



GISLAINE FERREIRA NOGUEIRA

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

CAMPINAS

2013



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

GISLAINE FERREIRA NOGUEIRA

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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 Consumo e Qualidade de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Gislaine Ferreira Nogueira, aprovada pela comissão julgadora em 14/06/2013 e orientada pelo Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso.

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

CAMPINAS

2013

N689p Nogueira, Gislaine Ferreira
Produção e caracterização de micropartículas com multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à interação eletrostática / Gislaine Ferreira Nogueira. -- 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. Alginatos. 5. Concentrado proteico do soro de leite. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production and characterization of multilayer
microparticles

obtained by ionic gelation associated with electrostatic interaction

Palavras-chave em inglês:

Microencapsulation

Ionic gelation

Electrostatic interaction

Alginates

Whey protein concentrate

Área de concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]

Ana Silvia Prata Soares

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Data da defesa: 14-06-2013

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profa. Dra. Ana Silvia Prata Soares

Membro Titular

Faculdade de Ciências Aplicadas - UNICAMP

Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Membro Titular

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante

Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profa. Dra. Izabela Dutra Alvim

Membro Suplente

Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas

Dedico este trabalho à minha família e em especial aos meus pais Maria e José, a minha irmã Camila e meu irmão João Pedro, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse os meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e forças, paciência e compreensão, por sempre iluminar minha vida e colocar nela pessoas primordiais para a concretização e conclusão desse trabalho. A todos estes, antecipo um “muito obrigado”. Mas, sem dúvida, há aqueles que precisam ser mencionados:

Meus pais José e Maria, a minha irmã Camila e ao meu irmão João Pedro pelo amor incondicional. Por todos os sacrifícios que fizeram para que eu estivesse aqui e tivesse oportunidades que eles não tiveram. Espero um dia retribuir ao menos parte dessa alegria proporcionada. Amo muitooooo vocês!

Aos meus avós Domingos e Margarida por serem meus eternos amores, pelas bênçãos e orações que iluminaram minha trajetória. Aos familiares por sempre me acolherem a cada volta para casa.

À minha amiga e Profa. Dra. Farayde Matta Fakhouri, por se dedicar a minha formação, e orientadora de iniciação científica e de TCC, que me apresentou o “mundo da pesquisa”, despertando em mim o interesse para com este, por ter confiado no meu potencial mais que eu mesma, e pelo incentivo a ingressar no mestrado. Sempre agradecida!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, toda a minha admiração, e obrigada pela oportunidade concebida a mim, pelos conhecimentos compartilhados e ensinamentos, pelo seu empenho, responsabilidade e disponibilidade constante ao trabalho, e por contribuir expressivamente na minha evolução intelectual e emocional.

À três pessoas muito especiais que Deus colocou em meu caminho, Joelma, Talita e Fernando, companheiros de análises e de preocupações, com os quais aprendi muito. Aprendi o verdadeiro sentido das palavras trabalho em equipe, generosidade e respeito. Obrigada pela sempre ajuda, pelo carinho e apoio nos momentos fáceis e difíceis. Com vocês o trabalho exaustivo do dia-a-dia do laboratório ficava mais divertido. À Joelma por ser muito mais que uma amiga de laboratório, da vida. Por ter construído comigo uma grande amizade, que vamos levar para a toda a vida, independente de onde estivermos.

Agradeço especialmente a Yara, por me ensinar a utilizar o Master, o Zeta, o microscópio, por ter me ajudado nas mais diversas circunstâncias da vida de laboratório, pela amizade, cuidado e organização. Obrigada por tudo.

Agradeço à Graziela por me ensinar na prática a produzir partículas, inúmeros Kjedahls, umidade e cinzas. À Flávia por ensinar a produzir coacervados e a fazer Bligh & Dyer das partículas. Vocês são pessoas muito especiais. Obrigada por toda generosidade em compartilhar seus conhecimentos.

Especialmente, à Izabela Rocha pela ajuda na construção do planejamento experimental e nas análises dos resultados, não tenho palavras para te agradecer, sem sua ajuda não teria conseguido. Muito, muito obrigada!

Às companheiras de laboratório Juliana Bürger Rodrigues, Bianca e Juliana Carusi, Karla e Roxana, e ao Emílio, a vida com vocês foi bem mais alegre e divertida.

À todos os funcionários do DEPAN, pela ajuda constante. Também aos funcionários da FEA, em especial aos funcionários Cosme e Marcos pelo auxílio. Ao Prof. Dr Nilo pelos docinhos de abóbora, mamão e de leite, que me davam ânimo após o almoço.

À banca examinadora, Profa. Dra. Ana Silvia Prata, Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, Profa. Dra Izabela Dutra Alvim, Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, pelas sugestões apresentadas que melhoraram a composição final deste trabalho.

Às colegas de mestrado e doutorado, com as quais dividi momentos nas disciplinas, no almoço, no cafezinho, nos corredores do departamento, nas sensoriais. Juliana, Angela, Cibele, Glaucia, Cinthia, Anne, Janaína, Fernanda, Elisa, Bruna, Miriam, Ju, Maris, obrigada. Aos companheiros de DTA, Cecília, Karina, Bruna e Guilherme...obrigada.

Às minhas amigas Claudia, Tatiane, Bianca, Anne, Valéria, Marisa, Marta, e amigo Tom, com vocês a descontração e a alegria sempre foi garantida. Obrigada por renovarem minhas energias.

À minha mais que amiga, minha irmã de coração Viviane, obrigada por torcer por mim assim como torço por você, por sempre me ouvir nos momentos alegres e tristes, pela toda força, carinho e atenção. É sempre bom ter você por perto. Te adoro, amiga.

À CNPq pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta neste trabalho, mesmo não citados aqui, meu muito obrigado!

“O mais importante na ciência não está na obtenção de novos fatos, mas na descoberta de novas maneiras de pensar a respeito deles.”

(Sir. William Lawrence Bragg)

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas com multicamadas contendo alto teor de proteínas, capazes de serem estáveis a condições adversas do meio e resistentes ao ambiente gástrico. Na primeira parte deste estudo, interações eletrostáticas entre o alginato e proteínas do concentrado proteico do soro do leite (WPC) foram avaliadas em relação às condições de pH (3,5 e 3,75) e proporções de polissacarídeo e proteína. A formação de coacervados com os biopolímeros alginato e WPC foi caracterizada quanto à aparência, tamanho médio e carga superficial. Esta análise permitiu definir as condições em que a interação entre proteínas e partículas de alginato pudesse ocorrer. Assim, micropartículas de alginato produzidas por gelificação iônica foram posteriormente recobertas por interação eletrostática com proteínas, utilizando soluções de diferentes concentrações de concentrado proteico do soro do leite, em dois pHs. Foram testadas três concentrações de proteína em solução para cada pH de recobrimento, sendo 0,6, 3 e 4% para o pH 3,5 e 1,7, 3 e 4% para o pH 3,75. As partículas obtidas foram caracterizadas com relação ao teor total de proteína, conteúdo de umidade, tamanho e morfologia. As maiores adsorções proteicas foram obtidas com a maior concentração de proteína em solução (4%) em ambos pHs. A partir deste estudo preliminar, selecionou-se a amostra de micropartículas com o maior teor de proteína adsorvida para se construir multicamadas em sua superfície através da interação eletrostática. Na segunda parte do estudo, foram produzidas multicamadas de alginato e proteínas do concentrado proteico do soro do leite sobre a superfície da partícula de alginato. Essas partículas foram caracterizadas igualmente as anteriores. A proteína total adsorvida na partícula foi alta, variou de 51,20% a 64,91%, sendo 33,24% dessa proteína encontrada na primeira camada (Alg_{Part1}). Na terceira camada (Alg_{Part3}), também foram encontradas elevados teores proteicos, variando de 17,96% a 31,67%. Uma relação proporcional entre a concentração de alginato e WPC com o aumento da adsorção proteica nesta camada foi observada. A formação das multicamadas (Alg_{Part1} e Alg_{Part3}) sobre a superfície das partículas provocou uma diminuição significativa no teor de umidade das partículas (Alg_{Part}), ao contrário do que foi observado com o tamanho. Observações realizadas por MEV revelaram que as camadas produzidas com alginato tendem a ter superfícies mais lisas, e com WPC, tendem a ser rugosas. A amostra de

micropartículas com multicamadas que apresentou a maior adsorção proteica foi avaliada quanto à estabilidade em temperatura de esterilização (121 °C, por 15 minutos), pH (2, 4, 6 e 8), concentração de sal (0, 50, 100, 150 e 200 mM) e em condições gastrointestinais (*in vitro*). Além disso, foram caracterizadas em relação ao tamanho médio, solubilidade proteica e morfologia. Partículas multicamadas úmidas permaneceram íntegras à temperatura de esterilização, apresentaram uma diminuição significativa de tamanho e um acréscimo significativo na solubilidade da camada proteica para o meio em pH 2, e permaneceram estáveis em pHs 4, 6 e 8. A perda de proteína das multicamadas da partícula aumentou significativamente com o aumento da força iônica do meio. As partículas com multicamadas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas, com uma liberação de 30,5% da proteína presente na partícula e, foram sensíveis à atividade proteolítica em ambiente intestinal simulado promovendo a desintegração das multicamadas e a liberação de praticamente toda proteína da partícula. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que é possível a formação de multicamadas de alginato e WPC sobre a superfície de partículas de gelificação iônica com alta adsorção proteica, capazes de serem estáveis em condições adversas do meio e parcialmente resistente às condições gástricas.

Palavras chaves: microencapsulação, multicamadas, gelificação iônica, alginato, concentrado proteico do soro do leite, interação eletrostática.

ABSTRACT

The objective of this work was to produce microparticles with multilayer containing high protein content, capable of being stable to harsh conditions of the environment and resistant to the gastric environment. In the first part of this study, the electrostatic interaction between the alginate and protein of concentrate whey protein (WPC) was evaluated in relation to pH conditions (3.5 and 3.75) and ratio of polysaccharide: protein. The formation of coacervates between the alginate and WPC was characterized as the visual appearance, medium size and surface charge. This analysis allowed us to define the conditions in which the interaction between proteins and alginate particles could occur. Thus alginate microparticles produced by ionic gelation were subsequently coated by electrostatic interaction with proteins, using solutions with different concentrations of whey protein at two pHs. Three concentrations were tested with respect to the protein concentration, being 0.6, 3 and 4% for pH 3.5 and 1.7, 3 and 4% for pH 3.75. The particles were characterized with respect to the total protein content, moisture content, size and morphology. The highest protein adsorption were obtained with the higher concentration of protein solution (4%) by both pH. From this preliminary study, we selected the particle with the highest level of protein adsorbed to construct multilayer using electrostatic interaction on its surface. In the second part of the study, were produced multilayers of alginate and WPC were produced on the surface of the particle of alginate. These particles were characterized in relation to protein adsorption, moisture content, medium size and morphology. The total protein adsorbed on the particle was high, varied from 51.20% to 64.91%, being 33.24% of this protein found in the first layer (Alg_{Part1}). In the third layer (Alg_{Part3}), were also found elevated protein levels, varying from 17.96% to 31.67%. A proportional relationship between the concentration of alginate and WPC with increased protein adsorption was observed in this layer. The formation of multilayers (Alg_{Part1} and Alg_{Part3}) on the particle surface caused a significant decrease in moisture content of the particles (Alg_{Part}), contrary to what was observed with the size. Observations made by SEM revealed that layers produced with alginate tend to have most smooth surfaces, and WPC tend to be rough. The particle multilayers that presented the highest protein adsorption was evaluated as to the stability at sterilization temperature (121 ° C for 15 minutes), pH (2, 4, 6 and 8),

salt concentration (0, 50, 100, 150 and 200 mM) and in gastrointestinal conditions. Furthermore were characterized with respect to medium size, protein solubility and morphology. Moist Multilayer particles have remained stable against the temperature of sterilization, showing a significant decrease in size and a significant increase in the solubility of the protein layer into the medium at pH 2, and remain stable at pH 4, 6 and 8. The loss of protein from multilayer particle increased as ionic strength increased. The particles with multilayer were partially resistant to gastric conditions, with a release of 30.49% of the protein in the particle, and were susceptible to proteolytic activity in simulated intestinal environment promoting the particle disintegration and the release of all protein recovering the particles. Considering the results obtained, it is concluded that it is possible the formation of multilayer alginate and WPC on the surface of particles obtained ionic gelation using high protein adsorption, capable of being stable in adverse conditions of the environment (temperature, pH, ionic strength) and resistant to gastric conditions.

Keywords: Microencapsulation, multilayer, ionic gelation, alginate, concentrated whey protein, electrostatic interaction.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xxxix
LISTA DE TABELAS	xxxvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
OBJETIVOS	9
1. OBJETIVO GERAL	9
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	11
CAPÍTULO 1.....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1. Microencapsulação	15
2. Gelificação Iônica	18
3. Alginato.....	19
4. Interação Eletrostática.....	22
5. Método “layer – by – layer”	23
6. Proteínas do soro do leite	26
7. Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO 2.....	37
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE ALGINATO E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E SEU EFEITO SOBRE A ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE PARTÍCULAS DE ALGINATO	37
RESUMO.....	39
1.INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Materiais.....	42
2.2 Métodos.....	43

2.2.1. Caracterização do biopolímero.....	43
2.2.2. Potencial Zeta.....	43
2.2.2.1 Potencial Zeta das Soluções de Biopolímeros	44
2.2.2.2 Potencial Zeta da Emulsão de alginato	44
2.2.2.3 Potencial Zeta de diferentes relações de Alg _{Sol} : WPC _{Sol}	44
2.2.2.4 Potencial Zeta de diferentes relações de Alg _{Emul} : WPC _{Sol}	45
2.2.2.5 Aspecto visual de diferentes relações de Alg _{Part} : WPC _{Sol}	45
2.2.3 Produção de partículas de alginato por gelificação iônica e avaliação da adsorção de proteína sobre a superfície das partículas por interação eletrostática..	46
2.2.3.1 Produção das partículas de Alginato por gelificação iônica (Alg _{Part})	46
2.2.3.2 Recobrimento com proteína por interação eletrostática	46
2.2.4 Caracterização das micropartículas	47
2.2.4.1 Conteúdo de proteína, umidade e eficiência de encapsulação.....	47
2.2.4.2 Tamanho médio das micropartículas	48
2.2.4.3 Microscopia ótica e eletrônica de varredura.....	48
2.2.5 Análise estatística	49
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Caracterização do Biopolímero	49
3.2 Potencial zeta.....	50
3.2.1 Soluções de biopolímeros	50
3.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de Alg _{Sol} : WPC _{Sol}	51
3.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de Alg _{Emul} : WPC _{Sol}	56
3.2.4 Avaliação visual de diferentes relações de Alg _{Part} : WPC _{Sol}	58

2.2.5. Avaliação da estabilidade da micropartícula com multicamadas.....	86
2.2.5.1 Estabilidade da partícula em temperatura	86
2.2.5.2 Estabilidade da partícula em diferentes pHs	87
2.2.5.3 Estabilidade da partícula em diferentes concentrações de sal.	88
2.2.5.4 Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais.....	88
2.2.6. Análise estatística	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
3.1 Avaliação das condições para produção de micropartículas com multicamadas – Planejamento Experimental.....	89
3.2 Teor de umidade e tamanho das micropartículas em função da concentração de alginato e de proteína em solução.....	95
3.3 Morfologia e microestrutura das micropartículas com multicamadas.....	99
3.4 Avaliação da estabilidade das micropartículas em condições de estresse.	106
3.4.1 Estabilidade da partícula frente à temperatura.	106
3.4.2 Estabilidade da partícula em diferentes pHs.	111
3.4.3 Estabilidade da partícula em diferentes concentrações de NaCl.....	115
3.4.4 Liberação proteica das micropartículas úmidas submetidas às condições gastrointestinais.	119
4. CONCLUSÕES.....	123
CONCLUSÕES GERAIS.....	125
5. REFERÊNCIAS BOBLOGRÁFICAS.....	127
ANEXO	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas.....	16
Figura 1.2 Cadeia de alginato conformação cadeira.....	20
Figura 1.3 Formação do gel de alginato de cálcio.....	21
Figura 1.4 Os procedimentos de auto-montagem de camada por camada sobre o modelo.....	24
Figura 2.1 Fluxograma da produção das partículas de alginato recobertas com proteína do soro do leite	47
Figura 2.2 Potencial zeta das soluções de WPC, alginato e da emulsão do alginato a concentração de 0,2% (p/p) em função do pH.....	50
Figura 2.3 Influência do pH e da proporção $Alg_{Sol} : WPC_{Sol}$, no aspecto visual e valores de potencial zeta das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.....	52
Figura 2.4 Influência do pH e da proporção $Alg_{Emul} : WPC_{Sol}$, no aspecto visual e valores de potencial zeta das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.....	56
Figura 2.5 Influência do pH e da proporção $Alg_{Part} : WPC_{Sol}$, no aspecto visual das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.....	59
Figura 2.6 Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica e recobertas com proteínas do soro do leite em diferentes concentrações de proteína em solução, pH 3,5. Barras 10 μ m (B, D, F e H), 25 μ m (A) e 50 μ m (C, E e G).....	66
Figura 2.7 Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de	

varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica e recobertas com proteínas do soro do leite em diferentes concentrações de proteína em solução, pH 3,75. Barras 10 μm (B, D, F e H), 25 μm (C e E) e 50 μm (A e G).....67

Figura 3.1 Gráfico de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a adsorção de proteína na terceira camada da partícula.....93

Figura 3.2 Superfície de resposta e superfície de contorno para adsorção de proteína (%) na terceira camada da partícula em função da concentração de Alginato e WPC em solução; Superfície de resposta (A); Superfície de contorno (B).....94

Figura 3.3 Morfologia das micropartículas produzidas por gelificação iônica sem recobrimento (Alg_{part}) e com o primeiro recobrimento de WPC_{sol} ($\text{Alg}_{\text{part1}}$). Barras 50 μm99

Figura 3.4 Microscopias das micropartículas com multicamadas úmidas dos ensaios do planejamento experimental. Barras 50, 75 e 100 μm103

Figura 3.5 Microscopias eletrônica de varredura das micropartículas dos ensaios 1 e 6 pela ordem de produção das multicamadas. Barras 10 μm105

Figura 3.6 Aparência e morfologia das partículas úmidas com multicamadas suspensas em água pH 3,75: A) aparência das partículas não esterilizadas; B) morfologia das partículas não esterilizadas (Barra 50 μm); C) aparência das partículas esterilizadas; D) morfologia das partículas esterilizadas (Barra 50 μm). Imagens após 1 hora de repouso.....107

Figura 3.7 Influência da temperatura na aparência e microestrutura das partículas com multicamadas liofilizadas: A) aparência das partículas liofilizadas não esterilizadas; B) MEV das partículas liofilizadas não esterilizadas (Barra 10 μm); C) aparência das partículas liofilizadas e esterilizadas; D) MEV das partículas liofilizadas e esterilizadas

(Barra 10 μm).....109

Figura 3.8 Influência da temperatura na aparência e morfologia das partículas com multicamadas liofilizadas e reidratadas em água, pH 3,75, por 12 horas: A) aparência das partículas não esterilizadas; B) microscopia ótica das partículas não esterilizadas (Barra 75 μm); C) aparência das partículas esterilizadas; D) microscopia ótica das partículas esterilizadas (Barra 75 μm).....111

Figura 3.9 Tamanho médio (μm) das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Médias seguidas de letras diferentes diferem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).....112

Figura 3.10 Microscopias das micropartículas úmidas com multicamadas, suspensas em diferentes pHs: A) 2; B) 4; C) 6 e D) 8. Barras 50 μm114

Figura 3.11 Tamanho médio (μm) das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em soluções aquosas de NaCl em diferentes concentrações. Médias seguidas de letras diferentes diferem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).....115

Figura 3.12 Microscopias das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em diferentes concentrações salinas versus ausência de sal: A) sem sal; B) 50 mM; C) 100 mM; D) 150 mM; E) 200 mM. Barras 50 μm118

Figura 3.13 Morfologia das micropartículas com multicamadas durante a simulação gastrointestinal: A) após 1 hora em solução gástrica com pepsina, em pH 2 a 37 °C (Barra 50 μm); B) após 2 horas em solução gástrica com pepsina, em pH 2 a 37 °C (Barra 60 μm); C) após 7 horas de simulação gastrointestinal com pancreatina, em pH 7, 37 °C (Barra 50 μm); D) após 24 horas de simulação gastrointestinal com pancreatina, em pH 7, 37 °C (Barra 75 μm).....121

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg _{Sol} : WPC _{Sol}	55
Tabela 2.2 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg _{Emul} : WPC _{Sol}	58
Tabela 2.3 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg _{Part} : WPC _{Sol}	61
Tabela 2.4 Teores de umidade e proteína adsorvida nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,5.....	62
Tabela 2.5 Teores de umidade e proteína adsorvida nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,75.....	62
Tabela 2.6 Tamanhos médios das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,5.....	64
Tabela 2.7 Tamanhos médios das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,75.....	64
Tabela 3.1 Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a obtenção de partículas multicamadas.....	83
Tabela 3.2 Planejamento experimental para obtenção de partículas multicamadas.....	84

Tabela 3.3 Ensaio do Planejamento Experimental e o teor de proteína adsorvida nas camadas das partículas, seguida da variável resposta da adsorção de proteína (%) na terceira camada das partículas, para avaliação da produção de partículas com multicamadas.....	91
Tabela 3.4 Teor de umidade nas micropartículas com multicamadas em função da concentração de alginato e de proteína em solução (%).....	96
Tabela 3.5 Tamanhos médios das micropartículas em função da concentração de alginato e de proteína em solução (%).....	97
Tabela 3.6 Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas úmidas com multicamadas (μm) suspensas em água pH 3,75, com ou sem tratamento térmico.....	108
Tabela 3.7 Teores de proteína solúvel e proteína adsorvida remanescente (%) nas micropartículas com multicamadas suspensas em diferentes pHs.....	114
Tabela 3.8 Teores de proteína solúvel e proteína adsorvida remanescente (%) das micropartículas com multicamadas suspensas em diferentes concentrações salinas versus ausência de sal.....	116
Tabela 3.9 Proteína Liberada acumulada (%) das micropartículas úmidas com multicamadas, submetidas a condições gastrointestinais <i>in vitro</i>	119
Tabela A.1 Coeficiente de regressão do modelo para a determinação da concentração de alginato e de WPC em solução para a maior adsorção de proteína na partícula.....	133
Tabela A.2 ANOVA para as respostas de adsorção de proteína na partícula.....	133

INTRODUÇÃO GERAL

A microencapsulação é um método pelo qual um material, ou uma mistura de materiais são revestidos ou aprisionados dentro de outro material (RISH, 1995) em forma de micro/nanopartícula (JAFARI et al., 2008). Seu principal objetivo é proporcionar proteção ao material encapsulado contra condições adversas do meio externo (umidade, calor, pH, oxigênio e luz) e, permitir sua liberação em seu local de ação, em quantidade e no momento adequado, mediante estímulos específicos (SHAHIDI; HAN, 1993; GIBBS, 1999). Essa liberação específica do material encapsulado pode ocorrer por ruptura mecânica, temperatura, pH, solubilidade no meio, biodegradação ou por difusão (REINECCIUS, 1995; GOUIN, 2004).

A utilização da microencapsulação de materiais de diferentes naturezas tem sido alvo de inúmeras pesquisas, contribuindo para aplicações potenciais em diversas áreas, tais como farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (SILVA et al., 2003; JAFARI et al., 2008). Diante disso, nos últimos anos diversos métodos e materiais têm sido investigados para produção de micropartículas, tal como, a gelificação iônica utilizando polissacarídeos naturais como o alginato (PATIL et al., 2010).

A gelificação iônica é uma técnica de microencapsulação branda, simples, rápida e de fácil execução, onde partículas de gel como, por exemplo, de alginato são formadas devido à interação de íons multivalentes, como o Ca^{2+} , com os grupos carboxílicos da cadeia polimérica do alginato (YEO; BAEK; PARK, 2001; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006; YOO et al., 2006; SMRDEL et al., 2008). Essas matrizes de gel propiciam a encapsulação de compostos hidrofóbicos (GUZEY; McCLEMENTS, 2006), além disso tem sido muito empregadas em aplicações entéricas como veículos de entrega de fármacos e micro-organismos (ANAL; STEVENS, 2005; CHANDRAMOULI et al., 2004), entretanto, a alta porosidade da matriz pode inviabilizar a proteção de compostos de baixo peso molecular acelerando a liberação do material encapsulado (SEZER; AKBUGA, 1999; FUJIWARA et al., 2010).

A resistência mecânica e a permeabilidade destas partículas podem ser melhoradas com a formação de uma ou mais camadas de polieletrólitos de cargas opostas sobre sua superfície (YEO; BAEK; PARK, 2001; PENICHE et al., 2004; ANAL; STEVENS, 2005; GBASSI et al., 2009; PATIL et al., 2010). Essa construção de camadas de

polieletrólitos ocorre principalmente devida à interação eletrostática entre cargas opostas, resultando na adsorção de polieletrólitos carregados positivamente ou negativamente, de forma alternada, sobre uma superfície carregada eletricamente (DECHER, 1997; QIU et al., 2001; AI; JONES; LVOV, 2003; SCHÖNHOF, 2003; SHENOY; SUKHORUKOV, 2005; JOHNSTON et al., 2006; WANG et al., 2007).

Uma variedade de polímeros naturais e sintéticos tem sido investigada para a formação de multicamadas, e dentre esses, os polímeros naturais, incluindo as proteínas do soro do leite tem se destacado principalmente pelas suas propriedades plastificantes, essenciais para formação de filmes fortes e flexíveis (FLORIS et al., 2008) e por formar complexos eletrostáticos com o alginato para concepção de sistemas com estabilidade e resistência desejáveis para aplicações entéricas (GBASSI et al., 2009; PATIL et al., 2010).

Além do tipo de polieletrólitos utilizados a formação e propriedades apresentadas pelas multicamadas são influenciadas pela concentração e pH das soluções de polieletrólitos, números e espessura das camadas desejadas, força iônica, temperatura e tempo de deposição (SUKHORUKOV et al., 2001; HALTHUR; CLAEISSON; ELOFSSON, 2004; RICHERT et al., 2004; SRIVASTAVA; KOTOV, 2008; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009). O manuseio cuidadoso desses fatores permitem a projeção e a fabricação de partículas com multicamadas, de modo a atingir a estabilidade físico-química, atender as condições de proteção e liberação do material encapsulado, mediante estímulos específicos.

A produção de partículas com multicamadas tem se tornado um grande atrativo para muitas aplicações em diversas áreas. Mais avanços no entendimento dos princípios de construção de camadas, interações das cargas dos materiais, e interação com o meio em que é inserida, são fundamentais para o avanço desta técnica. Portanto a produção de partículas com multicamadas a partir de materiais naturais que permitem a microencapsulação de compostos, garantindo sua viabilidade em seu local de ação se faz necessário, para maior compreensão do processo de obtenção das mesmas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver micropartículas pelas técnicas de gelificação iônica utilizando alginato de sódio com posterior formação de multicamadas de proteínas do soro do leite e alginato por interação eletrostática sobre sua superfície,

avaliando-se a influência das concentrações dos biopolímeros na adsorção proteica, bem como, a estabilidade das partículas quando inseridas em diferentes condições de meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 23-43, 2003.
- ANAL, A. K.; STEVENS, W. F. Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, 290, p. 45–54, 2005.
- BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p.645-658, 2006.
- CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, 56, p. 27– 35, 2004.
- DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, **Science**, v. 277, p. 1232– 1237, 1997.
- FLORIS, R.; BODNÁR, I.; WEINBRECK, F.; ALTING, A. C. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. **International Dairy Journal**, v.18, p. 566–573, 2008.
- FUJIWARA, G. M.; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez. - ISSN 1518-5192, 2010.
- GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.
- GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50, p. 213-224, 1999.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in food science & technology**., v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.
- GUZEY, D.; McCLEMENTS, D. J. Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β - Lactoglobulin–Pectin Complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 475-485, 2006.

HALTHUR, T. J.; CLAEISSON, P. M.; ELOFSSON, U. M. Stability of polypeptide multilayers as studied by in situ ellipsometry: Effects of drying and post-buildup changes in temperature and pH. **J. Am. Chem. Soc.**, 126, p. 17009–17015, 2004.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, 26:7, 816-835, 2008.

JOHNSTON, A. P. R.; CORTEZ, C.; ANGELATOS, A. S.; CARUSO, F. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 11, p. 203–209, 2006.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**. v. 71, n. 5, p. 481–487, 2009.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D.V. Iontropic 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.

PENICHE, C.; HOWLAND, I.; CARRILLO, O.; ZALDÍVAR, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, 18, p. 865–871, 2004.

QIU, X.; LEPORATTI, S.; DONATH, E.; MÖHWALD, H. Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles. **Langmuir**, 17, p. 5375-5380, 2001.

REINECCIUS, G. A. Controlled release techniques in food industry, in encapsulation and controlled release of food ingredients. In: REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. J. (Ed.). **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: American Chemical Society, p.1-4, 1995.

RICHERT, L.; LAVALLE, P.; PAYAN, E.; SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D.; STOLTZ, J. F.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C.; PICART, C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. **Langmuir**, v. 20, n.2, p. 448-458, 2004.

RISCH, S. J. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1995.

SCHÖNHOF, M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 8, p. 86–95, 2003.

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

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food Ingredients. **Food Science and Nutrition**, 33(6):501-547, 1993.

SHENOY, D. S.; SUKHORUKOV, G. B. Microgel-Based Engineered Nanostructures and Their Applicability with Template-Directed Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly in Protein Encapsulation. **Macromolecular Bioscience**, 5, p.451–458, 2005.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 39, n. 1, jan.- mar., 2003.

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

SRIVASTAVA, S.; KOTOV, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n.12, p.1831-1841, 2008.

SUKHORUKOV, G. B.; ANTIPOV, A. A.; VOIGT, A.; DONATH, E.; MÖHWALD, H. pH-Controlled Macromolecule Encapsulation in and Release from Polyelectrolyte Multilayer Nanocapsules. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, n. 1, 2001.

WANG, C.; YE, S.; DAI, L.; LIU, X.; TONG, Z. Enzymatic desorption of layer-by-layer assembled multilayer films and effects on the release of encapsulated indomethacin microcrystals. **Carbohydrate Research**, 342, p. 2237–2243, 2007.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 6, p. 213-230, 2001.

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 38, p. 25–30, 2006.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir partículas por gelificação iônica utilizando alginato e recobri-las com multicamadas de proteínas do soro do leite e alginato por interação eletrostática e avaliar sua estabilidade quando inseridas em diferentes meios.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a carga líquida dos materiais utilizados na produção de micropartículas e a relação de quantidades entre alginato e proteína necessárias para a produção de micropartículas revestidas;

- Avaliar o efeito do pH e da concentração de proteína em solução sobre a adsorção de proteína na primeira camada formada sobre a superfície das micropartículas de alginato;

- Avaliar o efeito da concentração de alginato e proteína em solução sobre a formação de multicamadas sobre a superfície de micropartículas de alginato para que ocorra alta adsorção proteica;

- Avaliar a relação tamanho médio das micropartículas com o número de camadas adicionadas;

- Avaliar a morfologia interna e externa das micropartículas com multicamadas;

- Avaliar a estabilidade e capacidade de hidratação das micropartículas com multicamadas úmidas e liofilizadas, respectivamente, frente à temperatura de esterilização;

- Avaliar a estabilidade das micropartículas com multicamadas úmidas frente ao pH e concentração de NaCl;

- Avaliar a resistência das micropartículas com multicamadas em condições que simulam o ambiente gástrico e intestinal.

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O trabalho está estruturado em capítulos, conforme descrito a seguir.

No Capítulo 1, “Revisão Bibliográfica” são apresentados os fundamentos teóricos dos tópicos abordados no presente trabalho;

O Capítulo 2, “Avaliação da interação eletrostática entre alginato e proteínas do soro do leite e seu efeito sobre a adsorção de proteínas na superfície de partículas de alginato”, reúne os ensaios preliminares para a obtenção das condições de pH, proporções e concentrações de alginato e proteínas dos soro do leite que viabilizem a interação entre os mesmos. Avaliou-se também a possibilidade de partículas de alginato obtidas por gelificação iônica, serem recobertas com uma camada de proteínas do soro do leite.

No Capítulo 3, “Produção e caracterização de micropartículas com multicamadas de alginato e proteínas do soro do leite”, o foco principal foi produzir multicamadas sobre a superfície de partículas de alginato com diferentes concentrações de biopolímeros em solução com alto conteúdo proteico, e avaliar o seu comportamento quando submetidas à temperatura, diferentes pHs, variadas concentrações de NaCl e simulação *in vitro* das condições gastrointestinal.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Microencapsulação

A microencapsulação é uma tecnologia de empacotamento que, com finas coberturas poliméricas aplicáveis em compostos sólidos ou líquidos formam partículas denominadas microcápsulas (SHAHIDI; HAN, 1993; GIBBS et al., 1999; JAFARI, et al., 2008).

O conceito desta técnica surgiu da idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável, que o protege do meio externo e, simultaneamente, controla a entrada e saída de substâncias na célula. De modo similar, a microcápsula consiste em uma camada de agente encapsulante, que atua como um filme protetor, isolando o material do núcleo e controlando sua liberação mediante os estímulos específicos, evitando efeitos de sua exposição inadequada (ROCHA; FÁVARO- TRINDADE; GROSSO, 2011; JIZOMOTO et al., 1993).

A técnica vem sendo estudada desde a década de 30 e a sua primeira aplicação comercial foi em 1954, com a produção de papéis de cópia sem carbono contendo uma fina camada de microcápsulas com tinta para a substituição dos papéis carbono. Ao serem pressionadas pela máquina, as microcápsulas rompiam-se liberando a tinta contida no seu interior, propiciando assim a obtenção da cópia (SHAHIDI; HAN, 1993, DUBEY; SHAMI; BASHKER RAO, 2009).

Desde então, a microencapsulação evoluiu muito e atualmente é considerada como uma tecnologia inovadora que tem sido empregada com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Dentro da área de alimentos, ela é utilizada para a proteção contra adversidades do meio (umidade, pH, calor, oxigênio, luz) aumentando assim a estabilidade e mantendo a viabilidade do material encapsulado. Além disso, é empregada para facilitar o manuseio e também mascarar sabores ou odores indesejáveis do material do núcleo (BARANAUSKIENÉ et al., 2007; DESAI; PARK, 2005; SHAHIDI; HAN, 1993).

No caso da área farmacêutica o seu principal objetivo é permitir a liberação controlada de fármacos, com foco principalmente na melhoria da segurança e eficácia dos fármacos. Esses sistemas permitem a liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes, melhoram a biodisponibilidade e estabilidade dos agentes terapêuticos contra degradação química e enzimática, antes e depois da administração, até exercerem a sua ação farmacológica, além de reduzirem a concentração dos fármacos em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvos (SILVA et al., 2003; HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

As micropartículas são partículas sólidas, que apresentam geralmente forma esférica com tamanho que varia de 1 a 1000 μm (SILVA et al., 2003). Dependendo das propriedades físico-químicas do material de núcleo diferentes tipos de partículas podem ser produzidas, tais como: esferas simples recobertas por uma camada de espessura uniforme; partículas contendo vários núcleos de forma irregular; partículas multinucleadas inseridas em uma matriz contínua do material de parede; vários núcleos distintos dentro de uma mesma partícula e partículas com multicamadas, como mostra a Figura 1.1 (GHARSALLAOUI et al., 2007; GIBBS et al., 1999; SHAHIDI; HAN, 1993).

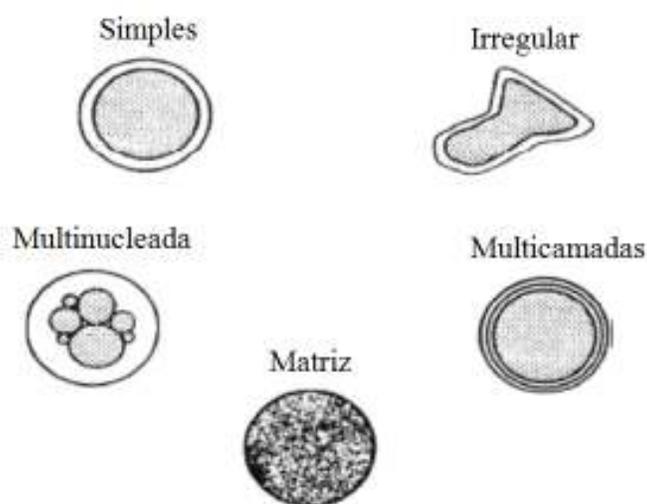


Figura 1.1 Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas, adaptado de Gharsallaoui et al. (2007).

A forma das micropartículas também é bastante variável em razão do método de microencapsulação e do material de parede utilizado para o seu preparo (JACKSON; LEE, 1991). Na escolha do material de parede deve-se considerar as suas propriedades físico-químicas, como a capacidade de formação de filme e compatibilidade, sua viscosidade, higroscopicidade, habilidade de selar e segurar o material do núcleo e suas propriedades de liberação do material do núcleo conforme a aplicação a que se destinam (AZEREDO, 2005).

Esta seleção do material de parede é um fator determinante na eficiência do processo de microencapsulação. Uma grande variedade de materiais de parede são utilizados, por exemplo: as gomas (goma arábica, ágar, alginato, carragena), os carboidratos (amidos, pectina, dextrinas, xarope de milho), as celuloses (carboximetilcelulose, etil, metil, acetil e nitro-celulose), os lipídeos (cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas) e as proteínas (glúten, caseína, isolado proteico de soro de leite, gelatina e albumina) (SHAHIDI; HAN, 1993).

As propriedades do material de parede e do material a ser encapsulado, a aplicação e os mecanismos desejados de liberação são fatores que refletem diretamente na escolha do método de microencapsulação (AZEREDO, 2005). Diferentes métodos são descritos para a preparação das micropartículas, que podem ser divididos em físicos-químicos, físicos e químicos. Entre os métodos físico-químicos estão: coacervação simples ou complexa (separação de fase aquosa), evaporação emulsão-solvente (separação por fase orgânica), emulsão-solidificação, envolvimento lipossômico, e os métodos físicos compreendem o spray drying, spray coating, spray chilling, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização. Os métodos químicos envolvem a polimerização interfacial e inclusão molecular (SHAHIDI; HAN, 1993; GIBBS et al., 1999).

A estrutura interna da partícula formada durante o processo de microencapsulação é um fator importante para se determinar suas características funcionais, como a eficiência de encapsulação, a capacidade de retenção do composto encapsulado, a permeabilidade, a integridade e a digestibilidade (JONES; McCLEMENTS, 2010).

2. Gelificação Iônica

A formação de partículas de géis a partir da gelificação iônica tem sido estudada nos últimos anos, como sendo uma das mais promissoras em sistemas de entrega controlada de fármacos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; PATIL et al., 2010). Grande parte desse interesse é devido a sua capacidade de formar partículas com textura suave, com características de biocompatibilidade com membranas, em consequência da natureza hidrofílica do material e seu elevado conteúdo de água (> 95%) (DE VOS et al., 2006; BUREY et al., 2008; HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

Dois tipos de gelificação iônica podem ser utilizadas para a formação de partículas, sendo estes a interna e a externa. A produção de partículas por meio da gelificação iônica interna é baseada na liberação de íons de cálcio a partir de um complexo insolúvel em uma solução polimérica contendo material de recheio. A solução é então emulsificada em uma fase oleosa contendo surfactante. Posteriormente, a gelificação é iniciada com a redução do pH por adição de uma solução ácida, que por sua vez, provoca a liberação dos íons cálcio, permitindo a complexação do cálcio com os grupos carboxílicos do polímero (BUREY et al., 2008; MARTÍN VILLENA et al., 2009). Por outro lado, a formação de partículas a partir da gelificação iônica externa é baseada na habilidade de diversos polissacarídeos gelificarem na presença de íons multivalentes (YEO; BAEK; PARK, 2001). A interação de íons, como o Ca^{2+} , com os grupos carboxílicos das cadeias poliméricas de polissacarídeos resulta na formação de um gel insolúvel (SMRDEL et al., 2008).

A vantagem desta técnica de gelificação iônica externa está na sua facilidade e praticidade de execução, o simples gotejamento de uma solução polimérica contendo o material de recheio sobre uma solução iônica, em agitação constante, resulta instantaneamente na formação de estruturas esféricas de gel (WILLAERT; BARON, 1996; MUKAI-CORREA et al., 2005; RACOVITĂ et al., 2009; RÉ; SANTANA; ÁVILA, 2010). O tempo de permanência das partículas na solução iônica está diretamente relacionado com a espessura da parede da cápsula e conseqüentemente com a sua resistência à ruptura mecânica (RACOVITĂ et al., 2009; PASQUALIM et al., 2010). São necessários, aproximadamente 20 minutos de contato com a solução iônica,

para que as partículas atinjam a sua estabilidade máxima e a resistência mecânica torne-se constante (RACOVITĂ et al., 2009).

Além do tempo, outros fatores como o pH e a concentração do polissacarídeo e do cátion influenciam na formação, na estabilidade e porosidade das partículas (MESTDAGH; AXELOS, 1998; WALSTRA, 2003).

A principal característica das partículas de gelificação iônica produzidas por hidrocolóides é a matriz de gel porosa, o que permite uma difusão rápida e fácil da água e/ou outros fluídos para dentro e fora da matriz da cápsula (GOUIN, 2004). Conseqüentemente, a porosidade dessas partículas determinará a quantidade de material de recheio retida e o tempo de liberação do mesmo.

3. Alginato

O uso de hidrocolóides para formação de partículas de géis têm tido crescente interesse por diversas áreas de aplicação, tais como alimentícia, farmacêutica e cosmética (BUREY et al., 2008). Estes hidrocolóides são particularmente atraentes por suas propriedades de formar géis e alterar a viscosidade quando dispersos em meio aquoso. Os principais hidrocolóides gelificantes são o alginato, pectina, carragena, gelatina, goma gelana e agar (SAHA; BHATTACHARYA, 2010). Dentre eles destaca-se o alginato, que é um polissacarídeo natural, biodegradável, obtido a partir de algas marinhas marrons como a *Laminaria digitata* e *L. hyperborica* (SILVA et al., 2006; YOO et al., 2006).

Na indústria médica e farmacêutica, o alginato é muito empregado devido a suas características de imunogenicidade, biocompatibilidade, bioadesão e não toxicidade (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006a).

Quimicamente, o alginato é um polissacarídeo aniônico, composto de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), unidos linearmente por meio de ligações glicosídicas α -1,4 (THU et al., 1996b; SILVA et al., 2006; YOO et al., 2006; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008). Possui ao longo de sua cadeia regiões homopoliméricas de D-manurônico (MM) e L-gulurônico (GG) intercaladas com regiões heteropoliméricas de M e G (MG) como mostra a Figura 1.2 (PATIL et al.,

2010; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999). A proporção e a distribuição dos dois ácidos na cadeia polimérica são dependentes da espécie de algas que se extrai o alginato, podendo ocorrer variações nas suas porcentagens (PENICHE et al., 2004; THU et al., 1996a; THIES, 1995).

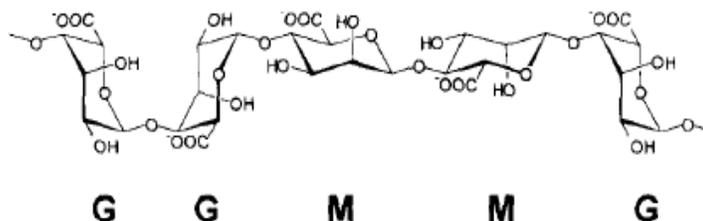


Figura 1.2 Cadeia de alginato conformação cadeira, adaptado de Thu et al.(1996b).

Além disso, o alginato é um polieletrólito carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu pK_a (pH 3,38 – 3,65) e, em baixos valores de pH a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida (SIMSEK-EGE et al., 2003). A distribuição de cargas negativas ao longo da estrutura do alginato em solução aquosa é resultado do arranjo sequencial dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico presentes no alginato (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008).

Suas propriedades gelificantes são provenientes de ligações cooperativas de cátions bivalentes com blocos de ácidos gulurônicos. Ocorrem através das mudanças dos íons sódio dos ácidos gulurônicos por cátions bivalentes, fazendo a junção entre as cadeias, e promovendo a formação de uma rede tridimensional, geralmente descrita pelo modelo caixa de ovos (Figura 1.3) (GOMBOTZ; WEE, 1998; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999; MUKAI- CORRÊA, 2003; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006b; YOO et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Os cátions bivalentes utilizados na gelificação do alginato são o Ca^{2+} , Ba^{2+} e Al^{3+} (RACOVITĂ et al., 2009). Dentre esses, a maior seletividade ao íons de cálcio é atribuída à sítios de ligações específicos de cálcio em grupos carboxílicos do ácido gulurônico (MUKAI- CORRÊA, 2008).

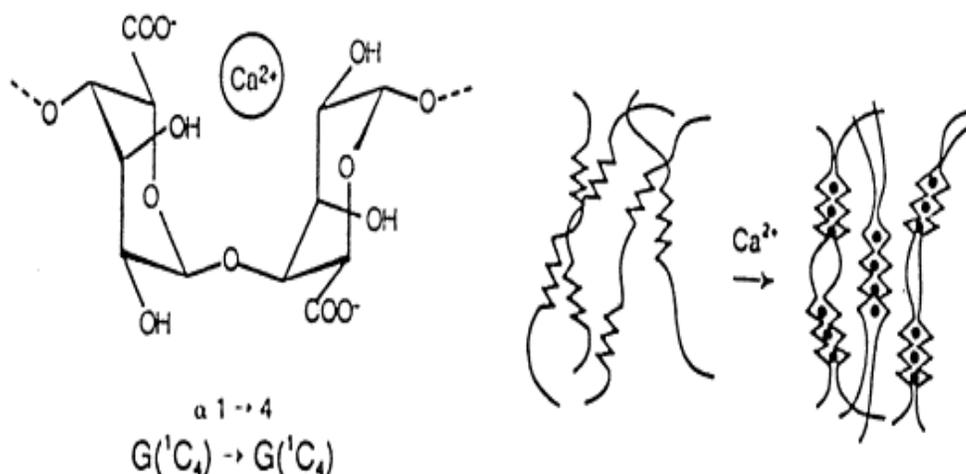


Figura 1.3 Formação do gel de alginato de cálcio. Adaptado de Martín Villena et al. (2009).

As propriedades de gelificação do alginato como porosidade, comportamento de inchamento, estabilidade e força do gel, são influenciadas pela sua composição monomérica e estrutura dos blocos, tamanho molecular, concentração do polímero e concentração do cátion (THU et al., 1996b; BLANDINO; MACIAS; CANTERO, 1999).

A utilização de alginato como material de parede para microencapsulação, traz como vantagem o seu baixo custo, sua facilidade de manuseio, ambiente relativamente inerte e aquoso dentro da matriz (GIBBS et al., 1999; DOUMÈCHE et al., 2004) e não toxicidade para as células (PREVOST; DIVIES, 1992; CHANDRAMOULI et al., 2004; DING; SHAH, 2007).

Extensas quantidades de trabalhos tem sido feitas com géis de alginato, principalmente por sua habilidade excepcional de ser relativamente estável em pH ácido, mas facilmente inchado e desintegrado em meios moderadamente alcalinos (DOUMÈCHE et al., 2004; YOO et al., 2006; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006a; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008).

Matrizes de alginato são utilizadas na produção de partículas para liberação de fármacos (ANAL; STEVENS, 2005) e bactérias (CHANDRAMOULI et al., 2004; DING; SHAH, 2007) no intestino, com finalidade de promover a proteção das substâncias encapsuladas em relação à acidez gástrica e permitir sua posterior liberação

no ambiente básico de fluídos intestinal (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008).

No entanto, um dos obstáculos para o uso das partículas de alginato, produzidas especialmente por gelificação iônica é a grande porosidade da membrana, que permite a passagem de pequenas moléculas, restringindo seu uso para moléculas de baixo peso molecular e hidrofílicas (FUJIWARA et al., 2010).

4. Interação Eletrostática

Uma das maneiras de superar este obstáculo e aumentar a sua estabilidade é o recobrimento de partículas de gelificação iônica com biopolímeros através de interações eletrostáticas (PATIL et al., 2010). A utilização desta técnica evita o uso de agentes químicos (gluralteído e etileno) para a reticulação dos hidrogéis, reduzindo assim, possíveis toxicidades e efeitos indesejáveis dos reagentes (ANAL; STEVENS, 2005; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009).

A interação eletrostática ocorre entre biopolímeros carregados com cargas opostas, que interagem entre si (PHILIPP et al., 1889). Na maioria dos casos, os sistemas de biopolímeros utilizados incluem uma molécula proteica como polieletrólito positivo e uma molécula de polissacarídeo como polieletrólito negativo (JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011).

As proteínas apresentam carga líquida negativa acima do seu ponto isoelétrico (pI) e carga líquida positiva abaixo do pI, enquanto que os polissacarídeos aniônicos tem carga negativa máxima em valores de pH bem acima do seu pKa, mas perdem progressivamente essa carga a medida que o pH é reduzido (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010a). Sabe-se que o pH exerce uma grande influência na intensidade da interação eletrostática, pois este determina o grau de ionização dos grupos laterais (grupos amina e carboxílico) dos biopolímeros afetando sua carga total (SCHMITT et al., 1998; SCHMITT et al., 1999).

Uma proteína e um polissacarídeo aniônico podem se associar fracamente quando o pH encontra-se sensivelmente acima do pI da proteína, devido a repulsão eletrostática entre os dois biopolímeros negativos. No entanto, à medida que o pH é reduzido para

abaixo do pI da proteína, tende-se a formar complexos insolúveis ou coacervados, devida à forte interação entre as cargas opostas (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010a).

Esta associação eletrostática entre proteínas e polissacarídeos depende de muitos fatores, como o peso molecular dos biopolímeros empregados, a densidade da carga, as concentrações e proporções utilizadas (SCHMITT et al., 1999; WANG et al., 1999). O controle destes fatores e a manipulação dessas interações entre as duas macromoléculas são essenciais para a formação de uma ou mais camadas protetoras na superfície do hidrogel, a fim de diminuir a porosidade da partícula, modificar a sua resistência mecânica e sua barreira de permeabilidade (PENICHE et al., 2004; PATIL et al., 2010).

Esta abordagem de formação de camadas finas de polissacarídeos e proteínas sobre superfícies sólidas pode melhorar e refinar as características que interessam na escolha das partículas. Diante disso, a técnica descrita acima, tem atraído um número crescente de pesquisadores, devida a ampla gama de vantagens para aplicações alimentícias, farmacêuticas e biomédicas (YE et al., 2005; MIRANDA et al., 2011).

5. Método “*layer – by – layer*”

Neste contexto, recentemente o método *layer - by - layer* foi aplicado à área de microencapsulação (YE et al., 2005), para a produção de multicamadas de polieletrólitos (JOHNSTON et al., 2006). A técnica baseia-se na adsorção consecutiva de camadas alternadas de polieletrólito carregado positivamente e negativamente sobre uma partícula modelo e tem como força matriz a interação eletrostática (DECHER, 1997; KREFT et al., 2007).

Desde a sua introdução por Decher e colaboradores (MIRANDA et al., 2011), esta técnica tem atraído a atenção da comunidade científica, devida à versatilidade de processo no que diz à respeito aos materiais que podem ser utilizados para a construção de multicamadas e ainda a possibilidade de sua combinação com outros métodos, resultando em um alto potencial de aplicação em diferentes áreas de desenvolvimento de materiais (SCHÖNHOF, 2003).

O processo básico da formação de multicamadas envolve a imersão de um substrato (por exemplo, uma partícula) com sua superfície carregada eletricamente, em uma solução contendo um polieletrólito de carga oposta. A interação eletrostática entre o substrato e o polieletrólito promove a sua adsorção e, a inversão da carga de superfície. O substrato é então lavado para a retirada do excesso de polióions livres, e imerso em outra solução de polieletrólito, com carga oposta à primeira solução. Tem-se a formação de duas camadas de polieletrólitos sobre a superfície do mesmo, a carga inicial é restabelecida e, a superfície está pronta para a montagem de outra camada de filme de polietrólito. Estes passos são repetidos alternadamente até atingir-se a espessura e o número de camadas desejadas (AI; JONES; LVOV, 2003), como ilustrado na Figura 1.4.

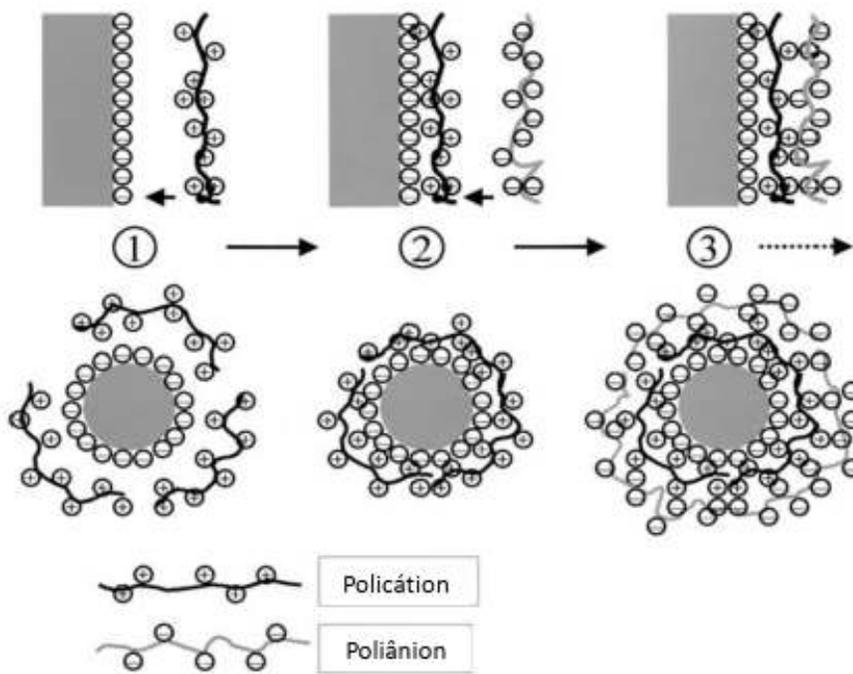


Figura 1.4 Procedimentos de auto-montagem de camada por camada sobre o modelo. Adaptado Ai, Jones e Lvov (2003).

Durante o processo de construção de multicamadas, múltiplos pontos de ligação entre a superfície e o polieletrólito são formados (SUKHISHVILI, 2005). Apesar das

interações eletrostáticas serem responsáveis por grande parte das forças que promovem esta formação, outras ligações também têm sido relacionadas com este processo, tais como pontes de hidrogênio, ligação covalente e interações de Van der Waals, porém os mecanismos de interações químicas não estão completamente compreendidos (KIM; PARK; HAMMOND, 2008; SRIVASTAVA; KOTOV, 2008).

Além disso, a formação das multicamadas, bem como, as propriedades apresentadas pelas camadas como espessura, estabilidade, grau de interpenetração entre as camadas e número de grupos funcionais não ligados são diretamente influenciados pela força iônica, concentração e pH das soluções de polieletrólitos, temperatura e tempo de deposição (HALTHUR; CLAEISSON; ELOFSSON, 2004; RICHERT et al., 2004; SRIVASTAVA; KOTOV, 2008; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009).

O manuseio cuidadoso desses fatores permite a projeção e a fabricação de partículas, de modo a atingir a estabilidade físico-química, atender as condições de proteção e liberação do material encapsulado, mediante estímulos específicos. A aplicabilidade desta abordagem tem sido empregada com êxito em várias áreas.

Na área alimentícia este princípio tem permitido a produção de emulsões com multicamadas para encapsulação de ingredientes bioativos lipofílicos, tais como ácidos graxos essenciais, carotenóides, óleos, vitaminas e fitoesteróis (TOKLE et al., 2012).

Com relação à área farmacêutica, sua principal aplicação é a liberação controlada de fármacos em locais específicos para tratamentos de doenças, como úlcera péptica, colite ulcerativa, carcinomas, infecções no intestino, artrite, asma, inflamações e quimioterapia tópica (ANAL; STEVENS, 2005; NAGARWAL; KUMAR; PANDIT, 2012).

Ademais, esta abordagem de adsorção sequencial de polieletrólitos ainda permite a modificação química de superfícies, o que fornece aplicações potenciais na área biomédica para revestimentos de superfícies de implantes para transplantes (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011).

Diferentes modelos, como partículas orgânicas e coloidais inorgânicos, agregados de proteína, células biológicas e nanocristais de drogas, com tamanhos variando de 50 nm a dezenas de μm , foram revestidos com multicamadas (TIOURINA; SUKHORUKOV, 2002).

A princípio, esta técnica pode ser aplicada a qualquer forma ou tamanho de superfície carregada (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011). Além disso, a idéia da técnica implica que não há nenhuma restrição quanto à escolha de polieletrólitos (AI; JONES; LVOV, 2003; DECHER, 1997), assim, tanto polímeros naturais quanto sintéticos, bem como suas combinações tem sido utilizados para a construção de multicamadas.

Bajpai e Tankhiwale (2006b) produziram em seu estudo, partículas com multicamadas de alginato aniônico com quitosana catiônica. Anal e Stevens (2005) desenvolveram cápsulas simples e com multicamadas com propriedades melhoradas para entrega controlada do antibiótico ampicilina por gelificação ionotrópica utilizando várias combinações de quitosana e Ca^{2+} como componentes catiônicos, e alginato e polifosfato como ânions.

Diversos materiais vêm sendo pesquisados para o recobrimento de micropartículas, tais como quitosana, proteínas do soro do leite (especialmente β - lactoglobulina), poli-L-lisina, caseína e lactoferrina (SULTANA et al., 2000; SAGIS et al., 2008; BENGOCHEA et al., 2011). No entanto, a composição das partículas varia conforme a aplicação a que se destina (RICHERT et al., 2004).

6. Proteínas do soro do leite

A utilização de proteínas do soro do leite na produção de micropartículas tem se mostrado uma boa estratégia, uma vez que são materiais classificados como seguros e permitem a encapsulação de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006). Além do mais, as proteínas possuem propriedades plastificantes, imprescindível para a formação de filmes fortes e flexíveis (FLORIS et al., 2008).

As proteínas de soro de leite são bem conhecidas pelo seu alto valor nutricional (BEAULIEU et al., 2002), contém quase todos os aminoácidos indispensáveis, que encontram-se em excesso às recomendações para humanos, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), que não aparecem em excesso, mas atendem às

recomendações para todas as faixas etárias. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Devido à ampla funcionalidade, incluindo a gelificação, emulsificação e estabilização de espuma, as proteínas do soro do leite vem sendo aplicadas em vários alimentos, tais como produtos lácteos, sobremesas, produtos de panificação e molhos frios (ELOFISSON et al., 1997; ANDRADE; NASSER, 2005).

As proteínas do soro do leite são um subproduto da indústria de laticínios, especialmente da produção do queijo e da caseína (DOHERTY et al., 2011). São obtidas da fase aquosa do leite após a precipitação da caseína e remoção da gordura (MULVIHILL, 2003).

As principais formas de sua comercialização são os concentrados (WPC) ou isolados proteicos. Os concentrados podem conter de 25 a 80% de proteína, enquanto os isolados devem apresentar mais de 90% proteínas (ANDRADE; NASSER, 2005).

Os concentrados proteicos do soro de leite são as principais fontes de proteínas globulares do soro em produtos alimentícios, contendo uma mistura de β -lactoglobulina (82%), α -lactoalbumina (15%) e traços de lactose, soro albumina e sais (DONNELLY; McCLEMENTS; DECKER, 1998). Estas proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e soro albumina) são caracterizadas por apresentar estruturas tridimensionais mantidas por ligações dissulfeto (YE; SINGH, 2000).

A β -lactoglobulina é uma proteína pequena, de peso molecular de 18350 Da, possui 162 resíduos de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, e apresenta um ponto isoelétrico de 5,2 (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010b). Esta proteína contém duas pontes dissulfeto e um grupo tiol livre, enquanto que a α -lactoalbumina, a segunda proteína mais prevalente no soro do leite bovino, consiste em quatro pontes dissulfeto e nenhum grupo tiol livre e uma massa molar de 14,2 kg / mol (NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

À temperatura ambiente, a β -lactoglobulina, na forma nativa encontra-se em diversas estruturas quaternárias, como monômeros, dímeros e octômeros, dependendo do pH da solução e da composição iônica (JONES; McCLEMENTS, 2010). Em pH fisiológico a β -lactoglobulina é encontrada principalmente como dímeros, e em valores de pH abaixo de 3,5 e acima de 7,5 a proteína tende a ser monômero (ZIMET; LIVNEY, 2009). Quando a β -lactoglobulina sofre um aquecimento superior a 70 °C,

ocorre sua desnaturação e uma exposição dos grupos hidrofóbicos e dos resíduos internos de cisteína, podendo-se formar agregados, dependendo do pH e da concentração de cálcio (JONES; McCLEMENTS, 2010).

As proteínas do soro do leite são biopolímeros biodegradáveis com grande capacidade de uso, para fabricação de partículas em escala nanométrica e micrométrica, que podem ser utilizadas para proteção em sistemas de entrega de drogas, lipídios bioativos, vitaminas e minerais (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010b), com ampla aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (GIRARD; TURGEON; GAUTHIER., 2003).

7. Referências Bibliográficas

AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 23-43, 2003.

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

ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n.2, p.315-321, abr.-jun. 2005.

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

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim.Nutri., Araquara**, v.16, n.1, p.89-97, jan./mar. 2005.

BARANAUSKIENÉ, R.; BYLAITÉ, E.; ZUKAUSKAITÉ, J.; VENSKUTONIS, R. P. Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, p. 3037-3036, 2007.

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.

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

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of dynamic release of vitamin B₂ from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p. 1565–1574, 2006a.

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p.645-658, 2006b.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, n. 6, p.686-689. 1999.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48, p. 361–377, 2008.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERGUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, 85, p. 522-528, 2011.

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

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

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, **Science**, v. 277, p. 1232– 1237, 1997.

DESAI, K.G. H.; PARK, H.J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, 23: 1361–1394, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2007.

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**, 25, p. 1604 – 1617, 2011.

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

DONNELLY, J. L.; McCLEMENTS, J.; DECKER, J. A. Iron-catalysed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 997-1000, 1998.

DOUMÈCHE, B.; KÜPPERS, M.; STAPF, S.; BLÜMICH, B.; HARTMEIER, W.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. New approaches to the visualization, quantification and explanation of acid-induced water loss from Ca-alginate hydrogel beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 5, p. 565–573, 2004.

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

ELOFSSON, C.; DEJMEK, P.; PAULSSON, M.; BURLING, H. Characterization of a Cold-Gelling Whey Protein Concentrate. **Int. Dairy Journal**, 7, p. 601-608, 1997.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr.- jun., 2008.

FLORIS, R.; BODNÁR, I.; WEINBRECK, F.; ALTING, A. C. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. **International Dairy Journal**, v.18, p. 566–573, 2008.

FUJIWARA, G. M.; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez. - ISSN 1518-5192, 2010.

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

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 50, p. 213-224, 1999.

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

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

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, n.3, p. 267-285, 1998.

HALTHUR, T. J.; CLAESSON, P. M.; ELOFSSON, U. M. Stability of polypeptide multilayers as studied by in situ ellipsometry: Effects of drying and post-buildup changes in temperature and pH. **J. Am. Chem. Soc.**, 126, p. 17009–17015, 2004.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, p. 1638–1649, 2008.

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

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, 26:7, 816-835, 2008.

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.

JOHNSTON, A. P. R.; CORTEZ, C.; ANGELATOS, A. S.; CARUSO, F. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 11, p. 203–209, 2006.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; McCIEMENTS, D. J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, 344, p. 21–29, 2010a.

JONES, O.; DECKER, E. A.; McCIEMENTS, D. J. Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, 24, p. 239–248, 2010b.

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

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, 125, p. 1267–1272, 2011.

KIM, B-S.; PARK, S. W.; HAMMOND, P. T. Hydrogen-Bonding Layer-by-Layer Assembled Biodegradable Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles from Surfaces. **A.C.S. NANO**, v.2, n. 2, p. 386-392, 2008.

KREFT, O.; PREVOT, M.; MÖHWALD, H.; SUKHORUKOV, G. B. Shell-in-Shell Microcapsules: A Novel Tool for Integrated, Spatially Confined Enzymatic Reactions. **Angew. Chem. Int.**, 46, p. 5605 –5608, ed. 2007.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**. v. 71, n. 5, p. 481–487, 2009.

MARTÍN VILLENA, M. J.; MORALES HERNÁNDEZ, M. E.; GALLARDO LARA, V.; RUIZ MARTÍNEZ, M. A. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **Ars Pharmaceutica**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer science: Food and Non-food Applications**, v.91, p.303-314, 1998.

MIRANDA, E. S.; SILVA, T. H.; REIS, R. L.; MANO J. F. Nanostructured Natural-Based Polyelectrolyte Multilayers to Agglomerate Chitosan Particles into Scaffolds for Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 21 e 22, 2011.

MUKAI-CORRÊA, R. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, p. 173, 2003.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Characterisation of Microcapsules Containing Casein and Hydrogenated Vegetable Fat, Obtained by Ionic Gelation. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 73-80, jan./mar., 2005.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Testes *in vivo***. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, p. 151, 2008.

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

NAGARWAL, R. C.; KUMAR, R., PANDIT, J. K. Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 47, p. 678–685, 2012.

NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 1945-1962, 2011.

PASQUALIM, P.; CULPI, T.A.; KAMINSKI, G. A. T.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; COSTA, C. K.; MIGUEL, M. D.; FUJIWARA, G. M.; RODRIGUES, B. H.; ZANIN, S. M. W. Microcapsules of calcium alginate and vegetable oil by ionic gelation: a study of encapsulation capacity and skin application. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 11, n.1, jan.-jun., 2010.

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

PENICHE, C.; HOWLAND, I.; CARRILLO, O.; ZALDÍVAR, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, 18, p. 865–871, 2004.

PHILIPP, B.; DAUTZENBERG, H.; LINOW, K.; KOTZ, J.; DAWYDOFF, W. Polyelectrolyte complexes-recent developments and open problems. **Prog Polym Sci**, 14:91–172, 1989.

PREVOST, H.; DIVIES, C. Cream fermentation by mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 7, p. 583–588, 1992.

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

RÉ, M. I.; SANTANA, M. H. A.; ÁVILA, M. A. Encapsulation Technologies for Modifying Food Performance. In Taylor and Francis Group, LLC, p. 223-275, 2010.

RICHERT, L.; LAVALLE, P.; PAYAN, E.; SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D.; STOLTZ, J. F.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C.; PICART, C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. **Langmuir**, v. 20, n.2, p. 448-458, 2004.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food Bioproducts Processing**, doc.1016/j.fbp. 2011.01.001.

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

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

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

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, 13 p. 483–496, 1999.

SCHÖNHOF, M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 8, p. 86–95, 2003.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 397-409, out./dez., 2004.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q. Encapsulation of food Ingredients. **Food Science and Nutrition**, 33(6):501-547, 1993.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 39, n. 1, jan.- mar., 2003.

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

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.

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

SRIVASTAVA, S.; KOTOV, N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n.12, p.1831-1841, 2008.

SUKHISVILI, S. A. Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10, p.37 – 44, 2005.

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

THIES, C. **How to make microcapsules lecture and laboratory manual**. Missouri: St. Louis, 1995.

THU, B.; BRUHEIM, P.; ESPEVIK, T.; SMIDSRØD, P.; SOON-SHIONG, G.; SKJAKBRAEK, G. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. **Biomaterials**, n.17. p.1069-1079, 1996a.

THU, B.; BRUHEIM, O.; ESPEVIK, T.; SMIDSRØD, O.; SOON-SHIONG, P.; SKJAKBRAEK, G. Alginate polycation microcapsules I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials**, 17, 10, p. 1031–1040, 1996b.

TIOURINA, O. P.; SUKHORUKOV, G. B. Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin and controlled release study. **International Journal of Pharmaceutics**, 242, p.155–161, 2002.

TOKLE, T.; LESMES, U.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Impact of dietary fiber coatings on behavior of protein-stabilized lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions. **Food & Function**, 3, p. 58–66, 2012.

WANG, Y.; KIMURA, K.; HUANG, Q.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Effects of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. **Macromolecules**, 32, p. 7128-7134, 1999.

WALSTRA P. Soft solids. In: **Physical chemistry of foods**. Marcel Dekker, New York, p. 714–768, ed. 2003.

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.

YE, A.; SINGH, H. Influence of calcium chloride addition on the properties of emulsions stabilized by whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, 14, p.337–346, 2000.

YE, S.; WANG, C.; LIU, X.; TONG, Z. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. **Journal of Controlled Release** 106, p. 319–328, 2005.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 6, p. 213-230, 2001.

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 38, p. 25–30, 2006.

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

CAPÍTULO 2

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

CAPÍTULO 2

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

RESUMO

Partículas de biopolímeros podem ser formadas a partir de misturas entre proteínas e polissacarídeos, baseando-se nas características físico-químicas de cada biopolímero ou da mistura entre eles formada. A interação entre proteínas e polissacarídeos em um sistema complexo, pode ocorrer pela atração entre grupos de cargas opostas formando complexos insolúveis, ou pela repulsão eletrostática entre grupos com o mesmo sinal de carga formando complexos solúveis. Desta maneira, a interação entre proteínas e polissacarídeos é muito estudada seja na forma de interação dos complexos com o meio ou na formação de partículas. Neste estudo, foram estudadas as condições para que pudesse ser feito o recobrimento de partículas de alginato com proteínas do soro do leite por interação eletrostática. Desta forma, foram avaliadas as cargas superficiais desenvolvidas pelos biopolímeros (alginato e proteínas do soro do leite) isolados em solução e pelas misturas entre eles formadas, pelas misturas de emulsão de alginato e solução de proteína, e pelas misturas entre partículas de alginato e solução de proteína, em função da proporção e pH. O efeito da mudança das concentrações de proteína em solução na adsorção proteica na superfície de partículas de alginato foi avaliado. A umidade, o tamanho médio e a morfologia das partículas foram determinados. Os estudos do potencial zeta revelaram que ocorreu interações eletrostáticas entre o alginato e proteínas do soro do leite em pH 3,5 e 3,75. Em todas as proporções avaliadas formaram-se precipitados, sendo a separação de fases evidente quando a carga total líquida do sistema era próxima de zero. No entanto, pode-se observar a necessidade de menor quantidade de solução de proteína para formar coacervados quando se utilizou partículas de alginato, em comparação com a solução de alginato, atribuindo-se tal fato a um número menor de grupos carboxílicos livres na superfície das partículas devida à interação iônica desses grupos com íons Ca^{2+} durante a formação da partícula. Maiores

adsorções proteicas nas partículas foram obtidas quando se utilizou a concentração de 4% de proteína em solução em ambos os pHs (3,5 e 3,75). Pôde-se observar que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de umidade, sendo que quanto maior a adsorção proteica menor o teor de umidade, em ambos os pHs. As partículas apresentaram formato semelhante ao esférico. O recobrimento da partícula de gelificação iônica com proteína não alterou significativamente a aparência das partículas em nenhuma concentração testada em pH 3,5 ou 3,75.

1. INTRODUÇÃO

O estudo das interações entre proteínas e polissacarídeos é de grande relevância para muitos sistemas biológicos, produtos farmacêuticos e alimentícios, bem como para a microencapsulação (WEINBRECK et al., 2003; SPERBER et al., 2009).

As forças de atração e repulsão entre polissacarídeos e proteínas podem conduzir a incompatibilidade entre os biopolímeros ou a formação de complexos, tal como uma única fase ou duas fases no sistema (TOLSTOGUZOV, 1997; GIRARD; TURGEON; GAUTHEIR, 2002). A incompatibilidade entre diferentes biopolímeros acontece quando a interação entre eles é mais repulsiva do que sua interação com o meio, o que leva à segregação dos biopolímeros e duas fases distintas e aquosas são formadas, sendo cada uma delas composta principalmente por um dos biopolímeros. Por outro lado, quando o contato entre os diferentes biopolímeros é semelhante ao contato de biopolímeros similares, ocorre uma mistura espontânea entre eles (SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998).

Outra interação que pode ocorrer entre os biopolímeros é a coacervação complexa que leva a formação de coacervados insolúveis ou precipitados. Esta formação de complexos insolúveis entre polissacarídeos aniônicos e proteínas ocorre geralmente em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico das proteínas (JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010). A atração entre os dois biopolímeros com cargas elétricas opostas faz com que eles se associem, atingindo-se a neutralidade das cargas no complexo e a falta de repulsão eletrostática permite a separação de fases. Como resultado, uma fase é concentrada nos dois biopolímeros complexados e a outra fase

contém principalmente o solvente (McCLEMENTS, 2006; SPERBER et al., 2009). Complexos solúveis também podem ser formados quando ambos biopolímeros apresentam cargas de mesmo sinal, que são estabilizados pela repulsão eletrostática, e desse modo o sistema exibe apenas uma fase (SPERBER et al., 2009).

A interação entre proteínas e polissacarídeos é diretamente influenciada pelo pH, força iônica, concentração e proporção de biopolímeros utilizados (WANG et al., 1999; KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004). Sob condições em que estes fatores são controlados, as interações podem ser manipuladas de modo a formar complexos solúveis, insolúveis ou precipitados (JONES et al., 2010).

Esta abordagem, de misturas entre proteínas e polissacarídeos, pode ser utilizada para produzir partículas de biopolímeros, com uma variedade de diferentes composições, baseando-se nas características físico-químicas de cada biopolímero ou da mistura entre eles formada (McCLEMENTS, 2006; JONES et al., 2010).

A utilização de polímeros naturais, tais como polissacarídeos e proteínas na produção de partículas têm sido crescente nos últimos anos, devido a sua natureza de compatibilidade e degradabilidade e por serem considerados como seguros para o consumo humano (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; DOHERTY et al., 2011; WANG; TIAN; CHEN, 2011).

Muitas combinações entre proteínas e polissacarídeos têm sido pesquisadas, tais como gelatina e goma arábica (QV; ZENG; JIANG, 2011), proteína isolada de soja e goma arábica (JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011), proteínas do soro do leite e goma arábica (WEINBRECK et al., 2003), β -lactoglobulina e goma acácia (SCHMITT et al., 1999), β -lactoglobulina e pectina (GIRARD; TURGEON; GAUTHEIR, 2002; SPERBER et al., 2009; JONES et al., 2010; JONES; DECKER; McCLEMENTS, 2010) entre outros.

O alginato, um polissacarídeo aniônico obtido a partir de algas marinhas marrons, tem ganhado importância no campo farmacêutico e alimentício por ser biodegradável e atóxico, que permitem que ele seja utilizado como matriz para proteção e liberação de uma variedade de agentes biológicos (SILVA et al., 2006; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN., 2008; KIM et al., 2008).

Normalmente, o alginato pode ser ionicamente reticulado pela adição de cátions divalentes, como o Ca^{2+} , resultando na formação de géis insolúveis (BAJPAI;

TANKHIWALE, 2006; YOO et al., 2006). Por outro lado, é conhecido por formar complexos fortes com polímeros, como as proteínas, incluindo as proteínas do soro do leite (TIOURINA; SUKHORUKOV, 2002). Recentemente, a formação de complexos eletrostáticos entre géis de alginato e proteínas do soro de leite tem sido proposta para concepção de sistemas com estabilidade e resistência desejáveis para aplicações entéricas (GBASSI et al., 2009; PATIL et al., 2010).

As proteínas do soro do leite fazem parte do grupo de proteínas globulares obtidas durante o processo de fabricação de queijos. O uso destas proteínas é crescente por suas propriedades funcionais, compreendendo a gelificação e a emulsificação (BEAULIEU et al., 2002; CHEN; SUBIRADE, 2006; DOHERTY et al., 2011). Além disso, as proteínas do soro de leite são veículos naturais de bioativos pépticos (LIVNEY, 2010).

Portanto, a interação entre alginato e proteínas do soro do leite para produção de partículas apresenta potencial aplicação tanto para a área alimentícia quanto farmacêutica. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as condições de interação entre o alginato e as proteínas do soro do leite. Foi analisada inicialmente, a influência do pH e a proporção de polissacarídeo : proteína sobre a carga elétrica livre no sistema, verificada a formação dos complexos, bem como os tamanhos dos complexos formados. Com base nisso, foi possível determinar as condições que maximizaram a interação entre os biopolímeros e com isso avaliou-se a possibilidade do recobrimento de partículas de alginato com proteínas do soro do leite. O efeito do recobrimento das partículas com diferentes concentrações de proteína em solução foi avaliado através da quantidade de proteína adsorvida, e sua influencia no tamanho médio e na morfologia das partículas úmidas ou secas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: Alginato de Sódio (Manugel DMB, lote G470021); Concentrado proteico do soro do leite (lote 80 4U17601, Lacprodan - Arla Foods Ingredients, Dinamarca); Óleo de girassol comercial (Mazola, Mairinque – SP, Brasil);

Cloreto de Cálcio P.A (lote 36308, Dinâmica, Diadema – SP, Brasil); Ácido clorídrico P.A 0,1M (Merck), Hidróxido de sódio a 50% (Nuclear, Diadema – SP, Brasil), Ácido sulfúrico P.A (Synth, Diadema - SP, Brasil); Sulfato de cobre P.A anidro (Synth, Diadema – SP, Brasil); Sulfato de potássio P.A anidro (lote 18308, Ecibra, São Paulo, Brasil), Sulfato de sódio P.A (Dinâmica, Diadema – SP, Brasil); Álcool Metílico P.A (Cetus, Santo Amaro – SP, Brasil); Clorofórmio P.A (Dinâmica, Diadema – SP, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1. Caracterização do biopolímero

O concentrado proteico do soro do leite foi caracterizado em relação à umidade e cinzas, segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2006) e quanto ao conteúdo de lipídeos, segundo Bligh e Dyer (1959). Utilizou-se a metodologia de Kjeldahl para a determinação de nitrogênio total, adotando-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio em proteína.

2.2.2. Potencial Zeta

Para investigar a formação de complexos eletrostáticos entre alginato e o concentrado proteico do soro do leite foram realizados testes preliminares. O potencial zeta foi determinado em soluções diluídas do concentrado proteico do soro do leite (WPC_{Sol}) e alginato (Alg_{sol}), bem como na emulsão de alginato com o óleo de girassol (Alg_{Emul}). As cargas superficiais da mistura de diferentes quantidades de solução de proteína para uma quantidade de solução de alginato fixa ($Alg_{sol} : WPC_{sol}$) foram determinadas. O mesmo teste foi conduzido para as misturas entre Alg_{Emul} e WPC_{Sol} , e misturas entre partículas de alginato (Alg_{part}) e WPC_{Sol} . As condições são descritas nos itens subsequentes.

Todas as determinações do potencial zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.).

2.2.2.1 Potencial Zeta das Soluções de Biopolímeros

Foram efetuadas leituras pontuais das cargas livres das soluções Alg_{sol} e WPC_{sol} a 0,2% (p/p) em pH 3, 4, 5, 6 e 7. Antes das leituras, o pH das soluções foi ajustado manualmente utilizando-se ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. As soluções foram preparadas em triplicatas, e cada solução foi medida em triplicata em temperatura ambiente. Assim os valores dos potenciais zeta representam uma média de nove valores medidos.

2.2.2.2 Potencial Zeta da Emulsão de alginato

Foram preparadas três soluções independentes de Alg_{sol} na concentração de 2% (p/p). As soluções foram então emulsificadas com 2% (p/p) de óleo de girassol em agitador Turrax 14000 rpm por 3 minutos (IKA, Works do Brasil, RJ). As emulsões (Alg_{Emul}) foram diluídas para a concentração de 0,2% (v/v) e a sua carga superficial foi medida no pH 3, 4, 5, 6 e 7, em temperatura ambiente. O pH das emulsões foram manualmente ajustados antes da realização das leituras pontuais. As análises foram realizadas em triplicata da triplicata como no item anterior.

2.2.2.3 Potencial Zeta de diferentes relações de Alg_{Sol} : WPC_{Sol}

Misturas das soluções de Alg_{Sol} e WPC_{Sol} foram preparadas, a concentração de 0,2% (p/p) em pH 3,5 e 3,75. As soluções permaneceram 4 horas sob agitação magnética para completa dissolução e tiveram seu pH ajustado antes das misturas. Foram preparadas misturas volumétricas nas relações de Alg_{Sol} : WPC_{Sol} - 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:7; 1:8; 1:9 e 1:10 para o pH 3,5 e 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6; 1:8; 1:9; 1:10 e 1:12 para o pH 3,75.

Após a preparação, as misturas permaneceram em repouso por 12 horas em temperatura ambiente para posterior determinação do potencial zeta. As amostras foram agitadas manualmente imediatamente antes de cada determinação. As relações foram

preparadas em triplicatas, e cada relação foi medida em triplicata, em temperatura ambiente. Os valores dos potenciais zeta representam uma média de nove valores medidos.

2.2.2.4 Potencial Zeta de diferentes relações de Alg_{Emul} : WPC_{Sol}

Foram preparadas emulsões Alg_{Emul} conforme no item 2.2.2.2, a concentração de 0,2% (p/p), em temperatura ambiente. Misturas volumétricas de Alg_{Emul} : WPC_{Sol} (0,2% p/p) foram preparadas conforme as relações no item 2.2.2.3 para os pHs 3,5 e 3,75. A determinação do potencial zeta foi efetuada em temperatura ambiente após as misturas permanecerem por 12 horas em repouso. As amostras foram agitadas manualmente antes de cada determinação. As séries foram preparadas em triplicatas independentes e medidas em triplicata.

2.2.2.5 Aspecto visual de diferentes relações de Alg_{Part} : WPC_{Sol}

Para esse experimento foram produzidas partículas de alginato (Alg_{part}), conforme descrito no item 2.2.3.1. As partículas obtidas foram suspensas em água deionizada com pH ajustado para 3,5 ou 3,75, de modo que o equivalente a uma concentração de 0,2% (p/p) de Alg_{Sol} fosse obtido. Foram produzidas misturas volumétricas entre Alg_{part} e WPC_{Sol} (0,2% p/p), em temperatura ambiente, utilizando-se as mesmas relações entre os biopolímeros avaliados no item anterior. Os sistemas foram mantidos em agitação durante 1 hora, em homogeneizador rotativo, a 22 rpm (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) e em seguida permaneceram em repouso a temperatura ambiente por 12 horas para avaliação do aspecto visual. As séries foram preparadas em triplicatas.

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

2.2.3.1 Produção das partículas de Alginato por gelificação iônica (Alg_{Part})

Foi realizada a homogeneização da solução de alginato, concentração de 2% (p/p de solução) com óleo de girassol (2% p/p) em Ultra-Turrax (IKA, Works do Brasil, RJ) a 14000 rpm durante 3 minutos. A emulsão foi atomizada sobre uma solução de cloreto de cálcio (2% p/v) com pH ajustado para 3,5 ou 3,75, a agitação constante. Para isso, foi utilizado um bico atomizador duplo fluido (\varnothing 1 mm) distante verticalmente em 12 cm da solução iônica, e mantido sob pressão de ar de 0,125 kgf/cm. Durante a atomização, a emulsão permaneceu em agitação constante a temperatura de 40 °C, para que se mantivesse homogênea e fluida.

As partículas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio, por 30 minutos adicionais em agitação constante, após completa atomização. Em seguida foram separadas em peneira de malha de aço, diâmetro de 53 μ m, e imersas em água deionizada com pH ajustado para 3,5 ou 3,75 por mais 5 minutos e novamente filtradas e lavadas com água deionizada (pH 3,5 ou 3,75). Foram feitas três produções independentes de partículas.

2.2.3.2 Recobrimento com proteína por interação eletrostática

O recobrimento de 100 g de Alg_{Part} preparadas no item 2.2.3.1, foi feito utilizando-se diferentes concentrações de proteína em solução WPC_{Sol}. Em pH 3,5 foram utilizadas as concentrações 0,6, 3 e 4% (p/p) e em pH 3,75, foram 1,7, 3 e 4% (p/p). As partículas foram mantidas nas respectivas soluções proteicas durante 30 minutos, sob agitação constante, à temperatura ambiente. As partículas foram então separadas em peneira (53 μ m) e lavadas com água deionizada, pH 3,5 ou 3,75 para a remoção das proteínas que não foram adsorvidas. Foram feitas três produções independentes de partículas para cada concentração de proteína estudada. As partículas foram analisadas em triplicata, em relação ao seu teor de proteína e umidade. Uma

porção das partículas úmidas foi congelada e liofilizada (Mod. 501, Edwards Pirani, Crawley, West Sussex, Reino Unido) com uma temperatura inicial de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão de $0,1\text{ mmHg}$, e temperatura final de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h, com tempo de ciclo total de 48 h, e em seguida, foi mantida sob refrigeração. O processo de produção de partículas está ilustrado no fluxograma da Figura 2.1.

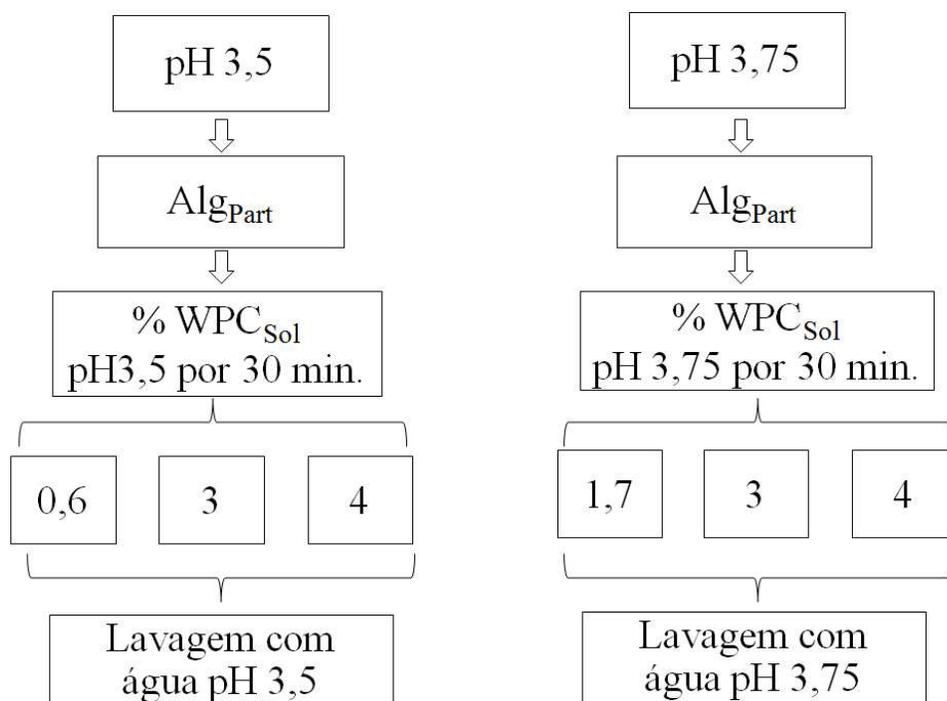


Figura 2.1 Fluxograma da produção de partículas de alginato recobertas com proteínas do soro do leite.

2.2.4 Caracterização das micropartículas

2.2.4.1 Conteúdo de proteína, umidade e eficiência de encapsulação

As micropartículas foram caracterizadas, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína e umidade, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2006). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Para a quantificação de proteína na partícula, foi realizada a

metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38, valor este relativo à proteína do soro de leite. As partículas de gelificação iônica também foram caracterizadas, em triplicata em relação ao conteúdo de lipídeos segundo Bligh e Dyer (1959). A eficiência de encapsulação foi calculada pela quantidade (%) de lipídeo determinado na partícula, em relação à quantidade inicial de lipídeo presente na emulsão formadora das partículas, sendo expressa em porcentagem (%).

2.2.4.2 Tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio ($d_{0,5}$) dos coacervados e das partículas úmidas foi medido no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Alemanha). O equipamento determina o tamanho das partículas por difração de luz, e o material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água deionizada com pH de 3,5 ou 3,75, conforme o pH de produção das partículas. A leitura foi realizada adicionando amostra dentro da unidade de amostragem, que já estava preenchida de água com pH ajustado. A quantidade de amostra adicionada variou de amostra para amostra, sempre atingindo a faixa de obscuração de 3 a 20%, conforme recomendação do fabricante.

2.2.4.3 Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A morfologia das partículas úmidas foi observada em microscópio ótico JENAVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 0,8 a 1,25 x. A captação das imagens foi realizada com a utilização do software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

A microestrutura das partículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (SEM) Jeol (T300, Japão), utilizando-se 15 kV. As amostras foram previamente fixadas em *stubs* com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (40 mA/200 s) por um evaporador Baltzer SCD50 (Baltec, Liechtensten).

2.2.5 Análise estatística

Diferenças significativas entre as médias para os valores obtidos foram avaliadas usando ANOVA e teste de Tukey com o auxílio do programa SAS 9, em nível de 5% de significância.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do Biopolímero

O concentrado proteico do soro do leite utilizado neste trabalho foi caracterizado quanto ao teor total de proteína, umidade, cinzas e lipídeos. Esta caracterização foi importante, uma vez que a amostra deste produto não é 100% constituída de proteína, sendo necessários cálculos de correção para se obter os valores exatos da quantidade de proteína em solução utilizados na avaliação da adsorção proteica na partícula.

Para o concentrado proteico do soro do leite foram encontrados valores de $74,30\% \pm 1,35$ de proteína, $6,72\% \pm 0,11$ de lipídeo, $8,52\% \pm 0,21$ de umidade, e $2,93\% \pm 0,04$ de cinzas. O concentrado proteico do soro do leite exibiu alto conteúdo proteico, coerente com os valores preconizados para os concentrados que variam de 25 a 80% de proteína (KADHARMESTAN; BAIK; CZUCHAJOWASKA, 1998; ANDRADE; NASSER, 2005; MADUREIRA et al., 2007).

O concentrado proteico do soro do leite é composto por uma mistura de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e traços de lactose, soro albumina e sais. A β -lactoglobulina representa cerca de 80% do total de proteínas presentes no soro do leite e a segunda proteína mais prevalente é a α -lactoalbumina (15%) (DONNELLY; McCLEMENTS; DECKER, 1998). Além disso, as proteínas do soro do leite são conhecidas pelo alto valor nutricional, apresentam valores superiores às recomendações para humanos para quase todos os aminoácidos, exceto pelos aromáticos (SGARBIERI, 2004).

3.2 Potencial zeta

3.2.1 Soluções de biopolímeros

O potencial zeta permitiu determinar a quantidade de cargas em solução do polissacarídeo e das proteínas do soro do leite, podendo, assim, identificar que é possível ocorrer interação eletrostática entre os materiais, em valores de pH abaixo de 4,5, onde estes apresentam cargas opostas.

Os valores de potencial zeta das WPC_{Sol}, Alg_{Sol} e Alg_{Emul} estão apresentados na figura abaixo (Figura 2.2).

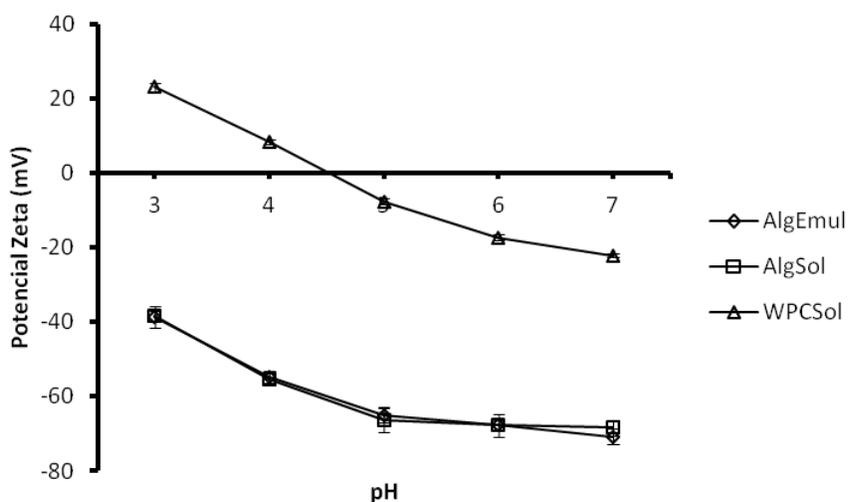


Figura 2.2 Potencial zeta das soluções de WPC, alginato e da emulsão do alginato a concentração de 0,2% (p/p) em função do pH.

O alginato em solução (Alg_{Sol}) apresentou cargas negativas em toda faixa de pH estudada, tendo sua eletronegatividade aumentada com a elevação do pH, variando de -38,36 a -68,34 mV, valores similares foram relatados na literatura. Um estudo realizado por Carneiro da Cunha et al. (2011) avaliando o potencial zeta de soluções de alginato a 0,2% (p/v) encontrou valores de -59,3 mV e -63,9 mV para os pHs 5 e 7, respectivamente. A carga líquida negativa do alginato é proveniente dos grupamentos carboxilas carregado negativamente (COO⁻) ao longo dos blocos D-manurônico e L-

gulurônico (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006), para soluções com pH acima de seu pKa, sendo que a medida que este pH aumenta, maior é sua carga negativa (JONES et al., 2010a).

Ao analisar o potencial zeta da emulsão (Alg_{Emul}) observou-se que a emulsificação do alginato com o óleo de girassol não alterou o potencial zeta do mesmo, indicando que a disponibilidade dos grupamentos COO⁻ não foram comprometidas pela mudança de área superficial.

O potencial zeta da WPC_{Sol} variou de 23,20 mV (pH 3) a 8,42 mV (pH 4) a -22,01 (pH 7), valores coerentes com os encontrados por Souza et al. (2012). O ponto isoelétrico (pI- carga nula) foi encontrado no pH 4,5, resultado muito próximo aos pontos isoelétricos reportados na literatura para as proteínas do soro do leite, que variam de 4,5 a 5,2 (WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 1997; LY et al., 2008).

Em pH inferior ao ponto isoelétrico, os grupos amino das proteínas apresentam-se carregados positivamente (-NH₃⁺), 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 (-NH₂). 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).

Em função do perfil eletroforético apresentados pelos biopolímeros, uma faixa restrita de interação entre pH 3 e 4,5 foi identificada. Desta forma, por conveniência adotou-se os pHs 3,5 e 3,75 para os testes subsequentes que definiram as condições ideais de formação dos complexos eletrostáticos entre o alginato e WPC.

3.2.2 Potencial zeta de diferentes relações de Alg_{Sol} : WPC_{Sol}

Diferentes relações entre Alg_{Sol} : WPC_{Sol} foram testadas nos pHs 3,5 e 3,75. Os resultados estão apresentados na Figura 2.3 (A – Alg_{Sol} : WPC_{Sol} em pH 3,5 e B – Alg_{Sol} : WPC_{Sol} em pH 3,75) onde na parte superior da figura têm-se os valores de potencial zeta, expressos em milivolts (mV) e na parte inferior as relações volumétricas utilizadas de Alg_{Sol} : WPC_{Sol}.

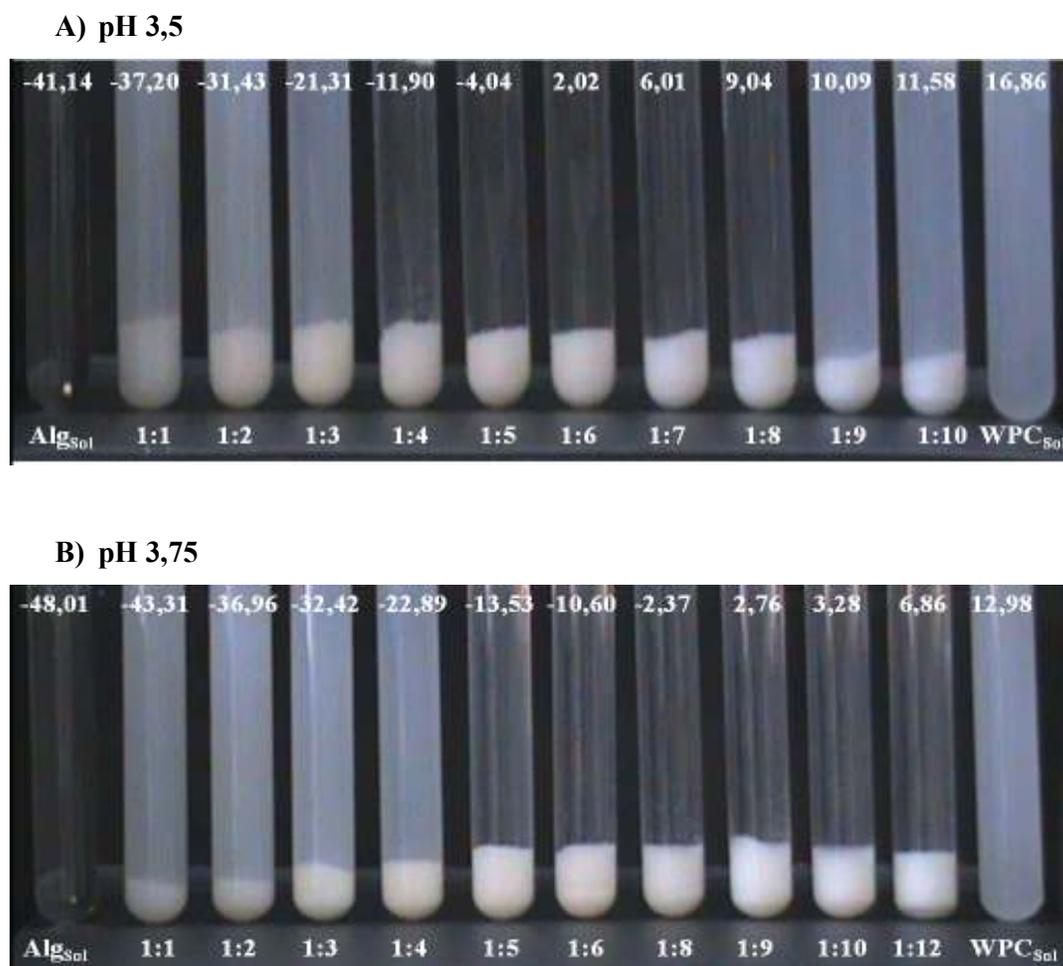


Figura 2.3 Influência do pH e da proporção Alg_{Sol} : WPC_{Sol}, no aspecto visual e valores de potencial zeta das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.

Em pH 3,5, os biopolímeros puros em solução apresentaram potencial zeta de 16,86 mV \pm 0,80 e -41,14 mV \pm 1,31, respectivamente para WPC_{Sol} e Alg_{Sol} (Figura 2.3 A). Estes valores foram de 12,98 mV \pm 0,63 para WPC_{Sol}, e -48,01 mV \pm 0,98 para Alg_{Sol} em pH 3,75 (Figura 2.3 B). As diferenças de carga apresentadas pelas soluções

em pH 3,5 e 3,75, estão de acordo com a literatura, uma vez que, polissacarídeos aniônicos perdem progressivamente sua carga a medida que o pH é reduzido em relação ao seu pKa (JONES et al., 2010a), ao contrário das proteínas, que aumentam sua carga positiva, em pHs inferiores ao seu pI.

É possível observar nas imagens que, os sistemas em ambos os pHs apresentaram mudanças físicas acompanhadas das alterações elétricas, a medida que a quantidade de WPC_{Sol} aumentou em relação ao conteúdo de alginato. Independentemente do pH, em todas as proporções de $Alg_{Sol} : WPC_{Sol}$ estudadas, formaram-se precipitados no fundo dos tubos. A formação dos precipitados ocorreu quase que imediatamente após a adição da WPC_{Sol} na Alg_{Sol} . Em um estudo onde a solução de goma acácia foi adicionada à solução de β - lactoglobulina, a separação de fases apareceu quase imediatamente após a mistura das soluções, em pHs 3,6, 4,2 e 5, e a amplitude das fases dependeu fortemente do valor do pH (SCHMITT et al., 1999).

Na análise visual das imagens das Figuras 2.3 A e B, pode-se observar uma aparência turva nos tubos das relações 1:1 a 1:3 para o pH 3,5 e 1:1 a 1:4 para o pH 3,75, embora tenha havido uma sedimentação no fundo dos tubos. Esta turbidez possivelmente esteve relacionada com o excesso de cargas negativas nos sistemas provenientes das cargas do alginato não neutralizadas pela presença insuficiente de proteína.

No entanto, com o aumento de proteína nos sistemas a partir das relações 1:4 (pH 3,5) e 1:5 (pH 3,75) e nas proporções seguintes destes pontos, os valores de potencial zeta foram reduzidos próximos a neutralidade, indicando um equilíbrio de cargas e a formação de complexos coacervados insolúveis que se sedimentaram. Nestas relações duas fases evidentes e distintas foram formadas nos tubos de ensaio: uma na parte inferior correspondente à associação entre Alg_{Sol} e WPC_{Sol} , e outra na parte superior correspondente à água, o solvente utilizado nos ensaios. Esta separação de fases ocorre quando existe uma forte atração eletrostática entre os biopolímeros, que faz com que eles se associem, resultando em uma separação de fases macroscópica (McCLEMENTS, 2006; SPERBER et al., 2009). Estas duas fases resultantes consistem em uma fase aquosa rica e outra pobre em biopolímeros (McCLEMENTS, 2006).

As relações 1:6 (2,02 mV) e 1:8 (-2,37 mV) em pH 3,5 e 3,75, respectivamente, foram as que apresentaram a carga mais próxima de zero, a neutralidade. A partir desses

resultados, observou-se que uma quantidade maior de solução de proteína foi necessária para neutralizar a solução de alginato, quando o pH foi aumentado de 3,5 para 3,75. Um estudo avaliando o potencial zeta de misturas entre pectina e β -lactoglobulina na proporção 1:10, também mostrou variações de carga em função do pH, foram encontrados valores de potencial zeta de 2 mV em pH 3,5 e -8,4 mV para o pH 7,5, na mesma relação (GIRARD; TURGEON; GAUTHIER, 2002). Assim, pode-se sugerir que o pH das soluções influenciou significativamente a formação dos coacervados, uma vez que o pH determina a densidade da carga dos biopolímeros e pode até induzir transições estruturais de proteínas e polissacarídeos (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007).

Além do pH, a proporção da mistura entre os biopolímeros também foi fundamental para controlar a carga de equilíbrio entre a proteína e o polissacarídeo, a intensidade das interações, e o grau de auto-agregação durante a complexação (SCHMITT et al., 1999; JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011). Em pH 3,5, o mais alto grau de coacervação com separação de fases evidentes ocorreu nas relações 1:4 a 1:8, e no pH 3,75 resultou nas relações 1:5 a 1:12. Desta forma pôde-se constatar que o efeito da proporção da mistura dos biopolímeros de coacervação foi dependente do pH das soluções.

A carga elétrica passou de negativa para positiva a partir das relações 1:6 e 1:9 para soluções de $Alg_{Sol} : WPC_{Sol}$ em pH 3,5 e 3,75, respectivamente. Com o aumento da quantidade de solução de proteína (nas relações 1:9 e 1:10 em pH 3,5) no sistema, a fase superior límpida tornou-se turva. Esta turbidez pode ser devida ao excedente de proteína no sistema que conseqüentemente geram um excesso de cargas positivas. Outra hipótese, é que a sobra de proteína esteja parcialmente complexada formando aglomerados muito pequenos que não se sedimentaram e acabaram gerando a turbidez.

Altas concentrações de biopolímero podem conduzir a auto supressão da coacervação complexa, uma vez que a composição do sistema atinge a do coacervado e a força matriz para a separação de fases tende a desaparecer (SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998).

Com relação aos tamanhos médios dos coacervados, estes variaram de 57,9 a 125,2 μm para o pH 3,5, e de 25,5 a 66,8 μm para pH 3,75. A partir das proporções 1:1 a 1:3, pH 3,5, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) do tamanho médio dos

coacervados (61,0 a 125,6 μm), seguido de uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de tamanho médio nas relações 1:4 a 1:10 (101,9 a 62,4 μm) ($p < 0,05$) (Tabela 2.1). O mesmo comportamento ocorreu em pH 3,75, um aumento significativo ($p < 0,05$) do tamanho médio dos coacervados ocorreu nas relações 1:1 a 1:4 (31,6 a 66,8 μm , respectivamente), sucedido de um declínio de tamanho médio a partir das proporções seguintes ($p < 0,05$) (Tabela 2.1). Com base nesses resultados, pode-se pressupor que ocorreu uma forte interação entre Alg_{Sol} : WPC_{Sol} o que levou a redução do tamanho médio dos coacervados. A força e a intensidade da interação eletrostática entre as soluções de bipolímeros podem produzir alterações morfológicas e afetar o inchamento das partículas (JONES; McCLEMENTS, 2010), podendo ser uma das causas para a redução do tamanho médio dos coacervados a partir das relações 1:4 e 1:5, em pH 3,5 e pH 3,75.

Tabela 2.1 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg_{Sol} : WPC_{Sol} .

Relações	pH 3,5	pH 3,75
	Média (μm)	Média (μm)
1:1	61,00 \pm 6,40 E*	31,57 \pm 2,42 E
1:2	97,20 \pm 21,66 B	38,36 \pm 2,26 D
1:3	125,58 \pm 10,09 A	52,90 \pm 6,62 B
1:4	101,91 \pm 8,30 B	66,82 \pm 5,69 A
1:5	89,20 \pm 10,73 CB	52,24 \pm 5,73 B
1:6	75,69 \pm 5,85 CD	46,26 \pm 5,41 C
1:7	57,98 \pm 4,57 E	ND
1:8	59,89 \pm 4,47 E	38,42 \pm 3,80 D
1:9	59,21 \pm 5,36 E	36,25 \pm 2,70 D
1:10	62,39 \pm 9,88 ED	30,52 \pm 3,12 E
1:12	ND**	25,55 \pm 2,39 E

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

** ND: não determinado.

3.2.3 Potencial zeta de diferentes relações de Alg_{Emul} : WPC_{Sol}

Os resultados das condições de coacervação avaliados no item anterior forneceram informações de carga livre quando os bipolímeros estão em solução. No entanto, também é muito importante analisar estas condições quando se utiliza uma emulsão, a fim de se verificar se a presença do óleo exerce alguma influência na interação eletrostática entre os biopolímeros e na formação de coacervados. Nesse caso, para poder comparar os dois sistemas foram mantidas as mesmas proporções nos mesmos pHs em que as misturas de Alg_{Sol} : WPC_{Sol} foram avaliadas. Na Figura 2.4, os valores de potencial zeta estão apresentados na parte superior da imagem (expressos em mV) e na parte inferior as relações entre Alg_{Emul} : WPC_{Sol}.

A) pH 3,5



B) pH 3,75

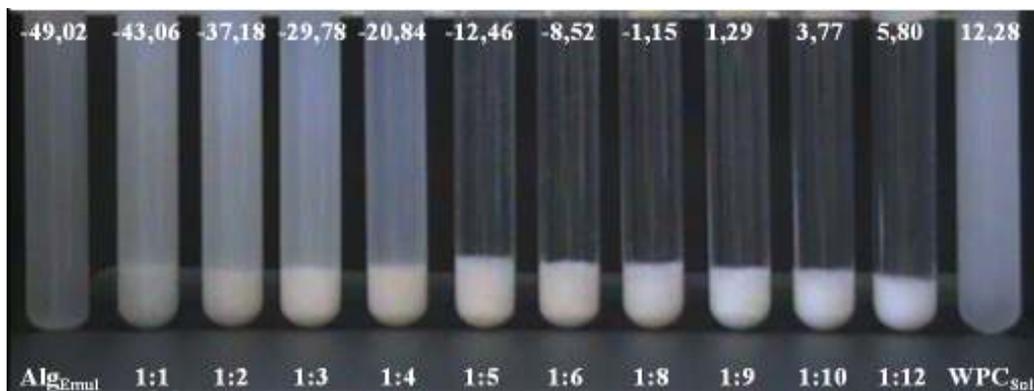


Figura 2.4 Influência do pH e da proporção Alg_{Emul} : WPC_{Sol}, no aspecto visual e valores de potencial zeta das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.

Em pH 3,5, a Alg_{Emul} a 0,2% (m/m) apresentou potencial zeta de $-42,89 \text{ mV} \pm 0,98$, muito próximo ao encontrado anteriormente para Alg_{Sol} $-41,14 \text{ mV} \pm 1,31$. Do mesmo modo, a Alg_{Emul} a 0,2% (m/m), pH 3,75, exibiu uma carga de $-49,02 \text{ mV} \pm 1,41$, muito similar ao potencial zeta da Alg_{Sol} $-48,01 \text{ mV} \pm 0,98$. As gotículas de emulsões, muitas vezes possuem carga elétrica devido à adsorção de biopolímeros ou de emulsificantes ionizáveis em sua superfície (McCLEMENTS; RAO, 2011), não verificado no presente estudo.

Ao analisar os valores do potencial zeta, observou-se que estes apresentaram valores de carga próximos aos encontrados anteriormente para misturas de Alg_{Sol} : WPC_{Sol} em seus respectivos pHs. Em todas as proporções estudadas, formaram-se precipitados no fundo dos tubos de ensaios, mostrando que a presença do óleo não influenciou no comportamento físico e elétrico dos coacervados entre os biopolímeros.

A partir da relação 1:4 e 1:5 em pH 3,5 e 3,75, respectivamente, a separação de fases foi evidente, sinalizando que a quantidade de proteína nos sistemas foi suficiente para o equilíbrio de cargas e a formação de coacervados insolúveis.

Para os sistemas contendo Alg_{Emul} : WPC_{Sol}, pH 3,5, a mudança de carga negativa para positiva ocorreu a partir da relação 1:6, enquanto que no pH 3,75, esta alteração ocorreu a partir da proporção 1:8.

Os sistemas com Alg_{Emul} também tiveram comportamentos similares aos sistemas de soluções em relação ao tamanho médio, sendo que, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,5$) do tamanho médio dos coacervados das relações 1:1 a 1:3 e 1:4, para pHs 3,5 e 3,75 respectivamente, seguido de uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do tamanho médio a partir das relações 1:4 para o pH 3,5 e 1:5 para o pH 3,75. Os tamanhos médios dos coacervados variaram de 36,0 a 74,6 μm para o pH 3,75 e, de 42,9 a 102,9 μm , pH 3,5 (Tabela 2.2).

Os tamanhos médios encontrados neste trabalho para os coacervados entre alginato e WPC foram maiores que os relatados na literatura para outras combinações de biopolímeros. Coacervados de hidrolisado de caseína produzidos com proteína de soja isolada e pectina de baixo teor de esterificação apresentaram tamanhos entre 16,2 a 24,1 μm , em pH 4,4 (MENDANHA et al., 2009). Partículas de luteína produzidas por coacervação complexa entre gelatina tipo B e goma arábica, na relação 1:1, apresentaram uma distribuição de tamanho entre 0 a 30 μm (QV; ZENG; JIANG, 2011),

valor este próximo ao encontrado neste estudo em pH 3,75. Coacervados produzidos com β - lactoglobulina e pectina de alto teor de metoxilação e pectina amidada apresentaram diâmetros de 350 e 1000 nm, respectivamente (KOVÁČOVÁ; SYNYTSYA; ŠTĚTINA, 2009).

Tabela 2.2 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg_{Emul} : WPC_{Sol}.

Relações	pH 3,5	pH 3,75
	Média (μm)	Média (μm)
1:1	49,61 \pm 12,49 FE*	36,05 \pm 14,99 E
1:2	69,94 \pm 11,43 C	45,83 \pm 5,70 DC
1:3	102,91 \pm 12,24 A	64,62 \pm 4,81 B
1:4	91,72 \pm 9,31 BA	74,56 \pm 8,82 A
1:5	82,20 \pm 9,06 B	64,73 \pm 6,39 B
1:6	67,23 \pm 7,15 C	62,12 \pm 6,15 B
1:7	62,65 \pm 5,78 DC	ND
1:8	55,76 \pm 7,37 DE	49,03 \pm 5,15 C
1:9	42,86 \pm 8,98 E	41,08 \pm 4,11DE
1:10	50,11 \pm 6,70 FE	38,82 \pm 2,66 DE
1:12	ND**	39,45 \pm 5,93 BE

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

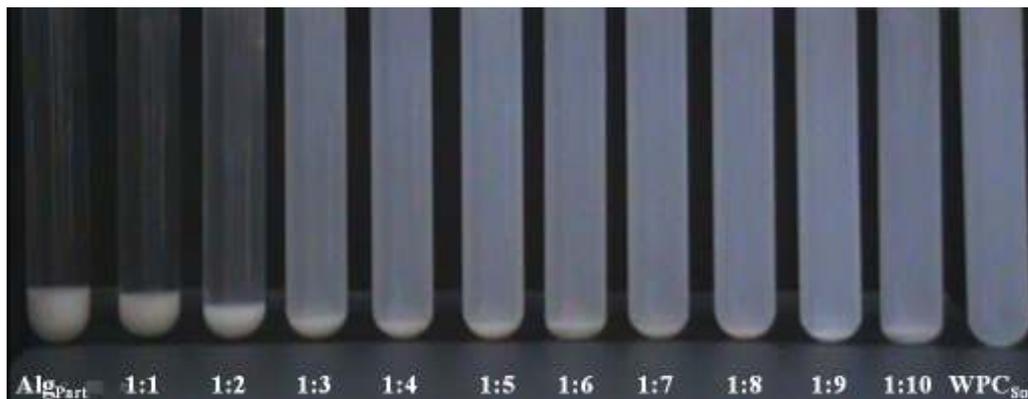
** ND: não determinado.

3.2.4 Avaliação visual de diferentes relações de Alg_{Part} : WPC_{Sol}

Quando as partículas foram produzidas parte da carga do alginato foi complexada com íons de cálcio e conseqüentemente a superfície da partícula terá menor carga disponível para interação com as proteínas do concentrado proteico do soro do leite. Deste modo, foi necessário avaliar todo o sistema (Alg_{Part} : WPC_{Sol}) com o intuito de verificar se também houve a formação de complexos entre Alg_{Part} e WPC_{Sol} quando ajustados para o pH 3,5 e 3,75.

As misturas entre $\text{Alg}_{\text{part}} : \text{WPC}_{\text{sol}}$ foram observadas visualmente nas mesmas proporções empregadas com $\text{Alg}_{\text{sol}} : \text{WPC}_{\text{sol}}$, mantendo a mesma quantidade de alginato utilizado nos ensaios anteriores (Figura 2.4).

A) pH 3,5



B) pH 3,75

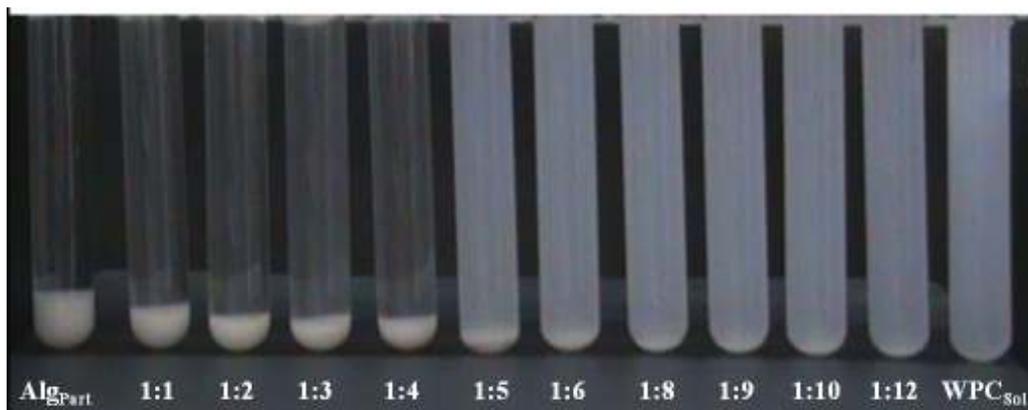


Figura 2.5 Influência do pH e da proporção $\text{Alg}_{\text{part}} : \text{WPC}_{\text{sol}}$, no aspecto visual das misturas. Imagens após 12 horas de repouso.

Neste estudo com partículas, a quantidade de carga não pôde ser quantificada pelo dispositivo de deslocamento eletroforético devida à rápida sedimentação das partículas de alginato. No entanto, a observação visual das proporções estudadas mostrou uma precipitação evidente de complexos nas proporções 1:1 e 1:2 para o pH 3,5 e 1:1 a 1:4 em pH 3,75, onde as fases superiores foram transparentes e incolores (Figuras 2.5 A e B). Segundo Sperber et al. (2009), a separação de fases ocorre quando

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

As imagens das Figuras 2.5 A e B, também permitiram observar um fato já esperado, uma menor quantidade de proteína no sistema foi necessária para a possível neutralização das cargas e precipitação das partículas coacervadas, em comparação com as misturas entre soluções (Figuras 2.3 A e B). Uma das prováveis causas para a diferença nas necessidades da quantidade de proteínas nos sistemas deve-se ao fato de que, durante o processo de gelificação iônica os grupos COO^- do alginato interagem com íons de Ca_2^+ , reduzindo as cargas livres totais na superfície das partículas de alginato (SMERDEL et al., 2008). Essa redução de cargas faz com que uma menor quantidade de proteína seja necessária para a neutralização das cargas do sistema. Em um estudo realizado por Opanasopit et al. (2008) utilizando pectina amidada, foi encontrado valores de potencial zeta de - 30 mV para uma solução de pectina a 0,1% em pH de 4 e - 10,4 \pm 0,8 mV para partículas de pectina obtidas por gelificação iônica no mesmo pH.

A partir da relação 1:3 e 1:5, pH 3,5 e pH 3,75 respectivamente, a fase superior tornou-se turva e opaca, indicando um excesso de proteína para a quantidade de partículas em solução.

Com relação aos tamanhos médios das partículas coacervadas, estes variaram de 194,5 a 201,1 μm para o pH 3,5, e de 196,9 a 219,9 μm para o pH 3,75. No entanto, não houve nenhuma diferença significativa entre os tamanhos médios das partículas em todas as relações estudadas em ambos os pHs (Tabela 2.3).

Com base nos resultados obtidos neste ensaio e nos anteriores, uma relação de $\text{Alg}_{\text{Part}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$ foi escolhida para cada pH, para a continuidade do trabalho. A proporção de $\text{Alg}_{\text{Part}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$ que formou mais precipitados no fundo do tubo de ensaio, com separação de fases evidentes foi escolhida, sendo esta relação a mais próxima da relação de $\text{Alg}_{\text{Sol}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$ e $\text{Alg}_{\text{Emul}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$ com carga próxima de zero. As relações escolhidas de $\text{Alg}_{\text{Part}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$ foram 1:1 em v/v ou 1:0,6 em p/p para o pH 3,5 e 1:4 em v/v ou 1:2,25 em p/p para o pH 3,75. A relação 1:2 de $\text{Alg}_{\text{Part}} : \text{WPC}_{\text{Sol}}$, pH 3,5 não foi escolhida, por não apresentar a fase superior totalmente transparente.

Tabela 2.3 Tamanhos médios dos coacervados obtidos entre misturas de Alg_{part} : WPC_{Sol}.

Relações	pH 3,5	pH 3,75
	Média (µm)	Média (µm)
1:0	199,00 ± 8,68 A	222,06 ± 22,61 A
1:1	194,51 ± 9,13 A	215,13 ± 21,05 A
1:2	198,76 ± 8,40 A	213,83 ± 16,62 A
1:3	194,94 ± 9,31 A	206,64 ± 12,02 A
1:4	197,80 ± 7,87 A	199,33 ± 12,01 A
1:5	198,41 ± 10,26 A	213,27 ± 16,83 A
1:6	195,14 ± 10,60 A	210,49 ± 20,54 A
1:7	199,93 ± 8,49 A	ND
1:8	201,14 ± 9,99 A	206,87 ± 11,59 A
1:9	200,77 ± 10,08 A	219,96 ± 32,81 A
1:10	197,66 ± 8,86 A	208,83 ± 17,67 A
1:12	ND	196,93 ± 24,87 A

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

** ND: não determinado.

3.3 Produção de micropartículas para avaliação da adsorção proteica

Ao se verificar no ensaio anterior, que foi possível formar complexos entre partículas de alginato (Alg_{part}) e WPC_{Sol} quando ajustados para o pH ótimo de interação, novos testes foram realizados para se quantificar o teor de proteína adsorvida sobre a superfície de Alg_{part}.

Foram produzidas partículas conforme descrito no item 2.2.3 recobertas com proteínas do soro do leite. Utilizou-se as proporções escolhidas nos ensaios anteriores, 1:0,6 (p/p) e 1:2,25 (p/p) para Alg_{part} e WPC_{Sol}, pH 3,5 e 3,75, e para se manter estas proporções em p/p, as concentrações testadas de solução de WPC foram 0,6 e 1,7%, respectivamente.

Ainda objetivando mais informações sobre esta incorporação proteica, outras tentativas foram realizadas, com as concentrações de 3 e 4% de WPC_{Sol}. Foi mantida a mesma quantidade de partículas utilizadas para adsorção de proteína nas concentrações 0,6 e 1,7%, de forma a se trabalhar com a mesma massa de alginato, e mesmo volume de solução proteica, havendo apenas um aumento mássico na quantidade de proteína em solução (3 e 4%), ocasionando assim um deslocamento da proporção em relação à WPC_{Sol}. Para a concentração de 3% a relação utilizada de Alg_{Part} e WPC_{Sol} em pH 3,5 foi de 1:3,62 (p/p) e de 1:4,49 (p/p) em pH 3,75, enquanto que para a concentração de 4% de proteína a relação foi para 1:7,25 (p/p) e 1:8,99 (p/p) Alg_{Part} e WPC_{Sol} pH 3,5 e 3,75, respectivamente.

Os teores de proteína adsorvida e a umidade estão apresentados nas tabelas 2.4 e 2.5.

Tabela 2.4 Teores de umidade e proteína adsorvida nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,5.

Alg _{Part} : WPC _{Sol}	Proteína (%)	Umidade (%)
	Média	Média
0,6%	7,39 ± 0,66 C*	93,00 ± 0,27 A
3%	11,69 ± 1,05 B	91,75 ± 0,31 B
4%	22,35 ± 1,80 A	89,17 ± 0,57 C

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

Tabela 2.5 Teores de umidade e proteína adsorvida nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,75.

Alg _{Part} : WPC _{Sol}	Proteína (%)	Umidade (%)
	Média	Média
1,7%	10,59 ± 1,70 B*	92,30 ± 0,34 A
3%	12,23 ± 1,13 B	91,50 ± 0,33 B
4%	32,49 ± 2,73 A	87,65 ± 0,77 C

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

A quantidade de proteína adsorvida variou de 7,39 a 22,35% para Alg_{Part} recobertas com WPC_{Sol} em pH 3,5, e de 10,59 a 32,49% em pH 3,75 (Tabelas 2.4 e 2.5).

A adsorção de proteína sobre a superfície das partículas de alginato aumentou com o aumento da concentração de proteína em solução para os dois pHs testados, 3,5 (Tabela 2.4) e 3,75 (Tabela 2.5). Em pH 3,5, a quantidade de proteína adsorvida foi significativamente ($p < 0,05$) aumentada com os níveis de 0,6, 3 e 4% de proteína em solução. Para o pH 3,75, o aumento da concentração de 1,7% para 3% de WPC_{Sol} não causou um aumento significativo na adsorção proteica ($p > 0,05$). Entretanto, quando a concentração de proteína em solução foi aumentada para 4% o teor de proteína adsorvida aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação às concentrações inferiores testadas.

Um estudo com micropartículas de alginato imersas em diferentes concentrações de quitosana também mostrou que o aumento na concentração de quitosana em solução causou um aumento na quantidade de quitosana adsorvida na superfície da partícula (XIE et al., 2009). Ainda segundo este mesmo estudo, a capacidade de adsorção em superfícies foi diretamente influenciada pelas cargas livres totais disponíveis, micropartículas com potenciais zeta elevados tinham maiores adsorções de quitosana na superfície.

As partículas produzidas neste trabalho apresentaram altos teores de umidade, variando de 89,2 a 93,0% em pH 3,5 e de 87,6 a 92,3% em pH 3,75 (Tabelas 2.4 e 2.5). Pode-se verificar que, para ambos os pHs estudados, o aumento da proteína adsorvida na partícula levou a uma redução significativa da umidade da mesma. Além disso, partículas recobertas em pH 3,75 foram as que apresentaram os menores teores de umidade. A redução da umidade está associada ao incremento de proteína na superfície da partícula.

Os tamanhos médios das partículas recobertas foram analisados e estão apresentados nas Tabelas 2.6 e 2.7, para as condições de pH 3,5 e 3,75, respectivamente.

Tabela 2.6 Tamanhos médios das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,5.

WPC_{Sol}	Tamanho (µm)	Tamanho (µm)
	Alg_{Part}	Alg_{Part}: WPC_{Sol}
0,6%	141,02 ± 16,13 Aa*	163,26 ± 22,76 BAa
3%	137,47 ± 28,48 Aa	188,22 ± 33,39 Aa
4%	135,03 ± 14,30 Ab	157,15 ± 22,97 Ba

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

Tabela 2.7 Tamanhos médios das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%) em pH 3,75.

WPC_{Sol}	Tamanho (µm)	Tamanho (µm)
	Alg_{Part}	Alg_{Part}: WPC_{Sol}
1,7%	140,38 ± 12,83 Ab*	192,82 ± 18,75 Aa
3%	120,23 ± 6,79 Ab	160,78 ± 15,90 Ba
4%	121,59 ± 16,26 Aa	134,04 ± 19,79 Ca

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

As partículas de gelificação iônica sem recobrimento proteico apresentaram tamanhos médios variando de 135,0 a 141,0 µm em pH 3,5 e de 121,6 a 140,4 µm, para o pH 3,75 (Tabelas 2.6 e 2.7). Quando foram recobertas com WPC_{Sol} em pH 3,5 na concentração 4%, e nas concentrações 1,7% e 3% em pH3,75, houve um aumento significativo nos tamanhos médios das partículas em relação às partículas Alg_{Part} de origem. Os tamanhos médios das partículas recobertas em pH 3,5 situaram entre 157,1 e 188,2 µm, e entre 134,0 a 192,8 µm em pH 3,75.

Partículas produzidas com alginato e quitosana também apresentaram um aumento de tamanho após o revestimento com quitosana, foram obtidos tamanhos entre 329 a 505 nm (NAGARWAL; KUMAR; PANDIT, 2012).

As partículas produzidas por gelificação iônica sem recobrimento proteico em pH 3,5 e 3,75, apresentaram teor lipídico de 46,3 e 47,4% (ambos em base úmida), e

eficiência de encapsulação de 92,6 e 94,8%, respectivamente, mostrando uma alta capacidade de retenção de óleo de girassol, utilizado como material de recheio durante a formação das partículas.

3.3.1 Morfologia e microestrutura das micropartículas

A morfologia das micropartículas dos ensaios pode ser visualizada nas Figuras 2.6 (pH 3,5) e 2.7 (pH 3,75). As imagens da microscopia ótica mostraram a formação de matrizes multinucleadas, com gotas lipídicas espalhadas homogeneamente ao longo das partículas. A grande maioria das partículas apresentou formato semelhante ao esférico, porém foram também observados formatos ovais.

O recobrimento das partículas com WPC_{Sol} não alterou significativamente sua aparência em nenhuma concentração testada. Independente do pH de produção das partículas, e da porcentagem de adsorção de proteína, as características morfológicas das partículas úmidas tenderam a serem similares entre si .

A observação da microscopia eletrônica de varredura para as partículas secas mostrou que as partículas aparentemente suportaram o processo de secagem, mantendo a sua forma esférica original (Figuras 2.6 e 2.7). No entanto, foi possível observar a presença de irregularidades e rugosidades nas superfícies das micropartículas desidratadas. As irregularidades na parede das partículas são provenientes principalmente de vesículas de óleo. A presença das rugosidades está associada à camada proteica adsorvida sobre a partícula, sem grandes diferenças visuais entre as micropartículas contendo as diferentes concentrações de proteína.

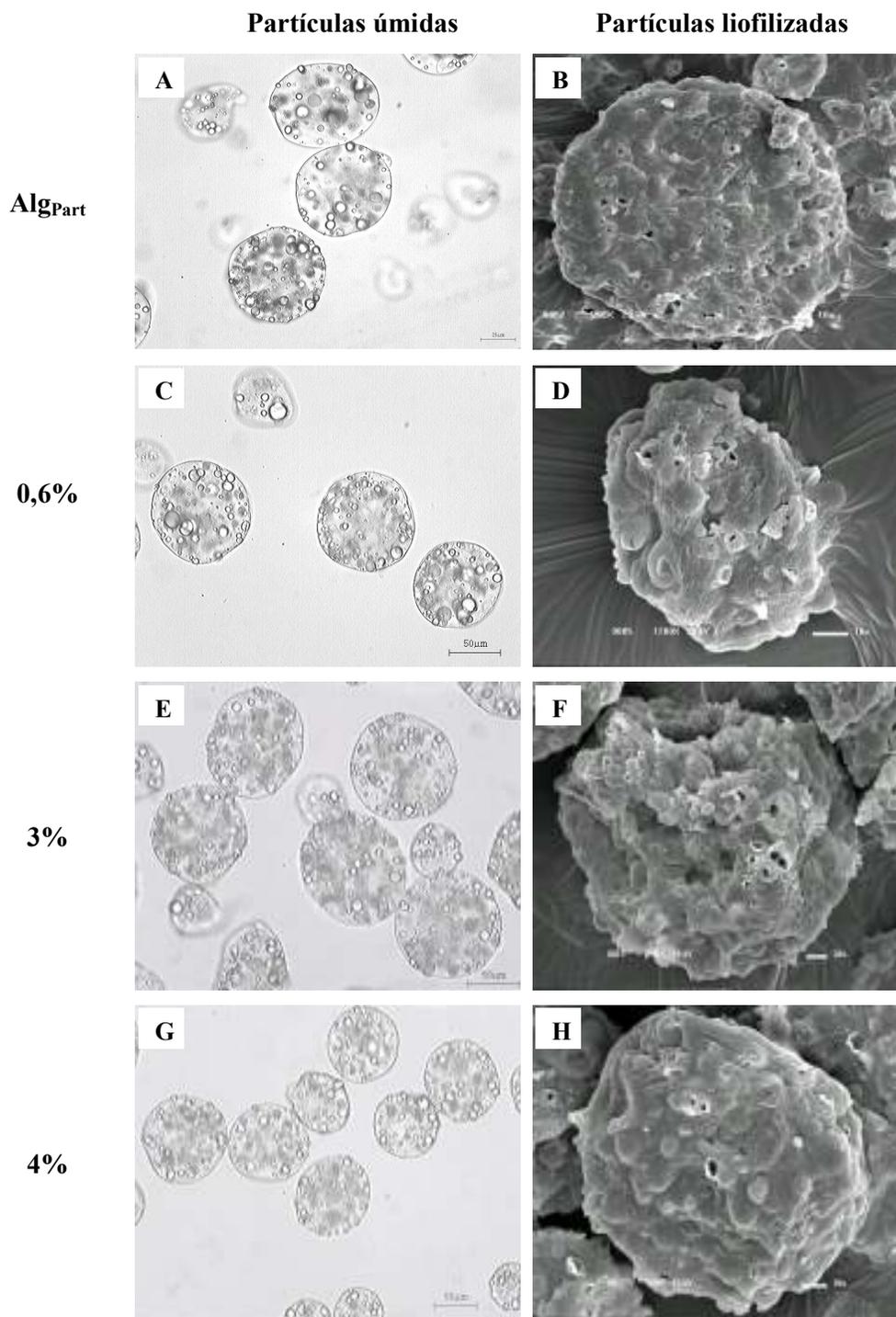


Figura 2.6 Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica e recobertas com proteínas do soro do leite em diferentes concentrações de proteína em solução, pH 3,5. Barras 10 μm (B, D, F e H), 25 μm (A) e 50 μm (C, E e G).

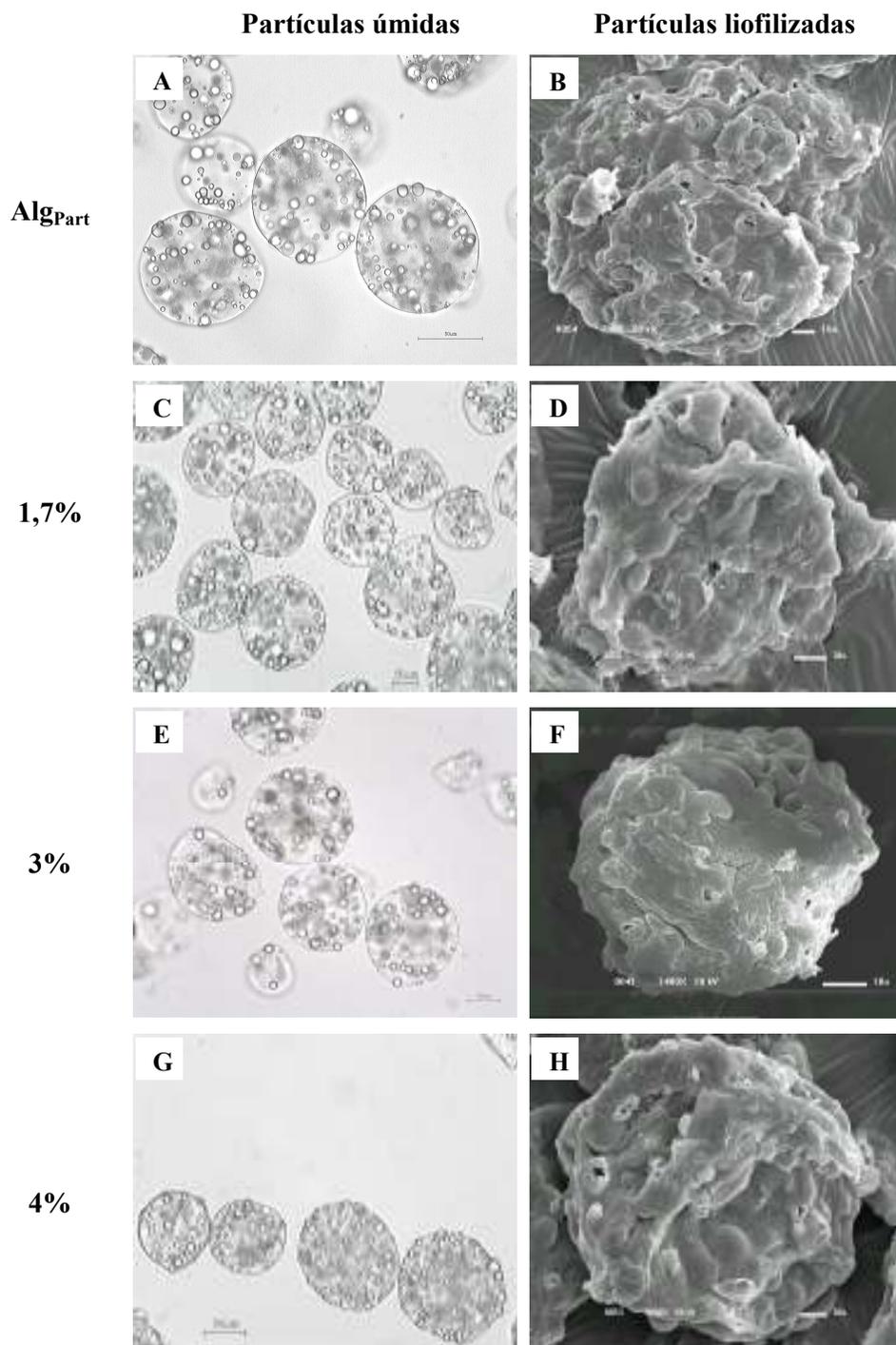


Figura 2.7 Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica e recobertas com proteínas do soro do leite em diferentes concentrações de proteína em solução, pH 3,75. Barras 10 μm (B, D, F e H), 25 μm (C e E) e 50 μm (A e G).

4. CONCLUSÕES

Com base na análise dos resultados, pôde-se observar que foi possível ocorrer interações eletrostáticas entre o alginato e o WPC em pH abaixo de 4,5, onde possuem cargas opostas. Além disso, misturas entre AlgSol : WPC_{Sol} e AlgEmul : WPC_{Sol} formaram coacervados em toda faixa estudada quando ajustadas para o pH 3,5 e 3,75. No entanto, houve necessidade de uma menor quantidade de WPC_{Sol} para formar coacervados quando utilizou-se Alg_{Part}. Embora a interação entre o alginato e os íons de Ca²⁺ tenha reduzido a carga total livre da superfície das partículas em comparação com a AlgSol, uma alta adsorção de proteína ainda foi possível através de interações eletrostáticas. Dentre os pHs 3,5 e 3,75 utilizados para a interação eletrostática entre a partícula de alginato e soluções de WPC, o que apresentou os melhores resultados de adsorção de proteica foi o pH 3,75. As maiores adsorções foram obtidas quando se utilizou a concentração de 4% de WPC_{Sol} em ambos pHs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n.2, p.315-321, abr.-jun. 2005.

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

AOAC. Association of official analytical chemist's official methods of analysis. 16th Ed. Washington, 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**, 3, p. 239-248, 2002.

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p.645-658, 2006.

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.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERGUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, 85, p. 522-528, 2011.

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

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4646- 4654, 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**, 25, p. 1604 – 1617, 2011.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with

wey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.

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

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; McCIEMENTS, D. J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, 344, p. 21–29, 2010.

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

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

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, 125, p. 1267–1272, 2011.

KADHARMESTAN, C.; BAIK, B.; CZUCHAJOWASKA, Z. Thermal behavior of wey protein concentrate treated by heat and high hydrostatic pressure and its functionality in wheat dough. **Cereal Chem**, v. 75, n. 6, p.785–791, 1998.

KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT**, 41, p. 493–500, 2008.

KOVÁČOVÁ, R.; SYNITSYA, A.; ŠTĚTINA, J. Characterisation of Whey Proteins-Pectin Interaction in Relation to Emulsifying Properties of Whey Proteins. **Czech J. Food Sci.**, v. 27, 2009.

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

KULMYRZAEV, A.; CHANAMAI, R.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and CaCl₂ on the stability of dilute wey protein stabilized emulsions. **Food Research International**, v.33, p.15-20, 2000.

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

LY, M. H.; AGUEDO, M.; GOUDOT, S.; LE, M. E.; CAYOT, P.; TEIXEIRA, J.A.; LE, T.M; BELIN, J.M; WACHÉ, Y. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.742-751, 2008.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, 40, p. 1197–1211, 2007.

McCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, 24, p. 621–625, 2006.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51, p.285–330, 2011.

MENDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MAURI, A.; MONTERREY- QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, 42, p. 1099–1104, 2009.

NAGARWAL, R. C.; KUMAR, R.; PANDIT, J. K. Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 47, p. 678–685, 2012.

OPANASOPIT, P.; APIRAKARAMWONG, A.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; RUKTANONCHAI, U. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. **AAPS PharmSciTech**, 9, 67-74, 2008.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Iontropic 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.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 1596- 1603, 2011.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between b-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, 13 p. 483–496, 1999.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 397-409, out./dez., 2004.

- SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, I. V.; GONÇALVES, A. R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **International Journal of Pharmaceutics**, 311, p. 1–10, 2006.
- SMERDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINŠEK, O.; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, 25, p. 90-105, 2008.
- SOUZA, F. N.; CORDEIRO, C. G. M. S.; RIBEIRO, M. C. E., CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International** (2012), doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.041
- SPERBER, B. L. H. M.; SCHOLS, H. A.; STUART, C.; NORDE, W.; VORAGEN, A. G. J. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, 23, p. 765–772, 2009.
- SYRBE, A; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems -an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **Int. Dairy Journal**, 8, p. 179- 193, 1998.
- TIOURINA, O. P.; SUKHORUKOV, G. B. Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin and controlled release study. **International Journal of Pharmaceutics**, 242, p.155–161, 2002.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Protein polysaccharide interactions. In: DAMODARAN, S. **Food proteins and their applications**. New York: M. Dekker, 1997. p.171-198
- 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.
- WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A. M. Mixed gels of gelatin and whey proteins, formed by combining temperature and high pressure. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 457- 470, 1997.
- WANG, Y.; KIMURA, K.; HUANG, Q.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Effects of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation. **Macromolecules**, 32, p. 7128-7134, 1999.
- WANG, R.; TIAN, Z.; CHEN, L. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. **Food Research International**, 44, p. 2735–2741, 2011.
- WEINBRECK, F.; VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; KRUIF, C. G. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 293 – 303, 2003.

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 38, p. 25–30, 2006.

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

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM MULTICAMADAS DE ALGINATO E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM MULTICAMADAS DE ALGINATO E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

RESUMO

A formação de multicamadas sobre a superfície de partículas pode ser utilizada para melhorar sua estabilidade e controlar a liberação do material encapsulado. Para o desenvolvimento de partículas com multicamadas de polieletrólitos para servir como um sistema de entrega de compostos ativos a compreensão dos principais fatores que influenciam a sua formação e a liberação dos compostos encapsulados são importantes. O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar a influência das concentrações de polieletrólitos na construção de multicamadas na superfície de partículas, além de monitorar a sua estabilidade frente a condições adversas do meio ambiente (temperatura, pH e sal) onde são inseridas, e seu comportamento dentro do trato gastrointestinal, *in vitro*. Partículas de alginato foram produzidas por gelificação iônica e a técnica “*layer by layer*” foi aplicada para a construção de multicamadas de alginato como polieletrólito aniônico e proteínas do soro do leite como componente catiônico. A influência das concentrações dos biopolímeros na construção de multicamadas sobre as partículas foi avaliada pela adsorção proteica na partícula. As partículas multicamadas também foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, tamanho médio e morfologia. O teor de proteína total encontrado nas multicamadas foi alto, variou de 51,20 a 64,91%, sendo que 33,24% dessa proteína foi encontrada na primeira camada (Alg_{Part1}), e valores entre 17,96 a 31,67% na terceira camada (Alg_{Part3}). Uma relação proporcional entre a concentração de alginato e WPC com o aumento da adsorção proteica na terceira camada foi observada. O teor de umidade das partículas de gelificação iônica (Alg_{Part}) diminuiu significativamente com a formação das multicamadas (Alg_{Part1} e Alg_{Part3}) sobre sua superfície, ao contrário do tamanho médio que aumentou durante este processo. Observações realizadas por MEV revelaram que camadas terminadas em alginato possuem superfícies mais lisas, enquanto que as terminadas em WPC apresentam rugosidades. A temperatura de esterilização influenciou a estabilidade, a morfologia e a capacidade de reidratação das partículas com multicamadas liofilizadas. As partículas

mantiveram-se estáveis em ampla faixa de pH (4 a 8) e de NaCl (0 a 150 mM) em solução, tendo uma solubilidade proteica menor que 3 e 16% da proteína inicial na partícula, respectivamente. Em pH 2 e na concentração 200 mM de NaCl, a solubilidade proteica aumentou significativamente para 22,05 e 19,49%, respectivamente. As partículas com multicamadas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas, com uma liberação de 30,49% da proteína na partícula. As multicamadas das partículas foram desfeitas com a ação da enzima pancreatina em ambiente intestinal simulado, promovendo a liberação de praticamente toda proteína da partícula.

1. INTRODUÇÃO

A concepção de micropartículas poliméricas tem inúmeras aplicações potenciais em diversas áreas, tais como veículos para fármacos, proteínas, enzimas, DNA, compostos antioxidantes, micro-organismos probióticos e entre outros (MOKARRAM et al., 2009; FANG; BHANDARI, 2010).

As micropartículas são desenvolvidas principalmente para proteger os materiais encapsulados de condições ambientais adversas do meio, como pH, luz, oxigênio e, ou condições gastrointestinais (pH, enzimas e temperatura), até que se atinja o momento ou o local desejado para sua liberação mediante estímulos específicos (SHAHIDI; HAN, 1993).

A produção de partículas por diversos métodos e materiais é cada vez mais estudada, apresentando grande importância no desenvolvimento de partículas estáveis e resistentes às condições gástricas (ANNAN; BORZA; TRUDELSTRUP HANSEN, 2008). A abordagem, “*layer by layer*” tem se mostrado uma técnica útil para a produção de partículas com multicamadas cujas propriedades supracitadas são definidas para aplicações entéricas (OCHS et al., 2010).

Esta técnica baseia-se na deposição eletrostática de polímeros com carga opostas, de forma alternada, sobre superfícies carregadas eletricamente, como as micropartículas (DECHER, 1997; AI; JONES; LVOV, 2003; YE et al., 2006; KREFT et al., 2007). Desde que, cada etapa de adsorção de polímero, leve a inversão de cargas na superfície, a deposição subsequente com polímero de carga oposta ao primeiro depositado, resulta

na formação de multicamadas, estabilizadas por fortes forças eletrostáticas (SCHÖNHOFF, 2003; ANTIPOV; SUKHORUKOV, 2004). A estrutura da partícula formada contém o núcleo revestido com várias camadas de material de parede (TOKLE et al., 2012).

Estudos tem mostrado que esta abordagem de construção de multicamadas pode ser utilizada para melhorar a estabilidade das partículas e controlar a liberação do material encapsulado (SCHNEIDER et al., 2001; TIOURINA; SUKHORUKOV, 2002; ANAL; STEVENS, 2005; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006a; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008; HÉBRARD et al., 2013).

A eficácia das multicamadas depende fortemente da sua capacidade em liberar os materiais encapsulados de forma controlada e no local desejado. Assim, a permeabilidade das camadas desempenha um papel fundamental neste processo, uma vez que as multicamadas poliméricas atuam como uma barreira de membrana obstrutiva para os materiais encapsulados (SHE et al., 2010). A permeabilidade e a desintegração das camadas podem ocorrer em resultado a estímulos externos tais como, mudança de pH, da força iônica e temperatura (YE et al., 2006; OCHS et al., 2010; SHE et al., 2010; MU; LU; LIU, 2011). Além disso, o tipo e as propriedades dos materiais utilizados, a espessura e o número de camadas também influenciam o comportamento de permeabilidade apresentado pelas multicamadas (SHE et al., 2010).

A construção de multicamadas sobre superfícies e, as respostas das camadas mediante estímulos foram revistos (AI; JONES; LVOV, 2003; SCHÖNHOFF, 2003; ANTIPOV; SUKHORUKOV, 2004; JOHNSTON et al., 2006; GLINEL et al., 2007). O processo de formação de multicamadas, em relação à variedade de materiais que podem ser utilizados para a sua construção e, ainda a possibilidade de sua combinação com outros métodos, torna esta técnica muito versátil e atraente (SCHÖNHOFF, 2003).

Nos últimos anos, a utilização de biopolímeros naturais para construção de multicamadas tem sido crescente. O biopolímero alginato tem se destacado neste sentido, por ser um polissacarídeo aniônico, composto de ácidos β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), unidos linearmente por meio de ligações glicosídicas α -1,4 (THU et al., 1996; SILVA et al., 2006; YOO et al., 2006; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008). Apresenta-se carregado negativamente acima do pH

correspondente ao seu pK_a (pH 3,65 - 3,80) e, e não dissociado em pH abaixo deste valor (SIMSEK- EGE; BOND; STRINGER, 2003).

O alginato sofre gelificação iônica, quando cátions divalentes interagem ionicamente com blocos de resíduos de ácido gulurônico, resultando na formação de géis insolúveis (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006b). No entanto, durante este processo, nem todos os grupos carboxílicos do alginato interagem com os íons cálcio, remanescendo cargas livres na superfície da partícula e possibilitando a formação de uma camada protetiva na sua superfície com um polieletrólito de carga oposta (DE VOS et al., 2007).

A produção de uma ou mais camadas de proteínas do soro do leite sobre a superfície de micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica pode melhorar seu efeito protetivo e sua estabilidade, uma vez que uma das dificuldades de sua aplicação é devida à grande porosidade da matriz que permite uma difusão rápida do material encapsulado (FUJIWARA et al., 2010).

Assim, devido às suas propriedades funcionais e nutricionais as proteínas do soro do leite, tem se mostrado como interessantes materiais para o recobrimento de partículas por permitir a sua proteção quando sujeitas aos fluidos gástricos (DOHERTY et al., 2012; SOUZA et al., 2012; HÉBRARD et al., 2013). Outro benefício potencial na utilização destas proteínas é a geração de bioativos pépticos, que podem exercer uma série de efeitos fisiológicos *in vivo*, através da hidrólise da proteína pela enzima pancreatina (CHEN; SUBIRADE, 2005; DOHERTY et al., 2011).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi produzir micropartículas de alginato através da gelificação iônica e construir multicamadas sobre sua superfície utilizando a técnica “*layer by layer*” com proteínas do soro do leite e alginato, com alta adsorção proteica. Avaliou-se a influência da concentração em solução do alginato e das proteínas do soro do leite sobre a adsorção proteica. As partículas foram caracterizadas quanto aos teores de proteína adsorvida, umidade, tamanho e morfologia. A estabilidade das partículas com multicamadas foi avaliada em temperatura de esterilização, diferentes pHs, variadas concentrações de NaCl em solução aquosa e em simulação das condições gastroentéricas através da caracterização das partículas quanto ao tamanho, solubilidade da camada proteica e morfologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: Alginato de Sódio (Manugel DMB, lote G470021); Concentrado proteico do soro do leite (lote 80 4U17601, Lacprodan - Arla Foods Ingredients, Dinamarca); Óleo de girassol comercial (Mazola, Mairinque – SP, Brasil); Cloreto de Cálcio P.A (lote 36308, Dinâmica, Diadema – SP, Brasil); Ácido clorídrico P.A 0,1M (Merck), Hidróxido de sódio a 50% (Nuclear, Diadema – SP, Brasil), Ácido sulfúrico P.A (Synth, Diadema - SP, Brasil); Sulfato de cobre P.A anidro (Synth, Diadema – SP, Brasil); Sulfato de potássio P.A anidro (lote 18308, Ecibra, São Paulo, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Produção de partículas

A partir da definição da concentração de proteína em solução que propiciou a maior adsorção proteica na partícula conforme o Capítulo 2, esta condição foi otimizada para a produção de uma nova partícula com multicamadas. Desta forma, a nova partícula foi produzida contendo uma segunda camada em polissacarídeo e uma terceira camada em proteína, como descrito nos itens subsequentes.

2.2.1.1 Produção de partículas de alginato por gelificação iônica (Alg_{part})

As partículas sobre as quais serão depositadas multicamadas sobre sua superfície foram produzidas por gelificação iônica. Para a obtenção dessas partículas, a solução de alginato a 2% (p/p) foi adicionada de óleo de girassol (2% p/p), e a mistura foi emulsificada em homogeneizador Ultra-Turrax (IKA, Works do Brasil) a 14.000 rpm durante 3 minutos. Essa emulsão foi atomizada sobre uma solução de cloreto de cálcio (2% p/v), pH 3,75, mantida sob agitação constante, utilizando um bico atomizador

duplo fluido de 1 mm de diâmetro, sob pressão de ar de 0,125 kgf/cm² e altura constante de 12 cm entre o atomizador e a solução iônica.

Após a atomização, as partículas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio, para cura, por 30 minutos. Em seguida, foram separadas por peneira de malha de aço (diâmetro de 53 µm) e imersas em água deionizada (pH 3,75) durante 5 minutos, e novamente separadas e lavadas com água deionizada neste mesmo pH.

2.2.1.2 Partículas com uma camada (Alg_{Part1})

Para a produção das partículas com uma camada (Alg_{Part1}), 100 g de Alg_{Part} obtidas como descrito no item 2.2.1.1 foram transferidas para a solução de WPC_{Sol} a concentração de 4% (p/p), com pH ajustado para 3,75, onde foram mantidas imersas sob agitação constante por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento, as partículas foram separadas em peneira de malha de aço (diâmetro de 53 µm) e lavadas com água deionizada (pH 3,75), para remoção da proteína não adsorvida.

2.2.2 Planejamento Experimental

As multicamadas sobre as partículas foram elaboradas de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR), do tipo 2² incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios foi elaborado. Esse planejamento visou determinar as condições que conduziriam em maior adsorção de proteínas na terceira camada formada sobre a partícula, já que o caso em estudo se tratou de um processo de obtenção de partículas com alta adsorção proteica. Assim, foram escolhidas como variáveis independentes a concentração das soluções de alginato e do WPC a serem utilizados como camadas. Esses biopolímeros foram escolhidos por serem biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos, podendo-se ampliar ainda mais a potencialidade de aplicação dessas partículas.

A escolha dos valores limites do planejamento foi feita baseada em alguns testes preliminares, onde se determinou que concentrações superiores a 0,125% de alginato em solução tornavam a solução muito viscosa dificultando a mobilidade das partículas quando adicionadas. Estes experimentos preliminares também indicaram que o pH das soluções de alginato utilizados para formar a segunda camada sobre a partícula não deveria ser ajustado, enquanto que, no caso das soluções proteicas utilizadas para a produção da terceira camada deveria ser ajustado para 3,75. As concentrações de proteína em solução foram escolhidas de modo a abranger parte dos estudos apresentados na literatura (SOUZA et al., 2012).

A variável resposta utilizada para a avaliação do planejamento foi a porcentagem de adsorção de proteína da terceira camada da partícula (Alg_{Part3}). Ela foi calculada como a diferença entre o total de proteína na partícula e a quantidade de proteína encontrada na primeira camada (Alg_{Part1}), sendo expressa em porcentagem. A quantidade de proteína encontrada na primeira camada foi utilizada como um valor fixo para calcular a adsorção de proteína da terceira camada de todos os ensaios realizados. A quantificação de proteína na partícula foi realizada pela metodologia de Kjeldahl como descrito no item 2.2.3.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente.

Tabela 3.1 Valores utilizados no delineamento composto central rotacional para a obtenção de partículas com multicamadas.

Variável	Código	-1,41	-1	0	1	+1,41
Concentração de						
Alginato (%)	ALG_{Sol}	0,065	0,074	0,095	0,116	0,125
Concentração de						
WPC (%)	WPC_{Sol}	1	1,44	2,5	3,56	4

Tabela 3.2 Planejamento experimental para obtenção de partículas com multicamadas.

Ensaio	Alg _{Sol} (%)	WPC _{Sol} (%)
1	0,074 (-1)*	1,44 (-1)
2	0,074 (-1)	3,56 (+1)
3	0,116 (+1)	1,44 (-1)
4	0,116 (+1)	3,56 (+1)
5	0,065 (-1,41)	2,5 (0)
6	0,125 (+1,41)	2,5 (0)
7	0,095 (0)	1 (-1,41)
8	0,095 (0)	4 (+1,41)
9	0,095 (0)	2,5 (0)
10	0,095 (0)	2,5 (0)
11	0,095 (0)	2,5 (0)

*Números em parênteses representam as variáveis codificadas do planejamento.

2.2.2.1 Produção de partículas multicamadas por interação eletrostática

2.2.2.1.1 Partículas com duas camadas (Alg_{Part2})

Foram transferidas 50 g de Alg_{Part1}, obtidas conforme o item 2.2.1.2, para Alg_{Sol} a diferentes concentrações: 0,065, 0,074, 0,095, 0,116 e 0,125%, sem ajuste de pH (pH natural entre 6,00 e 6,5), onde permaneceram por 1 hora sob agitação constante, a temperatura ambiente. Após este procedimento, o pH destas soluções foi medido e utilizados como referências para o ajuste do pH da água de lavagem das partículas. As partículas foram então novamente peneiradas (53 µm) e lavadas com água deionizada (pH entre 4,5 e 4,8).

2.2.2.1.2 Partículas com três camadas (Alg_{Part3})

As partículas obtidas (Alg_{Part2}) foram colocadas novamente em WPC_{Sol} , pH 3,75, em diferentes concentrações de acordo com o planejamento experimental, onde foram mantidas por 1 hora sob agitação constante, a temperatura ambiente. Posteriormente as partículas foram peneiradas e lavadas como descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.3 Conteúdo de proteína e umidade das micropartículas

As partículas foram caracterizadas em relação ao conteúdo total de proteína e umidade, de acordo com AOAC (2006). A umidade foi determinada por secagem em estufa a temperatura de 105 °C. O percentual de proteína contida na partícula, após secagem do material em estufa por 16 horas à 105 °C, foi determinado por metodologia de Kjeldahl, utilizando o fator de correção de 6,38 estabelecido para proteína do soro do leite, para conversão de nitrogênio em proteína.

2.2.4 Caracterização das micropartículas

2.2.4.1 Tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio ($d_{0,5}$) das micropartículas úmidas (recém processadas), respeitando a ordem de produção, Alg_{Part} , Alg_{Part1} , Alg_{Part2} e Alg_{Part3} foram avaliados no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Germany), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Germany). O equipamento determina o tamanho das partículas por difração a laser e o material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água deionizada. As partículas úmidas foram medidas com água em seus respectivos pHs. A leitura foi realizada adicionando-se a amostra dentro da unidade de amostragem, que já estava preenchida com água e a quantidade de amostra adicionada variou, sempre atingindo a obscuração de 3 a 20% conforme sugestão do fabricante.

2.2.4.2 Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A morfologia das partículas úmidas foi observada em microscópio ótico JENAVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 0,8 a 1,25 x. A captação das imagens foi realizada, utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

A microestrutura das micropartículas liofilizadas (secas) foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Uma porção das partículas úmidas foi congelada e liofilizada (Mod. 501, Edwards Pirani, Crawley, West Sussex, Reino Unido) com uma temperatura inicial de – 40 °C, uma pressão de 0,1 mmHg, uma temperatura final de 25 °C/ 2 h, um tempo de ciclo total de 48 h. Em seguida, as amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (200 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec, Liechtensten). Para observação foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo JMS – T300 Jeol, com uma aceleração de voltagem de 20 kV.

2.2.5. Avaliação da estabilidade da micropartícula com multicamadas

Do planejamento experimental, escolheu-se a amostra de partículas que obteve a maior adsorção de proteína para ser avaliada quanto a estabilidade em temperatura, diferentes pHs, variadas concentrações de sal e em simulação das condições gastrointestinais.

2.2.5.1 Estabilidade da partícula em temperatura

O efeito da temperatura na aparência visual, na morfologia e no tamanho das partículas foi avaliado, utilizando duas abordagens: (i) avaliação das partículas úmidas, onde 1 g de partículas foi suspenso em 10 mL de água deionizada em pH 3,75, estas foram submetidas a 121 °C por 15 minutos em uma autoclave e, em seguida foi determinado seu tamanho e sua morfologia. Foram utilizadas partículas úmidas para comparação como controle, adicionadas em 10 mL de água deionizada (pH 3,75), sem

submeter a temperatura, sua morfologia e seu tamanho foram determinados imediatamente após uma rápida agitação; (ii) avaliação das partículas secas por liofilização, aproximadamente 1 g de pó foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e, em seguida reidratado diretamente em água com pH ajustado para 3,75, estas ficaram sob agitação constante em um homogeneizador de soluções rotativo, a 22 rpm (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas. Para comparação foi utilizado o tamanho e a morfologia das partículas secas reidratadas conforme citado acima, sem submeter à temperatura. O tamanho foi determinado em triplicata para cada amostra em cada condição estudada, utilizando-se um medidor de tamanho Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, UK). Os resultados do tamanho são apresentados como tamanho médio (d 0,5) e desvio padrão. A morfologia das partículas foi observada em microscópio ótico JENAVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 0,8 a 1,25 x. A captação das imagens foi realizada, utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

2.2.5.2 Estabilidade da partícula em diferentes pHs

O efeito do pH nas propriedades das partículas com multicamadas foi avaliado quanto à aparência visual, morfologia, tamanho e solubilidade proteica. Aproximadamente 1 g de partículas úmidas foi suspenso em 10 mL de água deionizada em diferentes pHs 2, 4, 6 e 8, e estas permaneceram em agitação constante em um homogeneizador de soluções rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas antes da determinação do tamanho. As leituras de tamanho e a observação da morfologia foram realizadas em seus respectivos pHs conforme o item anterior. Adicionalmente amostras foram retiradas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, onde se quantificou o teor de proteína do sobrenadante, que se desprende das partículas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2006). A solubilidade proteica foi calculada pela quantidade determinada no sobrenadante, em relação ao valor de proteína inicial presente na massa da partícula, em base seca e expressa em porcentagem. O teor de proteína total inicial na partícula também foi determinado por Kjeldahl. Para esta

avaliação foram produzidos três lotes independentes de partícula com determinações feitas em triplicata para cada lote em cada condição avaliada.

2.2.5.3 Estabilidade da partícula em diferentes concentrações de sal.

O efeito do sal na estabilidade das micropartículas multicamadas foi investigado quanto à aparência visual, morfologia, tamanho e solubilidade proteica. Foi adicionado 1 g de partículas úmidas em 10 mL de solução de NaCl com pH ajustado para 3,75, em diferentes concentrações, a saber: 0 mM (0%); 50 mM (0,3%), 100 mM (0,6%), 150 mM (0,9%) e 200 mM (1,2%). As partículas foram mantidas em solução de NaCl sob agitação constante em um homogeneizador de soluções rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas. As leituras de tamanho foram realizadas em seguida, e em pH 3,75, utilizando-se um medidor de tamanho Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, UK). Os resultados de tamanho são apresentados como tamanho médio (d_{0,5}) e desvio padrão. A morfologia foi observada através da captura de imagens em microscópio ótico. A solubilidade proteica foi determinada conforme o procedimento citado acima. Os ensaios foram feitos em triplicata da triplicata.

2.2.5.4 Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais.

As partículas também foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas para avaliar sua resistência. Em tubos de vidro de 50 mL, foram adicionados 3 g de micropartículas úmidas e 30 mL de suco gástrico artificial (SGA) com pH ajustado para 2, e incubados a 37 °C, em banho maria com agitação, por 2 horas. O suco gástrico artificial (SGA) utilizado foi elaborado a partir de: 1,12 g/L KCl; 2 g/L NaCl; 0,11 g/L CaCl₂; 0,4 g/L KH₂PO₄; 3,5 g/L de mucina e 0,26 g/L de pepsina e HCl para ajuste de pH (SULTANA et al., 2000; MOZZI et al., 2009). Posteriormente, alterou-se o pH para 7 com solução de NaHCO₃ na concentração de 20% (p/v) e adicionou-se a pancreatina na concentração de 1,95 g/L, e novamente se incubou as amostras por mais 22 horas a

37 °C. Após intervalos de tempo de uma, duas, sete e vinte e quatro horas amostras foram retiradas e avaliadas quanto à morfologia ótica através da captação de imagens em microscópio ótico.

Após 2, 7 e 24 horas de simulação das condições gastrointestinais, alíquotas de 10 mL foram separadas e colocadas em banho de gelo, onde permaneceram imersas por 15 minutos para inativação das enzimas. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas por 20 minutos 34540 G (centrífuga modelo RC-5C Sorvall Instruments, Wilmington, USA). Do sobrenadante quantificou-se o teor de proteína que se despreendeu das micropartículas e ficou solúvel no SGA, por método de Kjeldalh (fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,38). Foi preparado um branco, contendo apenas SGA e a pancreatina para descontar o nitrogênio proveniente de enzimas, quantificando dessa forma a quantidade de proteína que foi solubilizada durante a simulação gastroentérica. O total de proteína inicial na partícula também foi determinado por Kjeldalh. A solubilidade proteica foi calculada pela quantidade determinada no sobrenadante, em relação ao valor de proteína inicial presente na massa da micropartícula, em base seca e expressa em porcentagem. Para esta avaliação, três lotes independentes de partículas foram produzidos e avaliados em triplicata para cada lote em cada tempo.

2.2.6. Análise estatística

Os resultados do planejamento experimental foram avaliados através do software *Statistica 7*. O cálculo da análise de variância ANOVA foi realizado pelo programa estatístico SAS 9 e o teste Tukey foi realizado para determinar diferenças entre médias no intervalo de 95% de confiança, para os resultados das demais análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação das condições para produção de micropartículas com multicamadas – Planejamento Experimental

As partículas com multicamadas foram produzidas utilizando duas técnicas de microencapsulação, a gelificação iônica e a interação eletrostática. Primeiramente a partícula de hidrogel foi formada por gelificação iônica, que ocorre devido à difusão de íons de cálcio a partir do meio de gelificação para os blocos D - manurônico e L – gulurônico do alginato (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006b). Em seguida, estas partículas recém processadas foram imersas na solução de WPC (4%), que tendem a se ligarem eletrostaticamente às cargas residuais das moléculas de alginato livres presentes na superfície das partículas. Após este procedimento, as partículas obtidas apresentaram coloração ligeiramente amarelada, similar à cor do WPC em pó, e um aspecto mais “seco” quando comparadas às partículas de gelificação iônica obtidas anteriormente, que aparentemente eram brancas, macias e úmidas. A transferência destas partículas para a solução de alginato aparentemente produziu outra camada de alginato sobre a superfície das mesmas, além disso, as partículas obtidas apresentaram um aspecto visual “flácido” e úmido similar a de um gel, no entanto as partículas voltaram a apresentar uma coloração ligeiramente amarelada e um aspecto aparentemente mais “seco” após serem imersas na solução de WPC, indicando que outra camada proteica foi formada sobre as partículas.

Extensos trabalhos de investigação na produção de multicamadas por “*layer by layer*” tem sido relatados na literatura. Anal e Stevens (2005) e Bajpai e Tankhiwale (2006), também produziram partículas com multicamadas de alginato e quitosana com a combinação das duas técnicas de microencapsulação utilizadas no presente estudo.

O planejamento experimental apresentado na Tabela 3.3 mostra as condições estudadas para produção das multicamadas sobre a partícula.

Tabela 3.3 Ensaios do Planejamento Experimental e o teor de proteína adsorvida nas camadas das partículas, seguida da variável resposta da adsorção de proteína (%) na terceira camada das partículas, para avaliação da produção de partículas com multicamadas.

Ensaio	Variáveis			Resposta	
	Algsol (%)	WPC _{Sol} (%)	Total*	% Proteína Alg _{Part1} **	Alg _{Part3} ***
1	0,074	1,44	51,20 ± 3,06		17,96 ± 3,06 b
2	0,074	3,56	52,8 ± 3,31		19,56 ± 3,31 b
3	0,116	1,44	57,49 ± 3,15		24,25 ± 3,15 a
4	0,116	3,56	64,21 ± 1,15		30,97 ± 1,15 a
5	0,065	2,50	52,96 ± 0,85		19,72 ± 0,85 b
6	0,125	2,50	64,91 ± 0,76	33,24 ± 2,67a****	31,67 ± 0,76 a
7	0,095	1,00	52,34 ± 1,29		19,10 ± 1,29 b
8	0,095	4,00	57,30 ± 1,96		24,06 ± 1,96 b
9	0,095	2,50	62,34 ± 1,94		29,15 ± 1,94 a
10	0,095	2,50	61,41 ± 0,53		28,17 ± 0,52 b
11	0,095	2,50	61,19 ± 1,66		27,95 ± 1,67 b

*Total: expressa a porcentagem total de proteína encontrada nas partículas de cada ensaio.

** Alg_{Part1}: teor de proteína adsorvida no primeiro recobrimento da partícula com WPC_{Sol}.

*** Alg_{Part3}: é o teor de proteína encontrado no terceiro recobrimento da partícula com WPC_{Sol} (Alg_{Part3}). Foi calculado como a diferença entre o total de proteína na partícula e a quantidade de proteína encontrada na primeira camada (Alg_{Part1}), sendo expresso em porcentagem.

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

Pode-se observar que a utilização do alginato como poliânion e do WPC como polycation para a produção das multicamadas sobre a superfície da partícula foi bem sucedida, mostrando que é possível utilizar estes dois polieletrólitos para a produção de camadas.

As partículas com multicamadas apresentaram uma alta adsorção de proteína, variando de 51,20 a 64,91% (Tabela 3.3). Na primeira camada (Alg_{Part1}) atingiu-se uma adsorção de proteína na partícula de 33,24%, resultado muito próximo ao encontrado no capítulo anterior, 32,49%.

As respostas obtidas da média de adsorção de proteína na terceira camada (Alg_{Part3}) da partícula mostram claramente que houve adsorção de proteína em todos os ensaios do planejamento, independentemente das concentrações de alginato e WPC em solução estudadas.

Essa adsorção proteica só foi possível devida à formação de uma camada anterior de alginato. Segundo Schönhoff (2003) a construção de camadas sobre uma superfície ocorre, contanto que, em cada etapa de adsorção de polímero leve a inversão de carga na superfície, possibilitando assim, a deposição de um polímero de carga oposta e a formação de um complexo de camadas através da interação eletrostática.

Diante disso, acredita-se que a formação da camada de alginato sobre a primeira camada proteica por interação eletrostática, tenha levado a uma inversão de carga livre total na superfície, passando de positiva para negativa. Conseqüentemente, em pH 3,75, uma forte interação eletrostática entre os grupos carboxílicos de alginato livres na superfície da partícula e os grupos aminos carregados positivamente do WPC, proporcionaram a adsorção da proteína e a formação da Alg_{Part3} .

O teor de proteína adsorvido na Alg_{Part3} foi alto, variando de 17,96 a 31,67%. As adsorções máximas ocorreram nos ensaios 4 e 6, com adsorções de 30,97 e 31,67%, respectivamente, aumentando em 93 e 95% o conteúdo de proteína em relação à primeira camada (Tabela 3.3). A menor adsorção foi observada no ensaio 1, quando se utilizou uma menor concentração de alginato e WPC em solução, atingindo uma adsorção de 17,96%.

A avaliação do planejamento mostra que todas as variáveis (concentração de alginato e WPC, e a interação entre essas duas variáveis) apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre a adsorção de proteína nas micropartículas. O coeficiente

de correlação R^2 ajustado pelo modelo foi de 0,9944, deixando evidente a validade do modelo e a significância da regressão, como pode ser observado no gráfico de Pareto da Figura 3.1. Os valores obtidos pelo coeficiente de regressão do modelo podem ser visualizados na Tabela A. 1 do Anexo.

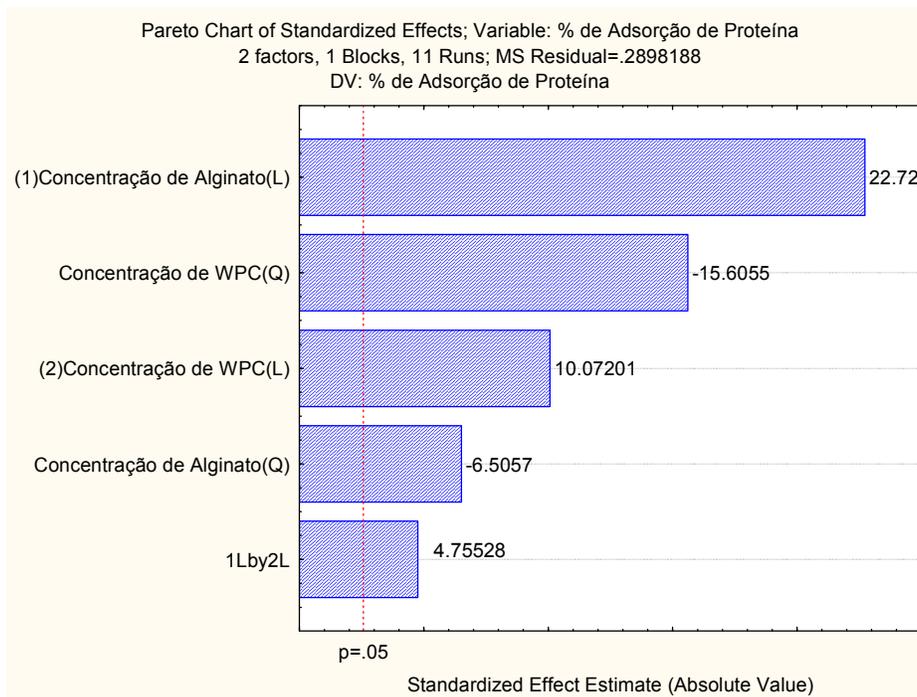


Figura 3.1 Gráfico de Pareto com valores estimados dos efeitos padronizados e suas interações para as variáveis estudadas sobre a adsorção de proteína na terceira camada da partícula.

Os efeitos das variáveis para as respostas de adsorção de proteína na partícula foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$ e estão apresentados na Tabela A.2 do Anexo. As análises dos efeitos das variáveis do processo, representadas por meio da superfície de resposta e de contorno, podem ser observadas na Figura 3.2 (A e B).

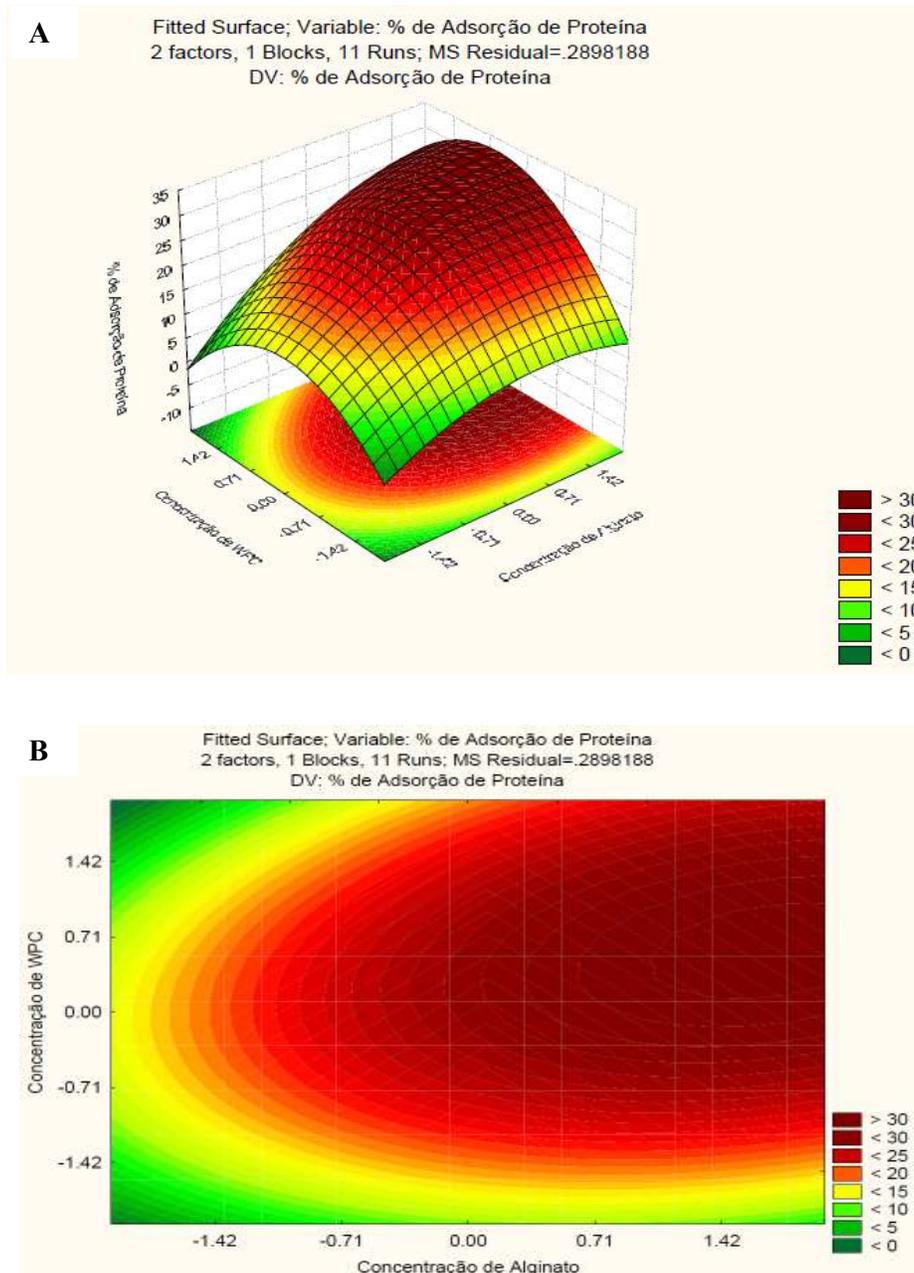


Figura 3.2 Superfície de resposta e superfície de contorno para adsorção de proteína (%) na terceira camada da partícula em função da concentração de Alginato e WPC em solução; Superfície de resposta (A); Superfície de contorno (B).

É possível verificar através da superfície e curva de contorno uma relação proporcional entre a concentração de alginato e WPC com aumento da adsorção de proteína. As concentrações 0,116% e 0,125% de alginato e 3,56% e 2,5% de WPC,

respectivamente, são as concentrações que maximizaram a adsorção proteica na partícula.

O número de grupos carboxílicos se eleva com aumento da fração de alginato (PETRUSIC et al., 2012). Assim a provável explicação para os resultados observados é que, com o aumento da concentração de alginato, um maior número de grupos carboxílicos em cadeia de alginato livres é fornecido para a interação eletrostática com a proteína, induzindo um aumento proporcional nas ligações entre os grupos carboxílicos livres e os grupos aminos da proteína, resultando em uma maior adsorção proteica.

3.2 Teor de umidade e tamanho das micropartículas em função da concentração de alginato e de proteína em solução.

O teor de umidade das partículas de gelificação iônica (Alg_{Part}) produzidas para os ensaios do planejamento variaram entre 93,31 a 93,90%, como esperado para matrizes produzidas com polissacarídeos, que apresentam como característica uma alta capacidade de retenção de água, resultados estes similares aos obtidos por Mukai-Corrêa et al. (2005), que encontraram valores de umidade superiores a 90% para microcápsulas de gelificação iônica.

No entanto, a formação das multicamadas (Alg_{Part1} e Alg_{Part3}) sobre a superfície das micropartículas diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o teor de umidade em relação ao seu teor inicial, sugerindo uma tendência a diminuição do teor de umidade com a adsorção de proteína na partícula.

Para as micropartículas com uma camada (Alg_{Part1}) os teores de umidade variaram entre 85,72 a 88,15% e entre 84,93 a 90,25% para as micropartículas com três camadas (Alg_{Part3}) (Tabela 3.4). O teor de umidade das partículas úmidas com duas camadas recém-processadas (Alg_{Part2}) não foi determinado, devida a dificuldade inerente à secagem da partícula sem alterar a sua estrutura, uma vez que a camada mais externa de alginato não se encontrava ainda enrijecida.

Tabela 3.4 Teor de umidade nas micropartículas com multicamadas em função da concentração de alginato e de proteína em solução (%).

UMIDADE%			
Ensaio	AlgPart*	AlgPart1**	AlgPart3***
1	93,75 ± 0,13 a****	87,01 ± 0,21 c	88,40 ± 0,54 b
2	93,74 ± 0,21 a	88,15 ± 0,41 b	87,77 ± 0,74 b
3	93,80 ± 0,26 a	86,97 ± 0,37 c	89,56 ± 0,51 b
4	93,90 ± 0,19 a	87,96 ± 0,28 b	87,85 ± 0,16 b
5	93,61 ± 0,22 a	87,63 ± 0,64 b	87,59 ± 0,25 b
6	93,36 ± 0,23 a	86,13 ± 0,21 c	87,70 ± 0,24 b
7	93,65 ± 0,17 a	86,59 ± 0,97 c	90,25 ± 0,91 b
8	93,63 ± 0,37 a	87,23 ± 0,66 b	84,93 ± 1,06 c
9	93,67 ± 0,07 a	86,66 ± 0,23 b	87,18 ± 0,18 b
10	93,31 ± 0,22 a	85,72 ± 0,31 c	87,11 ± 0,08 b
11	93,83 ± 0,33 a	87,54 ± 0,18 b	87,60 ± 0,15 b

* AlgPart: Partícula de alginato obtida por gelificação iônica, sem recobrimento.

** AlgPart1: Partícula com o primeiro recobrimento de WPC_{Sol}.

***AlgPart3: Partícula com o terceiro recobrimento de WPC_{Sol}.

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

Os tamanhos médios das partículas de gelificação iônica (AlgPart) dos ensaios do planejamento situaram-se entre 91,3 e 130,4 µm. A maioria das partículas produzidas para os ensaios apresentaram uma relativa homogeneidade de distribuição de tamanho. Para preparar partículas com tamanhos uniformes é essencial que a viscosidade da solução, a queda das gotas sob a agitação e a distância entre bico atomizador e o meio de gelificação sejam mantidos constantes, durante o processo de formação das partículas; uma ligeira variação em qualquer um destes parâmetros pode resultar na produção de partículas com tamanho não homogêneo (BAJPAI; TANKHIWALE, 2008).

Tabela 3.5 Tamanhos médios das micropartículas com multicamadas em função da concentração de alginato e de proteína em solução (%).

Ensaio	TAMANHO d (0.5) μm			
	Alg _{Part} *	Alg _{Part1} **	Alg _{Part2} ***	Alg _{Part3} ****
1	111,69 \pm 8,79 c	129,35 \pm 15,29 c	247,21 \pm 15,41 a	171,94 \pm 12,10 b
2	116,88 \pm 13,16 b	137,09 \pm 12,19 b	320,29 \pm 49,48 a	170,53 \pm 10,46 b
3	114,67 \pm 8,67 c	129,92 \pm 7,35 c	326,50 \pm 26,02 a	179,68 \pm 13,60 b
4	111,71 \pm 13,41 c	138,01 \pm 6,76 c	423,33 \pm 34,94 a	223,72 \pm 15,88 b
5	113,23 \pm 13,74 b	132,23 \pm 3,18 b	292,38 \pm 47,70 a	175,43 \pm 13,84 b
6	91,31 \pm 6,11 c	115,21 \pm 7,21 c	237,02 \pm 12,65 a	170,02 \pm 15,73 b
7	106,38 \pm 4,15 c	116,99 \pm 5,48 c	269,39 \pm 22,53 a	157,56 \pm 8,83 b
8	103,18 \pm 11,45 d	126,59 \pm 13,02 c	274,24 \pm 12,99 a	151,48 \pm 11,47 b
9	96,74 \pm 1,74 d	114,54 \pm 2,10 c	256,21 \pm 6,91 a	152,23 \pm 3,81 b
10	93,59 \pm 3,51 d	124,56 \pm 6,76 c	232,97 \pm 10,33 a	147,85 \pm 4,18 b
11	130,40 \pm 4,47 c	137,56 \pm 3,53 c	327,90 \pm 11,45 a	175,44 \pm 4,70 b

* Alg_{Part}: Partícula de alginato obtida por gelificação iônica, sem recobrimento.

** Alg_{Part1}: Partícula com o primeiro recobrimento de WPC_{Sol}.

***Alg_{Part2}: Partícula com o segundo recobrimento de Alg_{Sol}.

***Alg_{Part3}: Partícula com o terceiro recobrimento de WPC_{Sol}.

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

Com a formação de uma camada proteica (Alg_{Part1}) sobre a superfície da Alg_{Part} os tamanhos médios ficaram entre 114,5 e 138,0 μm , e entre 232,9 a 423,3 μm com segunda camada (Alg_{Part2}), e variaram de 147,8 a 223,7 μm com a formação da terceira camada (Alg_{Part3}), como pode ser observado na Tabela 3.5.

Os resultados apresentados mostram claramente o aumento no tamanho médio das partículas com a formação das multicamadas quando comparado ao tamanho das partículas de gelificação iônica de origem, independentemente das concentrações de bipolímeros testadas, provavelmente devido aos revestimentos adicionais.

O aumento mais expressivo de tamanho ocorreu com a formação da segunda camada de alginato. Esta diferença de tamanho pode estar relacionada à capacidade de hidratação dos polissacarídeos. Grupos laterais químicos como COO^- e SO_3^- , presentes em polissacarídeos podem interagir com as moléculas de água através de pontes de hidrogênio (CROUZIER; PICART, 2009; CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010). Por exemplo, grupos ésteres presentes na pectina são conhecidos por serem bons aceitadores de ligações de hidrogênio e podem, assim, reter moléculas de água na proximidade do polímero (CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010).

Estudo utilizando elipsometria constatou que a duração e a intensidade dos passos de lavagem das superfícies entre as adsorções de polieletrólitos afetam diretamente a espessura das multicamadas formadas sobre uma superfície. Observou-se que lavagens menos rigorosas da superfície levaram a formação de camadas mais espessas quando comparadas a espessura de camadas formadas com lavagens mais rigorosas (ELBERT; HERBERT; HUBBELL, 1999). A espessura da camada formada é um fator importante que determina a propriedade e a função do revestimento, tais como a sua robustez e permeabilidade (SUN et al., 2005).

Outro comportamento também pode ser observado na Tabela 3.5, quando as partículas com duas camadas de alginato interagiram eletrostaticamente com o WPC, havendo uma diminuição no tamanho médio das partículas, em relação ao obtido anteriormente, entretanto, o tamanho ainda permaneceu maior que o da partícula de origem. Uma das possíveis explicações para este comportamento deve-se ao fato de que, quando a proteína interage eletrostaticamente com os grupos carboxílicos negativos do alginato, ligações entre o polímero e as moléculas de água são desfavorecidas, o que

pode levar a desidratação da película, possivelmente, expulsando parte da água presente na partícula (CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010).

3.3 Morfologia e microestrutura das micropartículas com multicamadas

A Figura 3.3 mostra as observações feitas, por meio da microscopia óptica, das micropartículas de gelificação iônica, e das partículas recobertas com uma camada proteica. Nota-se que as partículas apresentaram o material encapsulado (óleo) bem distribuído por toda a matriz, e uma parede definida e contínua ao redor da partícula, além de um formato próximo ao esférico. Pode-se verificar também que o recobrimento da partícula de gelificação iônica com uma camada de WPC não alterou sua morfologia e nem afetou a distribuição do material de recheio na partícula. Souza et al. (2012) também não observaram alterações na morfologia de partículas de pectina quando as recobriu com proteínas do soro do leite.

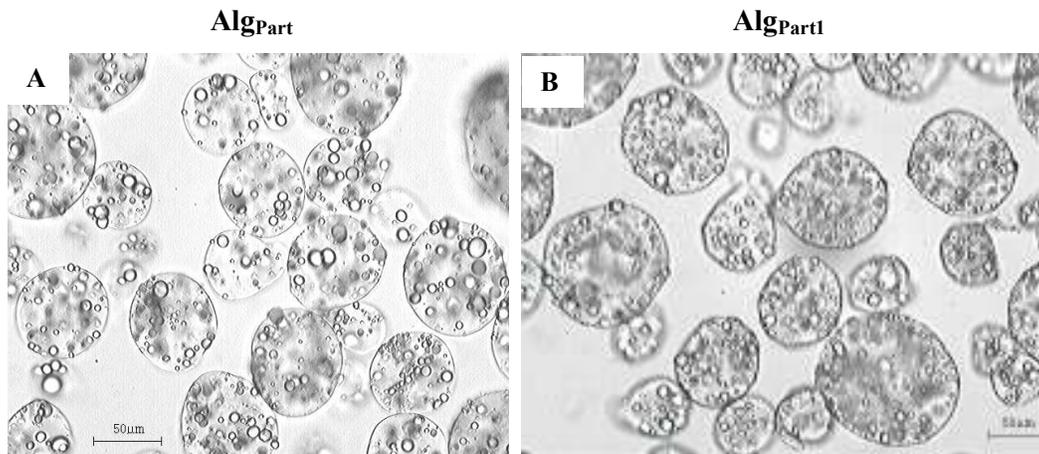


Figura 3.3 Morfologia das micropartículas produzidas por gelificação iônica sem recobrimento (Alg_{Part}) e com o primeiro recobrimento de WPC_{Sol} (Alg_{Part1}). Barras 50 μm .

As características morfológicas das multicamadas produzidas pelo planejamento experimental e observadas através de imagens de microscopia ótica estão apresentadas na Figura 3.4.

Pela observação das imagens é possível perceber que, de uma forma geral, a formação da segunda camada de alginato não alterou a esfericidade característica da partícula. Entretanto, observou-se que a construção desta camada sobre a partícula tornou, aparentemente, a estrutura fragilizada, inchada, hidratada e maior. Provavelmente, este comportamento esteja relacionado ao fato desta camada não estar ainda enrijecida. Tais características foram observadas em todas as concentrações de alginato testadas, conforme o planejamento (Figura 3.4).

Hébrard et al. (2013) observaram um comportamento similar em seu estudo quando revestiram partículas com alginato, a membrana frágil de revestimento era claramente visível ao redor de toda a partícula necessitando ser solidificada.

A incorporação da terceira camada proteica na partícula parece ter sido eficiente, um revestimento homogêneo sobre a superfície foi observado, notando-se uma tendência de voltar a apresentar as características obtidas com a primeira camada proteica. A formação desta camada sobre sua superfície não alterou sua forma esférica, e aparentemente as partículas se tornaram mais densas (Figura 3.4).

Um estudo reportou que partículas com multicamadas de alginato / poliarginina (Alg/PAr) fabricada pela forma “*layer by layer*” podem ser mais densas do que partículas com multicamadas de sulfato de dextrano / poliarginina (Dex/Par), a um certo número de camadas adsorvidas, atribuindo-se a uma quantidade menor de segmentos carregado por cadeia, o que pode ter levado a um empacotamento mais denso de alginato na camada inferior por causa da repulsão eletrostática dos mesmos segmentos de polieletrólitos carregados na rede (SHE et al., 2010).

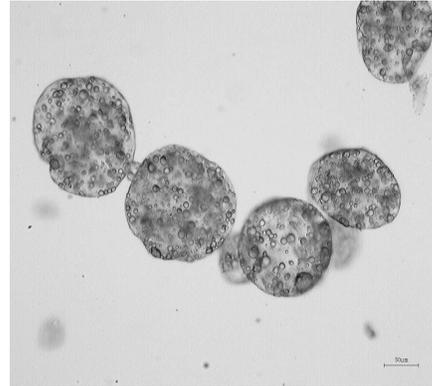
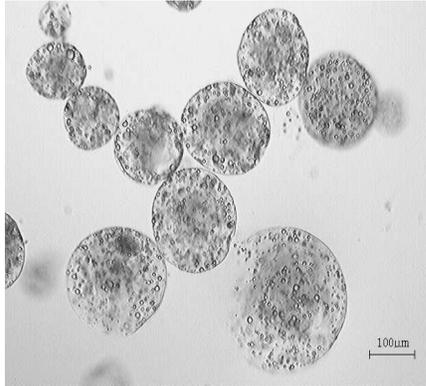
Ademais, com a formação da terceira camada, as gotas lipídicas são menos visíveis, possivelmente pelos revestimentos extras e alto teor de proteína adsorvida. Independentemente da concentração de proteína estudada, a morfologia das partículas com três camadas foram semelhantes entre si.

Ensaio

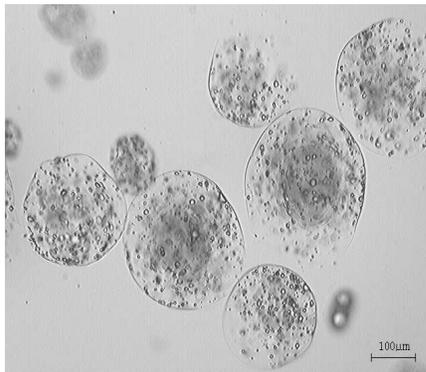
AlgPart2

AlgPart3

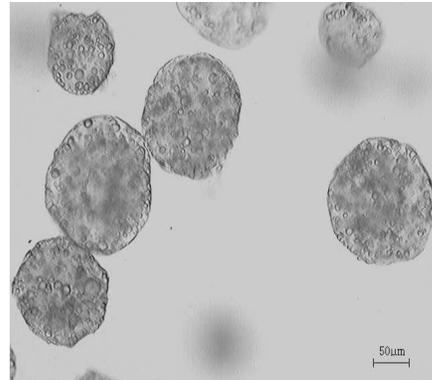
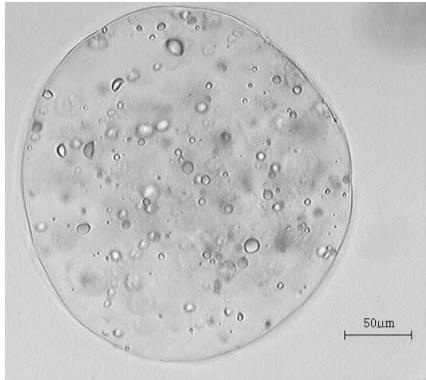
1



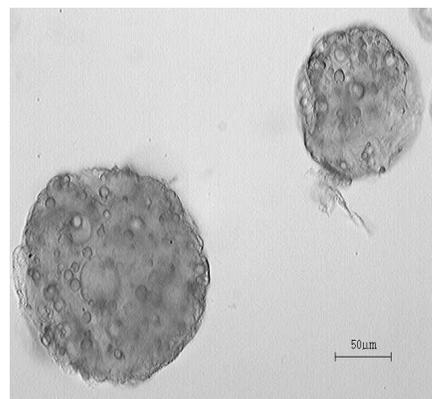
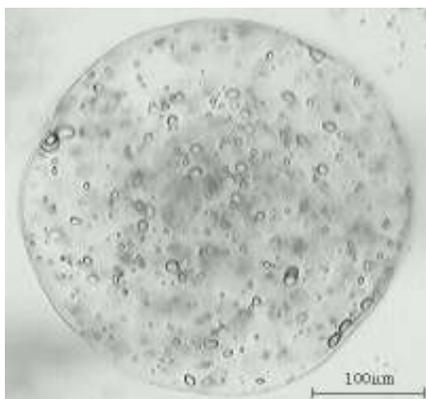
2



3



4

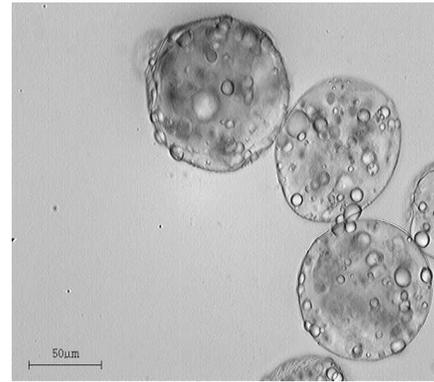
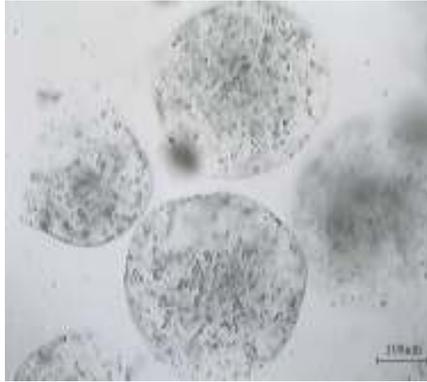


Ensaio

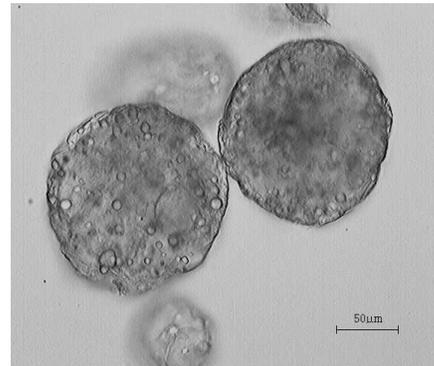
AlgPart2

AlgPart3

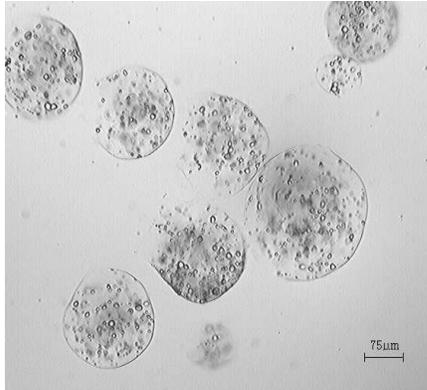
5



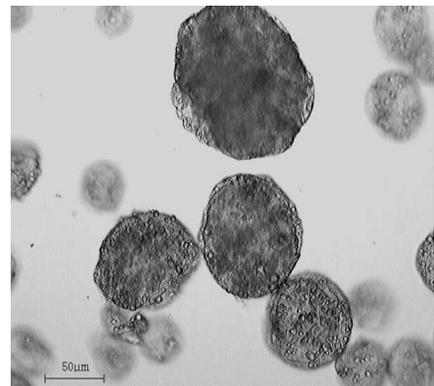
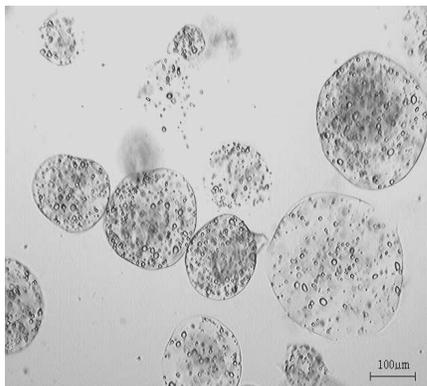
6



7



8



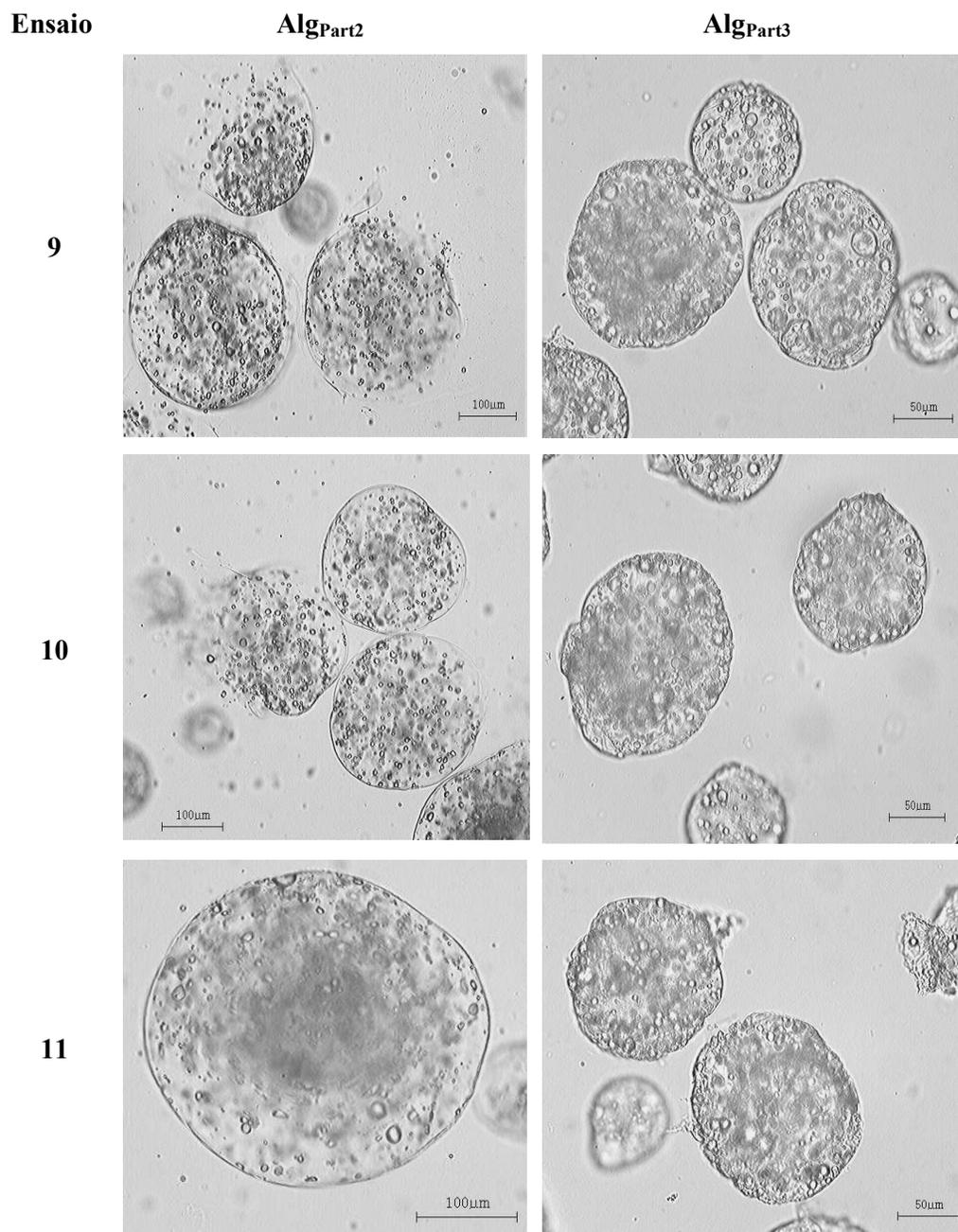


Figura 3.4 Microscopias das micropartículas com multicamadas úmidas dos ensaios do planejamento experimental. Barras 50, 75 e 100 µm.

Na Figura 3.5 estão apresentadas as observações da microscopia eletrônica de varredura das partículas dos ensaios 1 e 6, que apresentaram a menor e a maior adsorção proteica, respectivamente, conforme a ordem de produção de cada camada seguindo o planejamento experimental.

Observa-se que as partículas de ambos os ensaios seguiram a mesma tendência morfológica e mantiveram-se íntegras após o processo de secagem, apresentando um contorno semelhante ao esférico. Como esperado, as partículas de gelificação iônica de alginato apresentaram superfícies lisas, apesar de também poder-se observar a presença de ondulações em sua parede provenientes principalmente de vesículas de óleo.

A incorporação da primeira camada proteica sobre a partícula de alginato tornou sua superfície rugosa, pressupondo-se que a rugosidade na sua superfície está associada à camada proteica adsorvida.

Entretanto, quando esta partícula foi introduzida na solução de alginato, sua superfície tendeu a diminuir a rugosidade, presumivelmente devido ao revestimento extra de alginato, sem grandes diferenças morfológicas entre os ensaios 1 e 6. Miranda et al. (2011) observaram por microscopia de força atômica que camadas terminadas em quitosana tendem a ter superfícies ligeiramente mais ásperas do que camadas terminadas em alginato, atribuindo, principalmente às características do biopolímero.

Doherty et al. (2012) relataram que a deposição eletrostática de uma camada de revestimento de alginato foi claramente caracterizada por microscopia confocal como um revestimento liso.

Além disso, é evidente a rugosidade das superfícies das partículas após a adsorção da terceira camada proteica, evidenciando assim uma intensa rugosidade da superfície após a adsorção proteica, principalmente no ensaio 6. Outro estudo também mostrou superfícies mais rugosas quando elevadas concentrações de quitosana foram utilizadas para recobrir partículas de alginato, em comparação com menores concentrações de quitosana (XIE et al., 2009).

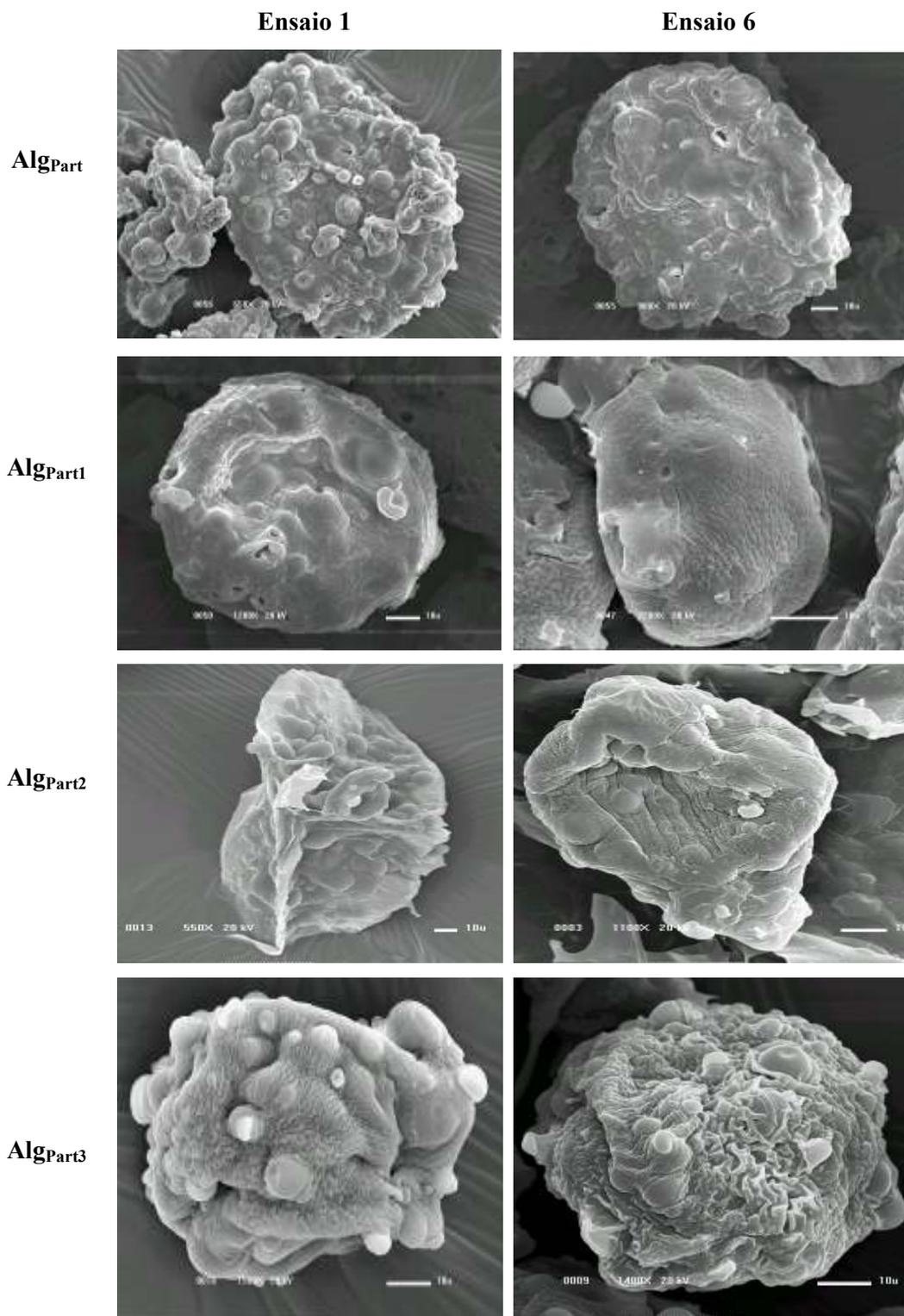


Figura 3.5 Microscopias eletrônica de varredura das micropartículas dos ensaios 1 e 6 pela ordem de produção das multicamadas. Barras 10 µm.

3.4 Avaliação da estabilidade das micropartículas em condições de estresse.

Através dos resultados de adsorção proteica (%) das partículas com multicamadas, segundo o planejamento experimental, um ensaio foi selecionado para a avaliação da sua estabilidade em temperatura, diferentes pHs, variadas concentrações de sal e em simulação das condições gastrointestinais.

Optou-se por escolher o ensaio 6 (partícula de gelificação iônica recoberta com 4% de WPC_{Sol}, 0,125% ALG_{Sol} e 2,5% WPC_{Sol}) para realizar estes testes, por apresentar a maior quantidade de proteína adsorvida na partícula.

3.4.1 Estabilidade da partícula frente à temperatura.

Dependendo da finalidade de aplicação das partículas, essas podem ser inseridas em diversos alimentos que, conforme a sua natureza, precisam ser submetidos a processos de esterilização, para obter-se os fatores de qualidade e segurança desejadas para sua comercialização.

A esterilização de alimentos em autoclaves pressurizadas para inativação de possíveis esporos e micro-organismos presentes no produto é um dos métodos mais utilizados na preservação dos alimentos (TEXEIRA; TUCKER, 1997). No entanto pouco se sabe sobre o impacto da temperatura de esterilização sobre a estabilidade das partículas com multicamadas.

Diante disso, para investigar a sensibilidade das partículas à temperatura de esterilização, partículas úmidas suspensas em solução aquosa, pH 3,75, e partículas liofilizadas (pó) foram autoclavadas a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, sua aparência visual, morfologia e tamanho foram analisados.

Em comparação com as partículas úmidas não esterilizadas, as partículas úmidas esterilizadas apresentaram uma aparência visual ligeiramente amarelada (Figura 3.6 A versus C). Corroborando estas observações, as imagens obtidas por microscopia ótica mostram claramente a coloração amarelada das partículas quando submetidas à temperatura (Figura 3.6 D). É evidente também que as partículas mantiveram-se

íntegras após o processo de esterilização, com características morfológicas muito similares as partículas não esterilizadas (Figura 3.6 B versus D). Desta forma, pode-se afirmar que estas partículas suportam a temperatura de esterilização.

Além disso, os resultados apresentados na Tabela 3.6, mostram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de tamanho médio das partículas após serem submetidas à esterilização. Em temperaturas elevadas, interações hidrofóbicas entre os segmentos hidrofóbicos se tornam mais fortes, enquanto que ligações de hidrogênio tendem a se enfraquecer e a quebrar, levando ao encolhimento de hidrogéis, devido à associação interpolímeros através de interações hidrofóbicas (PETRUSIC et al., 2012).

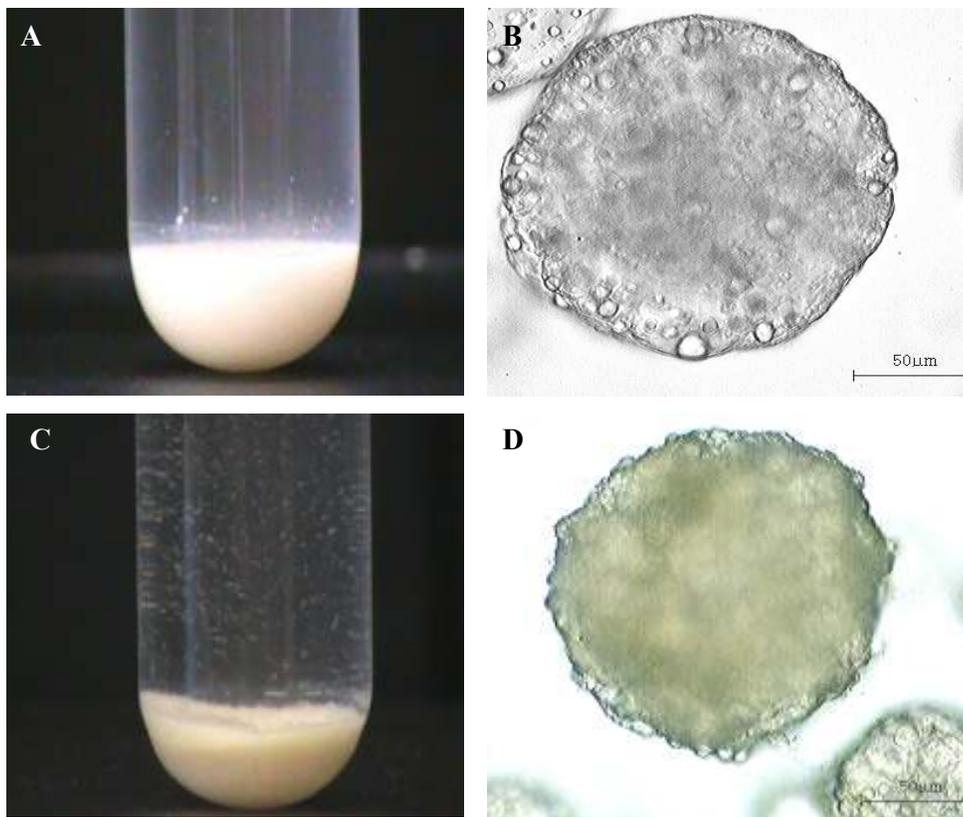


Figura 3.6 Aparência e morfologia das partículas úmidas com multicamadas suspensas em água pH 3,75: A) aparência das partículas não esterilizadas; B) morfologia das partículas não esterilizadas (Barra 50 μm); C) aparência das partículas esterilizadas; D) morfologia das partículas esterilizadas (Barra 50 μm). Imagens após 1 hora de repouso.

Tabela 3.6 Tamanho médio (d 0,5) das micropartículas úmidas com multicamadas (μm) suspensas em água pH 3,75, com e sem tratamento térmico.

Tratamento	d (0,5)
Partículas úmidas não esterilizadas	171,94 \pm 7,90 A*
Partículas úmidas esterilizadas	136,40 \pm 14,89 B

* Médias seguidas de letras diferentes diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A mesma tendência à mudança de cor observada para as partículas úmidas após a esterilização foi verificada para as partículas liofilizadas. Com o aquecimento (121 °C), a coloração clara do pó das partículas liofilizadas alterou-se para marrom (Figura 3.7 A versus C). Acredita-se que este comportamento de mudança de cor possa estar relacionado com a reação de Maillard (escurecimento não enzimático), que se refere a um conjunto complexo de reações, iniciado por reação entre aminas e açúcares redutores, os quais juntos em alta temperatura decompõem-se e, finalmente, condensam-se em um produto marrom insolúvel conhecido como melanoidinas. Geralmente são as proteínas e os aminoácidos que costumam fornecer os componentes aminos e os açúcares redutores, respectivamente, para esta reação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Além disso, pelas observações das imagens de microscopia eletrônica de varredura, pode-se visualizar que o tratamento térmico alterou a morfologia das partículas liofilizadas. Diferindo das partículas não esterilizadas que continham “parede contínua”, as partículas esterilizadas parecem perder esta característica. Aparentemente sua superfície tornou-se mais heterogênea e com presenças de rachaduras e furos, apesar de se manterem aparentemente íntegras e apresentarem um contorno semelhante ao esférico mesmo após o tratamento térmico (Figura 3.7 B versus D).

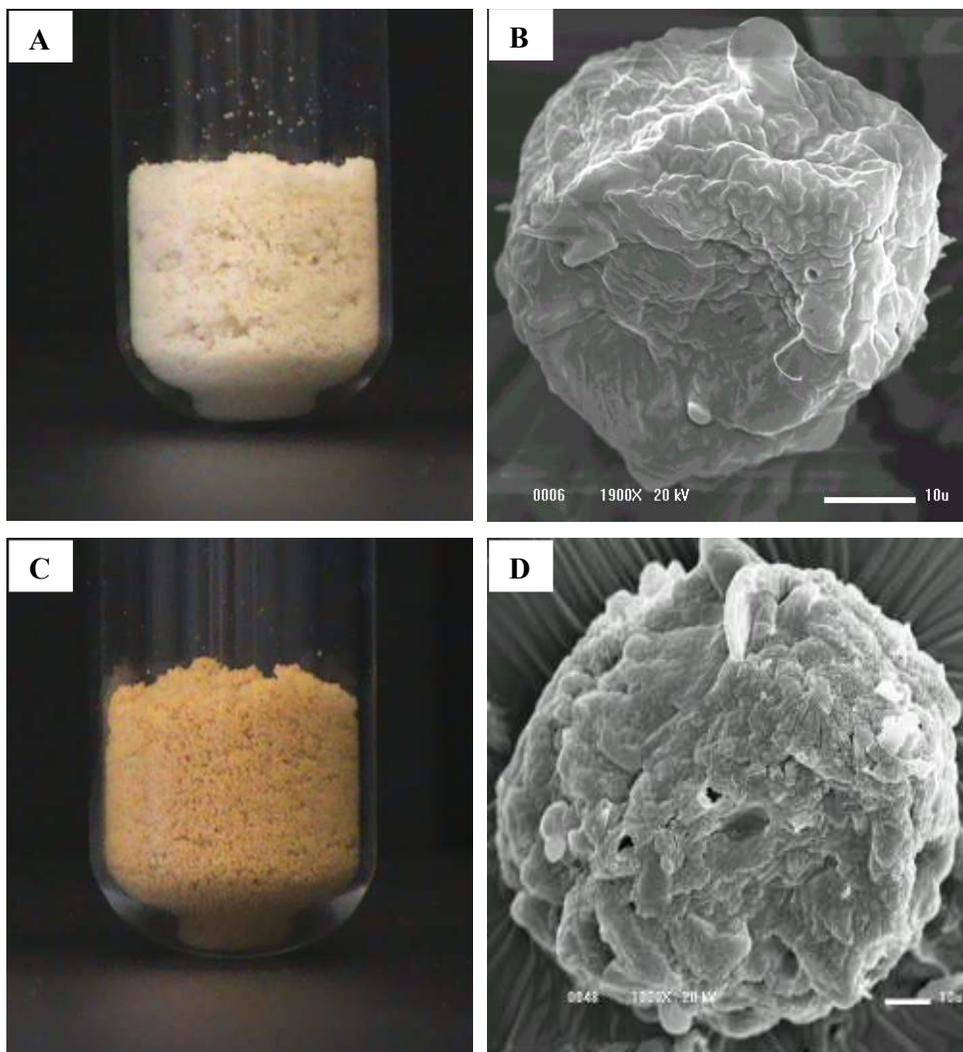


Figura 3.7 Influência da temperatura na aparência e microestrutura das partículas com multicamadas liofilizadas: A) aparência das partículas liofilizadas não esterilizadas; B) MEV das partículas liofilizadas não esterilizadas (Barra 10 μm); C) aparência das partículas liofilizadas e esterilizadas; D) MEV das partículas liofilizadas e esterilizadas (Barra 10 μm).

Entretanto, quando as partículas liofilizadas esterilizadas ou não foram reidratadas em água com pH ajustado para 3,75, dificuldade em absorver a água foi observada para as partículas esterilizadas. Através das microscopias óticas pode-se perceber que mesmo após 12 horas de imersão em água as partículas esterilizadas ainda

pareciam estar secas e muito aglomeradas em comparação com as partículas não esterilizadas (Figura 3.8 D versus B).

Acredita-se que a temperatura de 121 °C utilizada na esterilização das partículas possa ter causado uma reestruturação da cadeia dos biopolímeros na partícula, o que pode ter refletido na aglomeração e na dificuldade de absorção de água pela partícula seca.

Supõe-se que a proteína da partícula tenha sido desnaturada durante o processo de esterilização. Quando uma proteína globular, como a β -lactoglobulina é aquecida acima de cerca de 60 °C, sua estrutura é modificada e, a mesma se torna desnaturada, suas interações químicas e físicas mudam sensivelmente de tal forma que os grupos apolares e os grupos contendo enxofre que estavam originalmente no interior compacto da proteína globular se tornam expostos. Como consequência, as proteínas desnaturadas podem interagir com as outras proteínas, por meio de ligações hidrofóbicas e dissulfídicas que conduzem a uma agregação (JONES; MCCLEMENTS, 2010; NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011), podendo ser uma das prováveis causas para a aglomeração das partículas. Além disso, se a desnaturação realmente levou a agregação da proteína, a sua capacidade de ligação a água pode ter diminuído por causa do aumento das interações proteína – proteína (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

É muito provável também, que a formação das multicamadas sobre a superfície da partícula de gelificação iônica tenha influenciado no comportamento de reidratação das partículas. As partículas de gelificação iônica apresentam facilidade de inchamento/reidratação após imersão em água, em decorrência de sua matriz porosa. No entanto, a formação de multicamadas sobre a sua superfície, diminui esta porosidade e consequentemente pode modificar seu comportamento de reidratação.

Um comportamento inesperado pode ser visualizado nas imagens B e D da Figura 3.8. As partículas liofilizadas não esterilizadas após o processo de reidratação liberaram muitos resíduos de sua superfície para o meio aquoso, enquanto que as esterilizadas não apresentaram este tipo de comportamento. No entanto, a partículas liofilizadas não esterilizadas reidratadas voltaram a adquirir um tamanho médio de $194,97 \pm 26,25 \mu\text{m}$, semelhante ao obtido para as partículas úmidas, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si.

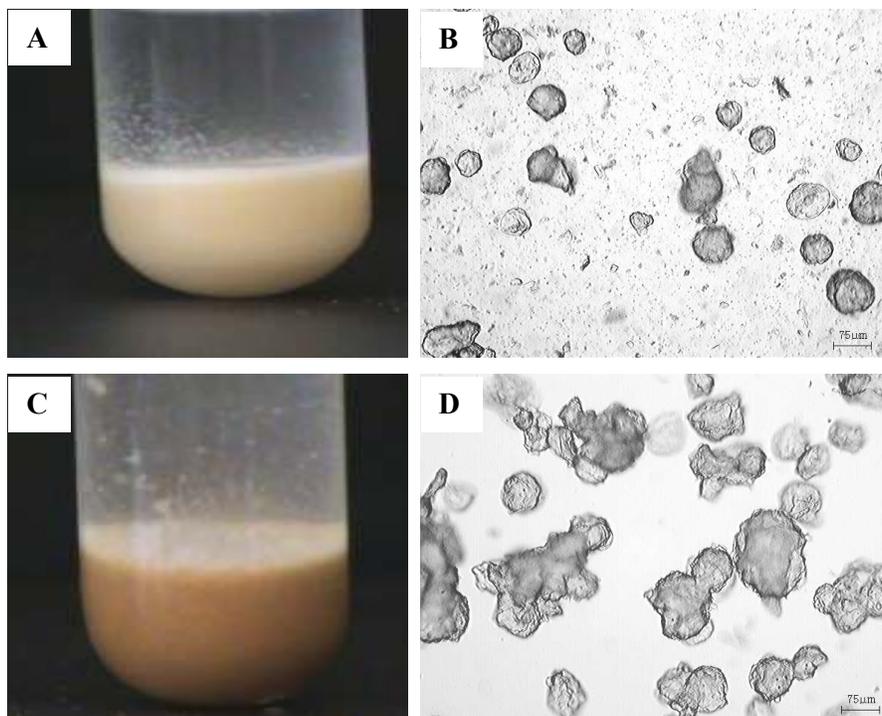


Figura 3.8 Influência da temperatura na aparência e morfologia das partículas com multicamadas liofilizadas e reidratadas em água, pH 3,75, por 12 horas: A) aparência das partículas não esterilizadas; B) microscopia ótica das partículas não esterilizadas (Barra 75 µm); C) aparência das partículas esterilizadas; D) microscopia ótica das partículas esterilizadas (Barra 75 µm).

3.4.2 Estabilidade da partícula em diferentes pHs.

Em aplicações comerciais, as partículas podem estar submersas em uma fase aquosa ácida, neutra ou alcalina, dependendo da natureza do produto em que é inserida e, após o seu consumo, ser exposta a mudanças de pH à medida que passa através do trato gastrointestinal humano. Desta forma é muito importante avaliar a influência do pH sobre a sua estabilidade.

Para se investigar o efeito do pH sobre as partículas com multicamadas, essas foram dispersas em soluções aquosa em diferentes pHs (2, 4, 6 e 8). Após 12 de imersão sob agitação constante, os tamanhos médios das partículas foram medidos e a

solubilidade proteica quantificada, os resultados estão apresentados na Figura 3.9 e na Tabela 3.7, respectivamente.

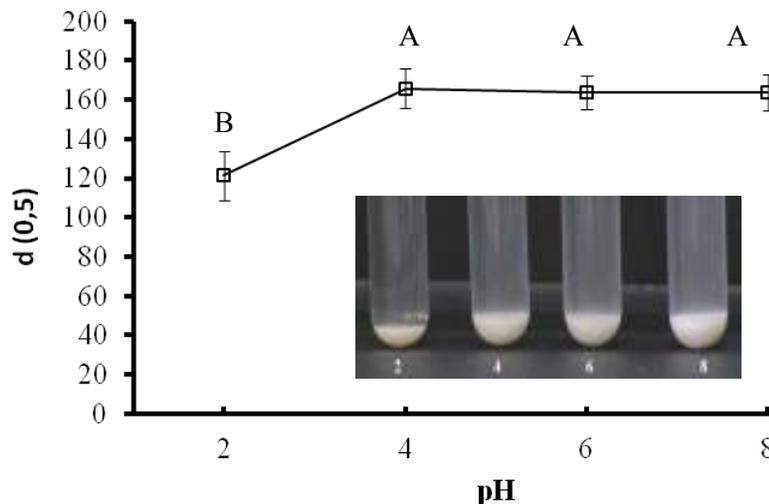


Figura 3.9 Tamanho médio (μm) das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Médias seguidas de letras diferentes diferem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pode-se observar que o tamanho médio das partículas se mantém constante em valores de pH de 4 a 8, havendo pequenas variações, sem diferenças significativas ($p > 0,05$). O mesmo comportamento pôde ser observado quando a solubilidade proteica foi avaliada. Uma baixa solubilidade da camada proteica para a solução aquosa foi encontrada, com porcentagens variando de 2,02 a 2,75% em valores de pH de 4 a 8 ($p > 0,05$), permanecendo na partícula mais de 97% da proteína adsorvida. Diante destes resultados, pode-se sugerir que estas partículas foram estáveis em pHs 4, 6 e 8 (Tabela 3.7).

No entanto, quando estas partículas foram colocadas em meio aquoso com pH fortemente ácido (pH 2), o seu tamanho médio original diminuiu significativamente ($p < 0,05$) de $164,7 \pm 8,9 \mu\text{m}$ (tamanho em pH 3,75 de produção) para $121,4 \pm 12,5 \mu\text{m}$, o que corresponde a uma diminuição de 26% (Figura 3.9). Uma perda de 22,05% da quantidade de proteína inicial na partícula também foi observada em pH 2, o que pode ter colaborado para a diminuição do seu tamanho (Tabela 3.7). Souza et al. (2012)

também reportaram em seu estudo, uma pequena diminuição no tamanho médio de partículas de pectina revestidas com WPC, após 1 hora de imersão em pH fortemente ácido (1,2), em relação ao pH 4.

Outro estudo mostrou um acréscimo de 6% no diâmetro de partículas produzidas com uma mistura de proteínas do soro do leite e alginato, e um aumento de 15 e 5% para as revestidas com proteínas do soro do leite e alginato, respectivamente, após 1 hora em pH 1.2 (HÉBRARD et al., 2013).

Os resultados do presente estudo não eram esperados, considerando que nesse pH os grupos carboxílicos do alginato deveriam estar sob a forma não dissociada (-COOH), uma vez que o pKa do ácido gulurônico e do ácido manurônico são 3,65 e 3,38, respectivamente (MU; LU; LIU, 2011), enquanto que a proteína deveria estar carregada positivamente (-NH₃⁺), o que deveria provocar uma repulsão eletrostática e um aumento no tamanho médio, conforme observado anteriormente na literatura para nanopartículas produzidas por coacervação complexa entre pectina de beterraba e β-lactoglobulina (SANTIPANICHWONG et al., 2008). No entanto, é possível que as interações eletrostáticas responsáveis pelas adsorções das multicamadas na superfície da partícula tenha sido intensas e desta forma suficientemente resistentes à difusão de grupos H⁺ e a mudança de carga nas regiões de interação entre o alginato e o WPC, como observado por Souza et al. (2012).

Rosenberg e Lee (2004) também sugeriram que as forças de repulsão entre o WPC desnaturado pelo calor e alginato eram relativamente pequenas em comparação ao efeito de ligações dissulfídicas entrecruzadas na matriz de partículas.

Apesar de uma relativa instabilidade da partícula em pH fortemente ácido, ainda pode-se verificar uma alta quantidade de proteína remanescente na partícula, mais de 77%. Desta forma, as multicamadas podem fornecer proteção a partícula de alginato e conseqüentemente ao material encapsulado em uma vasta gama de valores de pH.

Além da medida do tamanho e da solubilidade determinada em soluções aquosas em diferentes pHs, a morfologia das partículas e sua integridade foram acompanhadas por microscopia ótica (Figura 3.10). Observou-se nas imagens que, independentemente do pH utilizado (2, 4, 6 e 8) as partículas se mantiveram aparentemente íntegras, com bordas definidas e com o material encapsulado bem distribuído.

Tabela 3.7 Teores de proteína solúvel e proteína adsorvida remanescente (%) nas micropartículas com multicamadas suspensas em diferentes pHs.

pH	% de Proteína Solúvel	% de Proteína adsorvida remanescente
2	22,05 ± 1,61 A*	77,95 ± 1,61 B
4	2,02 ± 0,19 B	97,98 ± 0,19 A
6	2,24 ± 0,34 B	97,76 ± 0,34 A
8	2,75 ± 0,65 B	97,25 ± 0,65 A

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Observação: As partículas utilizadas neste experimento apresentaram um total de proteína inicial na partícula com multicamadas de 61,66% ± 0,51 e um teor de umidade de 88,76% ± 0,67.

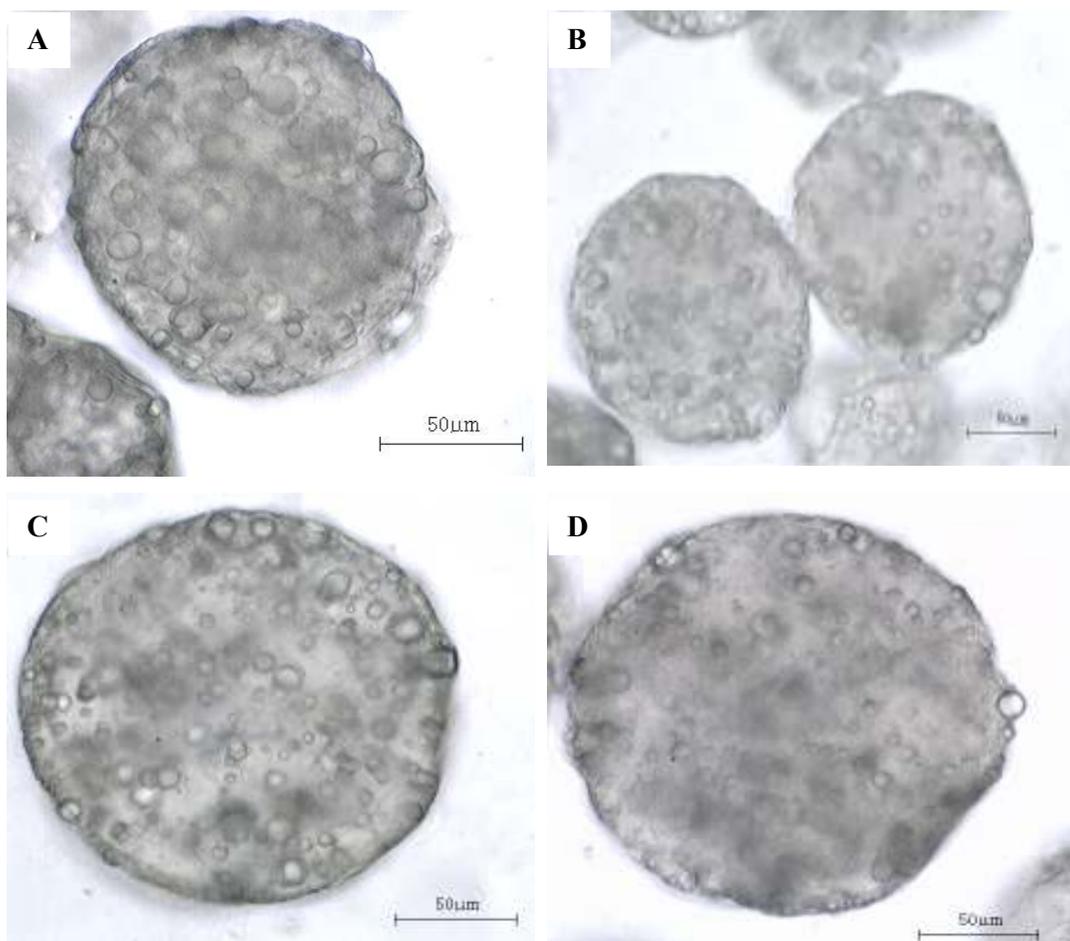


Figura 3.10 Microscopias das micropartículas úmidas com multicamadas, suspensas em diferentes pHs: A) 2; B) 4; C) 6 e D) 8. Barras 50 µm.

3.4.3 Estabilidade da partícula em diferentes concentrações de NaCl.

A resistência das partículas também foi analisada em função da concentração de NaCl em solução aquosa, pH 3,75. Os tamanhos médios das partículas com multicamadas variaram de $155,5 \pm 8,4 \mu\text{m}$ a $180,1 \pm 15,6 \mu\text{m}$ quando imersas em agitação constante em soluções de NaCl com concentrações variando de 0 a 200 mM, por 12 horas (Figura 3.11).

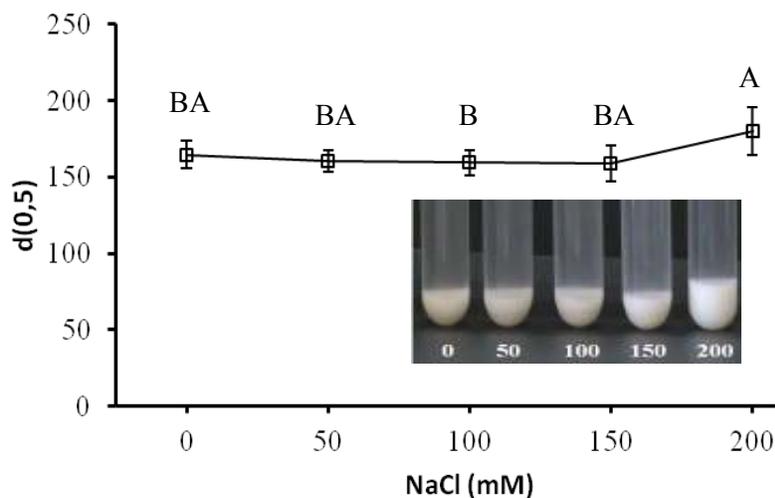


Figura 3.11 Tamanho médio (μm) das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em soluções aquosas de NaCl em diferentes concentrações. Médias seguidas de letras diferentes diferem de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Um aumento significativo de tamanho médio da partícula foi observado na concentração mais elevada de sal (200 mM). Alterações nas interações eletrostáticas induzidas pelo pH ou força iônica são bem conhecidas por causar inchamento ou encolhimento das partículas (OCHS et al., 2010).

Mu, Lu e Liu (2011) reportaram uma diminuição significativa no diâmetro de microcápsulas com multicamadas de quitosana e alginato de sódio de $2 \mu\text{m}$ a 73 nm , com o aumento da força iônica de $0 - 0,010 \text{ mol/L}$ de NaCl.

Tabela 3.8 Teores de proteína solúvel e proteína adsorvida remanescente (%) nas micropartículas com multicamadas suspensas em diferentes concentrações salinas versus ausência de sal.

[NaCl] mM	% de Proteína Solúvel	% de Proteína adsorvida remanescente
Sem sal	2,49 ± 0,08 D*	97,51 ± 0,08 A
50	7,36 ± 1,20 C	92,64 ± 1,20 B
100	12,54 ± 1,68 B	87,46 ± 1,68 C
150	15,68 ± 1,42 B	84,32 ± 1,42 C
200	19,49 ± 2,71 A	80,51 ± 2,71 D

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observação: As partículas utilizadas neste experimento apresentaram um total de proteína inicial na partícula com multicamadas de $61,66\% \pm 0,51$ e teor de umidade de $88,76\% \pm 0,67$.

A estabilidade da partícula também foi analisada quanto à solubilidade proteica em função da concentração de sal em solução, e os resultados estão expressos na Tabela 3.8. Um aumento significativo ($p < 0,05$) da solubilidade da camada proteica para a solução com o aumento da força iônica foi verificado.

Em pH 3,75 (pH de produção das partículas), na ausência de NaCl a perda de proteína da partícula para a solução foi de 2,49%, sendo o pH, o provável responsável pela solubilização proteica. Entretanto, quando as partículas foram colocadas em solução de NaCl 50 mM, verificou-se uma perda de 7,36% da quantidade de proteína na partícula, aumentando significativamente ($p < 0,05$) em 66,16% a solubilidade proteica em relação à condição sem sal.

A solubilidade proteica foi aumentada significativamente ($p < 0,05$) para 12,54 e 15,69% com a adição de NaCl 100 e 150 mM, respectivamente, entretanto essas médias foram próximas, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. Quando a concentração de NaCl em solução foi elevada para 200 mM o teor de proteína adsorvida remanescente diminuiu significativamente para 80,51%, e a solubilidade proteica aumentou significativamente ($p < 0,05$) para 19,49%, em relação à solução que não continha NaCl e as soluções que continham até 150 mM de NaCl (Tabela 3.8).

She et al. (2010) relatou uma liberação cumulativa de 16 e 13,5% de proteína (albumina de soro bovino marcada com isotiocianato de tetrametilrodamina – TRITC – BSA) a partir de microcápsulas de CaCO₃ com multicamadas de sulfato de dextrano / poliarginina (Dex/PAr)₃ e alginato / poliarginina (Alg/PAr)₃, respectivamente, quando incubadas em 10 mL de solução de NaCl a 0,15 M.

Os resultados já eram esperados, uma vez que é sabido, que a adição de sal ao meio circundante pode influenciar a permeabilidade de macromoléculas da partícula, devido à quebra de ligações entre os polieletrólitos de cargas opostas (SHE et al., 2010). No entanto, o que não era esperado era uma liberação relativamente baixa de proteína da partícula para o meio, mesmo na concentração mais alta de sal testada. Provavelmente o alto conteúdo de biopolímeros na superfície da partícula, tenha reduzido à mobilidade das cadeias, e conseqüentemente impedido a difusão dos íons para a partícula, interagindo-se apenas com as moléculas de proteínas mais próximas da superfície e, desta forma, mantendo-se ainda um alto conteúdo de proteína (80%) na partícula.

Microscopias óticas das partículas em função da concentração de NaCl mostram que as mesmas mantiveram-se íntegras, apresentando um contorno semelhante ao esférico, mesmo após 12 horas de imersão em solução salina (Figura 3.12). No entanto a partícula na concentração salina de 200 mM apresentou-se aparentemente fragilizada e menos densa, com gotas lipídicas mais visíveis quando comparada as imagens das partículas em outras concentrações (Figura 3.12). Pode-se pressupor que, estas alterações morfológicas sejam decorrentes da perda de proteína da partícula, o que deixa evidente a sensibilidade da partícula a altas quantidades de sal.

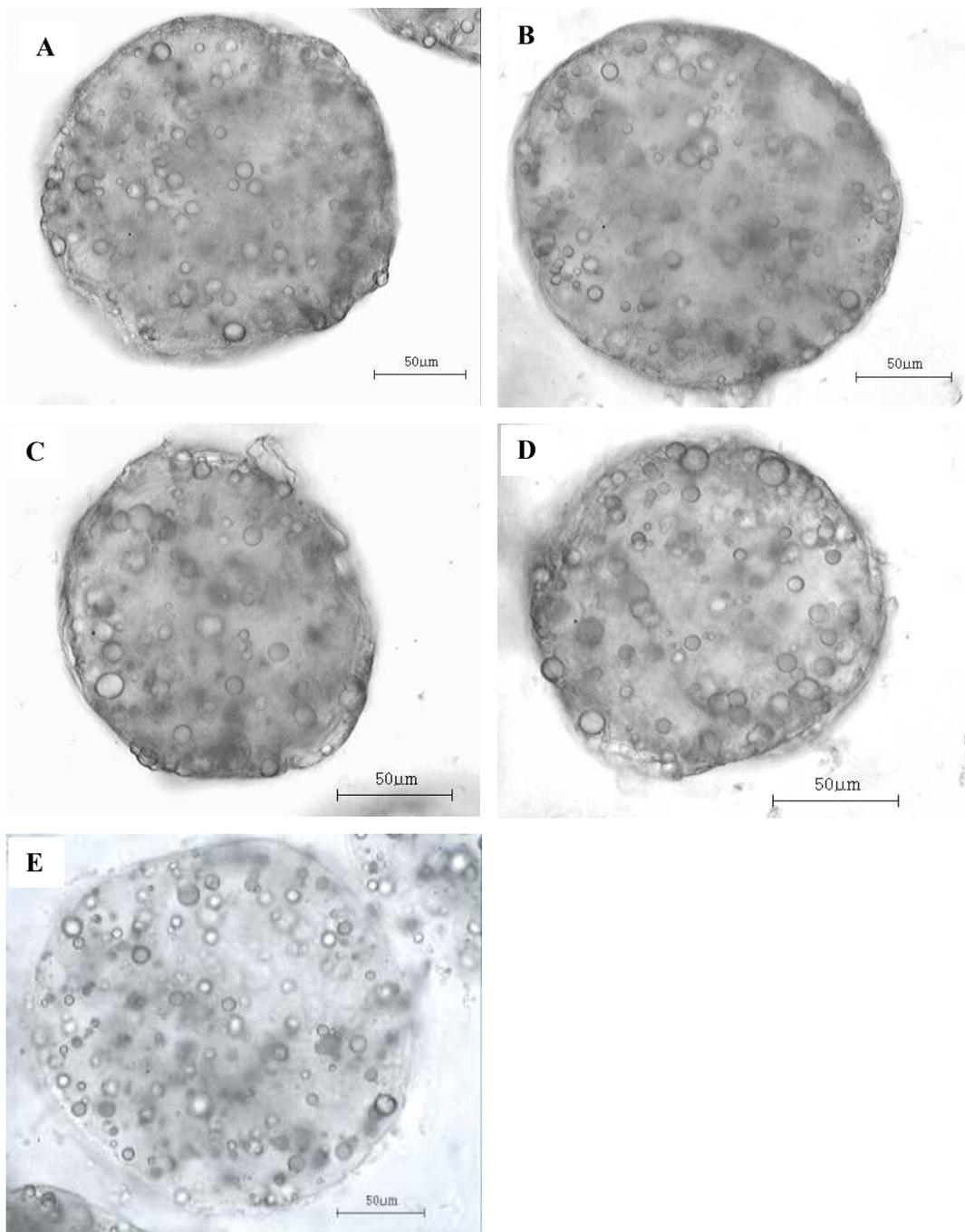


Figura 3.12 Microscopias das micropartículas úmidas com multicamadas suspensas em diferentes concentrações salinas versus ausência de sal: A) sem sal; B) 50 mM; C) 100 mM; D) 150 mM; E) 200 mM. Barras 50 µm.

3.4.4 Liberação proteica das micropartículas úmidas submetidas às condições gastrointestinais.

As partículas foram submetidas aos pHs 2 e 7 contendo enzimas proteolíticas, durante uma simulação das condições fisiológicas do estômago e do trato intestinal, respectivamente, para a avaliação da solubilidade proteica. Os resultados mostraram uma solubilidade de 30,49% de proteína da partícula para o meio de simulação gástrica com pepsina (pH 2, 37 °C), após 2 h de incubação (Tabela 3.9). Possivelmente, essa liberação deve ter sido da camada proteica mais próxima da superfície exterior (Alg_{Part3}) da partícula, uma vez que a outra camada proteica (Alg_{Part1}) está localizada abaixo de uma camada adicional de alginato, podendo-se desta forma ter alterado a capacidade da pepsina em acessar as moléculas de proteína desta camada.

Esta liberação de proteína aparentemente não refletiu na morfologia das micropartículas. Nenhuma alteração significativa na morfologia das partículas foi observada após 1 h e 2 horas de simulação das condições gástricas, as quais ainda se encontravam íntegras, esféricas e densas, como mostra a Figura 3.13 A e B.

Tabela 3.9 Proteína liberada acumulada (%) das micropartículas úmidas com multicamadas, submetidas a condições gastrointestinais *in vitro*.

pH	Tempo Acumulado (h)	Proteína Liberada Acumulada (%)
2	2h	30,49 ± 2,50
7	7h	85,78 ± 6,95
7	24h	99,17 ± 2,36

Observação: As partículas utilizadas neste experimento apresentaram um total de proteína inicial na partícula com multicamadas de 62,24% ± 1,31 e um teor de umidade de 88,18% ± 0,21.

Quando as suspensões de partículas foram subsequentemente, transferidas para as condições intestinais simuladas com pancreatina (pH 7, 37 °C), a taxa de solubilidade acumulativa passou para 85,78%, depois de 7h. Praticamente toda a proteína (99,17%) da partícula foi liberada em 24h de simulação gastroentérica (Tabela 3.9). Microscopias óticas das partículas revelaram uma aparente perda das multicamadas após 7h, porém as

partículas de gelificação iônica ainda permaneceram parcialmente íntegras após 24h de simulação (Figura 3.13 C e D).

Este comportamento também é reportado na literatura. Hébrard et al. (2013) encontraram uma liberação de 50% de proteínas do soro do leite a partir de partículas mistas de alginato e proteínas do soro de leite (ALG/WP) revestidas com proteínas do soro do leite (WP), e 30% para as revestidas com alginato (ALG) em simulação dos fluidos gástricos com pepsina em pH 1,2 após 6 horas de incubação, enquanto que em simulação das condições intestinais com pancreatina, pH 7,5, o revestimento com WP atrasou a liberação das proteínas (25% em 1 hora) e impediu uma liberação adicional até o fim da incubação. O revestimento de ALG em torno da partícula (ALG/WP) também controlou a liberação de proteínas, dentro da primeira hora (32%), mas não limitou a liberação para os tempos de incubação mais longos (mais de 90% de WP liberados em 6 h).

Tiourina e Sukhorukov (2002) mostraram que a proteína não foi liberada a partir de microcápsulas com multicamadas de alginato e protamina quando incubadas em solução de HCL, pH 1,7, durante 4 horas e nenhuma alteração na sua morfologia foi observada por microscopia confocal, entretanto, quando as microcápsulas foram transferidas para o tampão Tris, pH 8 (com 2,5% de desoxicolato de sódio), 85% da proteína foi liberada dentro de 6 horas e, praticamente toda a proteína (95%) foi liberada em 12 horas.

Um estudo com partículas com multicamadas de alginato e quitosana carregada com insulina, mostrou que a insulina foi liberada muito lentamente, em pH 1,4 e apenas 14,2% da insulina carregada pode ser liberada em 6 h, enquanto que, em pH 7,4, a liberação foi de cerca de 50% dentro de 80 minutos e, em seguida sua taxa de liberação acumulativa atingiu 80% (YE et al., 2006).

Em um estudo realizado com partículas produzidas com quitosana e β -lactoglobulina, a β -lactoglobulina na forma nativa, apresentou propriedades favoráveis para resistir à degradação do ácido e da pepsina, quando submetidas a uma simulação das condições gástricas em pH 1,2, *in vitro* (CHEN; SUBIRADE, 2005). De acordo com os autores, a pepsina é conhecida por atacar preferencialmente ligações peptídicas envolvendo aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos.

Estes resultados também foram observados por Gbassi et al. (2009), em seu estudo realizado com técnicas eletroforéticas, onde os autores mostraram que β -lactoglobulina manteve-se intacta, porém observando-se a hidrólise de algumas frações proteicas do soro de leite, incluindo α -lactoalbumina e albumina do soro, quando partículas de alginato recobertas com proteínas do soro do leite foram submetidas a simulações do TGI com pepsina.

Em outro estudo, quando partículas de proteínas do soro do leite foram incubadas em condições simuladas intestinais (pH 7), a matriz se mostrou sensível ao pH e a proteólise enzimática e sua desintegração foi iniciada nos 15 minutos iniciais, sendo a maioria dos peptídeos liberados maiores que 5 kDa. Após 30 minutos, aumentou em 40% a liberação de peptídeos menores que 2 kDa, e depois de uma hora a liberação de aminoácidos aumentou drasticamente, o que reflete a fragmentação da matriz. Este experimento foi monitorado por cromatografia (DOHERTY et al., 2011).

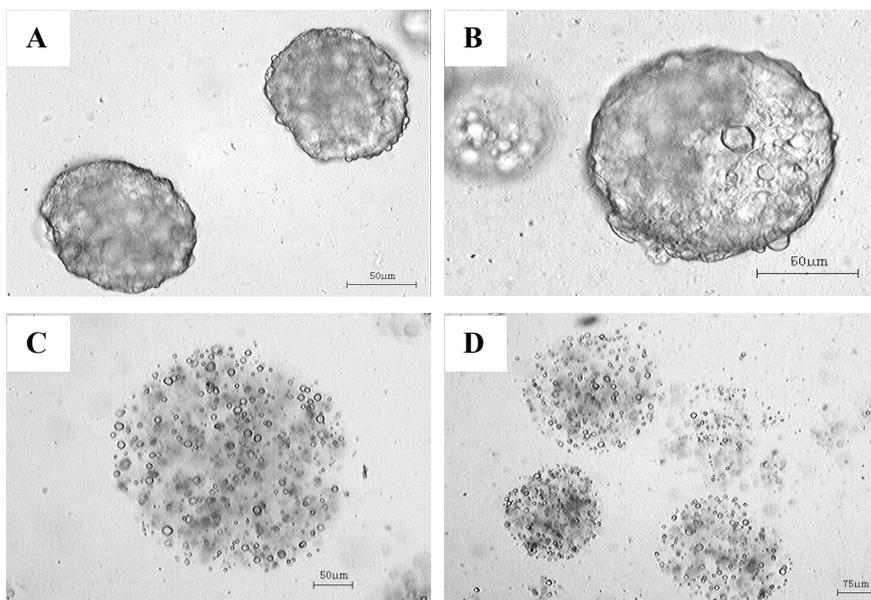


Figura 3.13 Morfologia das micropartículas com multicamadas durante a simulação gastrointestinal: A) após 1 hora em solução gástrica com pepsina, em pH 2 a 37 °C (Barra 50 μ m); B) após 2 horas em solução gástrica com pepsina, em pH 2 a 37 °C (Barra 60 μ m); C) após 7 horas de simulação gastrointestinal com pancreatina, em pH 7, 37 °C (Barra 50 μ m); D) após 24 horas de simulação gastrointestinal com pancreatina, em pH 7, 37 °C (Barra 75 μ m).

Frente as observações anteriores, pode-se pressupor que a baixa solubilidade das camadas proteicas da partícula do presente estudo em simulação gástrica, seja devida principalmente a resistência à hidrólise proteolítica da β -lactoglobulina, a qual representa a maior fração proteica do concentrado proteico do soro do leite. Por outro lado, é muito provável também que os sais presentes (NaCl e CaCl_2) no meio utilizado de simulação gástrica, tenha alterado a força iônica do meio e, portanto tenha contribuído para o enfraquecimento da camada mais externa da partícula levando a uma perda de proteína nesta condição.

Além disso, a transferência das partículas para um pH neutro em simulação intestinal, deveria levar a uma perda substancial de proteínas, uma vez que, neste pH a proteína tende a perder a maior parte da sua carga positiva e passa a ter a maior carga negativa, levando uma repulsão eletrostática entre o complexo WPC - alginato. No entanto, como observado anteriormente no item 3.4.2, a liberação de proteínas das partículas em $\text{pH} > 6$ foi inferior a 3%, pressupondo-se que a degradação das multicamadas tenha sido catalisada principalmente pela ação da pancreatina, gerando uma liberação proteica substancial. É evidente também que as multicamadas protegeram a partícula de gelificação iônica contra a ação das enzimas na simulação da passagem no trato gastrointestinal, retardando a sua desintegração e a liberação do material (óleo) encapsulado. Com a degradação das multicamadas a liberação do material encapsulado passou a ser favorecida.

Como observado as microcápsulas foram parcialmente resistentes as condições gástricas e sensíveis à atividade proteolítica em ambiente intestinal simulado, levando a desintegração das multicamadas. Essa formulação de partícula pode ser considerada como um potencial transportador de componentes sensíveis (nutracêuticos bioativos, probióticos, fármacos entre outros) com finalidade de liberação controlada em ambiente intestinal.

4 CONCLUSÕES

O objetivo principal dessa pesquisa envolveu a produção de multicamadas sobre a superfície de partículas obtidas por gelificação iônica, com a finalidade de se obter uma alta adsorção proteica nas camadas, bem como sua caracterização. A utilização de alginato e WPC para produção de multicamadas sobre a superfície de partículas de alginato pela técnica “*layer by layer*”, baseada principalmente na interação eletrostática entre cargas opostas dos biopolímeros foi bem sucedida.

A proteína total adsorvida na partícula foi alta, variando de 51,20 a 64,91%, sendo 33,24% dessa proteína encontrada na primeira camada (Alg_{Part1}). Na terceira camada (Alg_{Part3}) também foram encontrados teores proteicos elevados variando de 17,96 até 31,67%, que tornou possível verificar uma relação proporcional entre a concentração de alginato e WPC com o aumento da adsorção proteica nesta camada.

Uma diminuição significativa no teor de umidade das partículas de Alg_{Part} foi observada com a formação das multicamadas (Alg_{Part1} e Alg_{Part3}) sobre sua superfície, ao contrário do tamanho que se ampliou durante este processo. Observações realizadas por MEV revelaram que camadas terminadas em alginato possuem superfícies mais lisas, enquanto que as terminadas em WPC apresentam rugosidades.

Partículas úmidas suportaram a temperatura de esterilização, mantendo sua estrutura íntegra e características morfológicas similares às partículas úmidas não esterilizadas, enquanto que as partículas liofilizadas esterilizadas apresentaram alterações na sua morfologia, aglomeração e dificuldade de reidratação.

As partículas com multicamadas permaneceram estáveis em uma ampla faixa de pH (4 a 8), apresentando uma diminuição significativa de tamanho e um acréscimo significativo na solubilidade da camada proteica para o meio quando o pH foi alterado para 2. Um aumento significativo na perda de proteína da partícula também foi observado com o aumento da força iônica, embora esta perda tenha sido relativamente baixa.

As partículas com multicamadas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas, com uma liberação de 30,5% da proteína na partícula e, foram sensíveis à atividade proteolítica em ambiente intestinal simulado promovendo a desintegração das multicamadas e a liberação de praticamente toda a proteína da partícula.

Com base nestes resultados, conclui-se que a formação das multicamadas de alginato e WPC produziram partículas resistentes a influência do pH e da força iônica, além disso, estas partículas podem ser consideradas como potenciais transportadores de compostos sensíveis, cuja finalidade seja liberação em ambiente intestinal.

CONCLUSÕES GERAIS

O alginato, tanto em solução, emulsão ou em forma de partícula pode interagir eletrostaticamente com proteínas do soro do leite, em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína, onde possuem cargas opostas.

A interação eletrostática entre partículas de alginato obtidas por gelificação iônica e proteínas do soro do leite possibilita a adsorção de altas quantidades de proteína na superfície das ALG_{part} , em pHs 3,5 e 3,75. As maiores adsorções proteicas em partícula foram obtidas quando se utilizou a concentração de 4% de WPC_{sol} em pH 3,75.

Com a adsorção de proteínas sobre as partículas de alginato, possivelmente sua carga total da superfície passou de negativa para positiva, possibilitando a formação adicional de uma camada de alginato, pela adsorção do mesmo na superfície, resultado da interação eletrostática entre as cargas opostas remanescentes da proteína com o alginato livre em solução. Conseqüentemente outra camada proteica pôde ser formada novamente sobre a partícula.

O planejamento sequencial aleatório mostrou que o aumento de adsorção de proteína da terceira camada foi dependente da quantidade de alginato utilizado para a formação da segunda camada e, também da quantidade de proteína disponível em solução.

Os resultados da estabilidade das partículas com multicamadas indicaram que a temperatura de esterilização influenciou na estabilidade das partículas com multicamadas liofilizadas, tendo um efeito muito menor nas partículas úmidas com multicamadas. O pH e o NaCl influenciaram a solubilidade da camada proteica das micropartículas com multicamadas, aumentando a solubilidade com a redução do pH para condições extremamente drásticas (pH 2) e com o aumento na concentração de sal em solução aquosa.

As partículas com multicamadas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas simuladas.

5. REFERÊNCIAS BOBLIOGRÁFICAS

AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 23-43, 2003.

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

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

ANTIPOV, A. A.; SUKHORUKOV, G. B. Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability, **Advances in Colloid and Interface Science** 111, p. 49–61, 2004.

AOAC. Association of official analytical chemist's official methods of analysis. 16th Ed. Washington, 2006.

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of dynamic release of vitamin B₂ from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p. 1565–1574, 2006a.

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. **Reactive & Functional Polymers**, 66, p.645-658, 2006b.

BJAPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Preparation, characterization and preliminary calcium release study of floating sodium alginate/dextran-based hydrogel beads: part I. **Polymer International**, 57, p. 57- 65, 2008.

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

CROUZIER, T.; PICART, C. Ion pairing and hydration in polyelectrolyte multilayer films containing polysaccharides. **Biomacromolecules**, 10, p. 433–442, 2009.

CROUZIER, T.; BOUDOU, T.; PICART, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 15, p. 417–426, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**, 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010, p. 900.

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

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, **Science**, v. 277, p. 1232– 1237, 1997.

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**, 25, p. 1604 – 1617, 2011.

DOHERTY, S. B.; AUTY, M. A.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. *Journal of Microencapsulation*, v. 29, n. 8, p. 713–728, 2012.

ELBERT, D. L.; HERBERT, C. B.; HUBBELL, J. A. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. **Langmuir**, v. 15, n. 16, 1999.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science & Technology**, 21, p. 510-523, 2010.

FUJIWARA, G. M.; KAMINSKI, G. T. A.; FIN, M. T.; SASSO, D. G. B.; TIBERIO, C. C.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W. Comparação entre os perfis de liberação de azul de metileno a partir de micropartículas de alginato-quitosana em pH ácido. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez. - ISSN 1518-5192, 2010.

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

GLINEL, K.; DÉJUGNAT, C.; PREVOT, M.; SCHÖLER, B.; SCHÖNHOF, M.; KLITZING, R. V. Responsive polyelectrolyte multilayers, **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 303, p. 3–13, 2007.

HÉBRARD, G.; HOFFART, V.; CARDOT, J. M.; SUBIRADE, M.; BEYSSAC, E. Development and characterization of coated-microparticles based on whey protein/alginate using the Encapsulator device, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 39,1, p. 128–137, 2013.

JOHNSTON, A. P. R.; CORTEZ, C.; ANGELATOS, A. S.; CARUSO, F. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 11, p. 203–209, 2006.

JONES O. G.; MCCLEMENTS D. J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heattreating electrostatic protein-polysaccharide complexes. **Advances in Colloid and Interface Science**, Article in Press, doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071, 2010.

KREFT, O.; PREVOT, M.; MÖHWALD, H.; SUKHORUKOV, G. B. Shell-in-Shell Microcapsules: A Novel Tool for Integrated, Spatially Confined Enzymatic Reactions. **Angew. Chem. Int.**, 46, p. 5605 –5608, ed. 2007.

MIRANDA, E. S.; SILVA, T. H.; REIS, R. L.; MANO J. F. Nanostructured Natural-Based Polyelectrolyte Multilayers to Agglomerate Chitosan Particles into Scaffolds for Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 21 e 22, 2011.

MOKARRAM, R. R.; MORTAZAVI, S. A.; HABIBI NAJAFI, M. B.; SHAHIDI, F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Research International**, 42, p. 1040–1045, 2009.

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

MU, B.; LU, C.; LIU, P. Disintegration-controllable stimuli-responsive polyelectrolyte multilayer microcapsules via covalent layer-by-layer assembly, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 82, p. 385–390, 2011.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, p. 73-80, 2005.

NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, 25, p. 1945-1962, 2011.

OCHS, C. J.; SUCH, G. K.; YAN, Y.; KOEVERDEN, M. P.; CARUSO, F. Biodegradable click capsules with engineered drug-loaded multilayers. **ACSNano**, v. 4, n. 3, p. 1653 – 1663, 2010.

PETRUSIC, S.; LEWANDOWSKI, M.; GIRAUD, S.; JOVANCIC, P.; BUGARSKI, B.; OSTOJIC, S.; KONCAR, V. Development and characterization of thermosensitive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) and calcium alginate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 890–903, 2012.

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

SANTIPANICHWONG, R.; SUPHANTHARIKA, M.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Core-Shell Biopolymer Nanoparticles Produced by Electrostatic Deposition of

Beet Pectin onto Heat-Denatured β -Lactoglobulin Aggregates. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. N23-N30, 2008.

SCHNEIDER, S.; FEILEN, P. J.; SLOTTY, V.; KAMPFNER, D.; PREUSS, S.; BERGER, S.; BEYER, K.; POMMERSHEIM, R. Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. **Biomaterials**, 22, p. 1961- 1970, 2001.

SCHÖNHOFF, M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 8, p. 86–95, 2003.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q. Encapsulation of food Ingredients. **Food Science and Nutrition**, 33(6):501-547, 1993.

SHE, Z.; ANTIPINA, M. N.; LI, J.; SUKHORUKOV, G. B. Mechanism of Protein Release from Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules. **Biomacromolecules**, 11, p. 1241–1247, 2010.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v.101, p. 1484-1491, 2007.

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

SIMSEK-EGE, F. A.; 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.; CORDEIRO, C. G. M. S.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International** (2012), doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.041.

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

SUN, B.; MUTCH, S. A.; LORENZ, R. M.; CHIU, D. T. Layered polyelectrolyte-silica coating for nanocapsules. **Langmuir**, 21, p. 10763-10769, 2005.

TEIXEIRA, A. A.; TUCKER, G. S. On-line retort control in thermal sterilization of canned foods, **Food Control**, v. 8, n. 1, p. 13 – 20, 1997.

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

TIOURINA, O. P.; SUKHORUKOV, G. B. Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin and controlled release study. **International Journal of Pharmaceutics**, 242, p.155–161, 2002.

TOKLE, T.; LESMES, U.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Impact of dietary fiber coatings on behavior of protein-stabilized lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions, **Food Function**, 3, p. 58–66, 2012.

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

YE, S.; WANG, C.; LIU, X.; TONG, Z.; REN, B.; ZENG, F. New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly. **Journal of Controlled Release**, 112, p.79–87, 2006.

YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 38, p. 25–30, 2006.

ANEXO

Tabela A.1 Coeficiente de regressão do modelo para a determinação da concentração de alginato e de WPC em solução para a maior adsorção de proteína na partícula.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	28,42501	0,310812	91,4541	0,000000	27,62605	29,22398
x ₁ (L)	4,33157	0,190619	22,7238	0,000003	3,84157	4,82157
x ₁ (Q)	-1,47977	0,227458	-6,5057	0,001282	-2,06447	-0,89507
x ₂ (L)	1,91991	0,190619	10,072	0,000165	1,42991	2,40991
x ₂ (Q)	-3,54959	0,227458	-15,6055	0,000020	-4,13428	-2,96489
x ₁ x ₂	1,28000	0,269174	4,7553	0,005081	0,58807	1,97193

*x₁ Concentração de alginato; x₂ Concentração de WPC; L Termos lineares; Q Termos quadráticos.

Tabela A.2 ANOVA para as respostas de adsorção de proteína na partícula.

Fatores	SS	df	MS	F	p
x ₁ (L)	149,6537	1	149,6537	516,3699	0,000003
x ₁ (Q)	12,2663	1	12,2663	42,3241	0,001282
x ₂ (L)	29,4008	1	29,4008	101,4453	0,000165
x ₂ (Q)	70,5799	1	70,5799	243,5312	0,000020
x ₁ x ₂	6,5536	1	6,5536	22,6127	0,005081
Erro	1,4491	5	0,2898		
Total SS	258,8522	10			

*x₁ Concentração de alginato; x₂ Concentração de WPC; L Termos lineares; Q Termos quadráticos.