TALITA EMANUELA MELO E ALMEIDA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR MÉTODOS COMBINADOS PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *ERWINIA* SP. D12

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TALITA EMANUELA MELO E ALMEIDA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR MÉTODOS COMBINADOS PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *ERWINIA* SP. D12

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Gradução em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição na Área de Concentração de Nutrição Experimental e aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Talita Emanuela Melo e Almeida, aprovada pela comissão julgadora em __/__/__ e orientada pelo Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso.

_____

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Almeida, Talita Emanuela Melo e, 1986-

AL64p Produção e caracterização de micropartículas obtidas por métodos combinados para imobilização celular de *Erwinia* sp. D12 / Talita Emanuela Melo e Almeida. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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. Biopolímeros. 5. Células imobilizadas. 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
combined methods for cell immobilization of *Erwinia* sp. D12
Palavras-chave em Inglês:
Microencapsulation
Ionic gelation
Electrostatic interaction
Biopolymers
Immobilized cells
Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos
Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição
Banca examinadora:
Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]
Hélia Harumi Sato
Izabela Dutra Alvim
Data da defesa: 09-04-2013
Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Orientador

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Izabela Dutra Alvim
Membro Titular
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dr. Haroldo Yukio Kawaguti
Membro Suplente
Quantas Biotecnologia S/A

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco
Membro Suplente
Universidade Estadual de Campinas

DEDICO

Aos meus pais Albaneza e Manoel

e aos meus irmãos Patrícia e Victor.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível com a ajuda de muitas pessoas, as quais serei eternamente grata.

Em primeiro lugar a DEUS por me proporcionar viver esta experiência única, pelo crescimento pessoal, proteção e por iluminar o caminho nas horas difíceis;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso pela disponibilidade e dedicação na orientação e pelos ensinamentos compartilhados ao longo destes dois anos;

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Helia Harumi Sato, Profa. Dra. Telma Teixeira Franco, Dra. Izabela Dutra Alvim e Dr. Haroldo Yukio Kawaguti pela disponibilidade de ler o trabalho, pelas sugestões e contribuições;

Aos meus pais Albaneza e Manoel, e aos meus irmãos Patrícia e Victor por sempre acreditarem em mim, pelo apoio nesta jornada, pela vibração a cada conquista e por entenderem a ausência (apenas física);

Aos avós, tios e primos das famílias Almeida e Souza pela alegria, união, amizade e carinho;

Aos integrantes do laboratório Bianca, Fernando, Flávia, Gislaine, Grasiela, Joelma, Julianas e Karla pelos momentos compartilhados, aprendizado e ajuda nas análises. Lembrem-se hoje por mim, amanha por você;

À Yara pela ajuda com as microscopias e por fazer seu trabalho com tanta dedicação e perfeição;

À professora Helia Sato por disponibilizar a utilização do laboratório de bioquímica, pelas valiosas sugestões, dedicação e empenho;

Ao Haroldo e Priscila pela contribuição na execução deste trabalho, paciência e ajuda com as análises;

Ao Ruann pela ajuda com a cuba de fermentação;

Aos professores do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará pelos ensinamentos durante a graduação. Às professoras Evânia Figueiredo e Patrícia Constant por me inserirem no mundo acadêmico;

Aos amigos de longa data Alex, Carol, Delane, Emmanuel, Hélia, Heryca, Iasmim, Ivna, Janaína, João Henrique, Karina, Katherine, Larissa, Lícia, Manu, Mara, Moara, Monique, Patrícia, Rafael, Renata, Sabrina, Taciana, Tatiane e Thiago. Obrigada por fazerem parte da minha vida;

À delegação cearense: Ana Laura, Cinthia, Ruann e Wellington por ensolarar e alegrar até os dias mais frios, pelas conversas, apoio e incentivo. Iremos dominar o mundo!!!. Agradecimento em especial a Bruna pela amizade, companheirismo, acolhida e convivência diária, não tenho palavras para lhe agradecer;

Aos amigos conquistados em Campinas Ângela, Cecília, Guilherme e Karina pela amizade, pelos sorrisos e momentos que vivemos e que ainda vamos viver;

Aos amigos da pós-graduação (DEPAN, DTA e DCA) pela amizade;

Aos funcionários da FEA/UNICAMP que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho;

A FMC BioPolymer pela doação do alginato de sódio;

A CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado;

Muito obrigada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELA xv

ÍNDICE DE FIGURA xvii

RESUMO GERAL xix

SUMMARY xxi

INTRODUÇÃO GERAL 1

CAPÍTULO 1 11

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

1. MICROENCAPSULAÇÃO 13

2. APLICAÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA 15

3. GELIFICAÇÃO IÔNICA 17

4. INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA 19

5. AGENTES ENCAPSULANTES 21

5.1. Alginato 22

5.2. Proteínas do soro do leite 24

6. IMOBILIZAÇÃO CELULAR 26

7. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS 31

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO PROTEICA POR INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEO 45

1. INTRODUÇÃO 47

2. MATERIAL E MÉTODOS 50

2.1. Material 50

2.2. Métodos 50

2.2.1. Caracterização dos biopolímeros 50

2.2.2. Determinação da carga elétrica disponível 51

2.2.3. Produção de coacervados 53

2.2.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho ($D_{0.5}$) 54

2.2.5. Produção das micropartículas de alginato por gelificação iônica e avaliação da adsorção proteica sobre a superfície da partícula por interação eletrostática 55

2.2.6. Caracterização das micropartículas 56

2.2.7. Secagem das micropartículas 57

2.2.8. Morfologia e microestrutura 58

2.2.9. Análise estatística 58

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

3.1. Composição centesimal dos biopolímeros 59

3.2. Determinação da carga elétrica 59

3.2.1 Soluções dos biopolímeros 59

3.2.2. Concentrado proteico do soro do leite em solução e emulsões com diferentes concentrações de manteiga fundida 61

3.3. Produção de coacervados 63

3.3.1. Produção de coacervados entre solução de WPC e solução de alginato de sódio (sem adição de manteiga fundida) 64

3.3.2. Produção de coacervados entre proteínas do WPC em solução e alginato de sódio em emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida 65

3.3.3. Produção de coacervados a partir da interação eletrostática entre partículas de gelificação iônica e solução de WPC 70

3.4. Avaliação da adsorção de proteína em partículas de gelificação iônica 75

3.5. Composição centesimal 78

3.6 Morfologia e microestrutura 80

4. CONCLUSÕES 83

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85

CAPÍTULO 3 - IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *ERWINIA* SP. D12 EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONTEÚDOS LIPÍDICOS RECOBERTAS COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE 93

1. INTRODUÇÃO 95

2. MATERIAL E MÉTODOS 97

2.1. Material 97

2.2. Métodos 97

2.2.1. Micro-organismo e manutenção da cultura 97

2.2.2. Pré-inóculo, fermentação e produção de massa celular 98

2.2.3. Produção de micropartículas de alginato por gelificação iônica revestidas com concentrado proteico do soro do leite por interação eletrostática 98

2.2.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho ($D_{0.5}$) 100

2.2.5. Secagem das micropartículas 100

2.2.6. Morfologia e microestrutura 100

2.2.7. Determinação da atividade da glicosiltransferase 101

2.2.8. Contagem dos micro-organismos em placa 102

2.2.9. Viabilidade dos micro-organismos por microscopia confocal 102

2.2.10. Conversão de sacarose em isomaltulose 103

2.2.11. Análise de carboidratos 103

2.2.12. Análise estatística 104

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 104

3.1. Contagem em placa dos micro-organismos e atividade enzimática 104

3.2. Distribuição de tamanho das micropartículas 105

3.3. Morfologia e microestrutura 107

3.4. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres e imobilizadas com diferentes tratamentos 112

3.5. Viabilidade microbiológica avaliada por microscopia confocal dos micro-organismos imobilizados 118

4. CONCLUSÕES 119

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS 121

CONCLUSÃO GERAL 127

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 - Composição centesimal (%) dos biopolímeros utilizados para elaboração das micropartículas 59

Tabela 2 – Tamanho dos coacervados formados pela mistura em diferentes proporções volumétricas (v/v) de alginato de sódio em emulsão 0,1% (m/m) com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do concentrado 68

Tabela 3 – Tamanho médio dos coacervados formados pelas misturas entre partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e solução de WPC 0,1% (m/m) em pH 3,75 73

Tabela 4 – Teor de proteína (A) e umidade (B) das micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com proteínas do soro do leite por interação eletrostática (%) 75

Tabela 5 – Tamanho médio das micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com solução de concentrado proteico do soro do leite, por interação eletrostática, em diferentes concentrações..... 77

Tabela 6 – Composição centesimal (%) das micropartículas de gelificação iônica, adicionadas de diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro de leite.... 79

Tabela 7 – Tamanho médio das micropartículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC 106

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 – Desenho esquemático da formação do modelo caixa de ovos 23

Figura 2 – Conversão da sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase 27

Figura 3 – Potencial zeta de alginato de sódio em solução 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em função do pH 60

Figura 4 – Potencial zeta de alginato de sódio em emulsão 0,1% (m/m) com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em função do pH 62

Figura 5 – Influência de diferentes concentrações de WPC na aparência visual e carga elétrica das misturas entre alginato de sódio em solução e proteínas do WPC em solução ambos a 0,1% (m/m) em pH 3,75 64

Figura 6 – Influência de diferentes concentrações na aparência visual e carga elétrica das misturas entre alginato de sódio em emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em pH 3,75.. 66

Figura 7 – Aparência visual das misturas contendo micropartículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em pH 3,75 71

Figura 8 – Microscopia óptica das micropartículas úmidas produzidas por gelificação iônica seguidas ou não de recobrimento adicional, por interação eletrostática, com solução proteica 4% (m/m) de WPC 80

Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica seguidas ou de recobrimento adicional com solução 4% (m/m) de WPC 82

Figura 10 – Microscopia óptica das micropartículas úmicas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 seguidas ou não de recobrimento com solução 4% (m/m) de WPC por interação eletrostática 108

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 seguidas ou não de recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC 110

Figura 12 – Ampliação das imagens referentes as Figuras 10 B e 11 C obtidas por microscopia óptica e eletrônica de varredura de micropartículas contendo 2% (m/m) de células íntegras de *Erwinia* ap. D12 111

Figura 13 – Conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por 4 dias 113

Figura 14 – Microscopia óptica das micropartículas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de céllas íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 seguidas ou não de recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC após conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por 4 dias 117

Figura 15 – Microscopia confocal das micropartículas úmidas de gelificação iônica com alto nível de manteiga fundida contendo células íntegras de *Erwinia* sp. D12 118

RESUMO GERAL

Este estudo teve como objetivo a produção de micropartículas por técnicas combinadas de gelificação iônica e interação eletrostática utilizando alginato de sódio, concentrado proteico do soro do leite (WPC) e manteiga fundida para imobilização do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 e avaliação da conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras livres e imobilizadas em processo descontínuo durante quatro dias. No estudo preliminar, os biopolímeros alginato de sódio e WPC foram caracterizados para produção de micropartículas com boas propriedades. A análise da carga elétrica disponível de alginato de sódio em solução ou emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida e das proteínas do WPC em solução indicou que em uma faixa de pH de 3,0 - 4,5 pode ocorrer uma interação de natureza eletrostática entre os biopolímeros. Misturas formadas em diferentes proporções entre emulsão de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida e solução proteica de WPC foram caracterizadas com relação à carga elétrica e tamanho médio dos coacervados insolúveis formados. Maiores tamanhos de coacervados, variando entre 29,12 µm a 33,72 µm, foram obtidos na proporção volumétrica 1:6 (emulsão de alginato e manteiga fundida:WPC) sendo que a adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não modificou o tamanho dos coacervados formados. As micropartículas de alginato contendo manteiga fundida foram preparadas pela técnica de gelificação iônica associado com recobrimento, por interação eletrostática, com solução de WPC em diferentes concentrações e em seguida foi avaliada a adsorção proteica sobre as micropartículas em sistemas diluídos e concentrados. Um aumento da adsorção proteica pôde ser observado com o aumento da concentração de proteína em solução e diminuição da concentração de manteiga adicionada. Utilizando-se solução de WPC na concentração de 4% (m/m) foram obtidas maiores quantidades de proteínas adsorvidas sobre as micropartículas com taxas de adsorção variando de 44,35% para micropartículas com baixo nível de manteiga fundida, de 37,58% para micropartículas contendo nível intermediário de manteiga e de 30,61% para micropartículas contendo alto nível de manteiga. Micropartículas com elevado teor de umidade, conteúdo proteico acima de 30% e tamanho variando entre 130,0 µm a 161,5 µm puderam ser produzidas

pela técnica de gelificação iônica com posterior recobrimento, por interação eletrostática, com solução 4% (m/m) de WPC. A partir do estudo preliminar, as micropartículas com os diferentes tratamentos foram estudadas para imobilização celular do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 com uma contagem inicial de 10^8-10^7 UFC/mL e atividade enzimática de 10,7 U/mL. A incorporação de diferentes concentrações de manteiga fundida modificou a atividade enzimática do micro-organismo encapsulado sendo que uma maior adição de manteiga fundida (2%, m/m) acarretou em uma maior atividade enzimática (17,68 U/mL). O tamanho médio das micropartículas sem recobrimento variou entre 91,54 – 106,52 µm sendo observado um aumento no tamanho, 118,34 – 143,12 µm, após o recobrimento. Células íntegras na forma livre e imobilizadas com os diferentes tratamentos foram avaliadas com relação à conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo durante quatro dias. Maiores taxas de conversão foram obtidas no primeiro dia de análise empregando células livres ou imobilizadas com os diferentes tratamentos. A taxa de conversão diminuiu no decorrer dos dias, em todos os tratamentos, sendo observada uma queda mais acentuada na conversão utilizando células íntegras livres. As maiores médias aritméticas de conversão de sacarose em isomaltulose foram alcançadas por micropartículas de gelificação iônica sem adição de manteiga fundida e micropartículas de gelificação iônica adicionadas de 2% (m/m) de manteiga fundida, 33,77% e 35,12%, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre as mesmas. O recobrimento adicional das micropartículas acarretou em uma diminuição na taxa de conversão devido provavelmente à diminuição no tamanho dos poros ou recobrimento total dos mesmos. Outra hipótese levantada está no pH utilizado para produção das micropartículas (pH 3,75) que encontra-se fora da faixa ótima de crescimento do micro-organismo. Os resultados indicam o potencial de emprego de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em hidrogel de alginato, sem recobrimento adicional das micropartículas, para conversão de sacarose em isomaltulose em processos descontínuos.

Palavras-chave: microencapsulação, biopolímeros, gelificação iônica, interação eletrostática, imobilização celular.

SUMMARY

This study aimed to produce microparticles by combined techniques of electrostatic interaction and ionic gelation using sodium alginate, whey protein concentrated (WPC) and butter for immobilization of micro-organism *Erwinia* sp. D12 and evaluating the conversion of sucrose to isomaltulose by immobilized whole cells and free cells in a batch process during four days. In a preliminary study, biopolymers sodium alginate and WPC were characterized for production of microparticles having good properties. The analysis of electric charge available sodium alginate in solution or emulsion with different concentrations of butter and WPC solution indicated that in a pH range from 3.0 to 4.5 may occur electrostatic interactions between the biopolymers. Mixtures formed in different ratios emulsion of sodium alginate with different concentrations of butter and WPC solution were characterized with respect to size and load presented average coacervates insoluble formed. Larger coacervates sizes, ranging from 29.12 µm to 33.72 µm, were obtained in ratio 1:6 (emulsion alginate and butter: WPC) being that addition of different concentrations of butter not statistically change the size of coacervates formed. Alginate microparticles containing butter were prepared by ionic gelation associated with coating by electrostatic interaction with WPC at different concentrations and then the protein adsorption on the microparticles in dilute and concentrated was assessed. An increase in protein adsorption could be observed even in concentrated systems, with increasing concentration of protein in solution and decreased concentration of butter added. Using WPC solution at a concentration of 4% (w/w) were obtained larger quantities of proteins adsorbed on the microparticles with varying rates of adsorption of 44.35% for microparticles containing low level of butter , of 37.58% for microparticles containing intermediate level of butter and 30.61% for microparticles containing high level of butter. Microparticles content high moisture, protein content above 30% and size ranging from 130.0 µm to 161.5 µm could be produced by ionic gelation technique with subsequent coating by electrostatic interaction with solution 4% (w/w) WPC. From the preliminary study, the microparticles with different treatments were studied for cell immobilization of micro-organism *Erwinia* sp. D12 with an initial count of 10^8-10^7 CFU/mL and enzyme activity of 10.7 U/mL. The incorporation of

different concentrations of butter modify the enzymatic activity of the encapsulated micro-organism being greater than the addition of butter (2%, w/w) resulted in an increased enzymatic activity (17.68 U/mL). The average size of uncoated microparticles ranged from 91.54 µm to 106.52 µm an increase in size was observed, 118.34 - 143.12 µm, after coating. The addition of different concentrations of butter not influence statistically the average size of microparticles. Whole cells in free form and immobilized with different treatments were evaluated for conversion of sucrose to isomaltulose in a batch process during four days. Higher rates of conversion of sucrose to isomaltulose were obtained on the first day of analysis using free cells or immobilized with the different treatments. The conversion rate decreased during the days, in all treatments, with a more pronounced decrease observed in conversion using free cells. The greatest average conversion of sucrose into isomaltulose were reached by microparticle ionic gelling without addition of butter and microparticles ionic gelling added 2% (w/w) of butter, 33.77% and 35.12% respectively, no statistical differences between them. The additional coating of microparticles by electrostatic interaction resulted in a decrease in conversion rate probably due to a reduction in pore size or full coating thereof. Another hypothesis is the pH used for production of microparticles, at pH 3.75, which is outside the optimum range for growth of the micro-organism. The results indicate the potential use of whole cells of *Erwinia* sp. D12 immobilized in alginate hydrogel without additional coating of microparticles for conversion of sucrose to isomaltulose in batch processes.

Keywords: Microencapsulation, biopolymers, ionic gelation, electrostatic interaction, cell immobilization.

INTRODUÇÃO GERAL

A microencapsulação é a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis a sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso no qual o conteúdo pode ser liberado a taxas controladas e em condições específicas (TODD, 1970). Sua aplicação é bastante estudada, sendo empregada nas áreas farmacêutica, alimentícia, agropecuária, dentre outras (SHAHIDI; HAN, 1993; RÉ, 2000; DUBEY et al., 2009).

O aprisionamento em matrizes poliméricas tem como objetivo restringir, proteger ou impedir o contato com substâncias do meio circundante, que normalmente promove a sua degradação, aumentando a vida útil do material encapsulado (SHAHIDI; HAN, 1993; CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007) o qual pode ser liberado por mecanismos como ação da temperatura, pH, solubilidade no meio, ruptura mecânica, biodegradação e difusão (WHORTON, 1995).

Entre as técnicas para produção de microcápsulas encontra-se a gelificação iônica na qual uma solução polimérica interage com uma solução iônica de carga oposta à apresentada pelo polímero formando uma estrutura em gel, apresentando-se como um método simples, barato, rápido, com utilização de polissacarídeos atóxicos e condições brandas de temperatura (VILLAMAR; LANGDON, 1993; THIES, 1995; WILLAERT; BARON, 1996; RÉ, 2000; MUKAI-CORREA et al., 2004). No entanto, as partículas obtidas por esse método apresentam baixa resistência mecânica e elevada porosidade, podendo resultar em elevados índices de difusão do material encapsulado. Alternativamente, tem sido proposto o recobrimento das micropartículas com polieletrólito de carga oposta à apresentada pelo gel, por interação eletrostática (BERGER, 2004; PATIL, et al., 2010).

No setor alimentício, os materiais que podem ser encapsulados incluem ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos (DESAI & PARK, 2005). Biopolímeros naturais como pectina, quitosana e alginato, assim como proteínas como, gelatina e proteínas do soro do leite tem

sido utilizados em processos de microencapsulação. A grande vantagem destas macromoléculas está ligada a biodegradabilidade, não toxicidade, grau alimentício, formação de membranas transparentes com boas propriedades mecânicas que podem apresentar diversas aplicações (BERNABÉ; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL, 2005).

As proteínas possuem carga negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI) e uma carga líquida positiva abaixo desse pH. No ponto isoelétrico, elas não apresentam carga líquida, mas possuem regiões localizadas na superfície que são positiva ou negativamente carregadas, o que apresenta consequências importantes para interação com polissacarídeos (TOLSTOGUZOV, 1997; YE, 2008). A formação e propriedade dos coacervados formados pela interação entre polissacarídeos e proteínas são fortemente influenciados pelo pH, concentração total de polieletrólitos e a razão proteína/polissacarídeo (BENICHOU; ASERIN; GART, 2002; DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; COOPER et al., 2005; HONG; McCLEMENTS, 2007).

Existe um crescente interesse no desenvolvimento de partículas para aplicações industriais. Nas últimas décadas, a produção de edulcorantes substitutos da sacarose tem despertado grande interesse da indústria de alimentos para atender a demanda de consumidores que estão à procura de alimentos que promovam bem-estar associados com a promoção da saúde e redução dos riscos de doenças (KRASTANOV et al., 2006; ORSI; KAWAGUTI; SATO, 2009; KAWAGUITI; SATO, 2011). A isomaltulose (6-O-α-D-glucopiranosil-D-frutofuranose) é um isômero estrutural da sacarose (HUANG; HSU; SU, 1998) sendo considerado um substituto em potencial devido as suas características físico-químicas e sensoriais bastantes similares a sacarose (KAWAGUTI; SATO, 2008) e efeitos benéficos à saúde (KAWAI et al., 1989; MIZUTANI, 1989; MINAMI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1991; KASHIMURA; KIMURA; ITOKAWA, 1996; KRASTANOV; YOSHIDA, 2003).

Industrialmente a conversão da sacarose ocorre utilizando células imobilizadas principalmente em esferas de alginato (CONCORAN, 1983; CHEETHAM; GARRETT; CLARK, 1984; SALTER; KELI, 1991; KRASTANOV; YOHIDA, 2003) e oferecem as vantagens de custos mais baixos devido à possibilidade de reutilização do biocatalisador,

relativa facilidade de separação do produto, adequação para processos com fluxo contínuo e redução dos riscos de contaminação (PARK; CHANG, 2000; KOURKOUTAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 1997).

Uma das estratégias adotadas para melhorar a retenção do material encapsulado tem sido a adição de lipídeos à solução a ser encapsulada (MUKAI-CORREA et al., 2004; CONTESINI et al., 2012).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de micropartículas por técnicas combinadas de gelificação iônica e interação eletrostática utilizando alginato de sódio, concentrado proteico do soro do leite e manteiga fundida para imobilização celular do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 e avaliação da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células livres e imobilizadas em processo descontínuo.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Avaliar a carga elétrica disponivel dos biopolímeros alginato de sódio e concentrado proteico do soro do leite em uma varredura na faixa de pH entre 3 a 7.
- Caracterizar os coacervados formados pela mistura entre alginato de sódio em solução ou emulsão com diferentes conteúdos lipídicos e solução de concentrado proteico do soro do leite com relação à distribuição de tamanho dos coacervados formados e carga elétrica.
- Caracterizar as micropartículas produzidas quanto ao tamanho médio, distribuição de tamanho, adsorção de proteína à micropartícula formada e morfologia, por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar diferentes níveis de conteúdo lipídico na retenção do micro-organismo na partícula formada pela atividade enzimática.
- Medir a taxa de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres e imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 com diferentes concentrações de lipídeos em processo descontínuo por quatro dias.

- Avaliar a adição de uma cobertura adicional de proteína do soro do leite nas micropartículas durante a conversão de sacarose em isomaltulose.
- Medir a viabilidade do micro-organismo imobilizado por microscopia de fluorescência.

Para tanto, o seguinte trabalho foi organizado em três capítulos como descrito a seguir:

- Capítulo 1: Apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os principais conceitos e fundamentos teóricos abordados no presente trabalho;
- Capítulo 2: O capítulo aborda a caracterização do alginato de sódio em solução e emulsão adicionado de diferentes concentrações de manteiga fundida e solução proteica de WPC para produção das micropartículas. A análise da carga elétrica apresentada pelas soluções de alginato de sódio e concentrado proteico do soro do leite foi empregada para obter a melhor faixa de pH para interação entre os biopolímeros utilizados. As análises do tamanho médio ($D_{0.5}$) e da carga elétrica dos coacervados formados foram executadas para determinar uma melhor concentração entre polissacarídeo e proteína na qual houve uma maior quantidade de coacervados insolúveis formados associado a um maior tamanho médio. Posteriormente avaliou-se a adsorção de proteína em micropartículas de gelificação iônica em sistemas diluídos e concentrados. Microscopias óptica e eletrônica de varredura foram utilizadas para avaliar a morfologia interna e externa das micropartículas produzidas.
- Capítulo 3: Neste capítulo foram produzidas micropartículas de gelificação iônica recobertas ou não com solução 4% (m/m) de WPC com diferentes concentrações de manteiga fundida para imobilização de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12. Células livres e imobilizadas foram avaliadas com relação à atividade enzimática, viabilidade por contagem em placa e taxa de conversão de sacarose em isomaltulose por quatro dias em processo descontínuo. Microscopia confocal foi

utilizada para avaliar a viabilidade do micro-organismo encapsulado e microscopias óptica e eletrônica de varredura para avaliar a morfologia interna e externa das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENICHOU, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v.23, p.93-123, 2002.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNYB, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.

BERNABÉ, P.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. **Polymer Bulletin**, v.55, p.367–375, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.18, p.184–190, 2007.

CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Palatinose production using immobilized cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v.27, p.471-481, 1984.

CONTESINI, F.J.; IBARGUREN, C.; GROSSO, C.R.F.; CARVALHO, P.O.; SATO, H.H. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. **Journal of Biotechnology**, v.158, n.3, p.137-143, 2012.

CORCORAN, J.A. The production and use of immobilized living microbial cells. In**:** **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology** (Wiseman, A., ed.), vol.10, p.12 - 50, Wiley, New York, 1983.

COOPER, C.L.; DUBIN, P.L.; KAYITMAZER, A.B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte–protein complexes. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v.10, p.52–78, 2005.

DE KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.9, p.340–349, 2004.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v.23, n.7, p.1361-1394, 2005.

DUBEY, R.; SHAMI, T.C.; BHASKER RAO, K.U. Microencapsulation technology and applications. **Defence Science Journal**, v.59, n.1, p.82-95, 2009.

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

HONG, Y.H.; McCLEMENTS, D.J. Formation of hydrogel particles by thermal treatment of β-lactoglobulin-chitosan complexes. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.5653-5660, 2007.

HUANG, J.H.; HSU, L.H.; SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1988.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Production of isomaltulose obtained by *Erwinia* sp. cells submitted to diferent treatments and immobilized in calcium alginate. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.31, n.1, p.257-263, 2011.

KAWAI, K.; YOSHIKAWA, H.; MURAYAMA, Y.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Usefulness of isomaltulose as a caloric sweetener for diabetic patients. **Hormone and Metabolic Research**, v.21, p.338–340, 1989.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization techniques and supportmaterials—suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol.**, v.21, p.377–397, 2004.

KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.593-598, 2003.

KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D.; YANAKIEVA, I.; KRATCHANOVA, M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1306–1312, 2006.

MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T., NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.5, p.189–194, 1990.

MIZUTANI, T. Manufacture and application of isomaltulose oligosaccharides. **Food Chemicals**, v.5, p.67–72, 1989.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A.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.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.16, n.6, p.349-353, 1997.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Trehalulose does not induce caries in rats infected with mutans streptococci. **Caries Res.**, v.25, p.227–282, 1991.

ORSI, D.C.; KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Glucosiltransferase production by *Klebsiella sp.* K18 and conversion of sucrose to palatinose using immobilized cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 66-72, 2009.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnol. Adv.**, v.18, p.303–319, 2000.

PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.D.; 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.

RÉ, M.I. Microencapsulação: em busca de produtos "inteligentes". **Ciência Hoje**, v.27, n.162, p.24-29, 2000.

SALTER, G.J.; KELI, D.B. New materials and technology for cell immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p.385-389, 1991.

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

THIES, C. **How to make microcapsules**. Lecture and Laboratory Manual. St. Louis. Missouri. 1995.

TODD, R. D. Microencapsulation and flavour industry. **Flavour Industry**, v.1, n.11, p. 768-771, 1970.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. **Food Science and Technology**, v.80, p.171-198, 1997.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.14, p.377-382, 2008.

VILLAMAR, D.F.; LANGDON, C.J. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. **Marine Biology**, v.115, n.4, p.635-642, 1993.

WHORTON, C. **Factors influencing volatile release from encapsulation matrices**. ACS Symposium Series no.590. Washington p.134-142, 1995.

WILLAERT, R.G.; BARON, G.V. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, v.12, n.1-2, p.5-205, 1996.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MICROENCAPSULAÇÃO

O conceito de microencapsulação tem origem na idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que protege seu conteúdo do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e saída de substâncias na célula. De maneira similar, as microcápsulas possuem uma parede que isola o material ativo e controla a liberação sob estímulo específico (JIZOMOTO et al., 1993).

Define-se microencapsulação como a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis a sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso no qual o conteúdo pode ser liberado a taxas controladas e em condições específicas (TODD, 1970). A microencapsulação também pode ser definida, de acordo com Shahidi e Han (1993), como o processo no qual um material de parede envolve um material ativo, com o objetivo de protegê-lo das condições adversas do meio circundante, estabilizando e aumentando a vida útil do material encapsulado.

O material encapsulado pode ser liberado por diversos mecanismos como ruptura mecânica, ação da temperatura, pH, solubilidade no meio, biodegradação e difusão (WHORTON, 1995).

Os objetivos gerais da microencapsulação incluem: facilitar a manipulação ao converter um líquido à forma sólida; diminuir a reatividade do material encapsulado em relação ao ambiente externo; promover a liberação controlada; mascarar sabor e/ou gosto indesejável; prolongar a vida de prateleira; aumentar a estabilidade; permitir a separação de materiais reativos; proteção contra luz, água, calor e outros (JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993; DUBEY; SHAMI; BHASKER RAO, 2009; BURGAIN et al., 2011).

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em nano (< 0,2 µm), micro (0,2-500 µm) e macrocápsulas (> 500 µm) e conforme a distribuição do material ativo. Quando a estrutura formada é do tipo reservatório, observa-se uma cápsula mononucleada com o material encapsulado envolvido por uma parede, o que caracteriza as "verdadeiras" microcápsulas. Quando o conteúdo se distribui em uma estrutura tipo esponja ou matriz, observa-se uma partícula multinucleada que recebe o nome de micropartículas (THIES, 1995; RÉ, 1998; DUBEY; SHAMI; BHASKER RAO, 2009).

A principal diferença entre microcápsulas e micropartículas está no fato de que, nas micropartículas, uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície, o que é evitado pela verdadeira encapsulação. No entanto, o termo encapsulação tem sido usado em seu sentido mais amplo, englobando a formação de microcápsulas e micropartículas (AZEREDO, 2005).

A formação das cápsulas, de um modo geral, segue três etapas básicas: preparação de uma suspensão ou solução do material de parede e recheio seguido de homogeneização; deposição do material de parede ao redor do recheio e fixação ou solidificação do material de parede, que pode ser realizada por aquecimento, ligações cruzadas ou remoção do solvente (BAKAN, 1973).

Os métodos utilizados para produção das cápsulas podem ser divididos em três grupos (JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993; RÉ, 1998):

a) **Métodos físicos**: *spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, extrusão, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, leito fluidizado e co-cristalização.

b) **Métodos químicos**: polimerização interfacial e inclusão molecular.

c) **Métodos físico-químicos**: Coacervação simples ou complexa, envolvimento lipossômico, gelificação iônica e evaporação de solvente.

Vários fatores devem ser levados em consideração para avaliar o melhor método de encapsulação. A seleção do método depende do custo, fins de aplicação, tamanho da

partícula desejada, mecanismos de liberação, propriedades físico-químicas do agente encapsulante e material ativo (SHAHIDI; HAN, 1993).

Os métodos utilizados para caracterização e posterior avaliação do processo de encapsulação incluem: avaliação da estrutura interna e externa por técnicas de microscopia; tamanho e distribuição de tamanho; composição da parede, recheio e comportamento de liberação por cromatografia; determinação das propriedades físicas de estabilidade, dentre outras (THIES, 1995).

2. APLICAÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO NA INDÚSTRIA

A produção comercial de microcápsulas data da década de 1950 quando Green e Schleicher produziram microcápsulas para a fabricação de papel de cópia sem carbono que consistia no recobrimento de papel comum por uma fina camada de microcápsulas contendo tinta incolor. As microcápsulas, quando rompidas por pressão, liberavam a tinta que produzia a cópia nos pontos pressionados. Essa aplicação foi bem sucedida e levou ao desenvolvimento de microcápsulas para diversas aplicações, sendo utilizada com sucesso na indústria farmacêutica, alimentícia, agropecuária, dentre outras (SHAHIDI; HAN, 1993; RÉ, 2000; DUBEY; SHAMI; BHASKER RAO, 2009).

Para aplicação na indústria alimentícia, os materiais que podem ser encapsulados incluem ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos (DESAI; PARK, 2005). Segundo Jackson e Lee (1991), fazer um aromatizante líquido comportar-se como um pó é a maior aplicação da microencapsulação nesse setor.

Na indústria de alimentos, vários desafios precisam ser contornados para utilização das tecnologias de encapsulamento no processamento de alimentos, tais como a manutenção da estabilidade de ingredientes encapsulados durante o processamento, embalagem e armazenamento (DOHERTY et al., 2011).

O aprisionamento em matrizes poliméricas restringem ou impedem o contato com substâncias do meio circundante, que normalmente promovem a sua degradação (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007) assim, as micropartículas podem ser utilizadas para proteger agentes bioativos da degradação enzimática no estômago humano (McCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009; SINGH; YEAQ, 2009). Partículas biopoliméricas podem simular algumas características físico-químicas de gotículas lipídicas (tais como a dispersão de luz, reologia e sensação na boca) e são, portanto, úteis como substitutos de gordura (TAMIME et al., 1995; LIU; XU; GUO, 2007). Alguns polissacarídeos, como as fibras alimentares, apresentam potenciais benefícios à saúde, como redução do colesterol, prevenção de câncer, ou a melhoria da saúde do cólon. Por conseguinte, o consumo de partículas ricas nesses polissacarídeos podem apresentar benefícios à saúde (DIKEMAN; FAHEY, 2006; GRABITSKE; SLAVIN, 2009). Existe, portanto, um interesse crescente no desenvolvimento de vários tipos de partículas para aplicações industriais.

O *Global Industry Analysts* lançou um relatório internacional sobre a expansão do mercado de encapsulamento em alimentos no qual relatou-se uma previsão de investimento de aproximadamente 39 milhões dólares até o ano de 2015. Os fatores que estimulam o crescimento desse mercado incluem a mudança de hábitos alimentares, aumento da popularidade de sabores exóticos, crescente preocupação com a preservação dos alimentos e procura por inovações tecnológicas (DOHERTY et al., 2011).

Na área de pesticidas, as formulações comumente utilizadas apresentam-se na forma de pó, grânulos, concentrados emulsificados e soluções. Dependendo do método de aplicação e das condições climáticas, mais de 90% do agrotóxico aplicado não atinge o alvo específico para produzir a resposta biológica esperada. Esse excesso de agrotóxico tem potencial para atingir diferentes compartimentos ambientais, tais como solo, águas residuais e subterrâneas (BAJPAI; GIRI, 2002 a).

A encapsulação de pesticidas torna a aplicação do produto mais eficaz, minimizando a perda do agrotóxico por degradação, evaporação ou dissolução e escoamento para fontes de água, prevenindo a contaminação ambiental (KUMBAR;

AMINABHAVI, 2002; BAJPAI; GIRI, 2002 b). Além disso, ocorre também um aumento da eficiência do agente ativo por unidade de área de aplicação e um período de proteção prolongado, quando se compara com a mesma quantidade de pesticida aplicada de forma convencional. Em questão de segurança, os pesticidas encapsulados reduzem o perigo de intoxicação, pois minimizam o tempo de exposição do usuário durante o seu manuseio (SCHER, 1999; RÉ, 2000; TSUJI, 2001).

O processo de encapsulação também possui larga aplicação no desenvolvimento de novas fórmulas farmacêuticas devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (MANDAL et al., 2001; VANDENBERG et al., 2001; YOUAN et al., 2001).

Nesse setor houve uma contribuição importante, pois a encapsulação permitiu o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada, ou seja, aquelas com a capacidade de liberar os agentes ativos apenas nos órgãos onde devem agir ou onde serão absorvidos. Em tais produtos, o princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico e dissolução, dentre outros (RÉ, 2000; FREIBERG; ZHU, 2004).

Os sistemas de liberação controlada apresentam vantagens, quando comparados ao sistema de liberação convencional, sendo as principais: redução dos efeitos adversos devido à manutenção da concentração plasmática do fármaco por longo período, redução da dose ou freqüência de administração e maior adesão ao tratamento por parte do paciente (CAMILO, 2007).

3. GELIFICAÇÃO IÔNICA

A produção de micropartículas através da técnica de gelificação iônica envolve o conceito de gelificação como técnica de encapsulamento. Por esse método, uma solução polimérica negativamente ou positivamente carregada forma ligações cruzadas (*cross-*

linking) com soluções iônicas de carga oposta à apresentada pelo polímero. Dessa maneira, polieletrólitos de cargas opostas, interagem formando uma estrutura em gel tridimensional (THIES, 1995; RÉ, 2000).

Existem dois métodos principais pelos quais a gelificação iônica pode ocorrer: gelificação externa e interna, sendo a primeira o método mais fácil e utilizado. A gelificação externa envolve a introdução de uma solução polimérica negativamente carregada em uma solução iônica carregada positivamente, com a gelificação ocorrendo através da difusão de cátions para dentro da solução de hidrocolóide. No entanto, pode causar a formação de partículas não homogêneas devido à formação de gel primeiro na superfície das partículas, formando assim superfícies sólidas e núcleos não gelificados (CHAN; LEE; HENG, 2006).

As partículas de gel são formadas em duas etapas envolvendo a formação da gota (por extrusão ou atomização) e endurecimento da mesma. Logo após a formação, as partículas permanecem sob agitação por um período denominado tempo de maturação, pois as ligações cruzadas desenvolvem-se lenta e progressivamente da superfície para o interior da partícula gelificada (MESTDAGH; AXELOS, 1998; RÉ, 2000; ROCHA, 2001).

A gelificação iônica é um método bastante utilizado para o encapsulamento de compostos biologicamente ativos, no qual os polissacarídeos utilizados são atóxicos. É uma técnica simples, barata, rápida e utiliza condições brandas de temperatura. As desvantagens desta técnica são a pobre resistência mecânica e a limitada longevidade da estrutura do gel (VILLAMAR; LANGDON, 1993; WILLAERT; BARON, 1996; MUKAI-CORREA et al., 2004).

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética da formação do gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro ou para fora da matriz polimérica (MESTDAGH; AXELOS, 1998).

4. INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA

Reticulação é um processo onde as cadeias poliméricas são unidas por ligações covalentes, através de uma reação química ou por interações físicas entre o polímero e o agente de reticulação, ou entre dois polímeros diferentes. Devido ao potencial tóxico de certos agentes de reticulação, como o glutaraldeído, o desenvolvimento de alternativas para produção de hidrogéis foi necessário (BERGER et al., 2004 a; NETO et al., 2005).

Algumas propriedades do hidrogel formado podem ser melhoradas através de interações iônicas pela adição de um polieletrólito de carga oposta à apresentada pelo gel, formando os chamados complexos de polieletrólitos, o qual se apresenta como uma alternativa à formação de hidrogéis reticulados covalentemente (BERGER et al., 2004 b; PATIL et al., 2010). Esse revestimento pode fornecer uma maior estabilidade as condições adversas, tais como tratamento térmico, força iônica, pH, congelamento e desidratação (CHO; McCLEMENTS, 2009).

Polissacarídeos como pectina, quitosana e celulose, assim como proteínas, como gelatina e proteínas do soro do leite tem sido utilizadas para esse propósito. A grande vantagem destas macromoléculas está ligada a biodegradabilidade, não toxicidade, formação de membranas transparentes com boas propriedades mecânicas que podem apresentar diversas aplicações como encapsulação de materiais líquidos ou sólidos, sistema de liberação de drogas e tratamento de águas residuais (BERNABÉ; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL, 2005).

A formação de complexos eletrostáticos entre proteínas e polissacarídeos aniônicos ocorre em uma faixa de pH entre o valor do pKa dos grupos aniônicos do polissacarídeo e o ponto isoelétrico da proteína (TOLSTOGUZOV, 1997). A interação entre proteínas e polissacarídeos pode ser dividida em dois grupos:

a) Repulsão: também denominado de incompatibilidade termodinâmica. Ocorre quando a proteína possui uma quantidade elevada de carga negativa (pH >

pI), promovendo uma força de repulsão entre proteínas e polissacarídeos aniônicos (GAO; DUBIN; MUHOBERAC, 1997).

b) Atração: quando a solução é ajustada em torno do ponto isoelétrico da proteína (pH ~ pI), segmentos catiônicos localizados na proteína são capazes de interagir com os grupos aniônicos do polissacarídeo levando a uma complexação eletrostática fraca com a formação de complexos solúveis (GAO; DUBIN; MUHOBERAC, 1997). Uma redução mais acentuada do pH induz a uma maior interação entre os biopolímeros, resultando em separação de fases do complexo proteína-polissacarídeo, que é denominado coacervado (DE KRUIF; TUINIER, 2001).

A preparação de complexos de polieletrólitos ocorre em meio aquoso, o que representa uma vantagem sobre os géis reticulados covalentemente, e não exige o uso de catalisadores ou iniciadores (BERGER et al., 2004 a). Essas interações são influenciadas por fatores como pH, força iônica e concentração entre proteína e polissacarídeo (YE, 2008).

A adsorção de substâncias carregadas sobre hidrogéis é importante em numa ampla variedade de processos: interação de gotículas lipídicas com a língua durante a mastigação (DE JONGH; JANSSEN; WEENEN, 2006), liberação de ingredientes encapsulados no sistema gastrointestinal (MARCIANI et al., 2006), deposição de placas de gordura nas artérias (SOMA; PAOLETTI, 1996) e formação de revestimentos comestíveis sobre frutas e vegetais (McHUGH; KROCHTA, 1994).

O revestimento de micropartículas de gelificação iônica pela técnica de interação eletrostática foi relatado por alguns autores.

Rodrigues (2012) desenvolveu micropartículas de pectina por gelificação iônica utilizando concentrado proteico do soro do leite de duas formas: constituinte do material de recheio e incluída, por meio da interação eletrostática, na superfície da micropartícula. As micropartículas produzidas por gelificação iônica seguidas de recobrimento com

concentrado proteico do soro do leite por interação eletrostática, apresentaram maiores teores de umidade (86,83% - 93,63%) e proteína (50,41% - 60,65%), quando comparado com a utilização de concentrado proteico do soro do leite como constituinte do material de recheio.

Souza (2012) avaliou a resistência ao ambiente gástrico e degradabilidade em ambiente intestinal de micropartículas de pectina de baixo teor de esterificação amidada recobertas com concentrado proteico do soro do leite na forma nativa e submetida a tratamento térmico. As partículas foram submetidas a uma simulação das condições gastrointestinais *in vitro* permanecendo integras em ambiente gástrico e desintegrando-se em meio intestinal.

Ribeiro (2011) simulou a passagem pelo trato gastrointestinal de *Lactobacillus acidophilus* na forma livre e microencapsulada em iogurte. Após 35 dias de armazenamento refrigerado, a simulação da passagem do produto pelo trato gastrointestinal indicou uma maior sobrevivência do probiótico microencapsulado (68,49%) em relação ao micro-organismo na forma livre (45,68%). A microencapsulação do *L. acidophilus* por técnicas combinadas de gelificação iônica e interação eletrostática utilizando-se pectina e proteína do soro de leite, conferiu uma proteção adicional ao micro-organismo durante o armazenamento e simulação gastrointestinal.

5. AGENTES ENCAPSULANTES

Os agentes encapsulantes são basicamente materiais formadores de filme, que podem ser escolhidos de uma ampla variedade de polímeros naturais e sintéticos como: gomas (goma arábica, ágar, alginato e carragena), carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose), celuloses (carboximetilcelulose, acetilcelulose e nitrocelulose), lipídeos (parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras), materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos) e proteínas (caseína, gelatina, albumina e proteínas do glúten) (JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993).

A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores como formação e estabilização de emulsões, fácil manipulação, não reatividade com o material a ser encapsulado, processo utilizado para a formação das micropartículas e aplicação dessas. Essencialmente, o material de parede não deve reagir com o recheio e nem ser solúvel nesse, sendo que os dois geralmente possuem polaridades opostas (BAKAN, 1973; FANGER, 1974; JAKSON; LEE, 1991; CARDOSO, 2000).

5.1. Alginato

O alginato é um polissacarídeo hidrossolúvel extraído de espécies de algas marrons nas quais age como componente estrutural da parede celular e dos espaços intracelulares, promovendo rigidez e ao mesmo tempo flexibilidade à parede celular. Possui uma estrutura linear de resíduos de ácido β-D-manurônico (M) e ácido α-L-gulurônico (G) unidos através de ligações glicosídicas α 1-4. Os resíduos estão dispostos em blocos homopoliméricos (MM e GG) intercalados por blocos heteropoliméricos (MG) ao longo da cadeia. A distribuição dos blocos M e G na estrutura, bem como a razão M/G, influenciam fortemente nas propriedades do alginato em solução (GOMBOTZ; WEE, 1998; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006).

A propriedade mais importante do alginato é a sua capacidade de formar géis pela reação com cátions divalentes, como íons cálcio. Micropartículas de alginato podem ser preparadas por extrusão de uma solução de alginato de sódio em uma solução contendo cátions divalentes. A gelificação é alcançada principalmente pela troca de íons sódio dos ácidos gulurônicos com o cátion divalente, onde o cátion liga-se ao bloco GG de duas cadeias de alginato, formando uma estrutura característica (GOMBOTZ; WEE, 1998; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999).

Um modelo denominado caixa de ovos foi sugerido para a formação desta rede de gel. Nesse modelo, duas cadeias helicoidais adjacentes são unidas com íons cálcio

localizadas entre as cadeias conforme demonstrado na Figura 1 (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

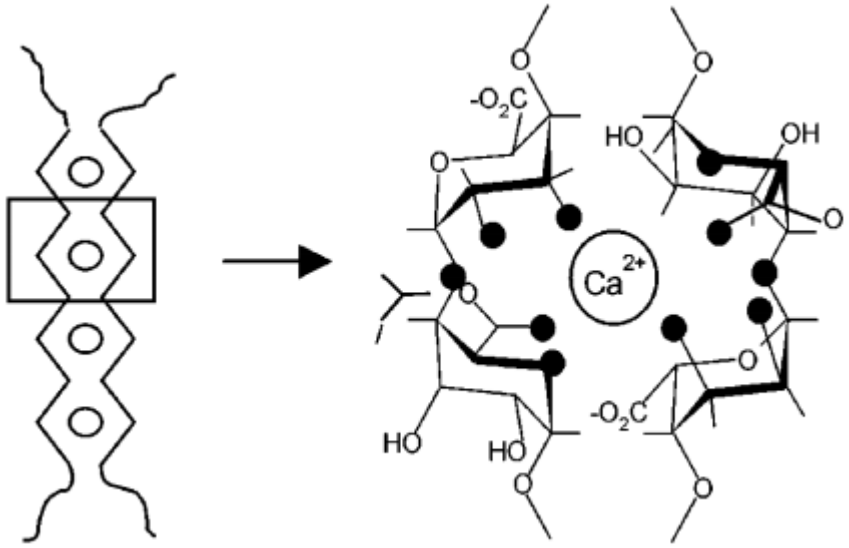


Figura 1 – Desenho esquemático para formação do modelo caixa de ovos.

Outras propriedades que permitem a utilização do alginato como matriz para o aprisionamento e/ou liberação de uma variedade de materiais incluem: ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz, processo de encapsulamento livre de solventes orgânicos, dissolução e biodegradação do sistema sob condições fisiológicas normais. O alginato também tem sido utilizado com sucesso na indústria de alimentos e bebidas como agente espessante, agente gelificante e estabilizador de soluções coloidais (GOMBOTZ; WEE, 1998).

Entretanto, algumas desvantagens são atribuídas ao uso do alginato. Processos utilizando alginato como material de parede são de difíceis reproduções em escala industrial e as partículas obtidas apresentam elevada porosidade (BURGAIN et al., 2011). Contudo, esses efeitos podem ser contornados misturando alginato com outro composto polimérico, revestindo as cápsulas com outro composto ou através de modificações estruturais no alginato através de diferentes aditivos (GOUIN, 2004).

Géis de alginato mostram uma alta porosidade resultando em elevados índices de difusão e, por esta razão, têm sido proposto à formação de complexos estáveis de alginato com policátions. A principal função do policátion é formar uma membrana complexa forte, que deve estabilizar e fortalecer a rede do gel iônico e reduzir/controlar a permeabilidade. Os géis de alginato são assim protegidos contra agentes quelantes de cálcio e a porosidade das micropartículas é reduzida, resultando em liberação mais controlada do recheio (THU et al., 1996 a e b).

O alginato apresenta-se como um polieletrólito carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu pKa (pH ~3,38 – 3,65) (SIMSEK-EGE et al., 2003).

5.2. Proteínas do soro do leite

As proteínas do leite são amplamente disponíveis, baratas e reconhecidas como seguras para o consumo humano ("GRAS"- *General Recognised As Safe*) sendo considerada uma matéria-prima com elevado valor nutritivo e boas propriedades sensoriais (LIVNEY, 2010).

A estrutura anfifílica apresentada por essas proteínas conferem a habilidade de ligar-se a interface óleo-água e estabilizar emulsões. Devido a essa característica, as proteínas do leite são utilizadas como emulsificantes em uma grande variedade de produtos incluindo bebidas, sobremesas, sorvetes, suplementos esportivos, fórmulas infantis e molhos para saladas (McCLEMENTS, 2004; LIVNEY, 2010).

As proteínas do leite podem ser divididas em duas frações principais: caseínas (~ 80% em peso) e proteínas do soro (~ 20% em peso). A separação dessas frações pode ocorrer por precipitação da caseína, por ajuste do pH próximo ao ponto isoelétrico (pI ~ 4,6), ou por adição da enzima renina (SWAISGOOD, 1996; McCLEMENTS, 2004; LIVNEY, 2010) .

O soro de leite, subproduto obtido a partir da fabricação de queijos, apresenta-se como uma mistura de diferentes proteínas como a β-lactoglobulina (~ 55%), α-lactalbumina

(~ 24%), albumina de soro (~ 5%), e as imunoglobulinas (~ 15%) (SWAISGOOD, 1996) estando disponível comercialmente na forma de concentrados (contendo de 25 - 80% de proteína) ou isolados proteicos (contendo acima de 90% de proteína) (MORR; HA, 1993).

Devido à sua elevada concentração, a β-lactoglobulina confere propriedades físico-químicas únicas ao soro do leite. Essa proteína possui um arranjo globular, com grande quantidade de estruturas secundária, terciária e quaternária, e pontes dissulfeto intramoleculares que estabilizam sua estrutura (YE, 2000; McCLEMENTS, 2004).

Complexos eletrostáticos entre proteína e polissacarídeo podem ser formados a partir de um polissacarídeo aniônico e grupos catiônicos proteicos ou vice-versa (JONES; McCLEMENTS, 2011). As proteínas possuem uma carga líquida negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI) e uma carga positiva abaixo desse pH. No ponto isoelétrico, ocorre um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas, resultando em uma carga líquida nula (COOPER et al., 2005) .

Interações com polissacarídeos podem influenciar as propriedades funcionais das proteínas como a solubilidade, estabilidade, capacidade de formação gel e propriedades emulsificantes. A formação de complexo eletrostático de biopolímeros com cargas opostas tem sido extensivamente estudada para fins de encapsulação e sistemas carreadores (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007; McCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009; SINGH, 2009; JONES; McCLEMENTS, 2011).

As proteínas do soro do leite possuem propriedades estruturais e funcionais que os tornam adequados como veículos, ou como componentes de veículos para liberação de compostos encapsulados por serem biodegradáveis e não necessitarem de agentes de reticulação durante sua preparação (GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007).

A encapsulação de micro-organismos utilizando as proteínas do soro do leite tem sido bastante explorada devido à compatibilidade com a maioria das matrizes alimentícias e a capacidade de formar partículas por diferentes técnicas. Além de serem utilizadas como material de parede podem ser utilizadas como material de recobrimento, promovendo a

deposição de uma camada adicional sobre a superfície da partícula formada, aumentando a proteção do material encapsulado (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012).

6. IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A pesquisa e produção de adoçantes substitutos da sacarose (α-D-glicopiranosil-1,2-D-frutofuranose) têm ganhado importância na indústria de alimentos devido ao elevado valor calórico e propriedades cariogênicas apresentadas por esse açúcar. A isomaltulose (α-Dglicopiranosil-1,6-D-frutofuranose), também conhecida como Palatinose®, tem sido apontada como um promissor substituto por apresentar propriedades físico-químicas e sensoriais bastantes similares à sacarose (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Além disto, esse dissacarídeo redutor apresenta baixo potencial cariogênico. No organismo, a isomaltulose é digerida e absorvida mais lentamente, o que conduz a um baixo índice glicêmico, além de promover seletivamente o crescimento de bifidobactérias no intestino. Estudos realizados com ratos não demonstraram efeitos teratogênicos, mutagênicos ou qualquer outro tipo de toxicidade, sendo a utilização do isômero recomendada em alimentos, principalmente destinados a diabéticos e esportistas (TAKAZOE,1989; KASHIMURA; KIMURA; ITOKAWA, 1996; LINA; PROOIJE; WAALKENS-BERENDSEN, 1997; HUANG; HSU; SU, 1998; KRASTANOV; YOSHIDA, 2003, CHO et al., 2007). Kashimura, Nagai e Ebashi (2003), propuseram que a isomaltulose tem efeitos sobre a função cerebral, melhorando a memória e produzindo um efeito de relaxamento.

A isomaltulose é um isômero estrutural da sacarose encontrada naturalmente, mas em baixas concentrações, no caldo de cana e mel (STODOLA; SHARP; KOEPSELL, 1956). A obtenção do isômero ocorre pela conversão da sacarose catalisada pela enzima glicosiltransferase (Figura 2) presente em alguns micro-organismos (COUGHLAN; KIERSTAN, 1988). A glicosiltransferase microbiana catalisa o rearranjo da ligação α-1,2

entre a glicose e a frutose na sacarose para uma ligação α-1,6, gerando a isomaltulose (CHO et al., 2007).

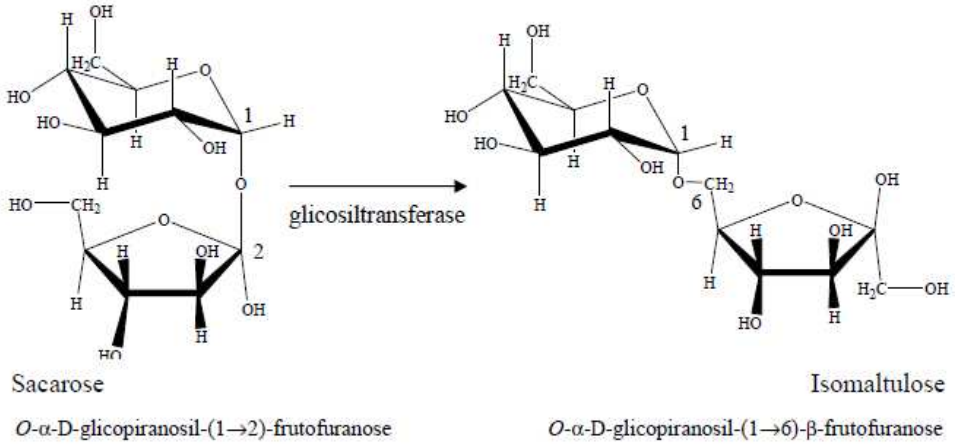


Figura 2- Conversão da sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase.

Os micro-organismos têm sido utilizados como biocatalisadores para obtenção de várias substâncias, uma vez que possuem grande poder de multiplicação e adaptação às variadas situações nutricionais, o que permite uma ampla flexibilidade em sua utilização (MORAES et al., 2005). No entanto, quando enzimas microbianas são isoladas de seu ambiente natural, tornam-se geralmente instáveis e facilmente desnaturadas. Esses problemas podem ser evitados, ou pelo menos minimizados, pela imobilização celular (COUGHLAN; KIERSTA, 1988).

A microencapsulação ou imobilização celular destaca-se como uma técnica promissora visando aumentar a resistência de micro-organismos às condições adversas do meio como pH, temperatura, solventes orgânicos, entre outros (PARK; CHANG, 2000; PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009).

Devido ao elevado custo, a produção industrial de isomaltulose torna-se economicamente viável quando as células e/ou enzimas são imobilizadas (OLIVA-NETO; MENÃO, 2009). O método mais utilizado para imobilização celular é o aprisionamento em polímeros naturais formadores de gel. Biopolímeros, especialmente o alginato, é o suporte

preferido pela facilidade e condições brandas de formação do gel, além de ser atóxico. Embora seja possível utilizar uma variedade de íons divalentes, os íons cálcio são geralmente utilizados (CORCORAN, 1983; COUGHLAN; KIERSTAN, 1988; SALTER; KELI,1991).

Em termos industriais, a microencapsulação celular, utilizada como biocatalisador em processos fermentativos, apresenta diversas vantagens em relação à utilização de células em sua forma livre, como a possibilidade de reutilização, maior facilidade de separação do produto, elevados rendimentos, custos operacionais reduzidos e possibilidade de operação em processos contínuos (CORCORAN, 1983; OLIVEIRA et al., 1997).

A enzima glicosiltransferase pode ser encontrada em alguns micro-organismos como *Protaminobacter rubrum* (SHARPE; STODOLA; KOEPSELL, 1960; KAKINUMA; YUASA; HASHIMOTO, 1998; OLIVA-NETO; MENÃO, 2009), *Klebsiella* sp (PARK; UEKANE; SATO, 1996; HUANG; HSU; SU, 1998; LI et al., 2003; ORSI; KAWAGUTI; SATO, 2009), *Serratia plymuthica* (VERONESE; PERLOT, 1999; KRASTANOV; YOSHIDA, 2003), *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM; GARRETT; CLARK, 1984; MUNDRA; DESAI; LELE, 2007) e *Erwinia* sp. D12 cuja imobilização de células íntegras, rompidas ou imobilização da enzima, tem sido reportada por alguns autores (MORAES, 2005; KAWAGUTI; SATO, 2007 a e b; KAWAGUTI et al., 2010; CONTESINI et al., 2012).

Moraes et al. (2005), estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio. Os autores obtiveram uma conversão em torno de 50% em isomaltulose, com soluções de sacarose variando entre 20-30% (m/v) a 35°C. No estudo do efeito do tempo e da temperatura na fermentação, obteve-se uma atividade enzimática de 15,6 unidades de atividade/mL do meio de cultura após 8 horas de fermentação em fermentador de 3 litros a 30 °C.

Kawaguti e Sato (2007 a), avaliaram a conversão de sacarose em palatinose por células íntegras imobilizadas, imobilização de células rompidas por ultrassom (vibração de 180 W por 40 segundos) e imobilização do extrato enzimático em processos descontínuos. Através dos resultados obtidos, verificou-se que as maiores taxas de conversão foram

obtidas na primeira batelada (24 horas), em todos os processos de imobilização: 64,6% para células íntegras, 62,6% para células rompidas e 43,1% para o extrato enzimático. Verificou-se também que, após a primeira batelada, as taxas de conversão diminuíram rapidamente sendo que, após a terceira batelada, não houve conversão quando utilizaram-se células íntegras e células rompidas.

No trabalho de Kawaguti et al. (2010), o rendimento máximo de isomaltulose obtido por células de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em quitosana foi observado após 24 de incubação (65% de conversão) em processo descontínuo, onde os parâmetros estudados foram temperatura de 35 °C, pH 5,5 e solução de sacarose a 35%. Concentrações de sacarose elevadas diminuíram em cerca de 55% o rendimento da conversão. Outros trabalhos concluíram que altas concentrações de sacarose diminuíam a conversão em cerca de 50% utilizando células livres (KAWAGUI & SATO, 2007 b) e em células imobilizadas (CHEETHAM et al., 1984; MORAES et al., 2005, OLIVA-NETO; MENÃO, 2009).

Contesini et al. (2012), avaliaram a imobilização da enzima glicosiltransferase obtida do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 por diferentes métodos: aprisionamento em microcápsulas de pectina de baixo teor de metoxilação, contendo uma mistura de manteiga e ácido oléico como conteúdo lipídico, e aprisionamento em Celite 545. Em relação à imobilização em microcápsulas de pectina, os autores relataram uma conversão de 30% de sacarose em isomaltulose. Entretanto, a conversão diminuiu para 5% na décima batelada indicando uma inativação da enzima. O conteúdo lipídico apresentou um efeito positivo na retenção da atividade enzimática. Comparando-se os dois processos de imobilização, a enzima imobilizada em Celite 545 apresentou melhores resultados de conversão (acima de 60%) com uma atividade enzimática de 170 U de glicosiltransferase/g em pH 4.

7. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. **Reactive & Functional Polymer**, v.53,p.125-141, 2002 a.

BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a ternary interpenetrating polymer network (IPN) and controlled release of potassium nitrate as a model agrochemical. **Journal of Macromolecular Science**, v.39, p.75-102, 2002 b.

BAKAN, J.A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Techology**, p. 34-44, 1973.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNYB, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.35–52, 2004 a.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNYB, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004 b.

BERNABÉ, P.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. **Polymer Bulletin**, v.55, p.367–375, 2005.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and $CaC1_2$ concentration on gelation kinetics. **Journal of Bioscience and Bioencineering**, v.88, n.6, p.686-689, 1999.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} - induced gelation in alginates and pectins: the Egg-Box model revisited**. Biomacromolecules**, v.2, p.1089-1096, 2001.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, p. 467-483, 2011.

CAMILO, K.F.B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. Tese, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, 166p, 2007.

CARDOSO, F.S.N. **Produção de microencapsulados de amido com recobrimento em leito fluidizado**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.18, 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. **Carbohydr. Polym**, v.63, p.176–187, 2006.

CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Palatinose production using immobilized cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v.27, p.471-481, 1984.

CHO, M.H.; PARK, S.E.; LIM, J.K.; KIM, J.S.; KIM, J.H.; KWON, D.Y.; PARK, C.S. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose producing microorganism isolated from traditional Korean food. **Biotechnol. Lett.**, v.29, p. 453-458, 2007.

CHO, Y.H.; McCLMENTS, D.J. Theoretical stability maps for guiding preparation of emulsions stabilized by protein-polysaccharide interfacial complexes. **Langmuir**, v.25, n.12, p.6649-6657, 2009.

CONTESINI, F.J.; IBARGUREN, C.; GROSSO, C.R.F.; CARVALHO, P.O.; SATO, H.H. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. **Journal of Biotechnology**, v.158, n.3, p.137-143, 2012.

COOPER, C.L.; DUBIN, P.L.; KAYITMAZER, A.B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte–protein complexes. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v.10, p.52–78, 2005.

CORCORAN, J.A. The production and use of immobilized living microbial cells. In**: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology** (Wiseman, A., ed.), vol.10, p.12 - 50, Wiley, New York, 1983.

COUGHLAN, M.P; KIERSTAN, M.P.J. Preparation and applications of immobilized microorganisms: a survey of recent reports. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p.51-90, 1988.

DE JONGH, H.; JANSSEN, A.; WEENEN, H. Differential retention of emulsion components in the mouth after swallowing: ATR FTIR measurements of oral coatings. **Food Lipids: Chemistry, Flavor and Texture**, v.92, p.87–94, 2006.

DE KRUIF, C.G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.555–63, 2001.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology** , v.23, n.7, p.1361-1394, 2005.

DIKEMAN, C.L.; FAHEY, G.C. Viscosity as related to dietary fiber: a review**. Crit Rev. Food Sci. Nutr.**, v.46, n.8, p.649-663, 2006.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1606-1617, 2011.

DUBEY, R.; SHAMI, T.C.; BHASKER RAO, K.U. Microencapsulation technology and applications. **Defence Science Journal**, v.59, n.1, p.82-95, 2009.

FANGER, G.O. Microencapsulation: a brief history and introduction. In: **Microencapsulation**: **Processes and applications**. VANDEGAER, J.E. ed. Plenum Press, New York, p.1-20, 1974.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutic**, v.282, p.1-18, 2004.

GAO, J.Y.; DUBLIN, P.L.; MUHOBERAC, B.B. Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. **Anal Chem.**, v.69, p.2945–51, 1997.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.31, p.267–285, 1998.

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

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

GRABITSKE, H.; SLAVIN, J. Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.49, n.4, p.327-360, 2009.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.52, p.291- 311, 2012.

HUANG, J.H.; HSU, L.H.; SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1988.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. Lebensmittel – Wissenchaft. **Technologic Food Science & Technology**, v.24, p.289–297, 1991.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic dugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.8, p.1115-1122, 1993.

JONES, O.G.; McCLEMENTS, D.J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.167, p.49–62, 2011.

KAKINUMA, H.; YUASA, H.; HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alfa-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydr. Res.**, v.312, p.103-115, 1998.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996.

KASHIMURA, J.; NAGAI, Y.; EBASHI, T. The effect of palatinose on mental concentration in humans. **J. Nutr. Sci. Vitaminol** (Tokyo), v.49, p.214–216, 2003.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.202-208, 2007 a.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.42, p.472-479, 2007 b.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KAWAGUTI, H.Y.; CELESTINO, E.M.; MORAES, A.L.L.; YIM, D.K.; YAMAMOTO, L.K.; SATO, H.H. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.211-217, 2010.

KRASTANOV, A.; YOSHIDA, T. Production of palatinose using *Serratia plymuthuca* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, n.10, p.593-598, 2003.

KUMBAR, S. G.; AMINABHAVI, T.M. Preparation and characterization of interpenetrating network beads of poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide) with sodium alginate and their controlled release characteristics for cypermethrin pesticide. **Journal of Applied Polymer Science**, v.84, p.552-560, 2002.

LI, X.; ZHAO, C.; AN, Q.; ZHANG, D. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.521-527, 2003.

LINA, B.A.R.; PROOIJE, S.V.; WAALKENS-BERENDSEN, D.H. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.35, p.309-314, 1997.

LIU, H.; XU, X.M.; GUO, S.D. Rheological, texture and sensory properties of low-fat

mayonnaise with different fat mimetics. **LWT Food Sci. Technol.**, v.40, n.6, p.946-954 2007.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.15, p.73-83, 2010.

MANDAL, T.K.; BOSTANIAN, L.A.; GRAVES, R.A.; CHAPMAN, S.R.; IDODO, T.U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. **Eur. J. Pharm. Biopharm**., v.52, p.91-96, 2001.

MARCIANI, L.; WICKHAM, M.S.J.; BUSH, D.; FAULKS, R.; WRIGHT, J.; FILLERY-TRAVIS, A.J. Magnetic resonance imaging of the behaviour of oil-in-water emulsions in the gastric lumen of man. **British Journal of Nutrition**, v.95, n.2, p.331–339, 2006.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice and techniques**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004.

McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.49, p.48–67, 2009.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Water-vapor permeability properties of edible whey protein–lipid emulsion films. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.3, p.307–312, 1994.

MESTDAGH, M.M; AXELOS, M.S.V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer Science: Food and Non-food Applications**, Montpellier, p.303-314, 1998.

MORAES, A.L.L; STECKELBERG, C.; SATO, H.H., PINHEIRO, A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 imobilizada em alginato de cálcio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.1, p.95-102, 2005.

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

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A.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.

MUNDRA, P.; DESAI, K.; LELE, S.S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2892-2896, 2007.

NETO, C.G.T; DANTAS, T.N.C; FONSECA, J.L.C; PEREIRA, M.R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly (ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v.34, p.2630–2636, 2005.

OLIVA-NETO, P.; MENÃO, P.T.P. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v.100, p.4252-4256, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.16, n.6, p.349-353, 1997.

ORSI, D.C.; KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Glucosiltransferase production by *Klebsiella* sp. K18 and conversion of sucrose to palatinose using immobilized cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.66-72, 2009.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-319, 2000.

PARK, Y.K.; UEKANE, R.T.; SATO, H.H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.131-136, 1996.

PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.D.; 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.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J.; CAMPOS-MONTIEL, R.G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.42, p.292-297, 2009.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, n.6, p.1195-1236, 1998.

RÉ, M.I. Microencapsulação: em busca de produtos "inteligentes". **Ciência hoje**, v.27, n.162, p.24-29, 2000.

RIBEIRO, M.C.E. **Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

ROCHA, W.S. **Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2001.

RODRIGUES, J.B. **Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (Piaractus mesopotamicus)**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

SALTER, G.J.; KELI, D.B. New materials and technology for cell immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p.385-389, 1991.

SCHER, B. H. **Controlled release delivery systems for pesticides**. Ed. Marcel Dekker, New York, 1999.

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

SHARPE, E.S.; STODOLA, F.H.; KOEPSELL, H.J. Formation of isomaltulose in enzymatic dextran synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.1062-1063, 1960.

SIMSEK-EGE, F.A.; GILLIAN, M.; BOND, G.M.; STRINGER, J. Polyelectrolye complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v.88, p.346-351, 2003.

SINGH, H.; YEAQ, H. D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. **Prog. Lipid. Res.**, v.48, n.2, p. 92-100, 2009.

SOMA, M.R.; PAOLETTI, R. The future of cardiovascular disease prevention and the role of lipid regulation. **Cardiovascular Risk Factors**, v.6, n.5, p.262–268, 1996.

SOUZA, F.N. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Food Polysaccharides and their applications**, 2nd ed., CRC Press: Florida, 2006.

STODOLA, F.H.; SHARP, E.S.; KOEPSELL, H.J.; The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. **Journal of the American Chemical Society**, v.78, p.2514–2518, 1956.

SWAISGOOD, H. E. Characteristics of milk. In O. R. Fennema (Ed.), **Food chemistry** (3rd ed.) (pp. 841–878). New York: Marcel Dekker, 1996.

TAKAZOE, I. Palatinose - An Isomeric Alternative to Sucrose. Editores GRENBY, T.H. **Progress in Sweeteners**, p.143-167, 1989.

TAMIME, A. Y.; KALAB, M.; MUIR, D.D.; BARRABTES, E. The microstructure of set-style, natural yogurt made by substituting microparticulate whey protein for milk fat. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.48, n.4, p.107-111, 1995.

THIES, C. **How to make microcapsules**. Lecture and Laboratory Manual. St. Louis. Missouri. 1995.

THU, B.; BRUHEIM, P.;ESPEVIK, T.; SMIDSROD, P.; SOON-SHIONG, G.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials**, v.17. p.1031-1040, 1996 a.

THU, B.; BRUHEIM, P.;ESPEVIK, T.; SMIDSROD, P.; SOON-SHIONG, G.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. **Biomaterials**, v.17. p.1069-1079, 1996 b.

TODD, R. D. Microencapsulation and favour industry. **Flavour Industry**, v.1, n.11, p.768-771, 1970.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. **Food Science and Technology**, v.80, p.171-198, 1997.

TSUJI, K. Microencapsulation of pesticides and their improved handing safety. **Journal of Microencapsulation**, v.18, p.137-147, 2001.

VANDENBERG, G.W.; DROLET, C.; SCOTT S.L.; DE LA NOUE, J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation. **J. Control. Release**, v.77, p.297-307, 2001.

VERONESE, T.; PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme Microb. Technol**., v.24, p.263-269, 1999.

VILLAMAR, D.F.; LANGDON, C.J. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. **Marine Biology**, v.115, n.4, p. 635-642. 1993.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.14, p.377-382, 2008.

YOUAN, B.B.C.; JACKSON, T.L.; DICKENS, L.; HERMANDEZ, C.; OWUSUBIOABA, G. Protein release profiles and morphology of biodegradable microcapsules containing an oil core. **J. Control. Release**, v.76, p.313-326, 2001.

WHORTON, C. **Factors influencing volatile release from encapsulation matrices**. ACS Symposium Series no.590. Washington, p.134-142, 1995.

WILLAERT, R.G.; BARON, G.V. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, v.12, n.1-2, p.5-20, 1996.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO PROTEICA POR INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEO

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO PROTEICA POR INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar os biopolímeros alginato de sódio e concentrado proteico do soro do leite (WPC) para produção de micropartículas por gelificação iônica seguida de recobrimento das micropartículas formadas. A análise da carga elétrica de alginato de sódio em solução, emulsões de alginato de sódio contendo diferentes concentrações de manteiga fundida e das proteínas do concentrado proteico do soro do leite em solução indicou que em uma faixa de pH de 3,0 - 4,5 pode ocorrer uma interação de natureza eletrostática entre os biopolímeros estudados. Misturas entre emulsões de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida e solução proteica de WPC foram avaliadas com relação à carga elétrica disponível e tamanho médio dos coacervados formados. Maiores tamanhos de coacervados, variando de 29,12 µm a 33,72 µm, foram obtidos na proporção volumétrica 1:6 (emulsão de alginato de sódio e manteiga fundida:WPC) sendo que a adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não influenciou estatisticamente no tamanho dos coacervados formados. A adsorção proteica sobre as micropartículas de gelificação iônica associado com recobrimento, por interação eletrostática, com solução proteica de WPC em diferentes concentrações foi avaliada em sistemas diluídos e concentrados. Mesmo em sistemas concentrados, o aumento da concentração de proteína em solução e diminuição da concentração de manteiga adicionada provocou um aumento da adsorção proteica. Utilizando-se solução de WPC na concentração de 4% (m/m) foram obtidas maiores quantidades de proteínas adsorvidas sobre as micropartículas com taxas de adsorção variando de 44,35% para micropartículas com baixo nível de manteiga fundida, de 37,58% para micropartículas contendo nível intermediário de manteiga e de 30,61% para micropartículas contendo alto nível de manteiga. Micropartículas com elevado teor de umidade, conteúdo proteico acima de 30% e tamanho variando de 130,0 µm a 161,5 µm

puderam ser produzidas pela técnica de gelificação iônica com posterior recobrimento, por interação eletrostática, com solução 4% (m/m) de WPC. Microscopias óptica e eletrônica de varredura foram utilizadas para caracterizar as micropartículas com relação à morfologia interna e de superfície na qual o conteúdo lipídico apresentava-se distribuído em toda extensão da matriz em diferentes tamanhos de glóbulos de lipídeo.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos está constantemente desenvolvendo novas técnicas para o encapsulamento, proteção e liberação de compostos bioativos, carotenóides, vitaminas, fitosteróis, enzimas, peptídeos, probióticos, entre outros (CHEN; SUBIRADE, 2006; PICOT; LACROIX, 2004; ZIMET; LIVNEY, 2009; JONES; McCLEMENTS, 2010; DRAGET; TAYLOR, 2011). Partículas formadas por biopolímeros naturais apresentam-se como matrizes promissoras devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, grau alimentício e grande disponibilidade (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004; MANDAL; PUNIYA; SINGH 2006, DOHERTY et al., 2011).

Um dos métodos mais comuns de encapsulação envolve o aprisionamento do recheio em gel de alginato, com o objetivo de proteger o material encapsulado das condições adversas do meio. A gelificação iônica utilizando este biopolímero como material de parede apresenta as vantagens de criação de um ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz, processo de encapsulamento sem a utilização de elevadas temperaturas e solventes orgânicos, e dissolução do sistema sob condições fisiológicas normais (EGAN et al., 2012; GOMBOTZ; WEE, 2012).

Entretanto, essas matrizes apresentam baixa resistência mecânica e elevada porosidade, o que pode permitir a difusão do material encapsulado para o meio externo. A modificação da porosidade torna-se essencial para evitar a difusão (DRAGET; TAYLOR, 2011; GOMBOTZ; WEE, 2012) sendo o recobrimento da partícula formada com um polieletrólito de carga oposta à apresentada pela matriz uma alternativa promissora (BERGER et al., 2004; CHO; McCLEMENTS, 2009; PATIL et al., 2010).

Proteínas globulares podem interagir com polissacarídeos aniônicos (goma arábica, pectina e alginato) para formar complexos solúveis ou insolúveis (TOLSTOGUZOV, 1997; WEINBRECK et al., 2003; DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS 2006, HONG; McCLEMENTS, 2007; YE, 2008). Esses complexos são estabilizados predominantemente por interações eletrostáticas e tem sido estudados com sucesso em processos de micro e

nanoencapsulação (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; DANIEL, 2007, JONES; McCLEMENTS, 2010).

As proteínas possuem uma carga negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI) e uma carga positiva líquida abaixo desse pH. No ponto isoelétrico, elas não apresentam carga líquida, mas possuem regiões localizadas na superfície que são positiva ou negativamente carregadas, o que tem consequências importantes para a sua interação com polissacarídeos aniônicos (TOLSTOGUZOV, 1997; YE, 2008) . Assim, complexos podem ser formados a partir de um polissacarídeo aniônico e proteínas carregadas positivamente.

As proteínas do soro do leite, principal subproduto de fabricação de queijo, são amplamente utilizadas devido ao seu elevado valor nutricional e ampla funcionalidade, incluindo capacidade de gelificação, emulsificação e formação de espuma (BEAULIEU et al., 2002; LEFEVRE; SUBIRADE, 2003; PONGSAWATMANIT; HARNSILAWAT; McCLEMENTS, 2006) . A β-lactoglobulina é a principal proteína da fração do soro de leite e apresenta-se como uma proteína globular compacta, de massa molecular de 18,3 kDa contendo 162 resíduos de aminoácidos, um grupo tiol e duas ligações dissulfeto. O ponto isoelétrico da β-Lactoglobulina tem sido relatado variando entre 4,7-5,2 (SAWYER; KONTOPIDIS, 2000; BROMLEY; KREBS; DONALD, 2005; HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS, 2006).

O alginato apresenta-se como um biopolímero de ocorrência natural, encontrado em algas marinhas marrons e algumas espécies de bactérias. Possui uma estrutura linear de resíduos de ácido β-D-manurônico e ácido α-L-gulurônico unidos através de ligações glicosídicas α 1-4. Na indústria de alimentos, o alginato é largamente utilizado como estabilizante, espessante ou gelificante em produtos como molhos, sopas, bebidas e sobremesas (DRAGET; TAYLOR, 2011; HOAD et al., 2011; GOMBOTZ; WEE, 2012). As constantes de dissociação (pKa) para os monômeros ácido manurônico e ácido gulurônico são 3,38 - 3,65, respectivamente (SIMSEK-EGE et al., 2003). Assim, o alginato tende a ser carregado negativamente em uma ampla faixa de pH.

Com base em experiências preliminares de Chen e Subirade (2006), microesferas formadas por alginato ou proteínas do soro do leite não oferecem uma proteção satisfatória

a compostos bioativos e nutracêuticos em fluidos gástricos devido à difusão e degradação prematura. No entanto, microesferas formadas por isolado proteico do soro do leite e alginato demonstraram a capacidade de atrasar a liberação do composto no estômago, permitindo a libertação completa no intestino delgado. Complexos formados entre β-lactoglobulina e pectina, abaixo do pI da proteína, proporcionaram melhor proteção contra a degradação de vitamina D em comparação com partículas formadas apenas por β-lactoglobulina (ZIMET; LIVNEY, 2009).

A formação e propriedades dos coacervados formados entre alginato e proteínas do concentrado proteico do soro do leite são fortemente influenciadas pelo pH, concentração total de polieletrólitos e a razão proteína/polissacarídeo (BENICHOU; ASERIN; GARTI, 2002; DE KRUIF; WEINBRECK; DE VRIES, 2004; COOPER et al., 2005; HONG; McCLEMENTS, 2007*).* Assim*,* torna-se importante compreender como as características dos biopolímeros utilizados podem influenciar na formação, estrutura e propriedades dos complexos formados.

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar os biopolímeros alginato de sódio e concentrado proteico do soro do leite (WPC) para produção de micropartículas. Manteiga fundida foi escolhida como lipídeo modelo de material de recheio por sua fácil acessibilidade. Misturas entre emulsões de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida e concentrado proteico do soro do leite foram avaliadas com relação à carga elétrica disponível e tamanho dos coacervados formados. As micropartículas foram preparadas pelo processo de gelificação iônica associado com recobrimento, por interação eletrostática, com concentrado proteico do soro do leite em diferentes concentrações e em seguida foi avaliada a adsorção de proteína sobre a micropartícula em sistemas diluídos e concentrados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizados: Alginato MANUGEL DMB (FMC BioPolymer, Brasil, Lote: G4200301), Concentrado proteico do soro do leite (Lacprodan- Arla Foods Ingredientes, Argentina, lote: 804A12701), Manteiga comum comercial sem adição de sal (Aviação, São Sebastião do Paraíso- MG, Brasil), Cloreto de cálcio (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil, P.M: 110,99); Ácido clorídrico 0,1 N (Merk, Alemanha); Hidróxido de sódio 0,2 N e 50% (Nuclear, Diadema-SP, Brasil, P.M:40), Ácido sulfúrico (Synth, Diadema-SP), Citrato de sódio (Synth, Diadema-SP). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterização dos biopolímeros

2.2.1.1. Composição centesimal

Alginato de sódio e concentrado proteico de soro do leite foram caracterizados em relação ao conteúdo de nitrogênio total, umidade, cinzas e lipídeos, sendo as análises realizadas em triplicatas.

O conteúdo de lipídeos foi determinado segundo Bligh e Dyer (1959) e a umidade foi obtida por perda de massa de água ocorrida durante a secagem em estufa a temperatura de 105 °C (A.O.A.C, 2006). A quantificação do conteúdo de nitrogênio total foi realizada através do método de Kjeldahl (A.O.A.C, 2006), utilizando-se o fator 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína. A determinação de cinzas foi realizada através da queima da matéria orgânica (A.O.A.C, 2006).

2.2.2. Determinação da carga elétrica disponível

Para se obter a relação de cargas elétricas entre alginato de sódio e concentrado proteico do soro do leite em diferentes valores de pH e assim alcançar as melhores condições para produção das micropartículas, mediu-se a carga elétrica disponível nas soluções e emulsões dos biopolímeros mencionados utilizando o analisador de potencial zeta Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.). Também avaliou-se a carga elétrica dos coacervados produzidos conforme metodologia descrita no item 2.2.3. Para cada análise, as soluções, emulsões e sistemas de coacervados foram preparados em triplicatas independentes e as análises realizadas em triplicata.

O potencial zeta é uma medida da carga elétrica a qual pode ser determinada através de instrumentos com princípio eletroforético. A determinação ocorre pela medição da velocidade e direção das gotas (soluções, emulsões ou partículas com tamanho de até 10 μm) que se movimentam em um campo elétrico definido após a aplicação de uma diferença de potencial elétrico na célula contendo a amostra a ser avaliada (GUZEY; KIM; McCLEMENTS, 2004). Os resultados foram expressos como média, em milivolts (mV), seguidas por seus desvios padrões.

2.2.2.1. Soluções de biopolímeros

Para obtenção de uma faixa de pH na qual os biopolímeros apresentem cargas elétricas opostas, foram preparadas soluções de alginato de sódio 0,1% (m/m) e WPC na concentração de 0,1% (m/m) de proteína. As soluções permaneceram sob agitação magnética constante até completa dissolução. Após a dissolução, as soluções foram avaliadas com relação à carga elétrica disponível, variando o pH das soluções de 3 a 7 utilizando pHmetro Digimed modelo DM 20. Para o ajuste do pH, foi utilizado ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de sódio 0,2 N.

2.2.2.2. Emulsões de alginato com diferentes concentrações de lipídeo

Com o objetivo de avaliar a influência de diferentes concentrações de lipídeo na carga elétrica disponível, mediu-se a carga elétrica em emulsões de alginato de sódio com três concentrações de manteiga fundida. Inicialmente, soluções de alginato 2% (m/m) foram preparadas, utilizando agitação magnética constante até completa dissolução. Em seguida, adicionaram-se as seguintes concentrações de manteiga fundida a cada solução:

- 2% (m/m) de manteiga fundida. Denominada Emulsão Alto Nível (EAN).
- 1% (m/m) de manteiga fundida. Denominada Emulsão Nível Intermediário (ENI).
- 0,04% (m/m) de manteiga fundida. Denominada Emulsão Baixo Nível (EBN).

As soluções foram homogeneizadas em homogeneizador ultra turrax (IKA modelo T18, Works do Brasil) por 3 minutos a 14000 rpm. Após a homogeneização, as emulsões foram diluídas para concentração final de 0,1% (m/m) e homogeneizadas novamente por mais 2 minutos a 14000 rpm. Resolveu-se preparar as emulsões, em todas as concentrações de manteiga estudadas, com uma concentração inicial de 2% (m/m) seguida de diluição para concentração final de 0,1% (m/m) devido à pequena quantidade de manteiga contida na emulsão denominada baixo nível

As emulsões foram avaliadas em relação à carga elétrica disponível conforme descrito no item 2.2.2, variando o pH das emulsões de 3 a 7. Realizou-se também a medição do tamanho médio ($D_{0.5}$) das emulsões conforme descrito no item 2.2.4.

2.2.3. Produção de coacervados

Com o objetivo de se obter a melhor proporção entre os biopolímeros mencionados em que a interação eletrostática ocorresse e coacervados insolúveis fossem formados, diferentes proporções de alginato:WPC foram avaliadas. Para isso, as seguintes proporções volumétricas (alginato:WPC, v/v) foram utilizadas - 1:1; 1:2; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9; 1:10 e 1:12 aumentando a quantidade de concentrado proteico do soro do leite em relação ao alginato. Para uma melhor visualização das mudanças ocorridas, antes das análises, imagens foram captadas através de câmera fotográfica dos tubos contendo cada relação descrita acima.

2.2.3.1. Produção de coacervados pela mistura de solução de alginato e solução de proteínas do soro do leite

Para esta análise, prepararam-se soluções de alginato 0,1% (m/m) e soluções de WPC a uma concentração 0,1% (m/m) de proteína. As soluções permaneceram em agitação magnética constante para completa dissolução. Após a dissolução, as soluções tiveram seu pH ajustado para 3,75 utilizando ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de sódio 0,2 N. Em seguida, foi realizada as misturas entre os biopolímeros utilizando as proporções descritas no item 2.2.3. Após a preparação, as misturas permaneceram em repouso *overnight* para posterior determinação da carga elétrica conforme descrito no item 2.2.2. Cada tubo de ensaio foi agitado manualmente imediatamente antes de cada análise.

2.2.3.2. Produção de coacervados pela mistura de emulsões de alginato e soluções de proteínas do soro do leite

Foram preparadas misturas entre emulsões de alginato com as concentrações de manteiga fundida descritas no item 2.2.2.2 e soluções de WPC. Utilizaram-se emulsões de alginato na concentração final de 0,1% (m/m), conforme preparo descrito no item 2.2.2.2 e

soluções de WPC a uma concentração 0,1% (m/m) de proteína, ambos ajustados para pH 3,75 utilizando ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de sódio 0,2 N. A determinação da carga disponível e avaliação do tamanho médio dos coacervados produzidos seguiu a metodologia descrita nos itens 2.2.2 e 2.2.4, respectivamente.

2.2.3.3 Produção de coacervados entre partículas de alginato obtidas por gelificação iônica e soluções de concentrado proteico do soro do leite

Partículas de gelificação iônica foram produzidas conforme descrito no item 2.2.5.1. Soluções de WPC a uma concentração 0,1% (m/m) de proteína com pH corrigido para 3,75 foram misturadas com suspensões de partículas de gelificação iônica na concentração de 0,1% (m/m). As relações utilizadas encontram-se descritas no item 2.2.3. Os sistemas foram mantidos em agitação durante 1 hora, em homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) e após este tempo as misturas permaneceram em repouso *overnight* para posterior determinação do tamanho médio dos coacervados formados conforme descrito no item 2.2.4.

Nas amostras de coacervados produzidos pela interação de micropartículas com solução de WPC com as melhores características mediu-se o teor de proteína não adsorvida, ou seja, a quantidade de proteína que não interagiu com as micropartículas. Os coacervados foram centrifugados em centrífuga sorvall RC5C (Sorvall Instruments. Dupont Company, Newton, CT) a 17000 rpm por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e o teor de proteína foi analisado pelo método de Kjeldahl conforme descrito no item 2.2.1.1.

2.2.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho ($D_{0.5}$)

O tamanho médio e a distribuição de tamanho dos coacervados formados, foram medidos no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instrumentos, Malvern,

Worcestershire, U.K.), unidade de amostragem Hydro 2000S utilizando água destilada e deionizada como material dispersante para fazer a leitura das amostras. A leitura foi realizada adicionando a amostra dentro da unidade de amostragem, preenchida com água. A quantidade de amostra adicionada sofreu variação de amostra para amostra, sempre atingindo a obscuração mínima exigida pelo equipamento.

O instrumento analisa o tamanho da amostra através da dependência angular da intensidade da luz (λ = 632,8 nm) dispersa pela amostra diluída. Em seguida, localiza a distribuição de tamanho de partícula que fornece o melhor ajuste entre os dados experimentais e as previsões baseadas pela teoria de Mie. A teoria assume que as gotículas da amostra são esféricas e homogêneas, porém, as partículas em emulsão podem conter gotículas não esféricas e não homogêneas (MAO; McCLEMENTS, 2012 b).

2.2.5. Produção das micropartículas de alginato por gelificação iônica e avaliação da adsorção proteica sobre a superfície da partícula por interação eletrostática

2.2.5.1. Produção de micropartículas por gelificação iônica

Soluções contendo 2% (m/m) de alginato de sódio foram preparadas sob agitação constante para completa dissolução do biopolímero. As concentrações de manteiga fundida descritas no item 2.2.2.2 foram adicionadas as soluções de alginato e em seguida, as soluções foram homogeneizadas em homogenizador ultra turrax (IKA modelo T18, Works do Brasil) a 14000 rpm por 3 minutos. As emulsões resultantes foram atomizadas sobre soluções de cloreto de cálcio 2% (m/v) com agitação constante e pH da solução ajustado para 3,75 com HCl 2,5 N. Para atomização, foi utilizado um bico atomizador duplo fluido de 1 mm de diâmetro, altura de 12 cm entre o bico e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 0,125 kgf/cm^2 e bomba peristáltica com velocidade de 556 mL/hora, que conduziu as emulsões até o bico atomizador. Durante a atomização, as emulsões permaneceram sob agitação constante a temperatura de 50 °C para que a manteiga se mantivesse fluida na emulsão.

Após a atomização, as micropartículas foram mantidas por 30 minutos sob agitação magnética constante para realização da cura das micropartículas. Em seguida, foram recolhidas em peneiras de malha de aço com diâmetro de 53 µm, imersas durante 5 minutos em água deionizada com pH ajustado para 3,75 com HCl 2,5 N, novamente escorridas e lavadas consecutivamente com água destilada e deionizada com pH ajustado para 3,75 para completa remoção do excesso de cloreto de cálcio.

2.2.5.2 Produção de micropartículas recobertas com proteínas

Após a produção das micropartículas úmidas de acordo com o item 2.2.5.1, 100 gramas das micropartículas foram transferidas para soluções de WPC nas concentrações de 1,7%; 2% e 4% (m/m) de proteína com pH previamente ajustado para 3,75, com solução de HCl 0,1 N, onde permaneceram por 30 minutos, em agitação magnética. Posteriormente, as partículas foram recolhidas em peneiras de malha de aço com diâmetro de 53 µm e lavadas com água destilada e deionizada com o pH corrigido para 3,75 para remoção do excesso de WPC.

Todas as etapas para produção das micropartículas descritas nos itens 2.2.5.1 e 2.2.5.2 foram realizadas a temperatura ambiente.

2.2.6. Caracterização das micropartículas

2.2.6.1. Composição centesimal

As micropartículas de gelificação iônica produzidas com diferentes concentrações lipídicas recobertas ou não com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite foram caracterizadas em relação ao conteúdo de nitrogênio total, umidade, cinzas e lipídeos, sendo as análises realizadas em triplicatas.

Para determinação do conteúdo lipídico, 5 gramas de micropartículas com os diferentes tratamentos foram previamente rompidas utilizando uma solução 3% (m/m) de citrato de sódio e posteriormente o conteúdo lipídio foi determinado segundo Bligh e Dyer (1959). A umidade foi obtida por perda de massa de água ocorrida durante a secagem em estufa a temperatura de 105 °C (A.O.A.C, 2006). A quantificação do conteúdo de nitrogênio total foi realizada através do método de Kjeldahl (A.O.A.C, 2006), utilizando-se o fator 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína. A determinação de cinzas foi realizada através da queima da matéria orgânica (A.O.A.C, 2006).

2.2.6.2. Tamanho médio e distribuição de tamanho ($D_{0.5}$)

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas úmidas (recém-processadas), foram medidos no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.), unidade de amostragem Hydro 2000S utilizando água destilada e deionizada como material dispersante para fazer a leitura das amostras. As micropartículas foram suspensas em água com pH corrigido para 3,75 utilizando HCl 2,5 N, mesmo pH usado para as leituras. A leitura foi realizada adicionando-se a amostra na unidade de amostragem, preenchida com água. A quantidade de amostra adicionada sofreu variação de amostra para amostra, sempre atingindo a obscuração mínima exigida pelo equipamento.

2.2.7. Secagem das micropartículas

Parte das micropartículas úmidas foram secas em liofilizador Edwards Pirani 501, conforme as condições estabelecidas por Mukai-Corrêa (2003): temperatura inicial: - 40 °C, temperatura final: 25 °C/2 horas, tempo total do ciclo de secagem: 48 horas e pressão: 0,1 mmHg. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração.

2.2.8. Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada por microscopia óptica (MO) em microscópio óptico (JENAVAL, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) 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*.

A morfologia das micropartículas liofilizadas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através do microscópio eletrônico de varredura modelo JMS – 5800 LV, com uma aceleração de voltagem de 20 kV. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (210 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Liechtensten).

2.2.9. Análise estatística

O cálculo da análise de variância, ANOVA, foi realizado pelo programa estatístico SAS versão 9.2 e as comparações entre os valores das médias foram avaliadas de acordo com o teste TUKEY, considerando um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal dos biopolímeros

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição centesimal dos biopolímeros utilizados na produção das micropartículas.

Tabela 1 - Composição centesimal (%) dos biopolímeros utilizados para elaboração das micropartículas.

	Composição centesimal (%)			
Biopolímeros	**Umidade**	**Proteína**	**Lipídeos**	**Cinzas**
WPC	7,24 ± 0,32	74,3 ± 1,35	6,7 ± 0,33	2,88 ± 0,05
Alginato	11,41 ± 0,62	ND	ND	24,1 ± 1,98

A determinação do teor de proteína em concentrados proteicos torna-se necessária uma vez que este produto não é totalmente constituído por proteína. O valor encontrado apresenta-se dentro dos valores preconizados variando de 25% - 80% de proteína (MORR; HA, 1993; SURH; WARD; McCLEMENTS, 2006) e foi utilizado como fator de correção durante o preparo de soluções de concentrado proteico do soro do leite.

Por ser um sal derivado o ácido algínico, o alginato de sódio apresenta um elevado teor de cinzas que pode ser justificado pelas etapas de produção do mesmo. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o alginato de sódio deve conter entre 10% - 13% de umidade.

3.2. Determinação da carga elétrica

3.2.1 Soluções dos biopolímeros

Inicialmente, é importante identificar as condições mais adequadas para a formação de complexos eletrostáticos com as propriedades físico-químicas desejadas. Por isso,

realizou-se a investigação da carga elétrica disponível para caracterizar o comportamento de alginato de sódio em solução 0,1% (m/m) e solução de WPC à concentração de 0,1% (m/m) de proteína em uma varredura de pH 3-7 (Figura 3).

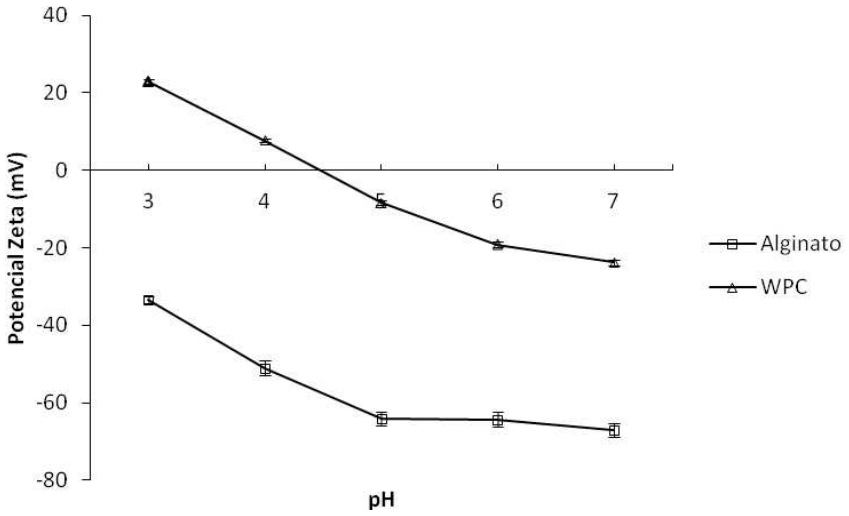


Figura 3 - Potencial zeta de alginato de sódio em solução 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em função do pH.

O alginato de sódio em solução 0,1% (m/m) apresentou carga elétrica negativa em toda faixa estudada. Houve uma elevação da eletronegatividade da solução com o aumento do pH variando de – 33,52 mV em pH 3 a – 67,1 mV em pH 7. A carga líquida negativa do alginato é atribuída aos grupos carboxila carregados negativamente ($-COO^-$) em soluções com pH acima de seu pka, aproximadamente 3,5 (HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS, 2006), sendo que, a medida que o pH aumenta, maior é a eletronegatividade.

As proteínas do WPC em solução exibiram carga elétrica positiva em pH 3 e 4 e carga negativa nos demais valores de pH estudados. As proteínas apresentaram carga nula (ponto isoelétrico) no pH 4,5. Estudos relatam carga elétrica nula em pH em torno de 4,7-5,2 para β- lactoglobulina, principal proteína encontrada em concentrados proteicos de soro

do leite, estando o valor encontrado neste trabalho próximo ao relatado em literatura (SAWYER; KONTOPIDIS, 2000, BROMLEY; KREBS; DONAL, 2005; HARNSILAWAT; PONGSAWATMANIT; McCLEMENTS, 2006).

Em pH inferior ao ponto isoelétrico, os grupos amino das proteínas apresentam-se carregados positivamente ($-NH_3^+$), enquanto que os grupos carboxila são neutros (-COOH). Com o aumento do pH, a magnitude da carga positiva na solução diminui, em parte, porque os grupos carboxila encontram-se carregados negativamente ($-COO^-$) e, em parte, porque alguns dos grupos amino tornam-se neutros ($-NH_2$). Posteriormente, a carga elétrica das proteínas torna-se zero, havendo um equilíbrio entre os grupos carregados positivamente e os grupos carregados negativamente. Um aumento adicional no pH faz com que as proteínas apresentem carga líquida negativa, que aumenta à medida que o número de grupos carboxila de carga negativa aumenta e o número de grupos amino carregados positivamente diminui (KULMYRZAEV; CHANAMAI; McCLEMENTS, 2000).

Harnsilawat, Pongsawatmanit e McClements (2006), avaliando a interação entre soluções de β-lactoglobulina e alginato de sódio, ambos a 0,1% (m/m), obtiveram carga negativa para alginato de sódio em solução em uma varredura de pH 2-8 encontrando os valores de -8,7mV para pH 2 e -68,4 mV para pH 8. Para β-lactoglobulina em solução, o potencial zeta variou de positivo (+19,6 mV) para negativo (-27,7 mV) com o aumento do pH. Os autores obtiveram o ponto isoelétrico da proteína em pH 4,8.

3.2.2. Concentrado proteico do soro do leite em solução e emulsões com diferentes concentrações de manteiga fundida

Com o objetivo de verificar a influência de diferentes concentrações de manteiga fundida, descritas no item 2.2.2.2, na carga elétrica, realizou-se a medição do potencial zeta das proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) e alginato de sódio em emulsão 0,1% (m/m) com diferentes concentrações de manteiga fundida em uma varredura de pH 3-7 (Figura 4) .

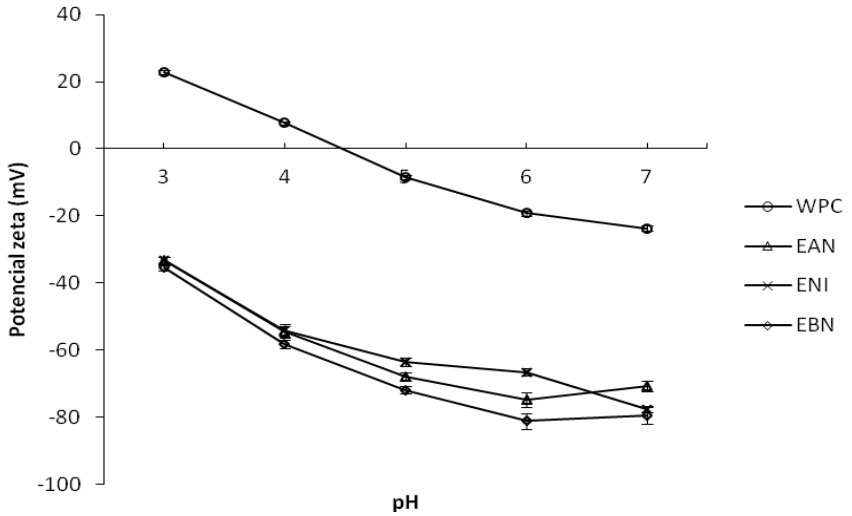


Figura 4 - Potencial zeta de alginato de sódio em emulsão 0,1% (m/m) com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em função do pH.

As emulsões com diferentes concentrações de manteiga fundida apresentaram comportamento similar possuindo carga negativa em toda faixa de pH estudada variando de –33,32 mV a -70,71 mV para emulsão alto nível de manteiga, -33,27 mV a -77,74 mV para emulsão nível intermediário de manteiga e -35,42 mV a -79,61 mV para emulsão baixo nível de manteiga. Com o aumento do pH houve um aumento da carga líquida negativa para todas as emulsões estudadas. Pequena variação no comportamento foi observada na emulsão alto nível de manteiga em pH 7 exibindo uma diminuição no potencial zeta. As propriedades elétricas das emulsões, que exibiram carga negativa em toda faixa estudada, podem ser atribuídas a carga do alginato de sódio que se manteve negativa em toda faixa de pH estudada (Figura 3).

A principal força motriz para a associação entre biopolímeros, adicionado ou não de gotículas lipídicas, que apresentam cargas opostas em soluções aquosas é a atração eletrostática (MAO; McCLEMENTS, 2012 a). Assim, a formação de complexos proteína-polissacarídeo é influenciada por fatores, tais como a densidade de carga dos biopolímeros

estudados, concentração proteína-polissacarídeo, pH e força iônica (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2009; JONES; McCLEMENTS, 2010).

A análise da densidade de cargas permitiu quantificar a carga elétrica do alginato de sódio em solução e emulsões com diferentes concentrações de manteiga fundida, como também das proteínas do WPC em solução, e assim analisar o intervalo de pH em que pode haver uma maior interação entre os materiais estudados. Através dos dados apresentados nas Figuras 3 e 4, pode-se observar que na faixa de pH 3,0 - 4,5 pode ocorrer uma interação de natureza eletrostática entre os materiais estudados. Em função deste resultado, para os demais testes, o pH das soluções e emulsões foram ajustados para 3,75.

Os estudos de Harnsilawat, Pongsawatmanit e McClements (2006) e Pongsawatmanit, Harnsilawat e McClements (2006) apontaram que na faixa de pH entre 3 e 4 ocorre a formação de complexos insolúveis entre soluções de alginato de sódio e β-lactoglobulina devido a elevada carga oposta dos biopolímeros com formação de complexos por interação eletrostática.

3.3. Produção de coacervados

A formação de coacervados foi registrada por captação de imagens dos tubos de ensaio contendo as diferentes proporções entre polissacarídeo/proteína em solução ou emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida. A adsorção de WPC à superfície de gotículas de alginato (sem adição de manteiga fundida) ou suas emulsões (com diferentes concentrações de manteiga fundida) foi caracterizada pela mudança na carga elétrica e medição do tamanho dos coacervados formados.

3.3.1. Produção de coacervados entre solução de WPC e solução de alginato de sódio (sem adição de manteiga fundida)

Diferentes proporções volumétricas, apresentadas no item 2.2.3, entre alginato de sódio em solução 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em pH 3,75, foram testadas e apresentadas na Figura 5. Na parte superior da imagem apresentam-se os valores do potencial zeta, expressos em milivolts (mV), e na parte inferior das imagens, as relações volumétricas entre os biopolímeros utilizados. Nas proporções volumétricas estudadas, a concentração de alginato de sódio em solução foi mantida fixa, na proporção de uma parte (v), enquanto houve um aumento na quantidade de WPC (proporção alginato:WPC, v/v).

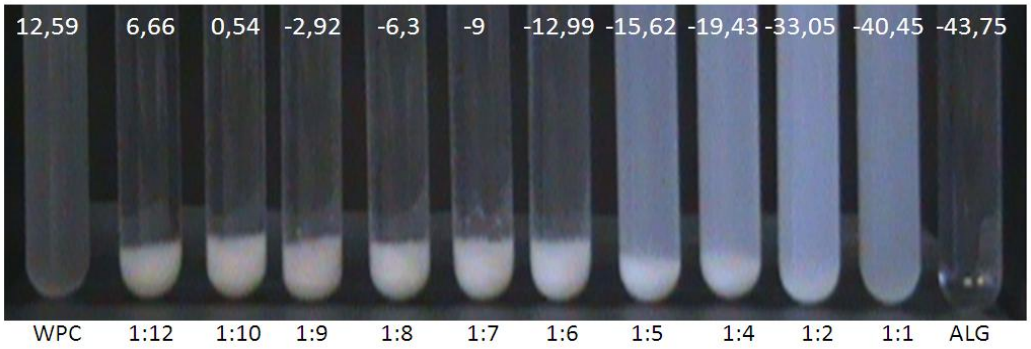


Figura 5 - Influência de diferentes concentrações de WPC na aparência visual e carga elétrica das misturas entre alginato de sódio em solução e proteínas do WPC em solução ambos a 0,1% (m/m) em pH 3,75.

Em baixas proporções alginato:WPC, grande parte das moléculas de proteína apresenta-se ligada às moléculas de polissacarídeo, o que pode ser confirmado pela carga negativa dos complexos formados, indicando que a carga elétrica foi influenciada pela predominância do polissacarídeo na solução. Com o aumento da quantidade de proteína, houve uma diminuição da carga negativa dos complexos formados, o que pode ser atribuído a uma neutralização da carga dos complexos. Aumentando ainda mais a concentração de proteína, a partir da relação 1:10 (alginato:WPC), a carga elétrica tornou-se positiva

indicando que a carga elétrica dos coacervados foi influenciada pela predominância de proteína.

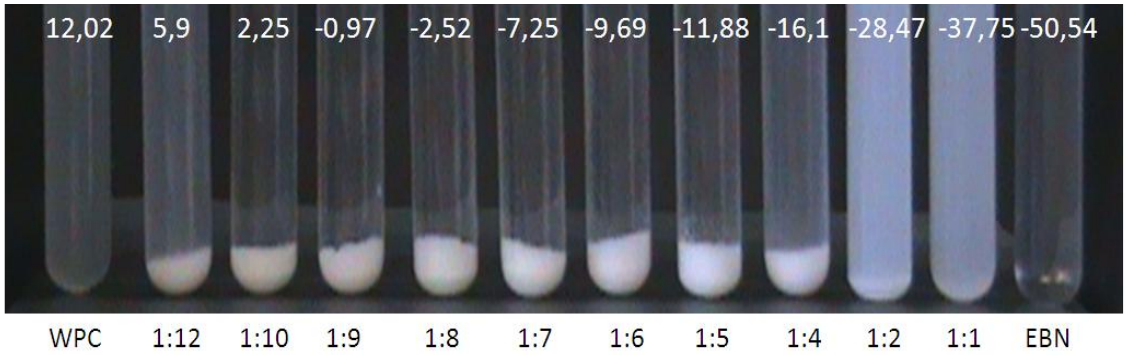
A partir da proporção 1:4 (alginato:WPC), observou-se a formação de precipitados no fundo dos tubos de ensaio. A quantidade desses precipitados aumentou até a proporção 1:6 e manteve-se praticamente constante nas demais proporções. Verificou-se também que a partir da proporção 1:6 houve alteração na coloração do sobrenadante passando de turvo para transparente.

As mudanças visuais na mistura entre proteína e polissacarídeo dependem da relação entre os biopolímeros utilizados (SCHMITT et al., 1998, TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007). Em baixas proporções dos biopolímeros, as interações eletrostáticas atrativas são relativamente fracas e um sistema de fase única é formado em que os polieletrólitos formam complexos solúveis. Com o aumento da quantidade dos biopolímeros, as interações eletrostáticas atrativas são relativamente mais fortes e um sistema de duas fases é formado, com uma fase rica em ambos os polieletrólitos e outra fase pobre. Essas mudanças visuais também foram verificadas por Hong e McClements (2007) e Jones e McClements (2011).

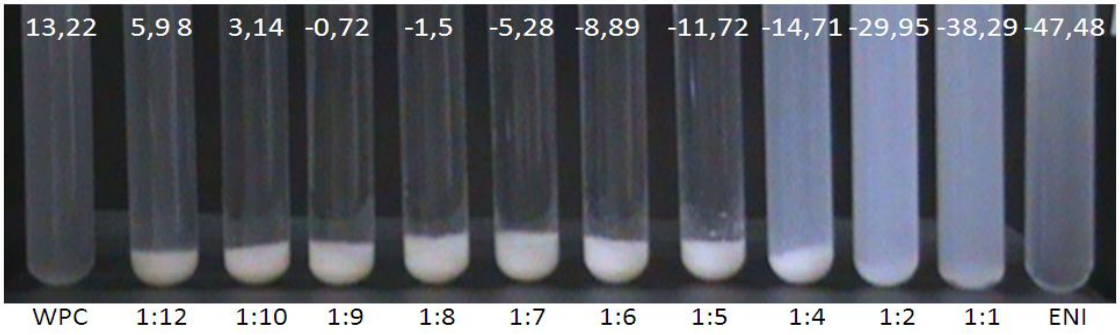
3.3.2. Produção de coacervados entre proteínas do WPC em solução e alginato de sódio em emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida

Com o objetivo de avaliar a adição de diferentes concentrações de manteiga fundida na produção de coacervados, foram testadas diferentes proporções volumétricas, apresentadas no item 2.2.3, entre proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) e alginato de sódio em emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) em pH 3,75 (Figura 6). Na parte superior das figuras apresentam-se os valores do potencial zeta, expressos em milivolts (mV), e na parte inferior das figuras as relações volumétricas entre os biopolímeros utilizados. Nas proporções volumétricas estudadas, a concentração da emulsão foi mantida fixa, na proporção de uma parte (v), enquanto houve um aumento na quantidade de WPC (proporção emulsão:WPC, v/v).

A- mistura entre algianto de sódio em emulsão com baixo nível de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções



B- mistura entre alginato de sódio em emulsão com nível intermediário de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções



C- mistura alginato de sódio em emulsão com alto nível de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções

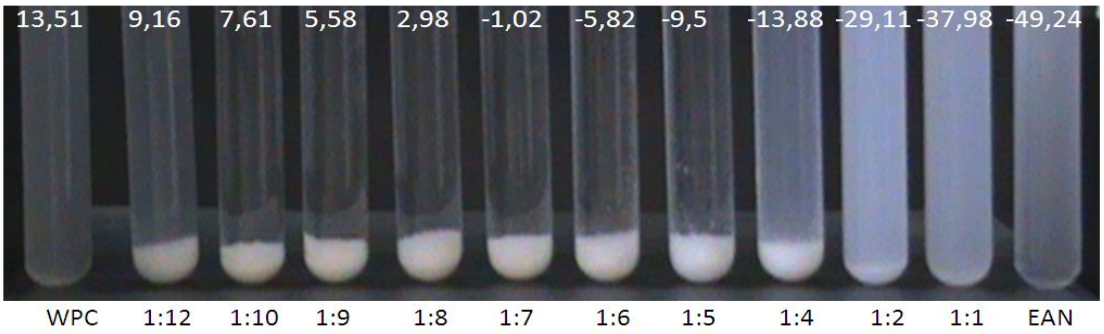


Figura 6 – Influência de diferentes concentrações na aparência visual e carga de elétrica das misturas entre alginato de sódio em emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em pH 3,75.

A Figura 6 (A, B e C) ilustra que houve mudanças físicas e visuais nas amostras com diferentes concentrações de manteiga fundida. Em baixas proporções emulsão:WPC utilizando baixo nível, nível intermediário ou alto nível de manteiga fundida, a carga elétrica mostrou-se negativa, indicando que a mesma foi influenciada pela predominância da carga apresentada pelo polissacarídeo em forma de emulsão. Com o aumento da quantidade de WPC, uma diminuição da carga negativa das misturas foi visualizada, seguida de mudança na carga de negativa para positiva.

A partir da proporção 1:10 (emulsão:WPC), as misturas contendo baixo nível e nível intermediário de manteiga apresentaram-se positivas enquanto que na mistura contendo alto nível de manteiga essa proporção diminuiu para 1:8. Esse resultado mostra que para a emulsão contendo alto nível de manteiga fundida, uma menor quantidade de proteína foi requerida para neutralização das cargas, o que possivelmente pode ser justificado pela presença de 0,4% de proteína em manteiga sem sal (TACO, 2011).

A formação de precipitados no fundo dos tubos de ensaio foi visualizada a partir da proporção 1:2 (emulsão:WPC) em todas as concentrações de manteiga fundida estudadas, e essa quantidade de precipitados manteve-se praticamente constante da proporção 1:4 até a proporção 1:12. Verificou-se também que a partir da proporção 1:5 houve alteração na opacidade do sobrenadante, passando de turvo para transparente, nas misturas contendo 1 % (m/m) de manteiga fundida e 0,04% (m/m) de manteiga fundida. Para misturas contendo 2% (m/m) de manteiga fundida, essa alteração foi alcançada a partir da proporção 1:4.

Comparando-se a carga apresentada pelo alginato de sódio em solução com a apresentada pelas suas emulsões, houve um aumento no módulo do potencial zeta com a adição de manteiga fundida em pH 3,75, sendo o valor apresentado sempre negativo. A carga elétrica apresentada pelas emulsões com alto nível e baixo nível de manteiga fundida foi similar, apresentando um valor de - 49,24 mV e - 50,24 mV respectivamente, enquanto que a carga elétrica apresentada pela emulsão com nível intermediário de manteiga fundida exibiu um valor um pouco menor, – 47,48 mV.

Mudanças também foram verificadas através da medição do tamanho dos coacervados formados (Tabela 2). Coacervados insolúveis de diferentes tamanhos foram

produzidos através da variação na proporção emulsão:proteína. O tamanho variou de 14,21 µm – 32,74 µm, 7,02 µm – 29,12 µm e 8,24 µm – 35,27 µm para misturas contendo baixo nível, nível intermediário e alto nível nível de manteiga fundida, respectivamente.

Tabela 2- Tamanho dos coacervados formados pela mistura em diferentes proporções volumétricas (v/v) de alginato de sódio em emulsão 0,1% (m/m) com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do concentrado proteico do soro do leite em solução 0,1% (m/m).

Proporção Emulsão:WPC	**Tamanho (µm)**		
	Coa. $_{BN}$	**Coa. $_{NI}$**	**Coa. $_{AN}$**
0:1	3,27 ± 0,32 ^{Fa}	3,98 ± 0,90 ^{Fa}	3,98 ± 0,44 ^{Fa}
1:1	15,72 ± 3,82 ^{DEa}	7,02 ± 0,62 ^{Fa}	8,24 ± 1,06 ^{FEa}
1:2	19,72 ± 2,71 ^{CDEa}	14,52 ± 1,12 ^{DEa}	21,96 ± 6,00 ^{BCDa}
1:4	32,74 ± 2,27 ^{Aa}	21,44 ± 0,97 ^{Bb}	28,08 ± 3,40 ^{ABa}
1:5	31,60 ± 2,32 ^{ABa}	22,26 ± 1,30 ^{Bb}	35,27 ± 7,00 ^{Aa}
1:6	32,56 ± 3,25 ^{Aa}	29,12 ± 1,54 ^{Aa}	33,72 ± 3,95 ^{Aa}
1:7	30,07 ± 3,85 ^{ABa}	26,74 ± 1,09 ^{Aa}	27,27 ± 2,44 ^{ABa}
1:8	26,01 ± 2,4 ^{BCa}	21,79 ± 1,13 ^{Ba}	23,25 ± 3,92 ^{BCa}
1:9	21,42 ± 2,09 ^{CDa}	19,63 ± 1,27 ^{BCa}	19,12 ± 3,00 ^{BCDa}
1:10	19,22 ± 2,68 ^{DEa}	17,77 ± 1,05 ^{CDa}	16,97 ± 3,82 ^{CDEa}
1:12	14,21 ± 1,67 ^{Ea}	12,39 ± 2,15 ^{Ea}	13,31 ± 1,92 ^{DEFa}
1:0	4,07 ± 0,39 ^{Fa}	3,64 ± 0,20 ^{Fa}	4,19 ± 0,22 ^{Fa}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$). Coa. BN- Coacervados formados contendo baixo nível de manteiga fundida. Coa. NI- Coacervados formados contendo nível intermediário de manteiga. Coa. AN- Coacervados formados contendo alto nível de manteiga fundida.

Ao promover misturas entre emulsão e proteína, o tamanho dos coacervados formados aumentaram com o aumento da quantidade de proteína até a proporção 1:6 e 1:7 (emulsão:WPC) com posterior diminuição do tamanho. O aumento na concentração de manteiga não modificou estatisticamente ($p > 0,05$) o tamanho dos coacervados formados.

Resultado similar foi obtido por Mao e McClements (2012 b) ao analisar o diâmetro médio volumétrico de gotículas lipídicas revestidas por solução de β-lactoglobulina aquecida a 90 °C por 30 minutos ($D_{4.3}$ = 0,35 μm) ou lactoferrina sem aquecimento ($D_{4.3}$ = 0,32 μm). Ao promover a mistura entre os biopolímeros composta por 40% de β-lactoglobulina e 60% de lactoferrina, com conteúdo lipídico variando de 5% - 40%, os autores obtiveram maiores tamanhos das gotículas formadas ($D_{4.3}$ = 10 μm – 20 μm) sendo o valor independente da concentração lipídica adicionada. Um aumento no tamanho dos complexos formados com 0,27% de isolado proteico do soro do leite e 0,13% de pectina de baixo teor de metoxilação também foi observado por Bédié, Turgeon e Makhlouf (2008) quando comparado com o tamanho das soluções desses biopolímeros separadamente.

O aumento inicial no tamanho dos coacervados pode ser atribuído à crescente interação de natureza eletrostática entre as moléculas de proteína e emulsão com as diferentes concentrações de manteiga estudadas. O subsequente decréscimo no tamanho dos coacervados formados deve-se a um rearranjo estrutural das moléculas levando a uma compactação dos coacervados formados (JONES; McCLEMENTS, 2010).

Modificações no tamanho dos coacervados formados pelas misturas entre β-lactoglobulina aquecida a 90 °C por 30 minutos e lactoferrina, sem aquecimento, em pH 7 foram obtidas por Mao e McClements (2012 a). Ao analisar o diâmetro médio volumétrico das gotículas de emulsões formadas por β-lactoglobulina e 20% de material lipídico ou lactoferrina e 20% de material lipídico, os autores obtiveram menores tamanhos de gotículas de emulsões. Ao promover a mistura entre os biopolímeros com a concentração de lactoferrina variando de 20% - 50%, um aumento no diâmetro médio volumétrico dos coacervados formados foi encontrado, entretanto, um aumento gradual no diâmetro não foi observado ao aumentar a proporção de lactoferrina de 60% - 80%.

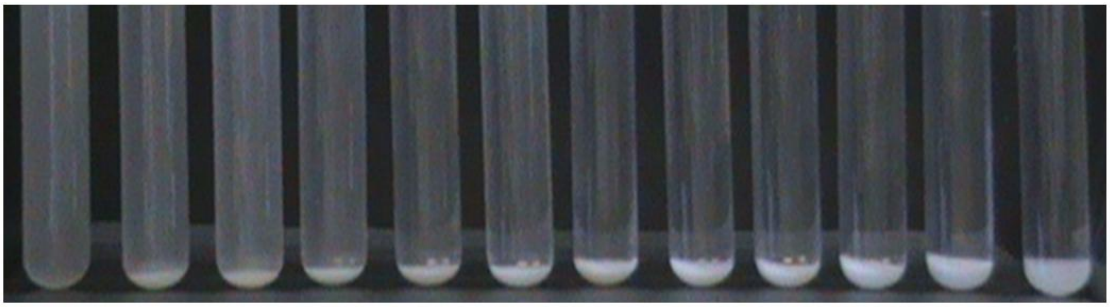
3.3.3. Produção de coacervados a partir da interação eletrostática entre partículas de gelificação iônica e solução de WPC

Durante a formação do gel, o cloreto de cálcio liga-se aos grupos carboxilas carregados negativamente do alginato de sódio. Assim, ocorre uma diminuição da carga negativa disponível para interação com a carga positiva apresentada pelas proteínas do concentrado proteico do soro do leite em pH 3,75. Para avaliar o efeito da modificação na quantidade de cargas disponíveis para interação, misturas entre proteínas de WPC em solução 0,1% (m/m) e suspensão de partículas de gelificação iônica 0,1% (m/m), com diferentes concentrações de manteiga fundida, foram preparadas (Figura 7).

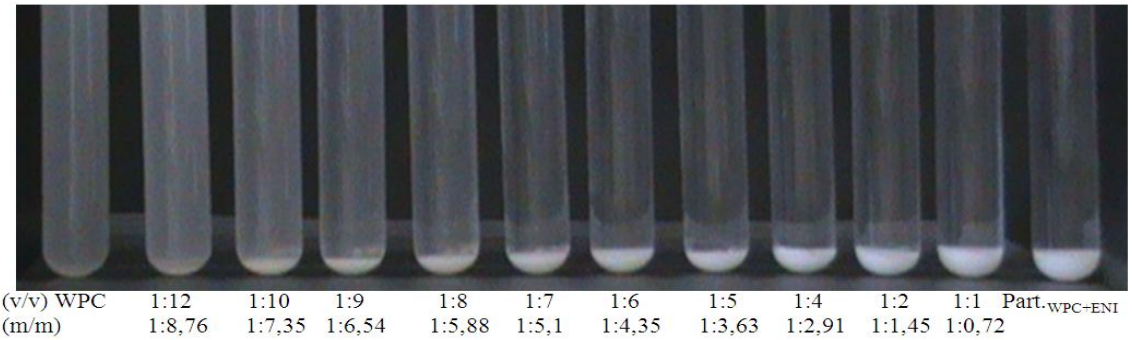
Não foi possível realizar a determinação da carga elétrica disponível devido ao tamanho dos coacervados formados serem maiores que o tamanho limite (10 μm) determinado pelo aparelho eletroforético para medição da carga elétrica.

Na parte inferior das imagens encontram-se apresentadas as relações volumétricas (v/v) e mássicas (m/m) das misturas entre partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do WPC em solução. Nas proporções estudadas, a concentração das partículas foi mantida fixa, na proporção de uma parte, enquanto houve variação na quantidade de WPC (proporção partícula:WPC). Para obtenção das relações mássicas, cálculos foram realizados para transformação das proporções volumétricas estudadas em proporções mássicas.

A- misturas entre partículas de gelificação iônica com baixo nível de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções



B- misturas entre partículas de gelificação iônica com nível intermediário de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções



C- misturas entre partículas de gelificação iônica com alto nível de manteiga fundida e solução de WPC em diferentes proporções

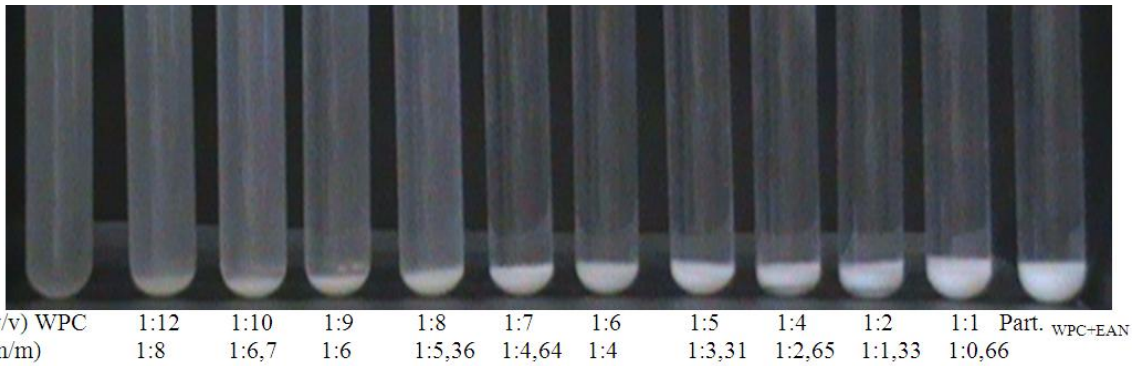


Figura 7- Aparência visual das misturas contendo micropartículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) em pH 3,75.

A Figura 7 (A, B e C) indica que a partir da proporção 1:1 (partícula:WPC) houve a formação de precipitados insolúveis correspondentes à associação eletrostática entre as partículas de gelificação iônica e proteínas do concentrado proteico do soro do leite. O sobrenadante apresentou-se transparente confirmando a hipótese de que grande parte da proteína adicionada apresenta-se adsorvida na partícula. A quantidade de coacervados formados manteve-se praticamente constante até a proporção 1:8, com diminuição nas demais concentrações. Um grande aumento na quantidade de proteína provocou uma leve turvação nas últimas proporções estudadas, indicando um excesso de proteína. Modificações visuais não foram observadas com o aumento na concentração de manteiga fundida.

O tamanho dos coacervados formados pela mistura em diferentes concentrações de partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e proteínas do WPC em solução 0,1% (m/m) também foi analisado e encontra-se apresentado na Tabela 3.

Assim como o tamanho médio dos coacervados formados pela mistura entre emulsão e solução de WPC (Tabela 2), o aumento na concentração de manteiga fundida não modificou estatisticamente ($p > 0,05$) o tamanho dos coacervados formados pela mistura entre partículas de gelificação iônica e solução de WPC. Pode-se constatar também que as diferentes proporções partícula:proteína não diferiram estatisticamente em relação ao tamanho dos coacervados formados. O tamanho dos coacervados formados variou de 170,18 µm a 194,16 µm para misturas contendo partículas com baixo nível de manteiga fundida, 176,17 µm a 196,90 µm para misturam contendo partículas produzidas com nível intermediário de manteiga fundida e 166,63 µm a 188,19 µm para misturas contendo partículas com alto nível de manteiga fundida.

Tabela 3 – Tamanho médio dos coacervados formados pelas misturas entre partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida 0,1% (m/m) e solução de WPC 0,1% (m/m) em pH 3,75.

	Tamanho (µm)		
Proporção Part.:WPC	**Part. $_{BN}$**	**Part. $_{NI}$**	**Part. $_{AN}$**
0:1	2,90 ± 0,49 ^{Ca}	2,42 ± 0,37 ^{Ca}	3,80 ± 0,70 ^{Ca}
1:1	194,16 ± 8,61 ^{Ba}	196,90 ± 7,96 ^{Ba}	188,19 ± 2,87 ^{Ba}
1:2	189,10 ± 8,81 ^{Ba}	193,57 ± 11,78 ^{Ba}	184,57 ± 6,67 ^{Ba}
1:4	180,39 ± 8,85 ^{Ba}	188,70 ± 14,07 ^{Ba}	181,44 ± 9,00 ^{Ba}
1:5	182,40 ± 8,45 ^{Ba}	184,30 ± 10,74 ^{Ba}	175,72 ± 9,57 ^{Ba}
1:6	176,18 ± 9,08 ^{Ba}	176,17 ± 15,88 ^{Ba}	173,15 ± 6,87 ^{Ba}
1:7	172,14 ± 3,68 ^{Ba}	184,91 ± 18,43 ^{Ba}	176,72 ± 9,84 ^{Ba}
1:8	170,18 ± 16,41 ^{Ba}	176,60 ± 28,31 ^{Ba}	176,00 ± 10,05 ^{Ba}
1:9	171,48 ± 6,38 ^{Ba}	186,81 ± 20,89 ^{Ba}	176,10 ± 16,22 ^{Ba}
1:10	170,95 ± 4,16 ^{Ba}	190,18 ± 19,3 ^{Ba}	166,63 ± 21,67 ^{Ba}
1:12	170,30 ± 9,45 ^{Ba}	184,11 ± 16,02 ^{Ba}	178,37 ± 3,85 ^{Ba}
1:0	209,18 ± 7,2 ^{Aa}	208,62 ± 8,67 ^{Aa}	203,93 ± 8,29 ^{Aa}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$). Part.BN- Partículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida. Part.NI- Partículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida. Part.AN- Partículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida.

O tamanho das partículas de gelificação iônica foi maior ao ser comparado com o tamanho das micropartículas com diferentes concentrações de proteína adsorvida na superfície por interação eletrostática indicando que a adição de diferentes quantidades de concentrado proteico do soro do leite promoveu uma compactação das partículas formadas. Resultado similar também foi observado por Souza (2012) ao promover misturas em diferentes proporções de partículas de gelificação iônica de pectina de baixo teor de esterificação amidada e solução proteica de concentrado proteico de soro do leite sem tratamento térmico. O autor obteve tamanhos médios variando entre 337,8 µm – 135,1 µm ao preparar misturas entre partículas e solução de WPC, sendo que partículas sem incorporação de proteína apresentaram maiores tamanhos (355,45 µm).

Micropartículas produzidas por gelificação iônica interna com tamanho superior a 100 µm foram produzidas por Chen e Subirade (2006) utilizando uma proporção de 9:1 dos biopolímeros isolado proteico de soro do leite, no qual aplicou-se um tratamento térmico de 80 °C por 30 minutos, e alginato de sódio. Micropartículas de tamanho superior a 100 µm também foram produzidas por Li e McClements (2011) utilizando a técnica de coacervação complexa e os biopolímeros alginato de sódio e quitosana.

Como não houve diferença estatística ($p > 0,05$) no tamanho dos coacervados formados pela mistura entre partículas:proteína, a escolha da melhor proporção foi realizada pela análise do tamanho dos coacervados formados pela mistura entre emulsão:proteína (Tabela 2). Nas proporções volumétricas 1:6 e 1:7 (emulsão:proteína) foram obtidos os maiores tamanhos de coacervados insolúveis formados, optando-se trabalhar com a proporção volumétrica 1:6 devido à economia de matéria prima.

Informações indiretas sobre a adsorção de proteína por interação eletrostática sobre as partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida foram obtidas através da porcentagem de proteína não adsorvida sobre as partículas, ou seja, a porcentagem de proteínas presentes no sobrenadante na proporção volumétrica 1:6 (partícula:WPC).

Para a medição de proteína no sobrenadante, as misturas entre proteína e partícula foram primeiramente centrifugadas para remoção dos complexos insolúveis e, em seguida, os sobrenadantes foram analisados conforme metodologia descrita no item 2.2.3.3. Valores de 55% ± 6,22, 55,1% ± 5,43 e 60,7% ± 6,91 foram encontrados para quantidade de proteína não adsorvida na partícula, em relação à quantidade inicial de proteína presente em cada tubo de ensaio, contendo baixo nível, nível intermediário e alto nível de manteiga fundida, respectivamente. Assim como a determinação do tamanho dos coacervados formados pela mistura de emulsão:WPC ou partícula:WPC, o aumento na concentração de manteiga fundida não modificou estatisticamente ($p > 0,05$) o teor de proteína não adsorvida.

3.4. Avaliação da adsorção de proteína em partículas de gelificação iônica

Com o objetivo de avaliar a adsorção de proteína em sistemas concentrados, partículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida foram produzidas como descrito no item 2.2.5.1 e revestidas com diferentes concentrações de WPC como descrito no item 2.2.5.2. Para a realização desta e das demais análises, utilizou-se a proporção mássica referente à proporção volumétrica 1:6 (partícula:WPC). Utilizou-se uma parte (m) de partículas de gelificação iônica e a quantidade de WPC (m) variou conforme a concentração de manteiga utilizada: 4,35; 4,14 e 4,00 para emulsões nível intermediário, baixo nível e alto nível de manteiga fundida (proporção mássica contida na Figura 7 A, B e C), respectivamente. Os teores de proteína adsorvida e umidade encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de proteína (A) e umidade (B) das micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com proteínas do soro do leite em diferentes concentrações por interação eletrostática (%).

A

	Proteína (%)		
Solução WPC	**Part. $_{WPC+ EBN}$**	**Part. $_{WPC + ENI}$**	**Part. $_{WPC+ EAN}$**
1,7%	16,52 ± 2,14 ^{Ca}	11,87 ± 1,37 ^{Cb}	9,44 ± 0,57 ^{Cc}
3,0%	21,64 ± 1,30 ^{Ba}	15,42 ± 0,94 ^{Bb}	13,67 ± 0,39 ^{Bc}
4,0%	44,35 ± 0,65 ^{Aa}	37,58 ± 2,75 ^{Ab}	30,61 ± 0,75 ^{Ac}

B

	Umidade (%)		
Solução WPC	**Part. $_{WPC+ EBN}$**	**Part. $_{WPC + ENI}$**	**Part. $_{WPC+ EAN}$**
1,7%	96,00 ± 0,07 ^{Aa}	94,96 ± 0,83 ^{Ab}	92,91 ± 0,26 ^{Ac}
3,0%	95,47 ± 0,20 ^{Ba}	94,00 ± 0,20 ^{Bb}	92,23 ± 0,21 ^{Bc}
4,0%	93,02 ± 0,40 ^{Ca}	91,18 ± 0,20 ^{Cb}	89,37 ± 0,47 ^{Cc}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey (p>0,05). Part. EAN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida (2%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC. Part. ENI + WPC –

Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida (1%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC. Part. EBN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida (0,04%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC.

Ao analisar a porcentagem de proteína adsorvida nas micropartículas (Tabela 4 A), pode-se constatar que, mesmo em sistemas concentrados, o aumento na concentração de proteína em solução provocou um aumento na adsorção proteica sobre as micropartículas. A adsorção proteica em micropatículas com baixo, intermediário e alto nível de manteiga fundida variou na faixa de 16,52% a 44,35%, de 11,87% a 37,58% e de 9,44% a 30,61%, respectivamente. O maior teor de proteína adsorvida em todas as concentrações de manteiga fundida utilizadas foi obtido utilizando uma solução 4% (m/m) de proteína.

Uma maior adsorção proteica foi obtida com a adição da menor concentração de manteiga fundida estudada, 0,04% (m/m), em todas as concentrações proteicas testadas, indicando que um aumento na concentração de manteiga provocou uma diminuição na porcentagem de proteína adsorvida sobre as micropartículas.

Elevados teores de proteínas também foram obtidos em estudos anteriores. Concentrações proteicas em solução variando de 2% - 12% foram utilizadas no estudo de Souza et al., (2012) para avaliar a adsorção de proteína do soro do leite desnaturada (80 °C por 15 minutos) e não desnaturada em micropartículas de gelificação iônica utilizando pectina de baixo teor de esterificação amidada como material de parede. Os autores obtiveram uma maior adsorção proteica, em torno de 50%, sobre as micropartículas utilizando soluções de 4% e 6% de proteína sem tratamento térmico. Teores mais elevados de retenção proteica, variando entre 55,71% a 83,88% e 34,2% a 62,2%, foram obtidos para partículas produzidas por Rosenberg e Lee (2004 a e b, respectivamente) utilizando isolado proteico de soro do leite e alginato de sódio. No entanto, nos respectivos estudos, os autores utilizaram uma metodologia de produção das partículas diferente da apresentada no presente trabalho ao promoverem a mistura entre os biopolímeros utilizados com posterior formação do gel com cloreto de cálcio.

Como era esperado, um aumento na porcentagem de proteína adsorvida sobre as micropartículas e aumento da concentração lipídica provocaram uma diminuição no teor de

umidade das mesmas (Tabela 4 B). Mesmo assim, umidades superiores a 89% foram obtidas nas micropartículas em todas as concentrações de manteiga fundida utilizadas. Assim como na adsorção proteica, teores de umidade menores foram obtidos em micropartículas contendo a maior concentração de manteiga fundida testada, 2% (m/m).

O tamanho médio das micropartículas de gelificação iônica revestidas com diferentes concentrações de proteína adsorvida também foi avaliado e encontra-se apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Tamanho médio das micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com solução de concentrado proteico de soro do leite, por interação eletrostática, em diferentes concentrações.

	Tamanho (µm)		
Solução WPC	**Part. $_{WPC+ EBN}$**	**Part. $_{WPC + ENI}$**	**Part. $_{WPC+ EAN}$**
1,7%	126,14 ± 9,15 ^{Bb*}	127,73 ± 3,78 ^{Bb}	147,05 ± 7,96 ^{Ba}
3,0%	138,31 ± 5,25 ^{Aab}	144,25 ± 7,52 ^{Aa}	135,46 ± 4,84 ^{Bb}
4,0%	130,03 ± 10,16 ^{Ab}	146,00 ± 13,78 ^{Aab}	161,50 ± 11,47 ^{Aa}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$). Part. EAN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida (2%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC. Part. ENI + WPC – Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida (1%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC. Part. EBN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida (0,04%, m/m) recobertas com diferentes concentrações de WPC.

As micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento, produzidas para esta etapa do trabalho, apresentaram tamanho de 118,28 µm ± 9,55, de 101,10 µm ± 6,23 e de 94,27 µm ± 9,95 contendo alto nível de manteiga, nível intermediário de manteiga e baixo nível de manteiga fundida, respectivamente. Não foram obtidas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre o tamanho das micropartículas contendo nível intermediário e baixo nível de manteiga fundida. Ao adicionar 2% (m/m) de manteiga fundida (alto nível), diferenças estatísticas foram observadas, quando comparadas com o tamanho das demais micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento.

Com relação às micropartículas recobertas, diferenças estatísticas ($p > 0,05$) não foram observadas com relação ao tamanho médio de micropartículas recobertas com soluções proteicas 3% e 4% (m/m) contendo 0,04% e 1% (m/m) de manteiga fundida. Um aumento na concentração de manteiga para 2% acarretou a formação de micropartículas maiores com diferenças estatísticas ($p < 0,05$) quando uma solução proteica 4% foi utilizada, em comparação com as demais concentrações estudadas.

O aumento na concentração de manteiga fundida provocou um aumento no tamanho médio das micropartículas formadas. Assim, a elevada porcentagem de adsorção proteica (Tabela 5) alcançada pelas micropartículas contendo baixo teor de manteiga fundida pode possivelmente ser explicada pelo menor tamanho das partículas formadas e maior área de superficial para interagir com a solução proteica.

Micropartículas com elevado teor de umidade, conteúdo proteico superior a 30% e tamanho variando entre 130,0 µm a 161,5 µm puderam ser produzidas pela técnica de gelificação iônica com recobrimento por interação eletrostática com solução proteica 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite.

3.5. Composição centesimal

A composição centesimal das micropartículas de gelificação iônica, adicionadas de diferentes concentrações de manteiga fundida, com e sem recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC foi realizada conforme descrito no item 2.2.6.1 e apresentam-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição centesimal (%) das micropartículas de gelificação iônica, adicionadas de diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro de leite.

	Composição centesimal (%)			
Micropartículas	**Umidade**	**Proteína**	**Lipídeos**	**Cinzas**
Part. EBN	97,04 ± 0,15 ^{A*}	-	13,51 ± 0,73 ^{C}	14,80 ± 1,62 ^{B}
Part. ENI	95,77 ± 0,13 ^{B}	-	34,98 ± 1,69 ^{B}	9,74 ± 2,75 ^{E}
Part. EAN	94,34 ± 0,26 ^{C}	-	46,74 ± 1,86 ^{A}	5,07 ± 1,46 ^{F}
Part. EBN + WPC	93,02 ± 0,40 ^{D}	44,35 ± 0,65 ^{A}	13,22 ± 1,14 ^{C}	18,82 ± 1,41 ^{A}
Part. ENI + WPC	91,18 ± 0,20 ^{E}	37,58 ± 2,75 ^{B}	35,07 ± 1,46 ^{B}	14,34 ± 1,58 ^{C}
Part. EAN + WPC	89,37 ± 0,47 ^{F}	30,61 ± 0,75 ^{C}	46,05 ± 1,23 ^{A}	10,04 ± 1,16 ^{D}

*Médias seguidas das mesmas letras não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$). Part. EAN - Micropartículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida. Part. ENI – Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida. Part. EBN - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida. Part. EAN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida recobertas com solução proteica 4% (mm) de WPC. Part. ENI + WPC – Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida recobertas com solução proteica 4% (m/m) de WPC. Part. EBN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida recobertas com solução proteica 4% (m/m) de WPC.

A porcentagem de cinzas encontrada variou conforme a concentração de manteiga fundida adicionada e recobrimento da micropartícula sendo que o aumento na concentração de manteiga fundida provocou uma diminuição no teor de cinzas. Micropartículas com baixo nível de manteiga fundida com e sem recobrimento apresentaram os maiores teores de cinzas, variando de 14,80% a 18,82%, devido a uma maior quantidade de biopolímeros presentes, enquanto que micropartículas com alto nível de manteiga com e sem recobrimento mostraram os menores valores (5,07% a 10,04%), devido a uma menor quantidade de biopolímeros presentes. Variações de 13,51% a 46,74% foram obtidas no conteúdo lipídico com o aumento da concentração de manteiga fundida em micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento. A etapa de recobrimento das partículas com solução proteica 4% (m/m) de concentrado proteico de soro do leite não provocou diferenças estatísticas ($p > 0,05$) no conteúdo lipídico, quando se compara o teor lipídico de micropartículas com e sem recobrimento.

3.6 Morfologia e microestrutura

Através da microscopia óptica (Figura 8), foi possível observar a morfologia e estrutura interna das micropartículas úmidas estudadas.

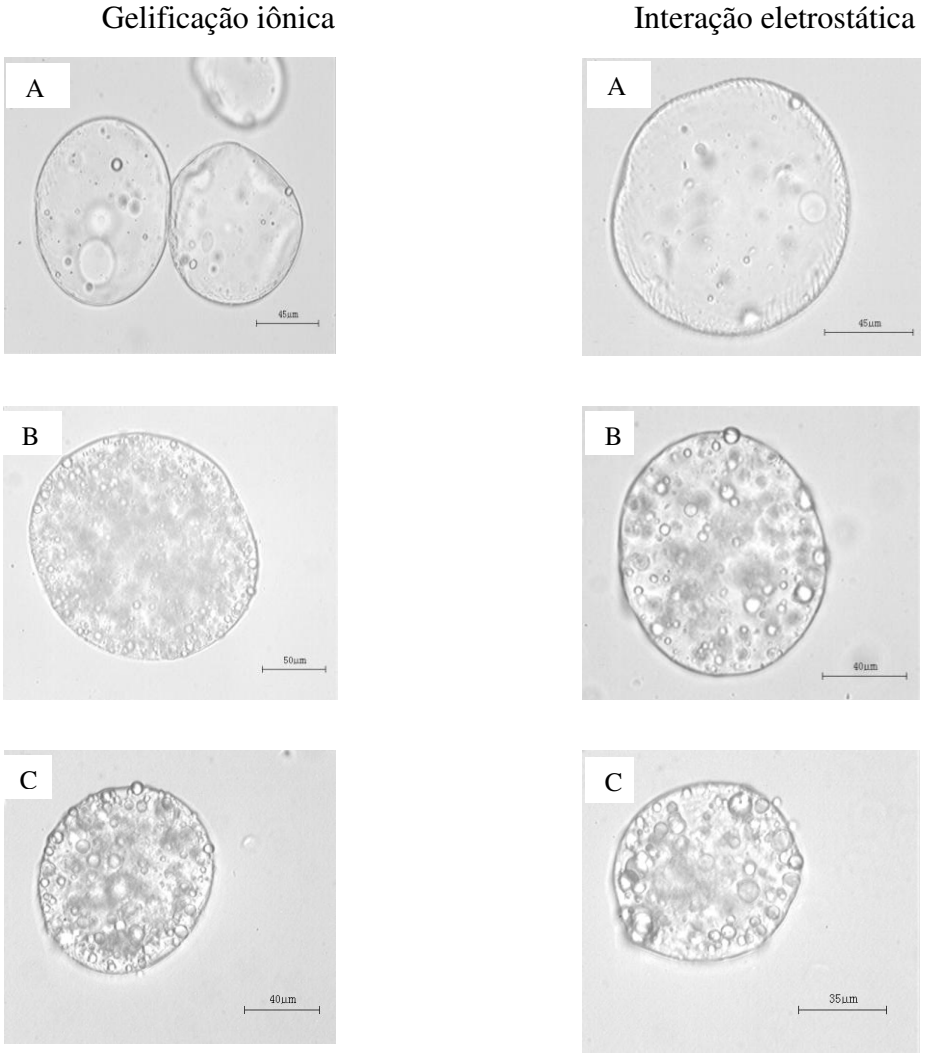


Figura 8 – Microscopia óptica das micropartículas úmidas produzidas por gelificação iônica seguidas ou não de recobrimento adicional, por interação eletrostática, com solução proteica 4% (m/m) de WPC. A- Micropartículas com baixo nível de manteiga fundida. B- Micropartículas com nível intermediário de manteiga fundida. C- Micropartículas com alto nível de manteiga fundida.

Em sua maioria, as micropartículas apresentaram formato próximo ao esférico, com o conteúdo lipídico distribuído por toda extensão da matriz com diferentes tamanhos de glóbulos. Variações no conteúdo lipídico confinado na matriz foram verificadas com o aumento da concentração de manteiga fundida utilizada.

Após a secagem por liofilização, as micropartículas foram avaliadas com relação a sua morfologia de superfície por microscopia eletrônica de varredura (Figura 9). Nas imagens obtidas, pode-se constatar que a estrutura das micropartículas manteve-se parcialmente íntegra após o processo de liofilização. As micropartículas recobertas com solução proteica 4% (m/m) de WPC apresentam rugas em sua superfície, o que pode ser atribuído à camada proteica de recobrimento das micropartículas de gelificação iônica. O recobrimento adicional possivelmente modificou a porosidade apresentada pelas partículas de gelificação iônica com o recobrimento total ou diminuição de tamanho de alguns poros.

Gombotz e Wee (2012) encontraram diâmetros de poros variando entre 5 nm -200 nm em micropartículas de géis de alginato de cálcio analisadas por microscopia eletrônica.

Gelificação iônica

Interação eletrostática

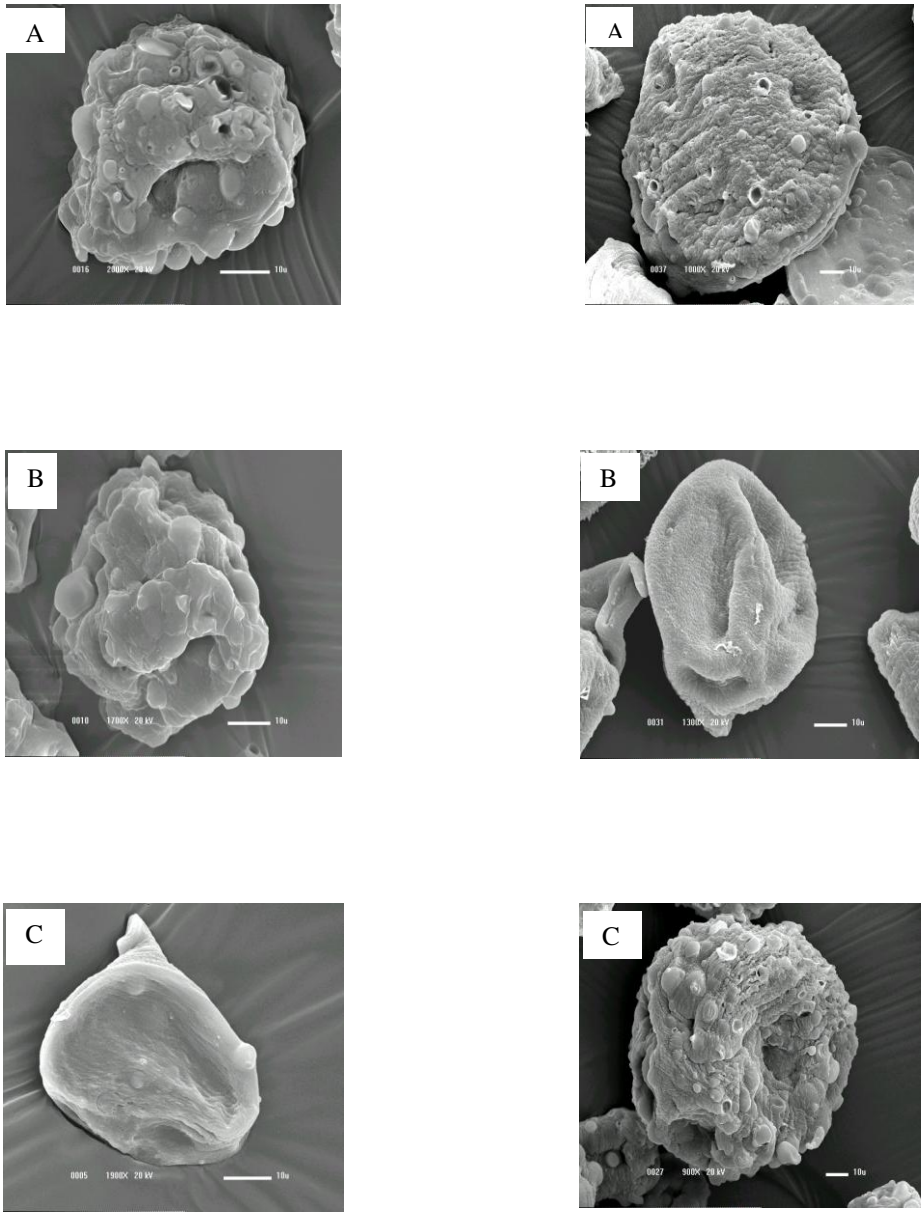


Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica seguidas ou não de recobrimento adicional com solução 4% (m/m) de WPC. A- Micropartículas contendo baixo nível de manteiga fundida. B- Micropartículas contendo nível intermediário de manteiga fundida. C- Micropartículas contendo alto nível de manteiga fundida.

4. CONCLUSÕES

A medição da carga de elétrica disponível mostrou que alginato de sódio em solução ou emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do concentrado proteico do soro do leite em solução apresentam cargas opostas em uma faixa de pH 3,0 - 4,5. O pH 3,75 foi escolhido para produção das micropartículas e ajuste das soluções e emulsões.

O diâmetro médio dos coacervados formados pela mistura entre emulsão e WPC em diferentes proporções tiveram seu valor aumentado até a proporção 1:6 e 1:7 (emulsão:WPC) com posterior diminuição do diâmetro. O aumento da concentração de manteiga não modificou estatisticamente ($p > 0,05$) o tamanho dos coacervados formados pelas misturas entre emulsão e WPC ou misturas entre partículas de gelificação iônica e WPC.

Para produção das micropartículas em pH 3,75 nas condições otimizadas utilizou-se a proporção mássica de uma parte de partículas de gelificação iônica (m) e a quantidade de WPC (m) variou conforme a concentração de manteiga utilizada: 4,35; 4,14 e 4,00 para emulsões contendo nível intermediário, baixo nível e alto nível de manteiga fundida, respectivamente.

Foi possível obter altas quantidades de proteína adsorvida na superfície das micropartículas de gelificação iônica com o aumento da concentração de proteína em solução, sendo que o aumento na concentração de manteiga utilizada provocou uma diminuição na porcentagem de proteína adsorvida sobre as micropartículas. O aumento na concentração de manteiga fundida para 2% (m/m) também provocou um aumento no tamanho das micropartículas de gelificação iônica recobertas com solução 4% (m/m) de WPC.

Micropartículas com elevado teor de umidade, conteúdo proteico acima de 30% e tamanho variando entre 130,0 µm a 161,5 µm puderam ser produzidas pela técnica de

gelificação iônica com recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite.

As micropartículas apresentaram formato próximo ao esférico, com o conteúdo lipídico distribuído por toda extensão da matriz. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas recobertas com solução 4% (m/m) de WPC apresentam rugas em sua superfície, o que pode ser atribuído ao recobrimento da partícula de gelificação iônica com uma camada proteica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Association of official analytical chemistry, **Official Methods of Analysis**, 16th ed., Arlington, v.1-2, 2006.

BEAULIEU, L.; SAVOIE, L.; PAQUIN, P.; SUBIRADE, M. Elaboration and characterization of whey protein beads by an emulsification/cold gelation process: application for the protection of retinol. **Biomacromolecules**, v.3, p.239-248, 2002.

BÉDIÉ, G.K.; TURGEON, S.L.; MAKHLOUF, J. Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.836–844, 2008.

BENICHOU, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v.23, p.93-123, 2002.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNYB, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BROMLEY, E. H. C.; KREBS, M. R. H.; DONALD, A. M. Aggregation across the length-scales in β-lactoglobulin. **Faraday Discussions**, v.128, p.13–27, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.18, p.184–190, 2007.

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

CHO, Y.H.; McCLMENTS, D.J. Theoretical stability maps for guiding preparation of emulsions stabilized by protein-polysaccharide interfacial complexes. **Langmuir**, v.25, n.12, p.6649-6657, 2009.

COOPER, C.L.; DUBIN, P.L.; KAYITMAZER, A.B.; TUKSEN, S. Polyelectrolyte-protein complexes. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v.10, p.52-78, 2005.

DANIEL, S.K. Microparticles and nanoparticles for drug delivery. **Biotechnol Bioeng.**, v.96, p.203–209, 2007.

DE KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.9, p.340–349, 2004.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1606-1617, 2011.

DRAGET, K.I.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.251–256, 2011.

EGAN T.; JACQUIER, J.C.; ROSENBERG, Y.; ROSENBERG, M. Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids. **Food Hydrocolloids***,* 2012, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production, properties and uses of alginates**. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e04.htm. Acesso em fevereiro de 2013.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.194–205, 2012.

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.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D.J. Characterization of β-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.577-585, 2006.

HOAD, C.; RAYMENT, P.; RISSE, V.; COX, E.; CIAMPI, E.; PREGENT, S.; MARCIANI, L.; BUTLER, M.; SPILLER, R.; GOWLAND, P. Encapsulation of lipid by alginate beads reduces bio-accessibility: An in vivo ^{13}C breath test and MRI study. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1190-1200, 2011.

HONG, Y.H.; McCLEMENTS, D.J. Formation of hydrogel particles by thermal treatment of β-Lactoglobulin-Chitosan Complexes. **J. Agric. Food Chem**., v.55, p.5653-5660, 2007.

JONES, O.G.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β-lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1312–1321, 2009.

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.36-43, 2010.

JONES, O.G.; McCLEMENTS, D.J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.167, p.49–62, 2011.

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.

KULMYRZAEV, A.; CHANAMAI, R.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and $CaCl_2$ on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. **Food Research International**, v.33, p.15-20, 2000.

LEFEVRE, T.; SUBIRADE, M. Formation of intermolecular beta-sheet structures: a phenomenon relevant to protein film structure at oil-water interfaces of emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.263, p.59-67, 2003.

LI, Y.; McCLEMENTS, D.J. Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1025-1033, 2011.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298**. International Dairy Journal**, v.16, n.10, p.1190-1195, 2006.

MAO, Y.; McCLEMENTS, D.J. Fabrication of viscous and paste-like materials by controlled heteroaggregation of oppositely charged lipid droplets. **Food Chemistry**, v.134, p.872-879, 2012 a.

MAO, Y.; McCLEMENTS, D.J. Fabrication of reduced fat products by controlled heteroaggregation of oppositely charged lipid droplets. **Food Chemistry**, v.134, p.872-879, 2012 b.

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

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe**. 2003. Dissertação–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.D.; 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.

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.

PONGSAWATMANIT, R.; HARNSILAWAT, T.; McCLEMENTS, D.J. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin. **Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.287, n.1-3, p.59-67, 2006.

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

ROSENBERG, M.; LEE, S.J. Water-insoluble, whey protein–based microspheres prepared by an all–aqueous process. **Journal of Food Science**, v.69, n.1, p.50-58, 2004 b.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine β-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1482, p.136–148, 2000.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein–polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.8, p.689–753, 1998.

SIMSEK-EGE, F.A.; GILLIAN, M.; BOND, G.M.; STRINGER, J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v.88, p.346-351, 2003.

SOUZA, F.N. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

SOUZA, F.N.; GEBARA, C.; RIBEIRO, M.C.; CHAVES, K.S.; GIGANTE, M.L.; GROSSO, C.R.F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v.49, n.1, p.560-566, 2012.

SURH, J.; WARD, L.S.; McCLEMENTS, D.J. Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. **Food Research International**, v.39, p.761–771, 2006.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela. Acesso em fevereiro de 2013.

TOLSTOGUZOV, V.B. Protein-polysaccharide interactions. **Food Science and Technology**, v.80, p.171-198, 1997.

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.

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

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.14, p.377-382, 2008.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C.G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v.4, p.293–303, 2003.

CAPÍTULO 3

IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *ERWINIA* SP. D12 EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONTEÚDOS LIPÍDICOS RECOBERTAS COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

CAPÍTULO 3 - IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE *ERWINIA* SP. D12 EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE SÓDIO COM DIFERENTES CONTEÚDOS LIPÍDICOS RECOBERTAS COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

RESUMO

Células íntegras na forma livre e imobilizada do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 foram avaliadas com relação à conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo durante quatro dias. Contagem inicial de 10^8-10^7 UFC/mL do micro-organismo com atividade enzimática de 10,7 U/mL foi utilizado para imobilização em micropartículas de gelificação iônica utilizando emulsão de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não, por interação eletrostática, com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite. A incorporação de diferentes concentrações de manteiga fundida modificou a atividade enzimática do micro-organismo sendo que uma maior adição de manteiga fundida, 2% (m/m), acarretou em uma maior atividade enzimática (17,68 U/mL). As imagens obtidas por microscopia confocal apontaram uma maior quantidade de células vivas, em relação às células mortas, após o processo de encapsulação no qual houve uma redução de dois ciclos logarítmicos. A adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não influenciou estatisticamente no tamanho médio das micropartículas. Contudo, o recobrimento adicional produziu partículas maiores, quando comparado com o tamanho das micropartículas sem recobrimento. Maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose foram obtidas no primeiro dia de análise empregando células livres ou imobilizadas com os diferentes tratamentos. A taxa de conversão diminuiu no decorrer dos dias sendo observada uma queda mais brusca na conversão utilizando células íntegras livres. As maiores médias de conversão, 33,77% e 35,12%, foram alcançadas utilizando-se respectivamente micropartículas de gelificação iônica sem adição de manteiga e micropartículas de gelificação iônica adicionadas de 2% (m/m) de manteiga fundida, sem diferenças estatísticas entre as mesmas. O recobrimento adicional das micropartículas por interação eletrostática com concentrado proteico do soro do leite acarretou em uma diminuição na taxa de conversão devido provavelmente à

diminuição no tamanho dos poros ou recobrimento total dos mesmos durante o processo de recobrimento limitando a difusão de substrato e produto na micropartícula. O pH utilizado para produção das micropartículas fora da faixa ótima de crescimento do micro-organismo por ter contribuído para os resultados obtidos. Os resultados indicam o potencial de emprego de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em gel de alginato de sódio, sem recobrimento adicional das micropartículas com solução 4% (m/m) de WPC para conversão de sacarose em isomaltulose em processos descontínuos.

1. INTRODUÇÃO

A sacarose é o principal adoçante utilizado na produção de alimentos devido as suas propriedades organolépticas e de textura, no entanto, o consumo excessivo desse açúcar contribui para o aumento da obesidade e cárie dentária. Nas últimas décadas, a produção de edulcorantes substitutos da sacarose tem despertado grande interesse da indústria de alimentos para atender a demanda de consumidores que estão à procura de alimentos que promovam bem-estar associados com a promoção da saúde e redução dos riscos de doenças (KRASTANOV et al., 2006; ORSI; KAWAGUTI; SATO, 2009; KAWAGUITI; SATO, 2011).

A isomaltulose (6-O-α-D-glucopiranosil-D-frutofuranose) é um isômero estrutural da sacarose encontrado naturalmente no mel e cana de açúcar (HUANG; HSU; SU, 1998). Esse dissacarídeo tem sido considerado um substituto em potencial da sacarose devido as suas características físico-químicas e sensoriais bastantes similares a sacarose (KAWAGUTI; SATO, 2008). A isomaltulose é não cariogênica (MINAMI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1991); sua ingestão provoca pequenos efeitos na concentração da glicose e insulina no sangue, sendo seu uso indicando em alimentos destinados a diabéticos e esportistas (KAWAI et al., 1989; KRASTANOV; YOSHIDA, 2003); é muito estável em soluções ácidas, facilitando a manutenção da doçura e sabor em alimentos e bebidas fermentadas (TAKAZOE, 1989; SCHIWECK et al., 1991) e promove seletivamente o crescimento de bifidobactérias na microflora intestinal humana (MIZUTANI, 1989; KASHIMURA; KIMURA; ITOKAWA, 1996). Estudos realizados com ratos não demonstraram efeitos teratogênicos, mutagênicos ou qualquer outro tipo de toxicidade da isomaltulose (LINA; PROOIJE; WAALKENS-BERENDSEN, 1997).

A conversão microbiana da sacarose em isomaltulose, através da enzima intracelular glicosiltransferase, tem despertado grande interesse comercial uma vez que a síntese química do isômero é muito difícil. Um pequeno número de bactérias são capazes de produzir a enzima glicosiltransferase, que transforma a sacarose em isomaltulose, entre elas: *Protaminobacter rubrum* (SHARPE; STODOLA; KOEPSELL, 1960; KAKINUMA;

YUASA; HASHIMOTO, 1998; OLIVA-NETO; MENÃO, 2009), *Klebsiella sp* (PARK; UEKANE; SATO, 1996; HUANG; HSU; SU, 1998; LI et al., 2003; ORSI; KAWAGUTI; SATO, 2009), *Serratia plymuthica* (VERONESE; PERLOT, 1999; KRASTANOV; YOSHIDA, 2003), *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM; GARRETT; CLARK, 1984; MUNDRA; DESAI; LELE, 2007) e *Erwinia* sp. D12 (MORAES et al., 2005; KAWAGUTI; MANRICH; SATO, 2006; KAWAGUTI; SATO, 2007 a e b; KAWAGUTI et al., 2010).

Na indústria de alimentos, a conversão da sacarose ocorre utilizando células imobilizadas (CHEETHAM; GARRETT; CLARK, 1984; KRASTANOV; YOHIDA, 2003). Entre os métodos de imobilização utilizados, o mais bem sucedido é o aprisionamento das células em esferas de alginato por apresentar as vantagens de ser uma técnica barata, simples e reprodutível (CORCORAN, 1983; SALTER; KELI, 1991).

A utilização de células imobilizadas oferece proteção à enzima das condições desfavoráveis do ambiente externo, tais como oxigênio, pH e em alguns casos temperatura. Industrialmente, a imobilização oferece vantagens, tais como custos mais baixos devido à possibilidade de reutilizar o biocatalisador, relativa facilidade de separação do produto, adequação para processos com fluxo contínuo e redução dos riscos de contaminação (OLIVEIRA et al., 1997; PARK; CHANG, 2000; KOURKOUTAS et al., 2004).

Uma das estratégias adotadas para melhorar a retenção do material encapsulado tem sido a adição de lipídeos a solução a ser encapsulada. Resultados mostram um aumento na retenção do material encapsulado durante a produção das micropartículas (LANDON; LEVINE; JONES, 1984; MUKAI-CORREA et al., 2004). Em processos de imobilização da enzima glicosiltransferase bruta, a adição de 2% de gordura (manteiga e ácido oléico na proporção 1:1, m:m) contribuiu para a manutenção da atividade enzimática durante a conversão de sacarose em isomaltulose (CONTESINI et al., 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo utilizando células íntegras na forma livre e imobilizada da bactéria *Erwinia* sp. D12 durante quatro dias. A imobilização do micro-organismo ocorreu em micropartículas de gelificação iônica utilizando emulsões de

alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foram utilizados: Alginato MANUGEL DMB (FMC BioPolymer, Brasil, Lote: G4200301), Concentrado proteico do soro do leite (Lacprodan- Arla Foods Ingredientes, Argentina, lote: 804A12701), Manteiga comum comercial sem adição de sal (Aviação, São Sebastião do Paraíso- MG, Brasil), Cloreto de cálcio (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil, P.M: 110,99), Ácido clorídrico 0,1 N (Merk, Alemanha); Hidróxido de sódio 0,2 N (Nuclear, Diadema-SP, Brasil, P.M:40), Citrato de sódio (Synth, Diadema-SP), anti-espumante Dow Corning® FG-10 (D'altomare Química, São Paulo, SP, BR), sacarose (Synth, Diadema-SP), frutose, glicose, sacarose e isolmaltulose (Sigma Ultra®, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Micro-organismo e manutenção da cultura

A linhagem de *Erwinia* sp. D12 produtora da enzima glicosiltransferase, foi utilizada neste trabalho. O micro-organismo foi isolado no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. A cultura foi cultivada em tubos de meio de cultivo inclinados, composto por 6% de sacarose, 4% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de ágar por 15 horas, a 30 °C. Em seguida adicionou-se vaselina estéril e os tubos foram armazenados a 5 °C com repicagem a cada dois meses.

2.2.2. Pré-inóculo, fermentação e produção de massa celular

A cultura da linhagem de *Erwinia* sp. D12, descrita no item 2.2.1, foi pré-inoculada em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo composto por 6% de sacarose, 4% de peptona e 0,4% de extrato de carne. Os frascos foram incubados em incubador com agitação New Brunswick Scientific Series 25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), a 200 rpm, por 24 horas, a 30 °C. Posteriormente, alíquotas de 5 mL foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 95 mL do mesmo meio de cultivo estéril que foram incubados sob agitação a 200 rpm, por 24 horas, a 30 °C.

Uma alíquota de 300 mL do pré-inóculo, preparado como descrito anteriormente, e 3 mL de anti-espumante Dow Corning® FG-10 foram adicionados assepticamente em fermentador de 6,6 litros New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) contendo 2.700 mL de meio de cultivo descrito anteriormente. A fermentação foi realizada a 26 ºC, na qual a agitação e a aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 1 vvm (volume de ar/volume de meio de cultivo/minuto), respectivamente, por 16 horas.

Para a recuperação da massa celular, o meio de cultivo passou por centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos, a 5 °C em centrífuga Hitachi (Himac modelo CR 21 G II, Tóquio, Japão). A massa celular obtida foi lavada duas vezes com água destilada para obtenção da massa celular.

2.2.3. Produção de micropartículas de alginato por gelificação iônica revestidas com concentrado proteico do soro do leite por interação eletrostática

2.2.3.1. Produção de micropartículas por gelificação iônica

Solução contendo 2% (m/m) de alginato de sódio foi preparada sob agitação constante para completa dissolução do biopolímero. As concentrações de manteiga fundida 0%, 0,04% (baixo nível de manteiga fundida), 1% (nível intermediário de manteiga fundida) e 2% (m/m) (alto nível de manteiga fundida) foram adicionadas nas soluções de

alginato e, em seguida, homogeneizadas em homogenizador Ultra turrax (IKA modelo T18, Works do Brasil) a 14000 rpm por 3 minutos. Sequencialmente, adicionou-se 2% (m/m) do concentrado celular de *Erwinia* sp. D12. A emulsão foi homogeneizada novamente a 10000 rpm por 2 minutos. As emulsões resultantes foram atomizadas sobre soluções de cloreto de cálcio 2% (m/v) com pH ajustado para 3,75 e agitação constante. Para atomização, foi utilizado um bico atomizador duplo fluido de 1 mm de diâmetro, altura de 12 cm entre o bico e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 0,125 kgf/cm^2 e bomba peristáltica com velocidade de 556 mL/hora, que conduziu as emulsões até o bico atomizador. Durante a atomização, as emulsões permaneceram sob agitação constante.

Após a atomização, as micropartículas foram mantidas por 30 minutos sob agitação magnética constante para realização da cura das micropartículas. Em seguida, foram recolhidas em peneiras de malha de aço com diâmetro de 53 µm, imersas durante 5 minutos em água deionizada com pH ajustado para 3,75, novamente escorridas e lavadas consecutivamente com água destilada e deionizada com pH ajustado para 3,75 para remoção do excesso de cloreto de cálcio.

2.2.3.2. Produção de micropartículas recobertas com proteína

Micropartículas úmidas produzidas de acordo com o item 2.2.3.1 foram pesadas e 100 gramas foram transferidas para solução de WPC na concentração 4% (m/m) de proteína com pH previamente ajustado para 3,75, com solução de HCl 0,1 N, onde permaneceram por 30 minutos, em agitação magnética. Posteriormente, as partículas foram recolhidas em peneiras de malha de aço com diâmetro de 53 µm e lavadas com água destilada e deionizada com o pH corrigido para 3,75 para remoção do excesso de WPC.

Todas as etapas de produção das micropartículas descritas nos intens 2.2.3.1 e 2.2.3.2 foram realizadas a temperatura ambiente. A produção das micropartículas foi

conduzida em ambiente asséptico e todos os materiais de laboratório utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (121 °C/15 minutos).

2.2.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho ($D_{0.5}$)

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas úmidas (recém-processadas), foram medidos no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.), unidade de amostragem Hydro 2000S utilizando água destilada e deionizada como material dispersante para fazer a leitura das amostras. As micropartículas foram suspensas em água com pH corrigido para 3,75, mesmo pH usado para as leituras. A leitura foi realizada adicionando-se a amostra dentro na unidade de amostragem, preenchida com água. A quantidade de amostra adicionada sofreu variação de amostra para amostra, sempre atingindo a obscuração mínima exigida pelo equipamento.

2.2.5. Secagem das micropartículas

Parte das micropartículas produzidas foram secas em liofilizador Edwards Pirani 501, conforme as condições estabelecidas por Mukai-Corrêa (2003): temperatura inicial: - 40 °C, temperatura final: 25 °C/2 horas, tempo total do ciclo de secagem: 48 horas e pressão: 0,1 mmHg. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração.

2.2.6. Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada por microscopia óptica (MO) em microscópio óptico (JENAVAL, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) 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*.

A morfologia das micropartículas liofilizadas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através do microscópio eletrônico de varredura modelo JMS – 5800 LV, com uma aceleração de voltagem de 20 kV. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (210 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Liechtensten).

2.2.7. Determinação da atividade da glicosiltransferase

A atividade da enzima glicosiltransferase em células livres, após de 16 horas de fermentação, e imobilizadas foi determinada através do aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose, como descrito por Uekane (1993), com modificações. A mistura de 450 µL da solução de sacarose 10% (p/v) em solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 6,3 e 50 µL de solução enzimática foi incubada a 35 °C por 20 minutos.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945). Utilizou-se um "branco" substituindo-se a enzima por água destilada na mistura de reação. Uma unidade de atividade enzimática de glicosiltransferase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de isomaltulose/minuto/mL de enzima sob as condições de ensaio estabelecidas.

Para determinação da atividade enzimática, células íntegras livres e imobilizadas foram previamente rompidas em ultrasonicador (Biosonik IV, Bronwill, Rochester, NY) por 40 segundos para lise celular, sendo esse procedimento repetido três vezes.

2.2.8. Contagem dos micro-organismos em placa

A viabilidade dos micro-organismos na forma livre e encapsulada foi determinada por meio da contagem de células viáveis em placa utilizando meio de cultura composto por 2% sacarose, 4% peptona, 0,4% extrato de carne e 2% ágar. As placas foram incubadas a 30 °C por 15 horas.

Antes da contagem dos micro-organismos encapsulados, 5 gramas de partículas com os diferentes tratamentos foram previamente desfeitas utilizando uma solução 3% (m/m) de citrato de sódio.

2.2.9. Viabilidade dos micro-organismos por microscopia confocal

Para avaliar a viabilidade dos micro-organismos encapsulados por microscopia confocal, 10 mg de micropartículas contendo 2% (m/m) de manteiga fundida e 2% (m/m) do concentrado celular sem recobrimento com solução 4% (m/m) de WPC foram pesadas na qual adicionou-se 1 mL de água destilada e deionizada com pH corrigido para 3,75 seguido de agitação em agitador de tubos Lab Dancer (IKA, Works do Brasil). A suspensão das micropartículas foi adicionado 3 µL de uma preparação de corantes fluorescentes do Kit comercial Live/Dead *Bac*Light™ (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.) seguido de nova agitação com posterior repouso, na ausência de luz, por 30 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio confocal (Leica, modelo TCS SP5 II, Wetzlar, Germany) utilizando objetiva de 63 x.

O kit Live/Dead BacLight é composto por dois marcadores: SYTO® 9, ácido nucleico com fluorescência verde e iodeto de propídio, ácido nucleico com fluorescência vermelha. O SYTO® 9 consegue penetrar na parede celular de células vivas e mortas. Contudo, o iodeto de propídio penetra apenas em células que apresentam membranas danificadas, reduzindo o SYTO® 9, que perde a fluorescência, quando os dois corantes estão presentes. Com isso é possível avaliar a diferenciação entre de células viáveis e não

viáveis através de observação microscopia em microscópio de fluorescência ou microscopio confocal. Células com membranas intactas refletem coloração verde enquanto células com membranas danificadas refletem a coloração vermelha.

2.2.10. Conversão de sacarose em isomaltulose

Para análise da conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo, 20 gramas de partículas de gelificação iônica contendo 2% (m/m) do micro-organismo *Erwinia* sp. D12, recobertas ou não com solução proteica 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite, foram adicionadas em Erleynmeyer contendo 100 mL de uma solução 35% (m/v) de sacarose. Os frascos foram incubados em incubador com agitação New Brunswick Scientific Series 25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), a 150 rpm, por 4 dias, a 30 °C. A cada 24 horas, as soluções foram filtradas, com a retirada de uma alíquota para análise de carboidratos e uma nova solução de sacarose 35% foi adicionada nos frascos. A conversão de sacarose em isomaltulose foi estudada em triplicatas independentes.

2.2.11. Análise de carboidratos

Os carboidratos formados durante a conversão enzimática foram analisados em triplicatas independentes em cromatógrafo de íons DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPac^{TM} PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac^{TM} PA 1 (4 mm x 50 mm), e como fase estacionária uma solução de hidróxido de sódio 20 mM, com fluxo de 1 mL/min, a 20 °C. A análise dos carboidratos produzidos foi realizada por comparação, através do tempo de retenção, dos padrões de frutose, glicose, sacarose e isomaltulose.

2.2.12. Análise estatística

O cálculo da análise de variância, ANOVA, foi realizado pelo programa estatístico SAS versão 9.2 e as comparações entre os valores das médias foram avaliadas de acordo com o teste TUKEY, considerando um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Contagem em placa dos micro-organismos e atividade enzimática

O concentrado celular de *Erwinia* sp. D12 apresentou uma contagem em placa variando de 10^8-10^7 UFC/mL. Durante a produção das micropartículas por gelificação iônica, houve uma redução de dois ciclos logarítmicos variando a contagem entre 10^6-10^5 UFC/g. A etapa de recobrimento das micropartículas por interação eletrostática com solução proteica 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite não alterou a contagem dos micro-organismos.

Gebara et al. (2013) empregando técnica de encapsulação similar à desse estudo aprisionaram o micro-organismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* La5 utilizando pectina amidada de baixo teor de metoxilação e manteiga fundida com posterior recobrimento das micropartículas formadas com concentrado proteico do soro do leite tratado e não tratado termicamente. Os autores obtiveram uma contagem, antes do processo de encapsulação, de 10^{10}-10^9 UFC/mL, resultado próximo ao encontrado no concentrado celular de *Erwinia* sp. D12. Depois do processo de encapsulação, os autores obtiveram uma contagem de 10^8 UFC/g, com redução de 1 ou 2 ciclos logarítmicos. Através dos resultados encontrados no trabalho de Doherty et al. (2011), os autores constataram que o processo de encapsulação do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GG por extrusão não apresentou efeito prejudicial na viabilidade celular.

O concentrado celular apresentou atividade enzimática média de 10,7 U/mL ± 0,42 após 16 horas de fermentação a 26 °C. Valor próximo foi encontrado por Kawaguti;

Manrich e Sato (2006) que obtiveram atividade enzimática de 14,6 U/mL para *Erwinia* sp. D12 após 10 horas de fermentação a 26 °C em meio de cultura composto por melaço de cana, peptona bacteriológica e extrato de levedura. Utilizando o mesmo micro-organismo, Moraes et al. (2005) relataram uma atividade de 15,61 U/mL após 8 horas de fermentação a 30 °C. Após 12 horas de fermentação a 30 °C, Orsi et al. (2009) obtiveram uma atividade enzimática de 9,94 U/mL para *Klebsiella* sp. K18.

Com relação à atividade enzimática do micro-organismo encapsulado, a mesma variou conforme a concentração de manteiga fundida adicionada: 9,04 U/mL ± 1,32 para micropartículas contendo baixo nível de manteiga fundida, 6,15 U/mL ± 1,11 para micropartículas contendo nível intermediário de manteiga fundida e 17,68 U/mL ± 1,81 para micropartículas contendo alto nível de manteiga fundida. Não houve diferença estatística, ao nível de 5% de significância, durante a medição da atividade enzimática do micro-organismo imobilizado em micropartículas de alginato de sódio recobertas com solução 4% (m/m) de WPC, quando comparado com micropartículas sem recobrimento.

Analisando os resultados encontrados da atividade enzimática do micro-organismo imobilizado, pode-se constatar que adição de alto nível de manteiga fundida, 2% (m/m), contribuiu para uma maior atividade da enzima glicosiltransferase durante o processo de imobilização celular. Resultado semelhante foi encontrado por Contesini et al. (2012) que relataram que a presença de 2% (m/m) de uma mistura entre manteiga e ácido oléico foi importante para retenção da atividade da enzima glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina de baixo teor de metoxilação.

3.2. Distribuição de tamanho das micropartículas

A distribuição do tamanho das micropartículas de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em gel de alginato de sódio adicionadas de diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não com solução 4% (m/m) de concentrado proteico do soro do leite foi determinada conforme o item 2.2.4 e encontra-se apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Tamanho médio das micropartículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC.

	Tamanho (µm)	
Micropartículas	**Gelificação iônica**	**Interação eletrostática**
Part. Alg + MO	93,92 ± 11,30 ^{Ab}	131,53 ± 8,22 ^{Aa}
Part. EBN + MO	82,62 ± 3,62 ^{Ab}	132,56 ± 10,58 ^{Aa}
Part. ENI + MO	106,52 ± 23,13 ^{Ab}	143,12 ± 15,04 ^{Aa}
Part. EAN + MO	91,54 ± 8,40 ^{Ab}	118,34 ± 10,38 ^{Aa}

*Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$). Part. Alg + MO- Micropartículas sem acréscimo de manteiga fundida adicionadas de 2% (m/m) de células íntegras de *Erwinia* sp. D12. Part. EBN + MO Micropartículas contendo baixo nível de manteiga fundida adicionadas de 2% (m/m) de células íntegras de *Erwinia* sp. D12. Part. ENI + MO- Micropartículas contendo nível intermediário de manteiga fundida adicionadas de 2% (m/m) de células íntegras de *Erwinia* sp. D12. Part. EAN + MO- Micropartículas contendo alto nível de manteiga fundida adicionadas de 2% (m/m) de células íntegras de *Erwinia* sp. D12.

Pode-se observar pela análise da Tabela 7 que a adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não influenciou estatisticamente ($p > 0,05$) o tamanho médio das micropartículas. As micropartículas de gelificação iônica adicionadas de diferentes concentrações de manteiga apresentaram tamanho médio variando entre 82,62 µm – 106,52 µm. Após o revestimento das micropartículas com solução 4% (m/m) de WPC, o tamanho variou de 118,34 µm – 143,12 µm indicando que o recobrimento produziu micropartículas maiores com diferença estatística de tamanho ($p < 0,05$), quando comparadas com micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento.

Contesini et al. (2012) relataram um tamanho médio de 173 ± 88 µm para micropartículas contendo a enzima glicosiltransferase imobilizada por gelificação iônica em gel de pectina de baixo teor de metoxilação. Um aumento no tamanho da micropartícula (196 ± 88 µm) foi observado pelos autores após a adição de 2% (m/m) de conteúdo lipídico, o que foi atribuído ao confinamento do material lipídico no interior das micropartículas. As diferenças de tamanho encontrados no estudo de Contesini et al. (2012) e no presente trabalho podem ser decorrentes da utilização de biopolímeros diferentes.

Doherty et al., (2011) relataram um tamanho de 200 µm ao encapsular *Lactobacillus rhamnosus* GG utilizando pulverizador eletrostático e isolado proteico do soro do leite como material de parede. Tamanhos de partículas maiores foram obtidos por Mundra; Desai e Lele (2007) e Kawaguti et al., (2010). Esses autores relataram variação de tamanho entre 2,25-3 mm de diâmetro utilizando células íntegras de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 e *Erwinia* sp. D12, respectivamente e empregando diferentes materiais de parede no processo de encapsulação. Neste caso, os autores utilizaram agulhas, seringa ou dispositivos semelhantes de deslocamento positivo para fabricação das partículas.

Variações no tamanho das partículas formadas podem ter sido devido ao tipo e concentração do polímero utilizado, concentração do material de recheio, técnica de encapsulação empregada e tipo de pulverizador (JONES; McCLEMENTS, 2010; CHAN, 2011; STRASDAT; BUNJES, 2013).

3.3. Morfologia e microestrutura

Através da microscopia óptica (Figura 10), foi possível observar a morfologia e estrutura interna das micropartículas úmidas estudadas. Em sua maioria, as micropartículas apresentaram formato próximo ao esférico, com o conteúdo lipídico e micro-organismos distribuídos por toda extensão da matriz. Variações no conteúdo lipídico confinado na matriz foram verificadas com o aumento da concentração de manteiga fundida utilizada.

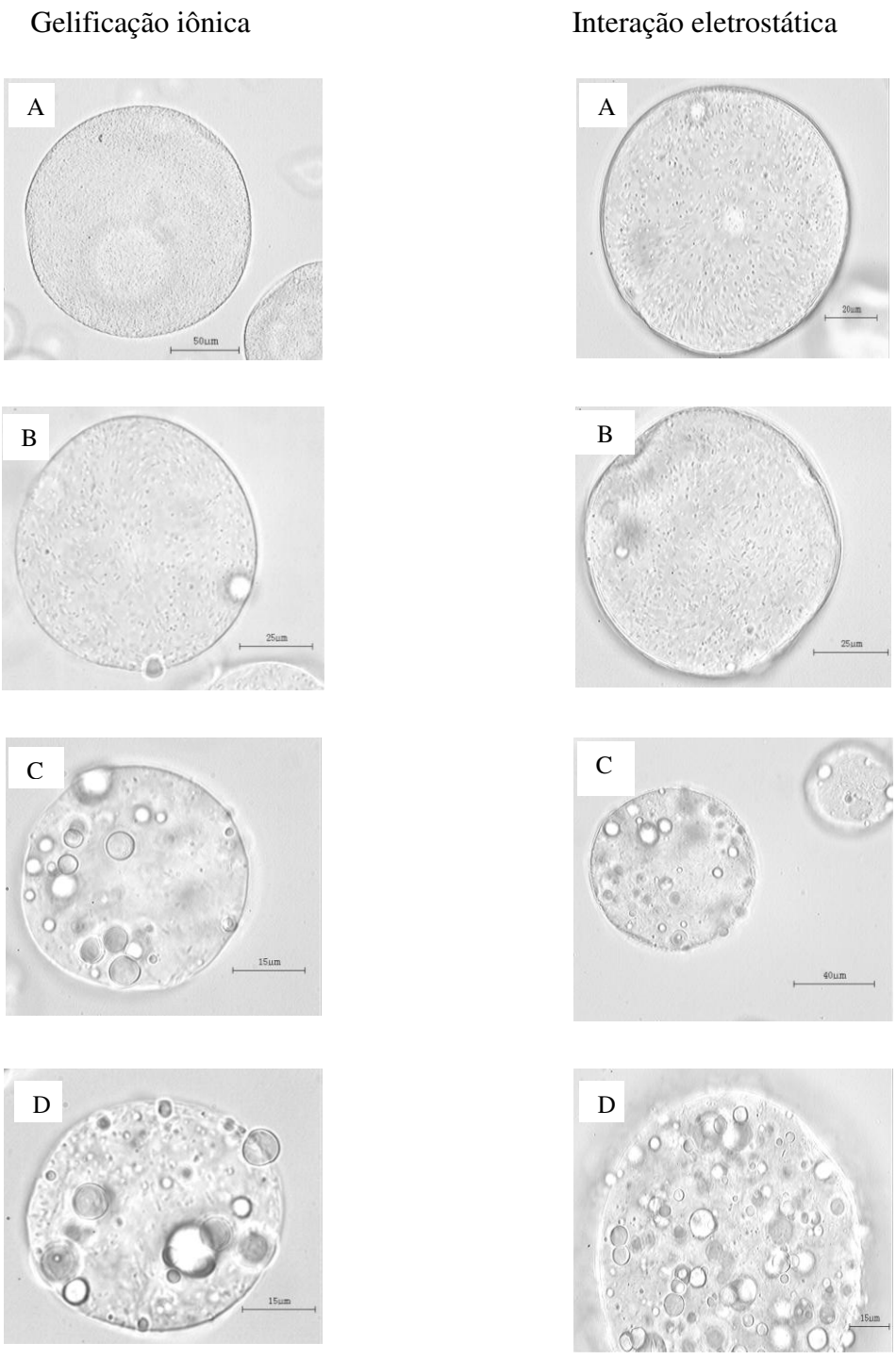


Figura 10 - Microscopia óptica das micropartículas úmidas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 seguidas ou não de recobrimento com solução 4% (m/m) de WPC por interação

eletrostática. A- Micropartículas sem adição de manteiga fundida; B- Micropartículas com 0,04% (m/m) de manteiga fundida, C- Micropartículas com 1% (m/m) de manteiga fundida, D- Micropartículas com 2% (m/m) de manteiga fundida.

Após a secagem por liofilização, as micropartículas foram avaliadas com relação a sua morfologia de superfície por microscopia eletrônica de varredura (Figura 11). Nas imagens obtidas, pode-se constatar que as micropartículas recobertas com solução 4% (m/m) de WPC apresentam rugas em sua superfície, o que pode ser atribuído à camada proteica de recobrimento da micropartícula de gelificação iônica. Ao avaliar a conformação das micropartículas sem manteiga e micropartículas com manteiga, pode-se concluir que a adição de manteiga fundida contribuiu para manutenção da forma esférica das partículas durante o processo de liofilização.

Gelificação iônica

Interação eletrostática

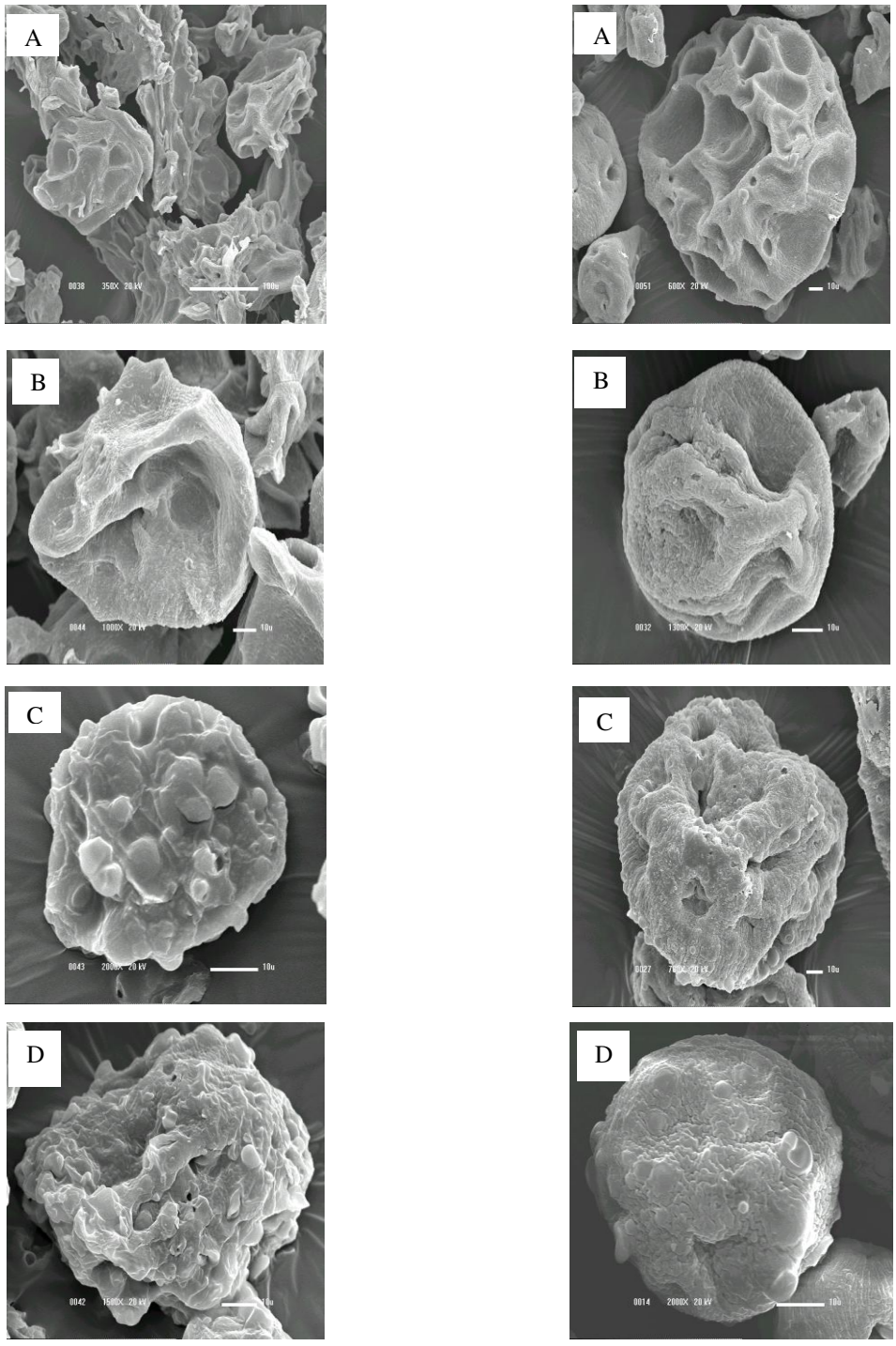


Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de células íntegras do micro-organismo *Erwinia*

sp. D12 seguidas ou não de recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC. A- Micropartículas sem adição de manteiga fundida, B- Micropartículas com 0,04% (m/m) de manteiga fundida, C- Micropartículas com 1% (m/m) de manteiga fundida, D- Micropartículas com 2% (m/m) de manteiga fundida.

Ampliando as imagens obtidas por microscopia óptica e eletrônica de varredura (Figuras 10 B e 11 C), pode-se observar a presença do micro-organismo encapsulado na micropartícula. A bactéria *Erwinia* sp. D12 apresentou-se na forma de bastonete com tamanho de aproximadamente 1 µm (Figura 12).

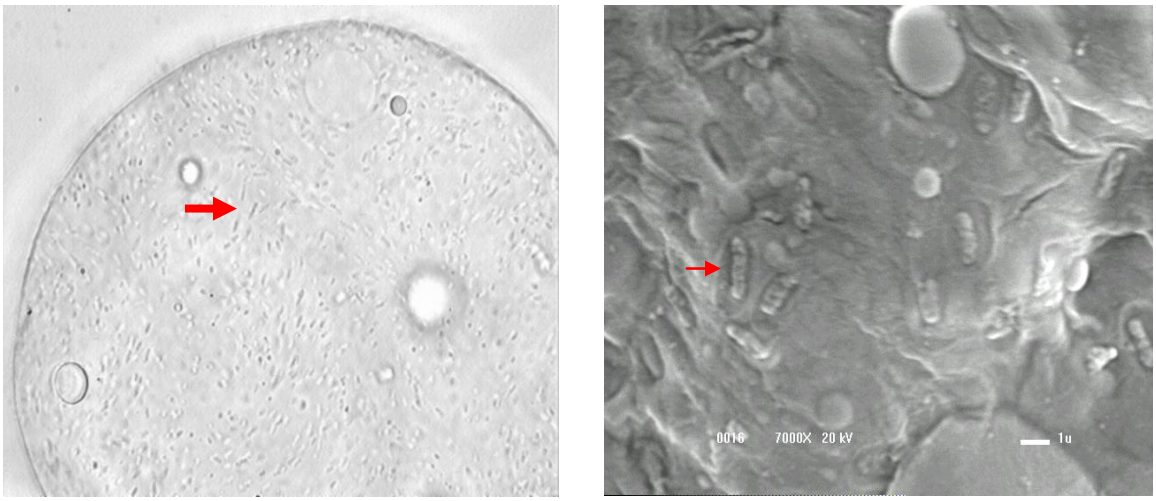


Figura 12 - Ampliação das imagens referentes às Figuras 10 B e 11 C obtidas por microscopia óptica e eletrônica de varredura de micropartículas contendo 2 % (m/m) de células íntegras de *Erwinia* sp. D12.

3.4. Conversão de sacarose em isomaltulose por células livres e imobilizadas com diferentes tratamentos

O estudo da conversão da sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por quatro dias utilizando células livres de *Erwinia* sp. D12 e imobilizadas em gel de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida (Figura 13 A) e células livres de *Erwinia* sp. D12 e imobilizadas em gel de alginato de cálcio revestidas com solução 4% (m/m) de WPC (Figura 13 B) foi realizado como descrito nos ítens 2.2.10 e 2.2.11. Os resultados encontram-se expressos como médias de triplicatas independentes.

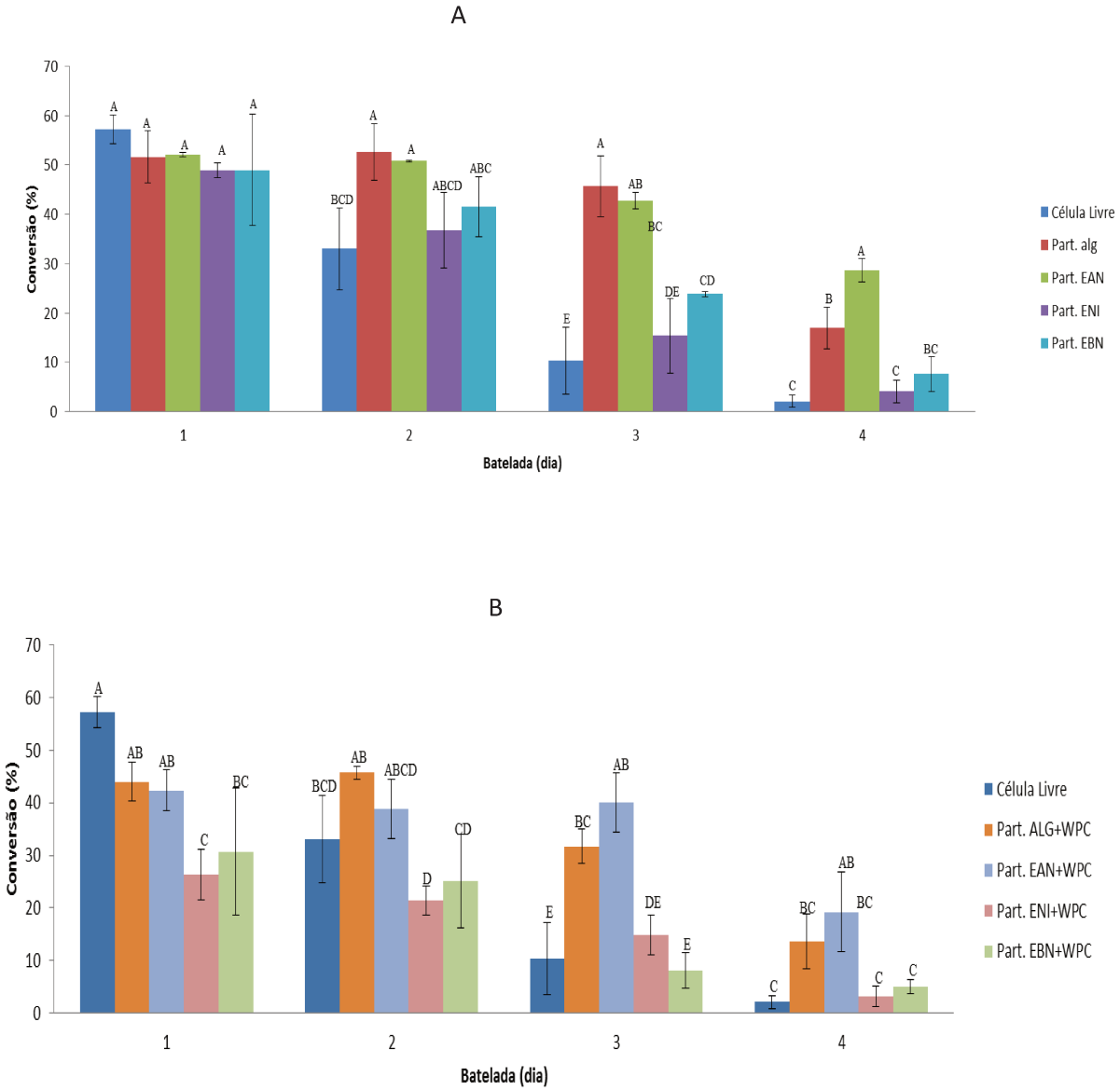


Figura 13 - Conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por 4 dias. A- Célula livre e célula íntegra imobilizada em micropartícula de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida. B- Célula livre e célula íntegra imobilizada em micropartículas de gelificação iônica com diferentes concentrações de manteiga fundida seguidas de recobrimento por interação eletrostática com solução de 4% de WPC. Part. Alg – Micropartículas de gelificação iônica sem acréscimo de manteiga fundida. Part. EAN - Micropartículas de gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida (2%). Part. ENI – Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida (1%). Part. EBN - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida, (0,04%). Part. Alg + WPC - Micropartículas sem acréscimo de manteiga fundida recobertas com solução 4% de WPC. Part. EAN + WPC - Micropartículas de

gelificação iônica contendo alto nível de manteiga fundida (2%) recobertas com solução 4% de WPC. Part. ENI + WPC – Micropartículas de gelificação iônica contendo nível intermediário de manteiga fundida (1%) recobertas com solução 4% de WPC. Part. EBN + WPC - Micropartículas de gelificação iônica contendo baixo nível de manteiga fundida (0,04%) recobertas com solução de 4% de WPC.

A maior taxa de conversão de sacarose em isomaltulose foi verificada no primeiro dia de análise (Figura 13 A), não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) na conversão empregando células livres ou imobilizadas em gel de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida. A taxa de conversão de sacarose em isomaltulose no primeiro dia variou de 48,94% ± 1,58 a 57,25% ± 2,90. A partir do segundo dia, a porcentagem de conversão utilizando células livres diminuiu drasticamente, com o decorrer dos dias, chegando a 2,06% ± 1,21 no quarto dia, enquanto que a taxa de conversão utilizando células imobilizadas apresentou decréscimo menos drástico. No quarto dia, a conversão de sacarose em isomaltulose variou de 28,64% ± 2,40 a 4,07% ± 2,35 utilizando células imobilizadas em gel de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida (Figura 13 A).

A conversão utilizando células imobilizadas sem acréscimo de manteiga e células imobilizadas adicionando 2% (m/m) de manteiga fundida, ambas sem recobrimento adicional, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) até o terceiro dia (Figura 13 A). A média aritmética de conversão durante os quatro dias de análise dessas duas micropartículas também não apresentaram diferenças estatísticas sendo de 41,74% ± 3,50 e 43,65% ± 1,01, para micropartículas sem acréscimo de manteiga e micropartículas adicionadas de 2% (m/m) de manteiga fundida, respectivamente. Valores médios de conversão mais baixos variando de 28,76% ± 6,01 a 30,5% ± 3,32 foram obtidos durante os quatro dias de análise por células contendo 1% e 0,04% (m/m) de manteiga fundida, respectivamente.

Kawaguti e Sato (2007 a) também encontraram maiores taxas de conversão de sacarose em palatinose durante a primeira batelada (24 horas) em processo descontínuo utilizando células íntegras de *Erwinia* sp. D12 (64,6%), células rompidas (62,6%) e extrato

enzimático (43,1%) imobilizadas por extrusão empregando alginato de cálcio com material de parede. Com o decorrer das bateladas, as taxas de conversão diminuiram rapidamente, principalmente para imobilização de células rompidas ou extrato enzimático, o que foi atribuído à inativação da enzima glicosiltransferase durante a sonicação celular (180 W por 40 segundos). Outra hipótese abordada pelos autores, é que durante a imobilização utilizando células íntegras, a enzima intracelular torna-se mais protegida das condições desfavoráveis e variações no ambiente externo, tais como temperatura e pH.

Conversões de sacarose em isomaltulose acima de 50% foram obtidas por Li et al., (2003), Moraes et al., (2005), Oliva-Neto e Menão, (2009) e Kawaguti et al., (2010) utilizando os micro-organismos *Klebsiella* sp. LX 3, *Protaminobacter rubrum* e *Erwinia* sp. D12, respectivamente, imobilizadas em alginato ou quitosana. Parâmetros como pH (5,5 - 6,6), temperatura (30 °C - 35 °C) e concentração de sacarose (10% - 70%) sofreram variação nos referentes trabalhos.

Ao comparar a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres e células íntegras imobilizadas em gel de alginato de sódio seguidas de recobrimento com solução 4% (m/m) de WPC por quatro dias (Figura 13 B), pode-se observar que a taxa de conversão empregando células livres ou imobilizadas foi maior no primeiro dia de análise apresentando valores de 26,40% ± 4,80 a 57,25% ± 2,90. Com o decorrer dos dias, uma diminuição mais drástica foi observada com a utilização de células livres (Figura 13 B).

As maiores médias aritméticas nas taxas de conversão, durante os quartos dias de análise, foram obtidas empregando células imobilizadas sem acréscimo de manteiga com recobrimento adicional das micropartículas (33,77% ± 4,10) e células imobilizadas contendo 2% (m/m) de manteiga fundida recobertas com solução 4% (m/m) de WPC (35,12% ± 1,10), sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os resultados encontrados. Valores médios de conversão mais baixos foram obtidos por células contendo 1% e 0,04% (m/m) de manteiga fundida, 16,47% ± 2,06 e 17,23% ± 4,60, respectivamente (Figura 13 B).

Comparando-se a conversão de sacarose em isomaltulose empregando células sem e com recobrimento com solução 4% (m/m) de WPC (Figura 13 A e B, respectivamente),

constatou-se que as células imobilizadas com posterior recobrimento apresentaram menores taxas de conversão, independente da concentração de manteiga fundida utilizada. O resultado encontrado pode ser atribuído à modificação na porosidade da micropartícula após o revestimento. Apesar de conferir uma proteção adicional ao material encapsulado das condições adversas do meio externo (BERGER et al., 2004; CHO; McCLEMENTS, 2009; PATIL et al., 2010), o recobrimento modificou a porosidade apresentada pelas micropartículas formadas pela técnica de gelificação iônica. Com a diminuição do tamanho dos poros ou recobrimento total dos mesmos, a difusão de substrato e produto na micropartícula pode ter sido prejudicada.

Outra hipótese que poderia justificar esses resultados está na faixa de pH ótimo de crescimento do micro-organismo. Os trabalhos de Kawaguti, (2003), Moraes et al., (2005), Kawaguti, Buzzato e Sato, (2007), Kawaguti e Sato, (2007 b) e Kawaguti et al., (2010) apontam valores de pH variando entre 5,5-7,5 como ótimo para o crescimento do micro-organismo *Erwinia* sp. D12. Entretanto, nesses valores de pH, os biopolímeros utilizados para produção das micropartículas apresentam-se carregados negativamente, impossibilitando a interação eletrostática entre os mesmos. Pelas análises de atividade enzimática, contagem em placa e viabilidade, pode-se observar que mesmo utilizando um valor de pH fora da faixa de crescimento ótimo do micro-organismo, pH 3,75, houve um bom crescimento do micro-organismo que resultou em boa conversão de sacarose em isomaltulose.

Embora a taxa de conversão de sacarose em isomaltulose diminua com o tempo, os resultados indicam o potencial de emprego de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em gel de alginato de sódio, sem recobrimento adicional das micropartículas para a conversão de sacarose em isomaltulose em processos descontínuos. A concentração de manteiga fundida utilizada modificou a taxa de conversão de sacarose em isomaltulose durante os dias de análise.

Após a conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por quatro dias, a morfologia das micropartículas com os diferentes tratamentos (Figura 14) permaneceu íntegra, mantendo o formato próximo ao esférico.

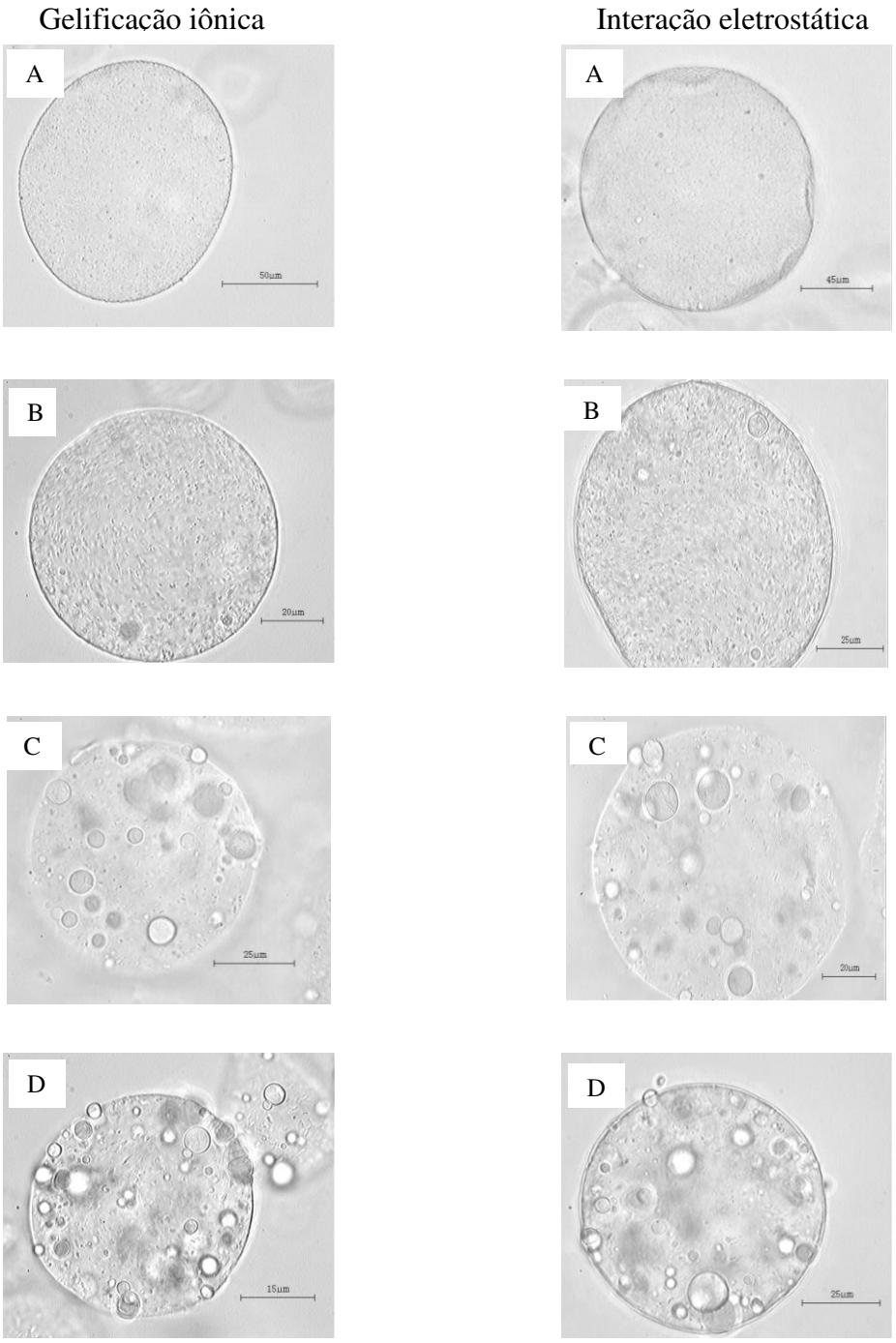


Figura 14 - Microscopia óptica das micropartículas produzidas por gelificação iônica contendo 2% (m/m) de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 seguidas ou não de recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC após conversão de sacarose em isomaltulose em processo descontínuo por 4 dias. A-

Micropartículas sem adição de manteiga fundida, B- Micropartículas com 0,04% (m/m) de manteiga fundida, C- Micropartículas com 1% (m/m) de manteiga fundida, D- Micropartículas com 2% (m/m) de manteiga fundida.

3.5. Viabilidade microbiológica avaliada por microscopia confocal dos micro-organismos imobilizados

A viabilidade das células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em gel de alginato de sódio contendo 2% (m/m) de manteiga fundida sem recobrimento adicional foi observada de forma subjetiva por microscopia confocal utilizando o kit comercial live/dead *Bac*Light. A Figura 15 apontou uma maior quantidade de células vivas (corante verde. Figura 15 A) em relação à quantidade de células mortas (corante vermelho. Figura 15 B). Esse resultado confirma a contagem em placa indicando que o processo de encapsulação não promoveu grandes reduções na contagem e viabilidade do micro-organismo. A figura 15 C apresenta a sobreposição dos dois corantes utilizados.

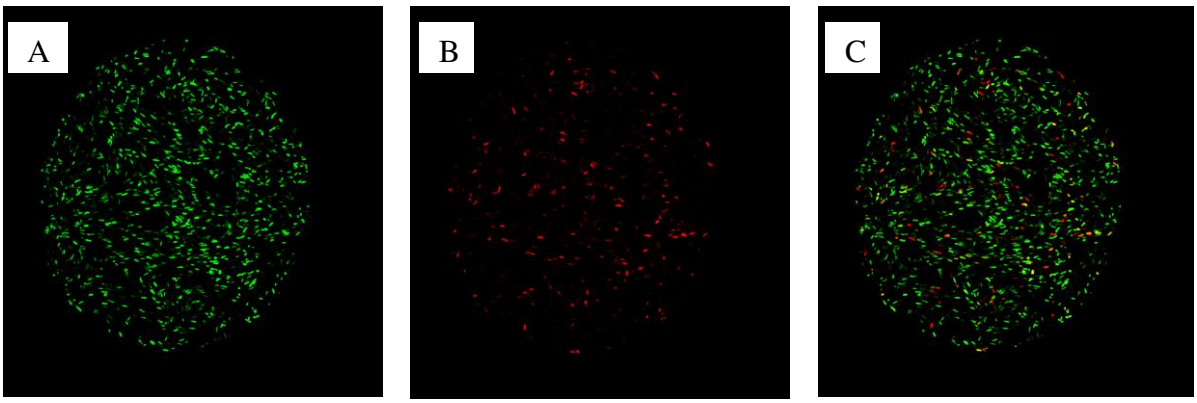


Figura 15 – Microscopia confocal das micropartículas úmidas de gelificação iônica com alto nível de manteiga fundida contendo células íntegras de *Erwinia* sp. D12. A- Micro-organismos viáveis (coloração verde). B- Micro-organismos não viáveis (coloração vermelha). C- Sobreposição dos corantes utilizados.

4. CONCLUSÕES

A atividade enzimática do concentrado celular livre apresentou um valor médio de 10,7 U/mL após 16 horas de fermentação a 26 °C. A incorporação de manteiga fundida durante o processo de encapsulação do micro-organismo modificou a atividade enzimática sendo o maior valor encontrado (17,68 U/mL) pertencente às micropartículas contendo uma maior concentração de manteiga fundida, 2% (m/m). O recobrimento das micropartículas com solução 4% (m/m) de WPC não provocou modificações na atividade enzimática.

Durante o processo de encapsulação pela técnica de gelificação iônica, houve uma redução de dois ciclos logarítmicos na contagem do micro-organismo encapsulado e o recobrimento adicional das micropartículas não alterou essa contagem. As imagens obtidas por microscopia confocal apontaram uma maior quantidade de células vivas, em relação a células mortas, mostrando que o processo de imobilização celular pela técnica de gelificação iônica não provocou grandes reduções na contagem e viabilidade do micro-organismo.

A adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não influenciou estatisticamente ($p > 0,05$) o tamanho médio das micropartículas. Contudo, o recobrimento adicional das micropartículas por interação eletrostática com solução de 4% de concentrado proteico do soro do leite produziu micropartículas maiores com diferença estatística das micropartículas sem recobrimento.

Maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose foram obtidas no primeiro dia de análise empregando células livres ou imobilizadas com os diferentes tratamentos. Micropartículas de gelificação iônica sem adição de manteiga e micropartículas com adição de 2% (m/m) de manteiga fundida obtiveram maiores médias aritméticas de conversão durante os quatros dias, 33,77% e 35,12%, respectivamente. O recobrimento adicional das micropartículas por interação eletrostática acarretou em uma diminuição na taxa de conversão provavelmente devido à diminuição do tamanho dos poros ou recobrimento total dos mesmos durante o recobrimento com solução de concentrado proteico do soro do leite.

A utilização do pH fora da faixa ótima de crescimento do micro-organism pode ter contribuído para uma menor conversão de sacarose em isomaltuose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNYB, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19–34, 2004.

CHAN, E.S. Preparation of ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.1267–1275, 2011.

CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Palatinose production using immobilized cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v.27, p.471-481, 1984.

CHO, Y.H.; McCLMENTS, D.J. Theoretical stability maps for guiding preparation of emulsions stabilized by protein-polysaccharide interfacial complexes. **Langmuir**, v.25, n.12, p.6649-6657, 2009.

CONTESINI, F.J.; IBARGUREN, C.; GROSSO, C.R.F.; CARVALHO, P.O.; SATO, H.H. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. **Journal of Biotechnology**, v.158, n.3, p.137-143, 2012.

CORCORAN, J.A. The production and use of immobilized living microbial cells. In**:** **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology** (Wiseman, A., ed.), vol. 10, p. 12-50, Wiley, New York, 1983.

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

GEBARA, C.; CHAVES, K.S.; RIBEIRO, M.C.E.; SOUZA, F.N.; GROSSO, C.R.F.; GIGANTE, M.L. Viability of *lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.008, 2013.

HUANG, J.H.; HSU, L.H.; SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1988.

JONES, O.G.; McCLEMENTS, D.J. Biopolymer nanoparticles from heat-treated electrostatic protein–polysaccharide complexes: factors affecting particle characteristics. **Journal of Food Science**, v.72, n.2, p.36-43, 2010.

KAKINUMA, H.; YUASA, H.; HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alfa-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydr. Res.**, v.312, p.103-115, 1998.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996.

KAWAGUTI, H.Y. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, n.29, p. 270–277, 2006.

KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M.F.; SATO, H.H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.34, p.261–269, 2007.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Palatinose production by free and ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p.202-208, 2007 a.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Influence of the fermentation parameters and optimisation of isomaltulose production from free *Erwinia* sp. D12 cells using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.42, p.472–479, 2007 b.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KAWAGUTI, H.Y.; CELESTINO, E.M.; MORAES, A.L.L, YIM, D.K.; YAMAMOTO, L.K.; SATO, H.H. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, p.211–217, 2010.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Production of isomaltulose obtained by *Erwinia* sp. cells submitted to diferent treatments and immobilized in calcium alginate. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.31, n.1, p.257-263, 2011.

KAWAI, K.; YOSHIKAWA, H.; MURAYAMA, Y.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Usefulness of isomaltulose as a caloric sweetener for diabetic patients. **Hormone and Metabolic Research**, v.21, p.338–340, 1989.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization techniques and supportmaterials—suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol.**, v.21, p.377–397, 2004.

KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.593-598, 2003.

KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D.; YANAKIEVA, I.; KRATCHANOVA, M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1306–1312, 2006.

LANDON, C.J.; LEVINE, D.M.; JONES, B.A. Microparticulate feeds, encapsulated particles. In: **Enciclopedia of aquaculture**, Stickney, R.R. (Ed.), Wiley, New York, p.365-373, 1984.

LI, X.; ZHAO, C.; AN, Q.; ZHANG, D. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella sp.* LX3. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.521-527, 2003.

LINA, B.A.R.; PROOIJE, S.V.; WAALKENS-BERENDSEN, D.H. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.35, p.309-314, 1997.

MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T., NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.5, p.189–194, 1990.

MIZUTANI, T. Manufacture and application of isomaltulose oligosaccharides. **Food Chemicals**, v.5, p.67–72, 1989.

MORAES, A.L.L; STECKELBERG, C.; SATO, H.H., PINHEIRO, A. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp. D12 imobilizada em alginato de cálcio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.1, p.95-102, 2005.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe**. 2003. Dissertação–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MUKAI-CORREA, R.; PRATA, A.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.

MUNDRA, P.; DESAI, K.; LELE, S.S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2892-2896, 2007.

OLIVA-NETO, P.; MENÃO, P.T.P. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v. 100, p.4252–4256, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the

production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.16, n.6, p.349-353, 1997.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Trehalulose does not induce caries in rats infected with mutans streptococci. **Caries Res.**, v.25, p.227–282, 1991.

ORSI, D.C.; KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Glucosiltransferase production by *Klebsiella sp.* K18 and conversion of sucrose to palatinose using immobilized cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 66-72, 2009.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnol. Adv.**, v.18, p.303–319, 2000.

PARK, Y.K.; UEKANE, R.T.; SATO, H.H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.131-136, 1996.

PATIL, J.S.; KAMALAPUR, M.V.; MARAPUR, S.D.; 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.

SALTER, G.J.; KELI, D.B. New materials and technology for cell immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p.385-389, 1991.

SCHIWECK, H.; MUNIR, M.; RAPP, K.M.; SCHNEIDER, B.; VOGEL, M. New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In: LICHTENTHALER F.W. (Ed.) **Carbohydrates as Organic Raw Materials**. Weinheim: Wiley-VCH, p.57–94, 1991.

SHARPE, E.S.; STODOLA, F.H.; KOEPSELL, H.J. Formation of isomaltulose in enzymatic dextran synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.1062-1063, 1960.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, n.1, p.61-68, 1945.

STRASDAT, B.; BUNJES, H. Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.30, p.567-575, 2013.

TAKAZOE, I. Palatinose- A Isomeric Alternative to Sucrose. Editores GRENBY, T.H. **Progress in Sweeteners**, p.143-167, 1989.

UEKANE, REGINA TOMIE. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella sp*. e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Dissertação. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

VERONESE, T.; PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme Microb. Technol**., v.24, p.263-269, 1999.

CONCLUSÃO GERAL

A caracterização dos biopolímeros através da avaliação da carga elétrica disponível mostrou que alginato de sódio em solução ou emulsão com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do concentrado proteico do soro do leite (WPC) em solução apresentam cargas opostas em uma faixa de pH 3,0 - 4,5 indicando que nesta faixa pode haver uma interação de natureza eletrostática entre os mesmos. O pH 3,75 foi escolhido para produção das micropartículas e ajuste das soluções e emulsões.

O tamanho médio dos coacervados formados pela mistura entre emulsão de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida e proteínas do WPC em solução tiveram seu valor aumentado até a proporção 1:6 e 1:7 (emulsão:WPC, v/v) com posterior diminuição do tamanho. O aumento da concentração de manteiga não modificou estatisticamente o tamanho dos coacervados formados.

Para produção das micropartículas em pH 3,75 nas condições otimizadas, utilizou-se a proporção volumétrica 1:6 (emulsão: WPC, v/v) que corresponte a proporção mássica de uma parte de partículas de gelificação iônica (m) e a quantidade de WPC (m) variou conforme a concentração de manteiga utilizada: 4,35; 4,14 e 4 para emulsões nível intermediário, baixo nível e alto nível de manteiga fundida, respectivamente.

Foi possível obter altas quantidades de proteína adsorvida sobre a superfície de micropartículas de gelificação iônica com o aumento da concentração de proteína em solução sendo que o aumento na concentração de manteiga utilizada provocou uma diminuição na porcentagem de proteína adsorvida sobre as micropartículas. O aumento na concentração de manteiga fundida também provocou um aumento no tamanho das micropartículas de gelificação iônica.

As micropartículas apresentaram formato próximo ao esférico, com o conteúdo lipídico distribuído uniformemente por toda extensão da matriz. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas recobertas com solução de 4% de

WPC apresentam rugas em sua superfície, o que pode ser atribuído ao recobrimento da partícula de gelificação iônica com uma camada proteica.

Micropartículas com elevado teor de umidade, conteúdo proteico acima de 30% e tamanho variando entre 130,0 µm a 161,5 µm puderam ser produzidas pela técnica de gelificação iônica com posterior recobrimento por interação eletrostática com solução 4% (m/m) de WPC.

Contagem de células livres de 10^8-10^7 UFC/mL com uma atividade enzimática de 10,7 U/mL após 16 horas de fermentação a 26 °C foram utilizadas para imobilização de células íntegras do micro-organismo *Erwinia* sp. D12 em micropartículas de alginato de sódio com diferentes concentrações de manteiga fundida, recobertas ou não com solução 4% (m/m) de WPC. A incorporação de manteiga fundida durante o processo de encapsulação modificou a atividade enzimática, sendo o maior valor encontrado (17,68 U/mL) em micropartículas contendo a maior concentração de manteiga fundida, 2% (m/m). Redução de dois ciclos logarítmicos foi observado durante o processo de encapsulação.

As imagens obtidas por microscopia confocal apontou uma maior quantidade de células vivas, em relação a células mortas, mostrando que o processo de imobilização celular por gelificação iônica não provocou grandes reduções na contagem e viabilidade do micro-organismo.

Micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento tiveram um tamanho médio variando de 82,62 µm a 106,52 µm. A adição de diferentes concentrações de manteiga fundida não influenciou estatisticamente o tamanho médio das micropartículas de gelificação iônica sem recobrimento. Contudo, o recobrimento adicional das micropartículas com solução proteica 4% (m/m) de WPC produziu micropartículas maiores variando de 118,34 µm a 143,12 µm, com diferença estatística em relação às micropartículas sem recobrimento.

Maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose foram obtidas no primeiro dia de análise empregando células livres ou imobilizadas com os diferentes tratamentos. A taxa de conversão diminuiu no decorrer dos dias, em todos os tratamentos, sendo observada

uma queda mais brusca na conversão utilizando células íntegras livres. As maiores médias aritméticas de conversão durante os quatro dias foram alcançadas por micropartículas de gelificação iônica sem adição de manteiga e micropartículas com adição de 2% (m/m) de manteiga fundida, 33,77% e 35,12%, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre as mesmas.

O recobrimento adicional das micropartículas, por interação eletrostática, acarretou em uma diminuição na taxa de conversão provavelmente devido à diminuição do tamanho dos poros ou recobrimento total dos mesmos durante o recobrimento com solução de concentrado proteico do soro do leite. O pH utilizado para produção das micropartículas fora da faixa ótima de crescimento do micro-organismo pode também ter contribuído para os resultados obtidos.

Os resultados indicam o potencial de emprego de células íntegras de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em gel de alginato de sódio, sem recobrimento adicional das micropartículas com solução proteica 4% (m/m) de WPC, para conversão de sacarose em isomaltulose em processos descontínuos.