, nas figuras que, independente do pH utilizado (1,2 ou 3) e independente da cobertura ter sido efetuada com WPC - STT ou WPC - TT as partículas se mantiveram aparentemente íntegras nos pHs gástricos após 1 ou 2 horas, desfazendo-se ao serem submetidas a condição intestinal simulada após 1 ou 5 horas. As imagens comprovam a resistência das partículas às condições gástricas e sua capacidade de liberação de ativo em meio intestinal. Diversas pesquisas vem sendo conduzidas neste sentido, a fim de se obter partículas que liberam o ativo em locais específicos, aumentando a funcionalidade do composto encapsulado (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA & AMINABHAVI, 2004; CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007).

Alguns materiais, como os polissacarídeos, não são digeridos pelas enzimas no TGI, sendo fermentados pela microbiota do cólon, apresentando-se como bons materiais de parede para desenvolvimento de micropartículas com resistência entérica, dentre eles pectina, inulina, quitosana, amilose e gomas vêm sendo investigados (KOSARAJU, 2005; LIU, FISHMAN & HICKS, 2007; ANNAN, BORZA & HANSEN, 2008; LAMBERT, WEINBRECK & KLEEREBEZEM, 2008). Micropartículas produzidas por biopolímeros como pectina e alginato não são digeridos pelas enzimas gástricas e permanecem intactas na parte superior do TGI, sendo desfeitas após fermentação das

enzimas no cólon, necessitando de um tempo maior de permanência em ambiente intestinal para liberação do composto encapsulado (LIU *et al.*, 2003; HOAD *et al.*, 2009; RAYMENT *et al.*, 2009). No caso do presente estudo, as partículas mantiveram-se íntegras em condições gástricas e desfizeram-se nas condições intestinais, efeito não esperado em função da não digestibilidade da pectina, como reportado acima. Como foi observada, a manutenção da integridade das partículas nas condições gástricas e que adicionalmente o meio base para a inserção das enzimas proteolíticas utilizada foi o mesmo, a possibilidade das partículas terem se dissolvido devido ao efeito da força iônica não parece provável. Por outro lado, a interação eletrostática pectina – proteína pode ter comprometido grupos carboxílicos que poderiam estar associados aos íons cálcio na partícula de gelificação iônica, enfraquecendo desta forma as partículas, que não resistiram às condições intestinais, desfazendo-se completamente.

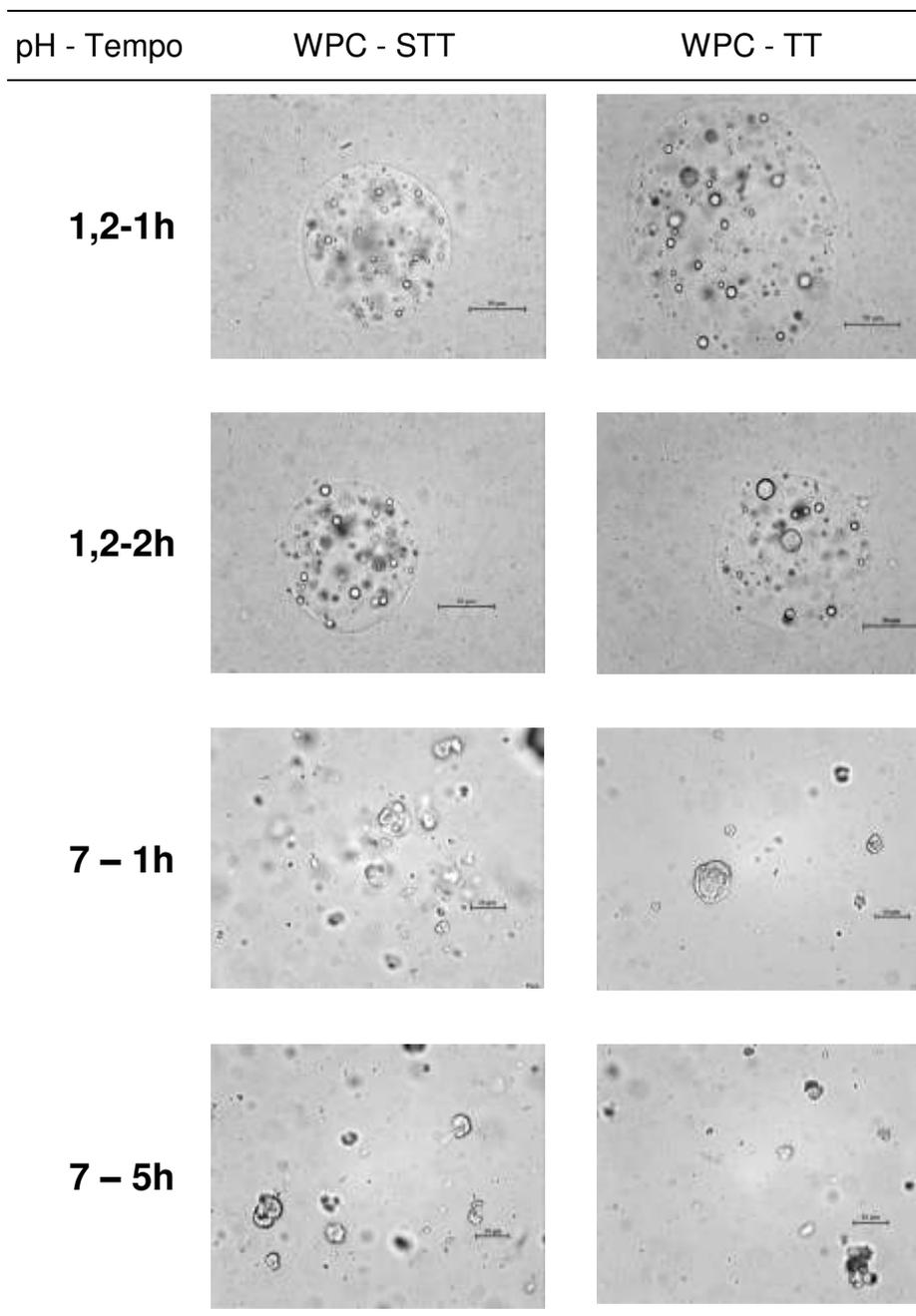


Figura 3.7. Morfologia das micropartículas durante da simulação gastrointestinal (2 horas, 37°C, pH 1,2, com pepsina e 5 horas, pH 7, 37°C com pancreatina).

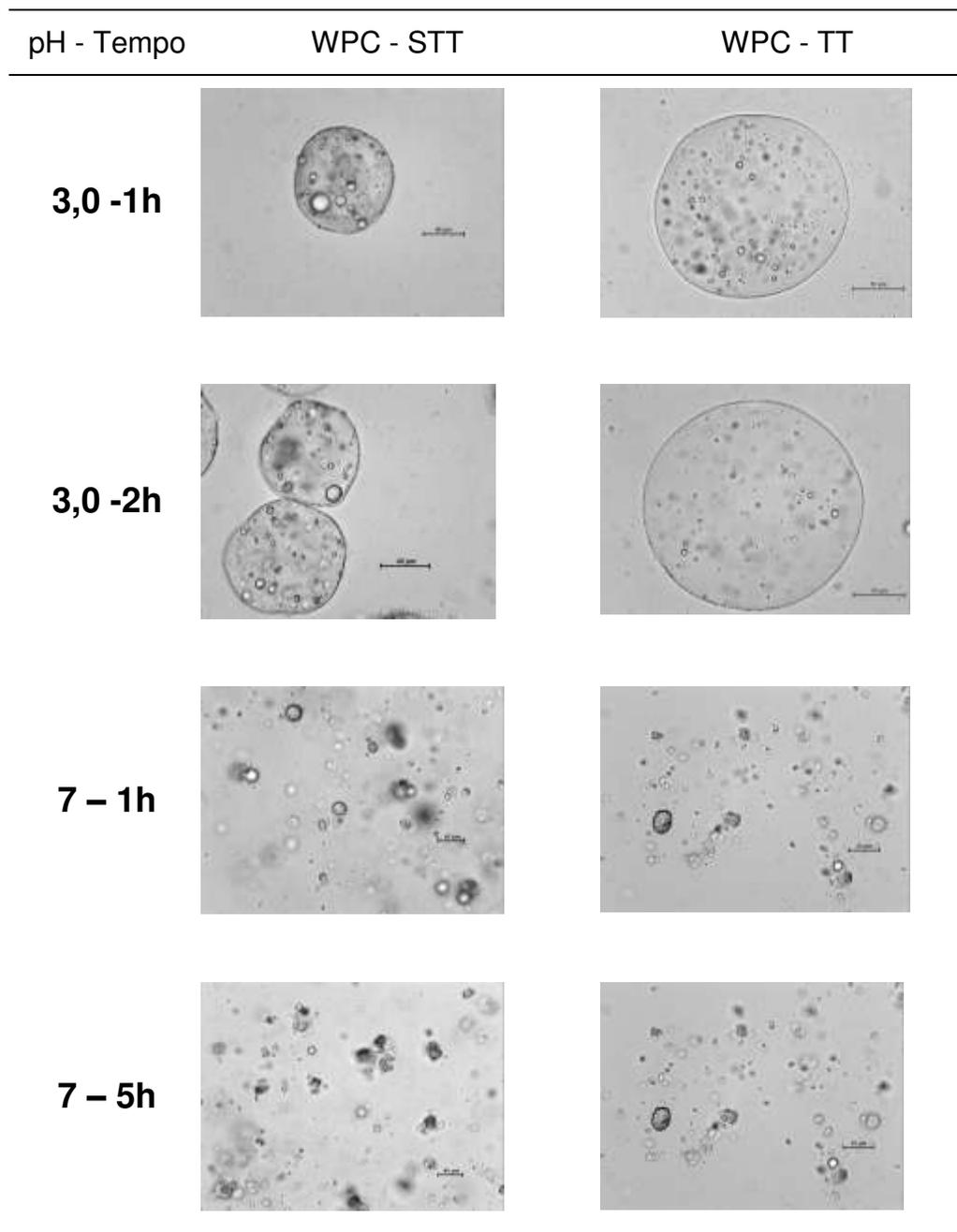


Figura 3.8. Morfologia das micropartículas durante da simulação gastrointestinal (2 horas, 37°C, pH 3,0, com pepsina e 5 horas, pH 7, 37°C com pancreatina).

4. CONCLUSÕES

A incorporação de um alto teor lipídico emulsificado no interior da matriz de partículas de gelificação iônica utilizando pectina de baixo teor de esterificação amidada não impediu que as partículas pudessem ser recobertas com uma alta quantidade de proteína (WPC - STT e WPC - TT), em base seca, de excelente valor nutricional atingindo quantidades próximas de 50 e 27%, respectivamente. Máxima adsorção foi observada à 4 - 6% de proteína em solução para WPC - STT e 4% de proteína em solução para WPC - TT.

O teor de proteína em solução não afetou o tamanho ou a morfologia das micropartículas recém processadas, entretanto, o recobrimento, seja para WPC - STT ou TT, promoveu uma redução no tamanho das partículas comparadas ao tamanho das partículas de gelificação iônica.

Partículas liofilizadas e reidratadas ou partículas úmidas recém-processadas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, mantendo sua estrutura íntegra e tamanho similar em condições ácidas, apresentando acréscimo de tamanho quando pH foi alterado para 7, no caso das partículas liofilizadas e reidratadas. Para as partículas úmidas, os tamanhos permaneceram muito próximos em pH ácido ou a pH 7.

Partículas recobertas com WPC - STT ou WPC - TT foram fortemente solubilizadas em condições simuladas do trato gástrico em pH 1,2 (> 40%). Entretanto, quando o pH avaliado foi igual a 3, as solubilidades foram bastante reduzidas, atingindo 5,6 % para WPC - STT e 18,6 % para WPC - TT. Os dois tipos de partículas se desintegram completamente quando o pH foi alterado para 7 na presença de pancreatina.

CONCLUSÕES FINAIS

Partículas obtidas por gelificação iônica contendo pectina de baixo teor de esterificação amidada e proteínas do soro do leite comercial ou desnaturada interagiram por interação eletrostática possibilitando a adsorção de altas quantidades de proteína na superfície das PPec, em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína, que neste estudo foi de 4,36 para WPC - STT e de 4,51 para WPC - TT. A utilização de WPC - STT permitiu a adsorção de \approx 50%, bastante superior aos \approx 30% quando as partículas foram recobertas com WPC - TT, utilizando 4% de concentração protéica em solução e 2% (p/p) de manteiga nas formulações.

A interação eletrostática ocorreu quando uma relação PPec : WPC - STT ou WPC - TT de 1:4 ou superior em relação ao conteúdo da proteína foi utilizada. Foi possível observar que a carga de superfície PPec é inferior a carga da solução de pectina, ambas com a mesma quantidade do polissacarídeo, medida através do potencial zeta.

O teor de manteiga presente nas PPec obtidas por gelificação iônica afetou negativamente a adsorção de proteína sobre a superfície da partícula, sendo que ao se aumentar a quantidade de manteiga houve uma redução na adsorção de proteína.

O recobrimento de PPec obtidas por gelificação iônica aumentou o valor nutricional das micropartículas além de permitir um melhor controle de tamanho em diferentes condições de pH.

O pH utilizado no SGA da simulação do TGI influenciou na solubilidade das micropartículas, aumentando a solubilidade protéica das partículas com a redução do pH para condições extremamente drásticas (pH 1,2) efeito muito menor quando o pH foi de 3.

As partículas estudadas foram resistentes às condições gástricas e desfizeram-se em ambiente intestinal, permitindo a liberação do material encapsulado, independente de se utilizar WPC - STT ou WPC - TT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AI, H.; JONES, S.; LVOV, Y. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n. 1, p. 23-43, 2003.

ALBERTINI, B.; VITALI, B.; PASSERINI, N.; CRUCIANI, F.; DI SABATINO, M.; RODRIGUEZ, L.; BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 359-366, 2010.

ALHNAN, M. A.; COSI, D.; MURDAN, S.; BASIT, A. W. Inhibiting the gastric burst release of drugs from enteric microparticles: The influence of drug molecular mass and solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 11, p. 4576-4583, 2010.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.

ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1-2, p. 45-54, 2005.

ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 184-193, 2008.

AOAC. Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analytical Chemists of the Association Chemistry**, 2006.

ASHFORD, M.; FELL, J.; ATTWOOD, D.; SHARMA, H.; WOODHEAD, P. Studies on pectin formulations for colonic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 3, p. 225-232, 1994.

ASKER, D.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and Stabilization of Antimicrobial Delivery Systems Based on Electrostatic Complexes of Cationic–Non-ionic Mixed Micelles and Anionic Polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 1041-1049, 2011.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.

BADILA, M.; BROCHON, C.; HÉBRAUD, A.; HADZIIOANNOU, G. Encapsulation of TiO₂ in poly(4-vinyl pyridine)-based cationic microparticles for electrophoretic inks. **Polymer**, v. 49, n. 21, p. 4529-4533, 2008.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 2011.

BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1227-1232, 2011.

BENGOECHEA, C.; PEINADO, I.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1354-1360, 2011.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.

BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 609-617, 2001.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 361-377, 2008.

CARDOSO, S. M.; COIMBRA, M. A.; LOPES DA SILVA, J. A. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca²⁺ networks: a rheological study. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 6, p. 801-807, 2003.

CHAMBIN, O.; DUPUIS, G.; CHAMPION, D.; VOILLEY, A.; POURCELOT, Y. Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1-2, p. 86-93, 2006.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 2, p. 176-187, 2006.

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 1, p. 27-35, 2004.

CHEN, J. Surface texture of foods: Perception and characterization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 6, p. 583-598, 2007.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2006.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Chitosan/[beta]-lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 6041-6053, 2005a.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 6041-6053, 2005b.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4646-4654, 2006.

CLARK, A. H.; FARRER, D. B. Shear modulus-concentration relationships for low DE pectin-calcium gels in the temperature range 20-85°C. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 1, p. 31-39, 1996.

CONSIDINE, T.; NOISUWAN, A.; HEMAR, Y.; WILKINSON, B.; BRONLUND, J.; KASAPIS, S. Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 2008-2017, 2011.

COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte-protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 1-2, p. 52-78, 2005.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of Probiotic *Lactobacilli* in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3060-3067, June 1, 2005.

CROGUENOC, P.; DURAND, D.; NICOLAI, T.; CLARK, A. Phase Separation and Association of Globular Protein Aggregates in the Presence of Polysaccharides: 1. Mixtures of Preheated β -Lactoglobulin and κ -Carrageenan

at Room Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 14, p. 4372-4379, 2001/07/01 2001a.

CROGUENNOG, P.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; CLARK, A. Phase Separation and Association of Globular Protein Aggregates in the Presence of Polysaccharides: 2. Heated Mixtures of Native β -Lactoglobulin and κ -Carrageenan. **Langmuir**, v. 17, n. 14, p. 4380-4385, 2001/07/01 2001b.

DE VOS, P.; DE HAAN, B. J.; KAMPS, J. A. A. M.; FAAS, M. M.; KITANO, T. Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: A predictive measure for biocompatibility? **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80A, n. 4, p. 813-819, 2007.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; STRAND, B.; CALAFIORE, R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. **Biomaterials**, v. 27, n. 32, p. 5603-5617, 2006.

DE WIT, J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DE WIT, J. N. Thermal behaviour of bovine [beta]-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 1, p. 27-34, 2009.

DEGEN, P.; LEICK, S.; REHAGE, H. Mechanical Stability of Ionotropic Alginate Beads. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 223, n. 9, p. 1079-1090, 2009/10/01 2009.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005/07/01 2005.

DOE, T.; HORITA, M.; NISHIDA, T.; ISHIKAWA, Y.; URAOKA, Y. Fabrication of semiconductor nanoparticles using electro spray deposition method. Electron Devices, Kansai, (IMFEDK), 2011 International Meeting for Future of, 2011. 19-20 May 2011. p.32-33.

DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein microbeads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1604-1617, 2011.

EL-SAYED, M.; CHASE, H. Trends in whey protein fractionation. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1501-1511, 2011.

FANG, Y.; ROGERS, S.; SELOMULYA, C.; CHEN, X. D. Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

FAO, Ed. **Compendium of food additive specifications, seventy-first meeting.** : FAO JECFA Monographs, v. ed. 2009.

FARRELL JR, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641-1674, 2004.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 5, p. 151-159, 2002.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1611-1624, 2007.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Developments in the chemistry and technology of milk proteins 1. Overview of major milk proteins. **Food Australia**, v. 55, n. 3, p. 104-108, 2003.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 5, p. 219-228, 2010.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GIBBS, S. K. I. A. C. N. M. B. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999/01/01 1999.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Interbiopolymer complexing between [beta]-lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 6, p. 585-591, 2002.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Quantification of the Interactions between β -Lactoglobulin and Pectin through Capillary Electrophoresis Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 6043-6049, 2003.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in food science & technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.

GUILLOTIN, S. E.; BAKX, E. J.; BOULENGUER, P.; MAZOYER, J.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 3, p. 391-398, 2005.

GUILLOTIN, S. E.; BAKX, E. J.; BOULENGUER, P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Determination of the degree of substitution, degree of amidation and degree of blockiness of commercial pectins by using capillary electrophoresis. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 444-451, 2007.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, v. 83, n. 1, p. 31-40, 2007.

GUZEY, D.; KIM, H. J.; MCCLEMENTS, D. J. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 6, p. 967-975, 2004.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β -Lactoglobulin-Pectin Complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 475-485, 2006.

HEELAN, B. A.; CORRIGAN, O. I. Preparation and evaluation of microspheres prepared from whey protein isolate. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 1, p. 93-105, 1998.

HILLS, B. P.; GODWARD, J.; DEBATTY, M.; BARRAS, L.; SATURIO, C. P.; OUWERX, C. NMR studies of calcium induced alginate gelation. Part II. The internal bead structure. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, n. 9, p. 719-728, 2000.

HOAD, C.; RAYMENT, P.; COX, E.; WRIGHT, P.; BUTLER, M.; SPILLER, R.; GOWLAND, P. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 2: In vivo characterisation. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 833-839, 2009.

HOFFMANN, M. A. M.; VAN MIL, P. J. J. M. Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 2942-2948, 1997.

HUMBLET-HUA, K. N. P.; SCHELTENS, G.; VAN DER LINDEN, E.; SAGIS, L. M. C. Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 569-576, 2011.

INNGJERDINGEN, K. T.; PATEL, T. R.; CHEN, X.; KENNE, L.; ALLEN, S.; MORRIS, G. A.; HARDING, S. E.; MATSUMOTO, T.; DIALLO, D.; YAMADA, H.; MICHAELSEN, T. E.; INNGJERDINGEN, M.; PAULSEN, B. S. Immunological and Structural Properties of a Pectic Polymer from *Glinus Oppositifolius*. **Glycobiology**, v. 17, n. 12, p. 1299-1310, December 1, 2007 2007.

JACKSON, C. L.; DREADEN, T. M.; THEOBALD, L. K.; TRAN, N. M.; BEAL, T. L.; EID, M.; GAO, M. Y.; SHIRLEY, R. B.; STOFFEL, M. T.; KUMAR, M. V.; MOHNEN, D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 805-819, August 1, 2007 2007.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JONES, O.; MCCLEMENTS, D. J. Stability of Biopolymer Particles Formed by Heat Treatment of β -lactoglobulin/Beet Pectin Electrostatic Complexes. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 191-197, 2008.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 2-3, p. 239-248, 2010.

JONES, O. G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 374-383, 2010.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer Nanoparticles from Heat-Treated Electrostatic Protein-Polysaccharide Complexes: Factors Affecting Particle Characteristics. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. N36-N43, 2010a.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 374-397, 2010b.

KANANEN, A.; SAVOLAINEN, J.; MÄKINEN, J.; PERTTILÄ, U.; MYLLYKOSKI, L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 10, p. 691-697, 2000.

KAZMIERSKI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of β -lactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1673-1679, 2003.

KIM, D. A.; CORNEC, M.; NARSIMHAN, G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of [beta]-lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 100-109, 2005.

KIM, Y.; YOO, Y. H.; KIM, K. O.; PARK, J. B.; YOO, S. H. Textural Properties of Gelling System of Low-Methoxy Pectins Produced by Demethoxylating Reaction of Pectin Methyl Esterase. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. C367-C372, 2008.

KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y. I. Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4917-4923, 1998.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 785-796, 2004.

KOSARAJU, S. L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 251-258, 2005/06/01 2005.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 8, p. 737-743, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 177-183, 2006.

KRISHNAMACHARI, Y.; MADAN, P.; LIN, S. S. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and

colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 238-247, Jun 2007.

KRISSANSEN, G. W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 713S-723S, 2007.

LAMBERT, J. M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. In Vitro Analysis of Protection of the Enzyme Bile Salt Hydrolase against Enteric Conditions by Whey Protein–Gum Arabic Microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8360-8364, 2008.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2000.

LEE, E.; KIM, B. Smart delivery system for cosmetic ingredients using pH-sensitive polymer hydrogel particles. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 6, p. 1347-1350, 2011.

LI, L.; HONG-HUA, X.; XIN-HUAI, Z.; JIAN-CHUN, H.; TIE-JING, L. Conformation and stability of three different enzymes adsorbed onto SiO₂ nanoparticles. *New Technology of Agricultural Engineering (ICAE), 2011 International Conference on, 2011. 27-29 May 2011. p.925-930.*

LIU, L.; FISHMAN, M.; HICKS, K. Pectin in controlled drug delivery – a review. **Cellulose**, v. 14, n. 1, p. 15-24, 2007.

LIU, L.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B.; KENDE, M.; RUTHEL, G. Pectin/Zein Beads for Potential Colon-Specific Drug Delivery: Synthesis and in Vitro Evaluation. **Drug Delivery**, v. 13, n. 6, p. 417-423, 2006.

LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333-3343, 2003.

MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; CORTI, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 508-518, 2008.

MAY, C. D. Industrial pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 79-99, 1990.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions - Principles, Practices, and Techniques**. CRC Press, 2005. ISBN 978-0-8493-2023-1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/9781420039436.ch12>>. Acesso em: 2011/09/14.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 48-67, 2009.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J. Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 6, p. 577-606, 2009/06/16 2009.

MISHRA, S.; MANN, B.; JOSHI, V. K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 9-15, 2001.

MISTRY, V. V. Manufacture and application of high milk protein powder. **Lait**, v. 82, n. 4, p. 515-522, 2002.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MORR, C. V.; HA, E. Y. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 223-238, 2002.

MOZZI, F.; GERBINO, E.; FONT DE VALDEZ, G.; TORINO, M. I. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 56-64, 2009.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Controlled Release of Protein from Hydrocolloid Gel Microbeads Before and After Drying. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 3, p. 265-273, 2004.

MULVIHILL, M. P. E. A. D. M. **Functional milk proteins: Production and utilization**. 2003.

NEIRYNCK, N.; VAN DER MEEREN, P.; BAYARRI GORBE, S.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 6, p. 949-957, 2004.

NEIRYNCK, N.; VAN DER MEEREN, P.; LUKASZEWICZ-LAUSECKER, M.; COCQUYT, J.; VERBEKEN, D.; DEWETTINCK, K. Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein–pectin interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 298, n. 1-2, p. 99-107, 2007.

NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. [beta]-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1945-1962, 2011.

NORTON, I. T.; FRITH, W. J. Microstructure design in mixed biopolymer composites. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 543-553, 2001.

OPANASOPIT, P.; APIRAKARAMWONG, A.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; RUKTANONCHAI, U. Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 67-74, 2008.

OVODOV, Y. Current views on pectin substances. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 269-284, 2009.

PARRIS, N.; HOLLAR, C. M.; HSIEH, A.; COCKLEY, K. D. Thermal Stability of Whey Protein Concentrate Mixtures: Aggregate Formation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 1, p. 19-28, 1997.

PATEL, K. R.; PATEL, M. R.; MEHTA, T. J.; PATEL, A. D.; PATEL, N. M. Microencapsulation: Review on novel approaches. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 3, n. 1, p. 894-911, 2011.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PATIL, S.; SANDBERG, A.; HECKERT, E.; SELF, W.; SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-4607, 2007.

PATTEN, G. S.; AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L.; HEAD, R. J.; ABEYWARDENA, M. Y. Site Specific Delivery of Microencapsulated Fish Oil to the Gastrointestinal Tract of the Rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 3, p. 511-521, Mar 2009.

PAWAR, K. S.; PAWAR, S. P.; PATEL, V. A. Microbial polysaccharidases in colon specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 6, n. 2, p. 188-196, 2011.

PEREIRA, C. D.; DIAZ, O.; COBOS, A. Valorization of by-products from ovine cheese manufacture: Clarification by thermocalcic precipitation/microfiltration before ultrafiltration. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 9, p. 773-783, 2002.

PEREZ, A. A.; SÁNCHEZ, C. C.; RODRÍGUEZ PATINO, J. M.; RUBIOLO, A. C.; SANTIAGO, L. G. Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air-water interface saturation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 306-315, 2011.

PESIC, M. B.; BARAC, M. B.; VRVIC, M. M.; RISTIC, N. M.; MACEJ, O. D.; STANOJEVIC, S. P.; KOSTIC, A. Z. The distributions of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 10, p. 831-838, 2011.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 505-515, 2004.

PURWANTI, N.; SMIDDY, M.; JAN VAN DER GOOT, A.; DE VRIES, R.; ALTING, A.; BOOM, R. Modulation of rheological properties by heat-induced aggregation of whey protein solution. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1482-1489, 2011.

RACOVIȚĂ, S.; VASILIU, S.; POPA, M.; LUCA, C. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 9, p. 709-718, 2009.

RALET, M.-C.; CRÉPEAU, M.-J.; BUCHHOLT, H.-C.; THIBAUT, J.-F. Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 191-201, 2003.

RALET, M.-C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J.-F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 117-125, 2001.

RAMÓN-AZCÓN, J.; YASUKAWA, T.; LEE, H. J.; MATSUE, T.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.; MARCO, M.-P.; MIZUTANI, F. Competitive multi-immunosensing of pesticides based on the particle manipulation with negative dielectrophoresis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 8, p. 1928-1933, 2010.

RAYMENT, P.; WRIGHT, P.; HOAD, C.; CIAMPI, E.; HAYDOCK, D.; GOWLAND, P.; BUTLER, M. F. Investigation of alginate beads for gastro-

intestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 816-822, 2009.

RE, M. I. **Microencapsulação: em busca de produtos 'inteligentes'**. Ciência Hoje. v. 27: p. 24-29 p. 2000.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VILELA, S.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 245-257, 2006.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168-8173, 2005.

ROLIN, C. A. D. V., J. Pectin. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**, 1990. p.401-434.

ROSENBERG, M.; LEE, S. J. Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 3, p. 263-281, 2004.

SADEGHI, A. M. M.; DORKOOSH, F. A.; AVADI, M. R.; SAADAT, P.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H. E. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 299-306, 2008.

SAGIS, L. M. C.; DE RUITER, R.; MIRANDA, F. J. R.; DE RUITER, J.; SCHROEN, K.; VAN AELST, A. C.; KIEFT, H.; BOOM, R.; VAN DER LINDEN, E. Polymer Microcapsules with a Fiber-Reinforced Nanocomposite Shell. **Langmuir**, v. 24, n. 5, p. 1608-1612, 2008.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 587-597, 2010.

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Core-Shell Biopolymer Nanoparticles Produced by Electrostatic Deposition of Beet Pectin onto Heat-Denatured β -Lactoglobulin Aggregates. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. N23-N30, 2008.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G.; WU, S. Y. β -Lactoglobulin - A three-dimensional perspective. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, n. 5-6, p. 409-418, 1999.

SCHMITT, C.; BOVAY, C.; VUILLIOMENET, A.-M.; ROUVET, M.; BOVETTO, L. Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 558-567, 2011.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C.-M.; DE KRUIF, C. G.; HARDY, J. Study of β -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 267-280, 2001.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1-2, p. 63-70, 2011.

SCHOUBBEN, A.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; RICCI, M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 363-369, 2010.

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

SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, I. V.; GONÇALVES, A. R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695-704, 2008.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINŠEK, O.; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90-105, 2008.

SONAJE, K.; CHEN, Y.-J.; CHEN, H.-L.; WEY, S.-P.; JUANG, J.-H.; NGUYEN, H.-N.; HSU, C.-W.; LIN, K.-J.; SUNG, H.-W. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 31, n. 12, p. 3384-3394, 2010.

SPERBER, B. L. H. M.; COHEN STUART, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; NORDE, W. Binding of β -Lactoglobulin to Pectins Varying in their Overall and Local Charge Density. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 12, p. 3246-3252, 2009a.

SPERBER, B. L. H. M.; SCHOLS, H. A.; COHEN STUART, M. A.; NORDE, W.; VORAGEN, A. G. J. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and [beta]-lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 765-772, 2009b.

SRIAMORNSAK, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 169, n. 2, p. 213-220, 1998.

SRIAMORNSAK, P.; SUNGTHONGJEEN, S.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Use of pectin as a carrier for intragastric floating drug delivery: Carbonate salt contained beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 436-445, 2007.

SRIVASTAVA, P.; MALVIYA, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - an overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 10-18, 2011.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

TALEI FRANZESI, G.; NI, B.; LING, Y.; KHADEMHOSEINI, A. A Controlled-Release Strategy for the Generation of Cross-Linked Hydrogel Microstructures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 47, p. 15064-15065, 2006.

TEOH, P. L.; MIRHOSEINI, H.; MUSTAFA, S.; HUSSIN, A. S. M.; MANAP, M. Y. A. Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics. **Food Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 77-101, 2011.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

THORNE, J.; VINE, G.; SNOWDEN, M. Microgel applications and commercial considerations. **Colloid & Polymer Science**, v. 289, n. 5, p. 625-646, 2011.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 317-332, 1995.

TORRES, I. C.; JANHØJ, T.; MIKKELSEN, B. Ø.; IPSEN, R. Effect of microparticulated whey protein with varying content of denatured protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 9, p. 645-655, 2011.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 166-178, 2007.

URIAS-ORONA, V.; RASCÓN-CHU, A.; LIZARDI-MENDOZA, J.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; GARDEA, A. A.; RAMÍREZ-WONG, B. A novel pectin material: Extraction, characterization and gelling properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 10, p. 3686-3695, 2010.

VAN DEN BERG, L.; VAN VLIET, T.; VAN DER LINDEN, E.; VAN BOEKEL, M.; VAN DE VELDE, F. Physical Properties Giving the Sensory Perception of Whey Proteins/Polysaccharide Gels. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 198-206, 2008.

VANDAMME, T. F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 219-231, 2002.

WEINBRECK, F.; MINOR, M.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 6, p. 667-679, 2004.

WILLIAMS, P. A. Gelling Agents. In: (Ed.). **Handbook of Industrial Water Soluble Polymers**: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p.73-97. ISBN 9780470988701.

WONG, T.; COLOMBO, G.; SONVICO, F. Pectin Matrix as Oral Drug Delivery Vehicle for Colon Cancer Treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 201-214, 2011.

XIE, H. G.; ZHENG, J. N.; LI, X. X.; LIU, X. D.; ZHU, J.; WANG, F.; XIE, W. Y.; MA, X. J. Effect of Surface Morphology and Charge on the Amount and Conformation of Fibrinogen Adsorbed onto Alginate/Chitosan Microcapsules. **Langmuir**, v. 26, n. 8, p. 5587-5594, 2009.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 406-415, 2008.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.

YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 292-297, 2010.

ZHOU, P.; LIU, X.; LABUZA, T. P. Effects of Moisture-Induced Whey Protein Aggregation on Protein Conformation, the State of Water Molecules, and the Microstructure and Texture of High-Protein-Containing Matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4534-4540, 2008.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 4, p. 1120-1126, 2009.

ANEXO

Além dos testes para avaliar o efeito de diferentes concentrações protéicas em solução na capacidade de adsorção de proteína sobre a partícula de gelificação iônica, mais uma avaliação complementar foi estudada. Para essa avaliação a concentração de proteína foi iniciada com 4% de proteína em solução (WPC - STT e WPC - TT) adicionando-se partículas de pectina como efetuado nos Capítulos 2 e 3. Após a primeira adsorção as partículas recobertas foram removidas e novas partículas de gelificação iônica adicionadas. Esse processo foi feito quatro vezes consecutivas. Os teores de proteína adsorvida e umidade nas partículas e os teores de proteína remanescente nas soluções foram determinados. O procedimento foi feito em três repetições completamente independentes. Todas as determinações de proteína e umidade nas partículas e soluções foram feitas em triplicata em cada etapa. A seguir são descritos os procedimentos utilizados.

Foram produzidas micropartículas de pectina conforme descrito no item 2.2.3 do Capítulo 2. As micropartículas de pectina da primeira emulsão (2% de pectina (m/m) e 2% de manteiga (m/m)) foram imersas em soluções de WPC - STT e WPC - TT a concentração de 4% de proteína em solução, com pH corrigido para 4 e mantidas sob agitação constante, em agitador magnético, por 30 minutos. As micropartículas foram escorridas em peneira de malha de aço de diâmetro de 125 μm e a solução de proteína foi recuperada e as partículas lavadas em água deionizada a pH 4. Uma nova emulsão de pectina foi preparada e novas partículas de pectina foram produzidas e essas foram novamente imersas na solução remanescente de WPC utilizada no primeiro recobrimento, também com pH corrigido para 4. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes, sempre se recuperando a solução de WPC. Durante o processo, utilizou-se uma proporção de 100 g de partículas de pectina obtidas de 100 mL de emulsão de pectina + manteiga para cada 200 mL de solução de proteína. Foi determinado o teor de proteína (base seca - Kjeldahl) nas soluções de WPC - STT e WPC - TT após cada banho, o teor de umidade das

micropartículas e o conteúdo de proteína adsorvida a superfície das partículas de pectina. Os testes foram realizados com soluções de WPC a 4% de proteína, para soluções de WPC - STT e WPC - TT. Os teores de proteína adsorvida e umidade das partículas encontram-se na Tabela 1.

Tabela A 1. Teores de proteína (%) de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática, reaproveitando a SPro.

Nº de imersões	WPC - STT	WPC - TT
1 ^a	46,5 ± 0,7 Aa*	27,9 ± 2,3 Ab
2 ^a	27,7 ± 0,7 Ba	10,1 ± 0,5 Bb
3 ^a	16,4 ± 0,2 Ca	5,1 ± 0,3 Cb
4 ^a	12,4 ± 0,5 Da	2,5 ± 0,1 Cb

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05).

Tabela A 2. Teores de umidade (%) de micropartículas produzidas por gelificação iônica e interação eletrostática, reaproveitando a SPro.

Nº de imersões	WPC - STT	WPC - TT
1 ^a	90,0 ± 0,3 Ca	95,9 ± 0,0 Db
2 ^a	94,0 ± 0,0 Ba	97,9 ± 0,0 Ab
3 ^a	95,3 ± 0,0 Ba	96,7 ± 0,2 Cb
4 ^a	96,5 ± 0,3 Aa	97,1 ± 0,1 Ba

Também foi quantificado o teor de proteína remanescente na solução de WPC após cada imersão. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela A 3. Teor de proteína nas soluções de WPC após as interações eletrostáticas seqüenciais.

Nº de imersões	WPC - TT	WPC - STT
1 ^a	4,0 Da*	4,0 Da
2 ^a	1,67 ± 0,03 Ab	2,56 ± 0,05 Aa
3 ^a	1,19 ± 0,01Bb	1,81 ± 0,03 Ba
4 ^a	0,85 ± 0,08 Cb	1,32 ± 0,03 Ca

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

A quantidade de proteína adsorvida variou em função da solução de WPC estar na forma nativa ou ter sido submetido ao tratamento térmico. Partículas com WPC - STT apresentam uma maior quantidade de proteína adsorvida quando comparado a partículas com WPC - TT, assim como observado no Capítulo 2 Tabela 2.2 e Capítulo 3 Tabela 3.1.

O teor de proteína adsorvida sobre a superfície das partículas variou em função do número de vezes que as partículas de pectina foram imersas na mesma solução de WPC, independente de WPC - STT ou WPC - TT. Como esperado, a quantidade de proteína em solução decresceu com o aumento do número de vezes que a solução foi reutilizada, e a adsorção de proteína sobre a superfície das partículas de pectina também decresceu à medida que as soluções eram reaproveitadas. Após quatro testes, as partículas recobertas com WPC - STT tiveram uma grande redução no teor de proteína adsorvida, variando entre 46,46% para 12,36% enquanto que, para as partículas recobertas com WPC - TT essa redução foi de 27,91% para 2,49%.

Como esperado, o teor de proteína em solução afetou a quantidade de proteína adsorvida. À medida que a solução de proteína era reaproveitada a concentração de proteína era reduzida, levando a uma menor quantidade de proteína disponível no sistema para interagir com as partículas de gelificação iônica. Isso indica que a quantidade de proteína disponível em solução não era suficiente para interagir eletrostaticamente com todos os grupos carboxílicos disponíveis na superfície das partículas de gelificação iônica. Segundo Roach *et al* (2005), a adsorção de proteína sobre superfícies é influenciado pela

concentração do material de recobrimento em solução. A estratégia utilizada nesse experimento pode representar, no futuro, uma alternativa para bioremediação de efluentes das indústrias de produtos lácteos, em especial, das indústrias de queijos.