



BIANCA SOUZA DA COSTA

**MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA
RECOBERTAS COM GELATINA DE PEIXE E ISOLADO PROTEICO DE SOJA**

CAMPINAS

2014



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

BIANCA SOUZA DA COSTA

**MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA
RECOBERTAS COM GELATINA DE PEIXE E ISOLADO PROTEICO DE SOJA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição
na Área de Concentração Nutrição Experimental e aplicada à Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
BIANCA SOUZA DA COSTA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. CARLOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

Costa, Bianca Souza da, 1990-
C823m Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja / Bianca Souza da Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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. Isolado proteico de soja. 5. Gelatina de pele de peixe. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Microparticles produced by ionic gelation coated with fish gelatin and isolated soy protein

Palavras-chave em inglês:

Microencapsulation

Ionic gelation

Electrostatic interaction

Isolated soy protein

Fish skin gelatin

Área de concentração: Nutrição Experimental e de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]

Marcelo Cristianini

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

CPQBA-UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dra. Ana Silvia Prata

Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP
Membro Suplente

Prof. Dra. Renata Mukai Côrrea

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro Suplente

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir partículas de pectina e alginato por gelificação iônica, com posterior recobrimento com isolado proteico de soja (IPS), gelatina de pele de tilápia (GPT) e com a mistura dessas duas proteínas (IPS:GPT), avaliando suas características físico-químicas e seu comportamento frente a diferentes tratamentos. No estudo preliminar foram analisadas as condições que promovessem a carga elétrica livre que otimizassem a interação entre os polissacarídeos e proteínas, formando complexos insolúveis. A partir desses ensaios foram estabelecidas as seguintes proporções de polissacarídeo: proteína e valores de pH: 1:2 em pH4 para recobrimento com gelatina de pele de tilápia, e 1:0,75 em pH3 para interação com o isolado proteico de soja e para a mistura das duas proteínas. Foram testados 4 níveis de proteína em solução (1, 2, 4 e 8 %) para recobrimento das partículas de pectina e alginato. As partículas obtidas foram caracterizadas pelo teor de umidade, conteúdo proteico adsorvido e pela sua morfologia. A partir deste estudo preliminar foi selecionada a concentração de 8% de proteína em solução, devido à produção de partículas com alto teor proteico. Estas partículas foram avaliadas com relação à sua estabilidade frente a variações de pH, diferentes concentrações de NaCl e sob simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Utilizando a concentração de 8% de proteína em solução foram obtidos altos valores de adsorção proteica, resultando no percentual de proteína de 61,87%, 47,61% e 52,06% para as partículas recobertas com GPT, IPS e IPS:GPT, respectivamente. A variação de pH e das concentrações de sal influenciaram na solubilidade da camada proteica, apresentando uma maior solubilidade em condições de extrema acidez (pH 1) e a medida em que aumentava a concentração de sal. Nas faixas de pH (1 a 7) e nas concentrações de NaCl (0 a 584 mM) estudadas, independente do valor da solubilidade proteica obtida, todas as partículas permaneceram íntegras. No ensaio gastroentérico *in vitro*, as partículas de pectina e alginato (PEC:ALG_{part}) sem recobrimento e as recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{part}) foram resistentes as condições gástricas e entéricas, permanecendo íntegras. As partículas recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{part}) e com a mistura de proteínas (IPS:GPT_{part}), foram resistentes às condições gástricas, porém desintegraram-se em meio intestinal, liberando o material encapsulado.

Palavras chaves: microencapsulação, gelificação iônica, interação eletrostática, isolado proteico de soja, gelatina de pele de peixe.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce particles of pectin and alginate by ionic gelation with subsequent coating with isolated soy protein (IPS), tilapia skin gelatin (GPT), and a mixture of these two proteins (IPS:GPT), evaluating their physico-chemical characteristics and behavior to different treatments. In the preliminary study, the conditions that promote the balance of free electrical charge due the interaction between polysaccharides and proteins were analyzed. From these tests the following proportions of polysaccharide:protein and pH values were established: 1:2 at pH 4 for covering with tilapia skin gelatin, and 1:0.75 at pH 3 for interaction with the isolated soybean protein and mixing of the two proteins. Four protein levels were tested (1, 2, 4 and 8%) in solutions for coating the particles of pectin and alginate. The particles obtained were characterized by moisture content, adsorbed protein content and their morphology. From this preliminary study it was selected the concentration of 8 % protein solution, due to the production of particles with high protein content. These particles were evaluated for their stability against pH changes, different concentrations of NaCl and simulation under the simulated gastrointestinal conditions. Using a concentration of 8% protein solution high levels of protein adsorption were obtained, resulting in percentage of protein adsorbed of 61.87 %, 47.61 % and 52.06 % for the coated particles GPT, IPS and IPS: GPT, respectively. The variation of pH and salt concentrations influence the solubility of the protein layer having a higher solubility in conditions of extreme acidity (pH 1) and the extent to which increased salt concentration. In the pH ranges and concentrations of NaCl studied, regardless of the amount of protein solubility obtained, all the particles remained intact. In the gastrointestinal assay, pectin and alginate particles (PEC: ALG_{part}) uncoated and coated particles with tilapia skin gelatin (GPT_{part}) were resistant to the gastric and enteric conditions, remaining intact. The coated particles with isolated soy protein (IPS_{part}) and the protein mixture (IPS:GPT_{part}) were resistant to gastric conditions, but disintegrated in the intestinal environment, releasing the encapsulated material.

Key words: microencapsulation, ionic gelation, electrostatic interaction, fish skin gelatin , isolated soy protein.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | xvii |
| LISTA DE TABELAS | xxi |
| LISTA DE ABREVIACÕES | xxiii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 5 |
| ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO | 7 |
| CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| 1. Microencapsulação | 10 |
| 2. Aplicação da microencapsulação na indústria | 13 |
| 3. Técnicas de Microencapsulação | 144 |
| 3.1. Gelificação iônica | 14 |
| 3.2 Interações eletrostáticas | 16 |
| 4. Agentes encapsulantes | 188 |
| 4.1 Alginato | 18 |
| 4.2 Pectina..... | 21 |
| 4.3 Gelatina de Pele de Tilápia | 22 |
| 4.4 Isolado Proteico de Soja | 25 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 27 |
| | |
| CAPÍTULO 2- MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA RECOBERTAS COM GELATINA DE PEIXE E ISOLADO PROTEICO DE SOJA: ESTUDO DA ADSORÇÃO PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS..... | 37 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 40 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| 2.1. Material | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.2. Métodos | 44 |
| 2.2.1. Composição centesimal dos biopolímeros | 44 |
| 2.2.2. Obtenção da fração solúvel do isolado proteico de soja e da gelatina de pele de tilápia..... | 44 |
| 2.2.3. Determinação da carga elétrica | 45 |
| 2.2.4. Produção de coacervados | 45 |
| 2.2.5. Tamanho médio e distribuição de tamanho (D 0,5) | 48 |
| 2.2.6. Produção de micropartículas por gelificação iônica e avaliação da adsorção de proteína por interação eletroestática..... | 48 |
| 2.2.7. Secagem das micropartículas | 50 |
| 2.2.8. Caracterização das micropartículas | 50 |
| 2.2.8.1 Composição centesimal..... | 50 |
| 2.2.8.2. Tamanho médio das micropartículas (D 0,5)..... | 51 |
| 2.2.8.3 Morfologia e microestrutura..... | 51 |
| 2.2.9. Análise estatística | 52 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 3.1 Composição centesimal dos biopolímeros..... | 53 |
| 3.2 Determinação da carga elétrica..... | 54 |
| 3.3 Produção de coacervados..... | 56 |
| 3.3.1 Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG _{Sol} e soluções de proteína..... | 56 |
| 3.3.2 Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG _{Emul} e soluções de proteína...59 | |
| 3.3.3. Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG _{Part} e soluções de proteína.....62 | |
| 3.4. Avaliação da adsorção proteica nas micropartículas | 66 |
| 3.4.1. Caracterização das micropartículas e adsorção proteica | 66 |
| 3.4.2. Morfologia e Microestrutura | 70 |
| 4. CONCLUSÕES | 76 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

**CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MICROPARTÍCULAS
OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA E INTERAÇÃO ELETROESTÁTICA
COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS..... 83**

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 86 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 89 |
| 2.1. Material | 89 |
| 2.2. Métodos | 89 |
| 2.2.1. Produção de micropartículas | 89 |
| 2.2.2. Caracterização das micropartículas | 90 |
| 2.2.3 Avaliação da estabilidade da micropartícula em diferentes condições | 91 |
| 2.2.3.1 Estabilidade sob diferentes concentrações de NaCl..... | 91 |
| 2.2.3.2 Estabilidade em diferentes valores de pH | 92 |
| 2.2.3.3 Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais | 92 |
| 2.2.4 Análise estatística | 93 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 93 |
| 3.1. Avaliação da estabilidade das micropartículas | 93 |
| 3.1.1. Morfologia e solubilidade proteica da micropartícula sob diferentes concentrações molares de NaCl..... | 94 |
| 3.1.2. Morfologia e solubilidade proteica da micropartícula sob diferentes valores de pH..... | 101 |
| 3.1.3. Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i> | 106 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 111 |
| CONCLUSÕES FINAIS..... | 113 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 115 |

*Dedico este trabalho aos meus pais Ilda e Daniel
pelo amor e apoio para que mais uma trajetória fosse cumprida.*

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível ser realizado graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas elas e de forma particular:

- A Deus, por iluminar meus caminhos, colocando sempre pessoas especiais. Por ter me dado saúde, paciência e sabedoria para a conclusão de mais uma etapa importante na minha vida.

- Aos meus pais, Daniel e Ilda, por todo esforço realizado ao longo de anos para que eu pudesse prosseguir com meus estudos, e por acreditarem na importância da educação. Pelos bons exemplos demonstrados, e por estarem sempre presentes, acompanhando cada etapa da minha vida. E mesmo com a distância, mostram-se preocupados, atenciosos, permanecendo presentes em todas minhas decisões. Obrigada por todo amor e por acreditarem em mim. Amo vocês!

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela orientação e pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço por ter me apresentado outro ponto de vista acerca do vasto “mundo das micropartículas” e por ter me feito ficar cada vez mais encantada com esse universo micrométrico. Pela sua responsabilidade e atenção com o trabalho, e sua exigência, os quais foram fundamentais para a execução e finalização deste trabalho.

- Aos integrantes da banca examinadora: Profa. Dra. Ana Silvia Prata, Prof. Dr. Marcelo Cristianini, Dra. Renata Muka Corrêa e Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, pela atenção e pelas sugestões apresentadas para a realização desse trabalho.

- A todos os funcionários da FEA, pois somente através do trabalho cada um torna-se possível o bom funcionamento de cada departamento. Meu agradecimento especial à Yara, pelos ensinamentos técnicos, por compartilhar bons momentos no laboratório e pela amizade; à Cidinha por sempre ser atenciosa e dedicada; a Val por toda alegria e carinho transmitidos; a técnica Eliana pela sua ajuda em diversas análises e sua atenção; e ao

Cosme pela sua dedicação, paciência e comprometimento em auxiliar os alunos da pós-graduação.

- À professora Eliane Fialho (UFRJ) por me inserir no mundo da pesquisa ainda na graduação e pelos bons exemplos concedidos. Agradeço a Profa. Dra Anna Paola Trindade (INJC-UFRJ) pela oportunidade de trabalhar com microencapsulação ainda na iniciação científica e a Profa. Dra Maria Helena Miguez da Rocha Leão (EQ-UFRJ) pela orientação durante mais de 2 anos e pela extrema dedicação ao trabalho, fazendo com que meu interesse em relação as partículas só aumentassem...afinal esses foram os primeiros passos para minha inserção no mundo da pesquisa.

- Aos professores Dr. Armando Sabaa e Dra. Maria de Lourdes, pela grande influência na minha escolha pela Unicamp, afinal o incentivo de vocês foi fundamental para minha vinda para FEA...Obrigada pelo carinho e dedicação que possuem em relação ao ensino e pesquisa, para mim vocês são exemplos de educadores e pesquisadores!

- Aos companheiros de laboratório: Gislaine, Fernando e Talita, pelos conhecimentos compartilhados e bons momentos vividos.

- Aos amigos da Unicamp, da moradia, do forró, da vida...a todos estes que estiveram ao meu lado, dando-me apoio incondicional, fazendo meus dias mais alegres e felizes.

- Aos meus amigos de longa data: Angélica, Bianca, Bruno, Luiza, Rafaela, Renata, mesmo com a distância sempre se fazem presentes. Agradeço por todo carinho e pelos momentos compartilhados, e por todo apoio que me deram.

- ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Microesfera (agente ativo distribuído em uma matriz polimérica) e microcápsula (agente ativo envolvido pelo agente encapsulante).....12
- Figura 2-** Conformação da cadeia de alginato.....19
- Figura 3-** Estrutura química da cadeia de pectina.....21

CAPÍTULO 2

- Figura 1 -** Potencial zeta das soluções de PEC:ALG, GPT, IPS e IPS:GPT na concentração de 0,1% (m/m) em função do pH.....54
- Figura 2 -** Influência da concentração de proteína na aparência visual e no potencial zeta das misturas de solução de pectina com alginato e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.....57
- Figura 3 -** Influência da concentração de proteína na aparência visual das misturas de emulsão da mistura de pectina com alginato e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.....60
- Figura 4-** Influência da concentração de proteína na aparência visual e tamanho médio dos coacervados das misturas de suspensão de micropartículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}) (0,1% m/m) e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.....63

| | |
|---|----|
| Figura 5 - Morfologia das partículas úmidas e microestrutura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica utilizando a mistura binária de pectina e alginato (PEC:ALG _{Part}) em pH 3 e pH 4..... | 71 |
| Figura 6 - Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com GPT com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 4..... | 72 |
| Figura 7 - Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com IPS com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 3..... | 73 |
| Figura 8 - Microscopia ótica de partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com IPS:GPT com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 3..... | 74 |

CAPÍTULO 3

| | |
|---|-----|
| Figura 1 – Tamanho médio (µm) das partículas úmidas de pectina e alginato recobertas com GPT, IPS e IPS:GPT, suspensas em diferentes concentrações molares de NaCl, mantidas por 12 horas de agitação..... | 95 |
| Figura 2 - Microscopia ótica das partículas recobertas com GPT 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas..... | 98 |
| Figura 3 - Microscopia ótica das partículas recobertas com IPS 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas..... | 99 |
| Figura 4 - Microscopia ótica das partículas recobertas com IPS:GPT 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas..... | 100 |

Figura 5 - Tamanho médio (μm) das partículas úmidas de GPT_{part} , IPS_{part} e $\text{IPS}:\text{GPT}_{\text{part}}$ suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH por 12 horas de agitação.....102

Figura 6 - Microscopias das micropartículas suspensas em diferentes pHs sob agitação por 12h.....105

Figura 7- Morfologia das partículas de alginato e pectina durante a simulação gastrointestinal, após 2 horas em SGA com pepsina em pH 2 a 37 °C; após 5 e 17 horas com pancreatina em pH 7 a 37°C, totalizando 24h de ensaio.....107

Figura 8- Morfologia das partículas recobertas com proteína durante a simulação gastrointestinal: após 2 horas em SGA com pepsina em pH 2 a 37 °C; após 5 e 17 horas com pancreatina em pH 7 a 37°C; totalizando 24h de ensaio.....109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados para elaboração das micropartículas.....53

Tabela 2 - Tamanho dos coacervados obtidos entre as misturas de solução de polissacarídeos e solução de proteína.....58

Tabela 3 - Tamanho dos coacervados obtidos entre as misturas de PEC:ALG_{Emul} e solução de proteína.....61

Tabela 4 - Resultados da adsorção proteica em micropartículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}).....65

Tabela 5 - Teor de umidade nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).....67

Tabela 6 - Resultados da adsorção proteica em micropartículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}) utilizando diferentes concentrações proteicas.....68

Tabela 7 - Tamanho médio das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).....69

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Teor de proteína solúvel (%) das micropartículas obtidas por interação eletroestática suspensas em soluções aquosas com diferentes concentrações de NaCl.....96

Tabela 2- Teor de proteína solúvel (%) das diferentes micropartículas de interação eletroestática suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH.....103

Tabela 3 - Teor de proteína solúvel (%) das micropartículas após avaliação em condição gastrointestinal simulada.....108

LISTA DE ABREVIACÕES

BCA: ácido bicinconínico

CaCl₂: Cloreto de cálcio

GPT: gelatina de pele de tilápia

GPT_{Part}: partícula de pectina e alginato recoberta com gelatina de pele de tilápia

IPS: isolado proteico de soja

IPS_{Part}: partícula de pectina e alginato recoberta com isolado proteico de soja

IPS: GPT: mistura (1:1 m/m) de isolado proteico de soja e gelatina de pele de tilápia

IPS:GPT_{Part}: partícula de pectina e alginato recoberta com mistura (1:1 m/m) de isolado proteico de soja e gelatina de pele de tilápia

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

NaCl: cloreto de sódio

PEC: ALG_{Sol}: solução de pectina e alginato

PEC: ALG_{Emuls}: emulsão de pectina e alginato

PEC: ALG_{Part}: partícula de pectina e alginato

INTRODUÇÃO GERAL

A microencapsulação é uma tecnologia que proporciona o revestimento de compostos sólidos, gotículas de líquidos ou materiais gasosos, através de diferentes tipos de materiais poliméricos, convertendo-os em produtos de maior conveniência e aplicabilidade. A partir da microencapsulação é possível alterar as propriedades coloidais e de superfície de materiais, sendo capaz de proporcionar proteção ambiental e controlar suas características de liberação e biodisponibilidade (BANSODE *et al.*, 2010).

A formação de produtos de tamanho micrométrico resulta em uma característica singular desse método, podendo carrear uma quantidade alta de material de recheio e menor percepção de textura, facilitando a incorporação desse tipo de produto nas áreas alimentícias e farmacêuticas (NUPOOR & RATHORE, 2012). Essa tecnologia vem sendo extensivamente pesquisada, devido a sua diversidade de aplicações, principalmente nas áreas de alimentos, farmacêutica, agroindustrial e têxtil (DUBEY *et al.*, 2009; GOUIN, 2004).

Existem diversos métodos de microencapsulação, incluindo métodos físicos como spray drying, liofilização e spray cooling; métodos químicos envolvendo a polimerização interfacial e inclusão molecular, e métodos físico-químicos como a coacervação complexa e gelificação iônica. A escolha do método vai depender das características físico-químicas do material que será carreado e do polímero encapsulante, assim como as propriedades de barreira e liberação desejadas para o produto final que será obtido (JONES & MCCLEMENTS, 2010).

A escolha do método de microencapsulação para a área de alimentos é movida pela busca de técnicas de baixo custo e de simples execução, além de ser imprescindível que os materiais utilizados sejam biocompatíveis, excluindo o uso de solventes orgânicos ou compostos tóxicos ao organismo humano. Nesse segmento a gelificação iônica apresenta-se como um método aplicável, mediante o uso de polímeros que possuem a capacidade de formação de hidrogéis, a partir de ligação cruzadas com íons bivalentes sob condições brandas de temperatura, formando partículas atóxicas e biologicamente compatíveis (RÉ, 2000).

Como principais materiais de revestimento aplicados na gelificação iônica, tem a pectina, um polímero extraído do material péctico de algumas frutas (cítricas e maçãs), e o alginato que é obtido a partir de algas marrons. Ambos são polissacarídeos atóxicos que formam uma malha tridimensional através de ligações cruzadas com íons como o cálcio, mediante a presença de cargas negativas desses polímeros, quando o pH da solução apresenta-se acima de seu pKa (MESTDAGH & AXELOS, 1998; ANNAN *et al.*, 2008).

No entanto, as partículas obtidas por gelificação iônica utilizando alginato e pectina apresentam uma elevada porosidade, o que permite a difusão de compostos de baixo peso molecular, além de uma baixa resistência mecânica. Visando a diminuição dessa porosidade e a melhora das características de proteção da partícula, tem sido proposta a aplicação de um recobrimento através de interações eletrostáticas pela adição de um polieletrólito de carga oposta à apresentada pelo gel, formando os chamados complexos polieletrólitos (BERGER *et al.*, 2004; PATIL *et al.*, 2010).

Nessa vertente o uso de proteínas apresenta-se interessante, pois quando estão abaixo do seu ponto isoelétrico, apresentam-se carregadas positivamente, podendo interagir com os grupamentos carboxílicos da superfície das partículas de gelificação, formando complexos estáveis sobre a partícula (YE, 2008).

O estudo das interações de proteínas e polissacarídeos é de grande relevância para a microencapsulação, pois produzem partículas com diferentes composições e funcionalidades, e com melhores características mecânicas. Porém, essa adsorção proteica sobre as partículas porosas sofre interferência do pH e da força iônica do meio, da concentração e proporção de biopolímeros utilizados. Portanto deve ser realizado o estudo das características físico-químicas dos biopolímeros, avaliando-se as condições de pH que possibilite a formação de um maior número de cargas opostas e a avaliação da proporção de proteína e polissacarídeo que possibilite uma maior formação de complexos eletrostáticos (SPERBER *et al.*, 2009; JONES & MCCLEMENTS, 2010).

Algumas proteínas têm sido estudadas para esse tipo de aplicação como proteínas do soro de leite e a gelatina (PENICHE *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2012; GEBARA *et al.*, 2013). Entretanto, há uma busca por novos materiais que possam ser aplicados nesse tipo de partícula. Dessa forma a gelatina de peixe e o isolado proteico de soja apresentam-se

como materiais alternativos de baixo custo, atóxicos, com boas propriedades físico-químicas e relevantes características nutricionais (KARIM & BHAT, 2009; NESTERENKO *et al.*, 2013). Porém, são escassos os estudos aplicando esses materiais como revestimento para partículas de gelificação iônica. Assim, torna-se importante compreender como as características desses biopolímeros podem influenciar na formação, estrutura e propriedades dos complexos formados em partículas compostas de alginato e pectina, além de ser necessário o estudo das condições operacionais para obtenção destes complexos. A avaliação da resistência dessas partículas a condições adversas também é de grande relevância, para revelar dados sobre suas características de proteção e liberação desse tipo de partícula.

Tendo em vista a potencial aplicação do isolado proteico de soja e da gelatina de peixe, o presente trabalho teve como objetivo o estudos das condições para a produção de micropartículas por gelificação iônica utilizando mistura de pectina e alginato, com posterior recobrimento com proteína isolada de soja e/ou gelatina de pele de tilápia por interação eletrostática, e avaliar sua resistência e estabilidade em ambientes adversos.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Avaliar a carga elétrica líquida das soluções diluídas de proteína e de polissacarídeo através de medidas do potencial zeta;
- Caracterizar os coacervados formados pela mistura entre solução ou emulsão de polissacarídeos e solução de proteína em relação à distribuição de tamanho e a carga elétrica dos coacervados formados;
- Caracterizar os coacervados formados pela mistura de partículas de gelificação iônica e solução de proteína em relação à distribuição de tamanho e adsorção proteica, visando estabelecer parâmetros para o processamento em condições reais (concentradas);
- Produzir micropartículas utilizando os métodos combinados de gelificação iônica e interação eletrostática, sendo a gelificação iônica realizada com mistura de pectina

de baixo teor de esterificação amidada e alginato de sódio, e posteriormente com recobrimento das partículas com isolado proteico de soja (IPS) ou gelatina de pele de tilápia (GPT), ou uma mistura dessas proteínas na proporção 1:1 (m/m);

- Avaliar a capacidade de adsorção das diferentes proteínas e mistura sobre as partículas de gelificação iônica. Avaliar a morfologia interna e externa das micropartículas produzidas;
- Avaliar a estabilidade e solubilidade proteica das micropartículas úmidas frente a soluções aquosas com diferentes pHs;
- Avaliar a estabilidade e solubilidade proteica das micropartículas úmidas frente a diferentes concentrações molares de NaCl;
- Avaliar a resistência das micropartículas recobertas por interação eletrostática sob condições gastroentéricas simuladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.1, p.38-43, 2010.

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

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

GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. . Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872-878, 2013.

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

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D.J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, p. 374-397, 2010.

KARIM, A. A. & BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v.23 , p.563–576, 2009.

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

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v.42 p.469– 479, 2013.

NUPOOR, S. & RATHORE, K. S. A Review on Microencapsulation: A New Multiutility Advanced Technology. **International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences**, vol.1 n.4 p. 477-489, 2012.

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

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

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

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**, v.23, p.765–772, 2009.

YAO, R.; ZHANG, R.; LUAN, J.; FENG, L. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. **Biofabrication**, v.4, 2012.

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

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O trabalho foi dividido em três capítulos, conforme descrito a seguir:

No Capítulo 1, “Revisão Bibliográfica” são apresentados os fundamentos teóricos sobre microencapsulação e suas aplicações, técnicas de gelificação iônica e interação eletroestática, e sobre matérias-primas utilizadas na elaboração das micropartículas.

O Capítulo 2, “Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja: estudo da adsorção proteica e caracterização das partículas”, reúne os ensaios preliminares para a obtenção das condições de pH, proporções e concentrações de polissacarídeos e proteínas, viabilizando uma maior interação entre os biopolímeros. Avaliou-se também a possibilidade de partículas de mistura de pectina com alginato obtidas por gelificação iônica serem recobertas por gelatina de pele de tilápia e por isolado proteico de soja, isoladamente, e pela mistura das duas proteínas.

No Capítulo 3, “Avaliação da resistência de micropartículas obtidas por gelificação iônica e interação eletroestática com alto teor de proteína submetidas a diferentes tratamentos”, o foco principal foi produzir micropartículas com alto teor proteico, e avaliar o seu comportamento quando submetidas a diferentes pHs, variadas concentrações molares de NaCl e simulação *in vitro* das condições gastrointestinais.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Microencapsulação

A microencapsulação pode ser definida como uma técnica que consiste no envolvimento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos através do seu revestimento por uma fina camada polimérica, originando uma micropartícula (TODD, 1970). As indústrias de alimentos, farmacêutica e química utilizam essa tecnologia visando a proteção do material encapsulado às condições adversas do meio circundante, estabilizando e aumentando sua vida útil, permitindo sua liberação em local e quantidade propícia para atender as mais diversas necessidades destes segmentos (SHAHIDI & HAN, 1993).

O conceito teve origem na concepção de um modelo celular, no qual o núcleo encontra-se envolvido por uma membrana semipermeável, que atua de forma simultânea tanto para proteção contra agentes do meio externo, quanto na liberação controlada a partir de determinado estímulo (JIZOMOTO *et al.*, 1993).

Desde os seus primeiros relatos na década de 30 e as iniciais aplicações na década de 50, o processo de microencapsulação evoluiu, expandindo-se para diversas áreas de aplicação. Uma das primeiras aplicações foi em 1954, através da produção de microcápsulas por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica para a produção de papéis de cópia sem carbono, que entre suas folhas de papel comum, continham tinta microencapsulada. As microcápsulas eram rompidas quando pressionadas, liberando a tinta que, ao entrar em contato com uma segunda folha previamente banhada em um revelador, produzia a cópia nos pontos pressionados. Nessa mesma época também foram realizadas as primeiras pesquisas na área farmacêutica, pela Universidade de Wisconsin nos Estados Unidos (RÉ, 2000; DUBEY *et. al.*, 2009).

Avanços na área de pesquisa desta técnica permitiram a ampliação de seu uso, incluindo segmentos industriais na área de aromas e sabores, tintas, química, agrícola,

dentre outras. As áreas de maior pesquisa e investimento atuais são a farmacêutica e a cosmética, visto que as micropartículas possuem uma ampla gama de finalidades de aplicação (RÉ, 1998; WIELAND-BERGHAUSEN *et al.*, 2002; GOUIN, 2004).

Os principais objetivos da microencapsulação incluem a transformação de um líquido em sólido, de modo a facilitar sua manipulação, suprimir ou atenuar aromas indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade, além de aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (TRINDADE *et al.*, 2008).

A produção das cápsulas pode ser feita através de métodos físicos: spray drying, spray chilling, extrusão, extrusão centrífuga, leiteo fluidizado, co-cristalização e liofilização; por métodos químicos: polimerização interfacial e inclusão molecular, além de métodos físico-químicos: coacervação simples ou complexa, formação de lipossomas, gelificação iônica e evaporação de solvente (SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 1998; THIES, 2001).

A escolha do tipo de método irá depender da aplicação e do tipo de mecanismo de liberação desejado, assim como as propriedades físico-químicas do agente encapsulante e da solubilidade do material ativo, das condições de produção e dos requisitos do produto final (RÉ, 1998; JONES & MCCLEMENTS, 2010a).

As características estruturais, como forma e disposição do núcleo (único ou múltiplo), assim como o tamanho das partículas obtidas dependerá dos tipos de materiais e da técnica empregada. As partículas produzidas podem ser classificadas de acordo com o tamanho, como micropartículas de 1 a 1000 μm ou nanopartículas de 10 a 1000 nm (SILVA *et al.*, 2003). Este é o principal parâmetro avaliado na área de alimentos, pois interferem diretamente nas propriedades físico-químicas como os atributos sensoriais (VAN DEN BERG *et al.*, 2008).

Em termos estruturais, podem-se observar dois grupos: um caracterizado por uma partícula mononucleada com o material encapsulado envolvido por uma parede, com estrutura do tipo reservatório, o que caracteriza “verdadeiras microcápsulas”; e outro onde se observa uma partícula multinucleada, na qual o conteúdo se distribui em uma estrutura

tipo esponja ou matriz, sendo denominada de micropartículas (Figura 1) (RÉ, 1998; MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003, PIMENTEL *et al.*, 2008).

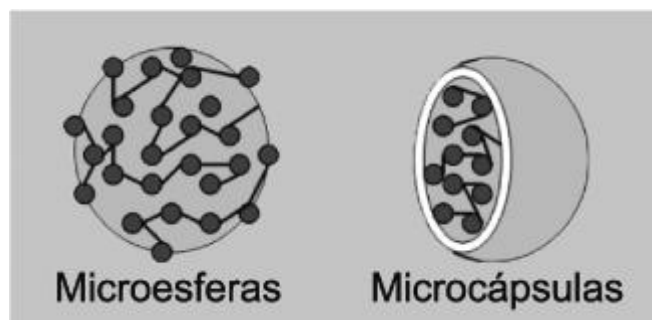


Figura 1 – Microesfera (agente ativo distribuído em uma matriz polimérica) e Microcápsula (agente ativo envolvido pelo agente encapsulante). Adaptado de PIMENTEL *et al.*, 2007.

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

A formação das cápsulas envolve a homogeneização de uma suspensão ou solução contendo o material de parede e o composto a ser encapsulado, seguido da deposição do material de parede ao redor do recheio, e fixação ou solidificação da estrutura da parede, que pode ser realizada por aquecimento, ligações cruzadas ou remoção do solvente. A liberação do material encapsulado pode ser obtida por mecanismos como ruptura mecânica, ação da temperatura, pH, solubilidade no meio, difusão e biodegradação (BAKAN, 1973).

Os métodos utilizados para caracterização e posterior avaliação do processo de microencapsulação incluem: avaliação da microestrutura e morfologia através da microscopia ótica e eletrônica de varredura, distribuição de tamanho, composição da parede, recheio e comportamento de liberação por técnicas diversas. Porém, as características funcionais como capacidade de retenção do composto encapsulado, integridade e digestibilidade atuam direcionando o produto encapsulado para a aplicação pretendida (THIES, 1995; JONES & MCCLEMENTS, 2010a).

2. Aplicação da microencapsulação na indústria

Os principais parâmetros que justificam o uso da técnica de microencapsulação na indústria alimentícia são: redução da reatividade do material de recheio com o ambiente externo; diminuição da velocidade de evaporação ou o controle da liberação do material de núcleo para o meio; mascara sabores; facilita a manipulação do produto e a proteção em relação aos agentes externos, como umidade, luz, calor e/ou oxidação (SHAHIDI & HAN, 1993).

Na área alimentícia, o material a ser encapsulado pode ser o alimento como um conjunto, ou apenas compostos extraídos ou produzidos de forma sintética, como aromas, compostos bioativos, pigmentos, entre outros. A expansão da microencapsulação na indústria de alimentos revela o crescente potencial de aplicação para materiais como óleos poliinsaturados, enzimas, micro-organismos, vitaminas, sais, aminoácidos, óleos essenciais e corantes. Entre as suas aplicações, visa à proteção dos compostos de aroma, que podem ser perdidos por evaporação, oxidação ou interações com outros compostos, e uma liberação controlada destes (DESAI & PARK, 2005).

Estudos têm mostrado os efeitos protetores da microencapsulação sobre a estabilidade de compostos sensíveis a degradação química, como antocianinas e ácido ascórbico (CHANDRA *et al.*, 1993; RIGHETTO & NETTO, 2006). Para pigmentos, como os carotenóides, por exemplo, a encapsulação tem atuado auxiliando na extensão da vida útil, protegendo o material contra condições ambientais adversas, além de permitir a liberação controlada desses compostos sob condições desejadas (SAHIDI & HAN, 1993).

Na indústria farmacêutica a microencapsulação também possui larga aplicação, devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo a liberação precisa de baixas doses do fármaco, redução da concentração do fármaco em outros locais que não os tecidos-alvo e proteção dos compostos lábeis, antes e depois da administração, até exercerem a sua ação farmacológica (MANDAL *et al.*, 2001). Os sistemas de liberação controlada apresentam vantagens, quando comparados ao sistema de

liberação convencional, pela redução dos efeitos adversos devido à manutenção da concentração plasmática do fármaco por longo período, redução da dose ou frequência de administração, e maior adesão ao tratamento por parte do paciente (CAMILO, 2007).

No setor agropecuário, a microencapsulação de pesticidas vem sendo aplicada visando à redução da contaminação ambiental e toxicidade, além de minimizar as perdas por degradação, e diminuição do escoamento para fontes de água, prevenindo assim contaminação ambiental (KUMBAR & AMINABHAVI, 2002). Além disso, a microencapsulação vem sendo empregada na fabricação de dietas inertes para peixes capazes de substituírem o alimento vivo (PEDROZA-ISLAS, 2000).

Estudos revelam uma expansão do mercado de encapsulação em alimentos, impulsionado pela mudança de hábitos alimentares, pela crescente busca por inovações tecnológicas, popularidade de sabores exóticos e procura por compostos bioativos e funcionais, além da crescente preocupação com a preservação dos alimentos (DOHERTY et al., 2011).

3. Técnicas de Microencapsulação

3.1 Gelificação iônica

A produção de micropartículas através da técnica de gelificação iônica é um método de encapsulação simples, rápido e de baixo custo, baseado na capacidade dos polieletrólitos de fazerem ligações cruzadas na presença de contra-íons, formando uma estrutura em malha tridimensional (THIES, 1995; RÉ, 2000). Por esse método, uma solução polimérica carregada negativamente forma ligações cruzadas (*cross-linking*) com cátions de baixa massa molecular, formando hidrogéis (RÉ, 2010).

Existem dois tipos de gelificação iônica: a interna e a externa. A gelificação iônica interna produz partículas por meio da adição de sais de cálcio insolúveis em uma solução

polimérica contendo material de recheio, com posterior dispersão desta mistura em uma fase oleosa contendo surfactante. Para que a gelificação ocorra, adiciona-se uma solução ácida para a redução do pH, afim de liberar os íons cálcio, permitindo sua complexação com os grupos carboxílicos. Já a gelificação iônica externa é uma técnica onde partículas são produzidas pelo gotejamento de uma solução polimérica negativamente carregada em uma solução catiônica, normalmente contendo cálcio, com a gelificação ocorrendo através difusão de cátions para dentro da solução de hidrocolóide (SILVA *et al.*, 2006; SCHOUBBEN *et al.*, 2010).

O método de gelificação externa além de simples, não necessita a utilização de solventes orgânicos, apresentando grande potencial para a aplicação nas áreas farmacêuticas, biomédicas e alimentícia (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; PATIL *et al.*, 2010).

A formação das partículas de gel envolve a formação da gota, pelo processo de extrusão ou atomização, seguida do endurecimento da mesma. Logo após a formação, as partículas permanecem sob agitação por um período denominado tempo de maturação, pois as ligações cruzadas desenvolvem-se lenta e progressivamente da superfície para o interior da partícula gelificada (RÉ, 2000; ROCHA, 2001).

Através da técnica de gelificação iônica, é possível a produção de dietas proteicas ricas em carboidratos, além de incorporar partículas insolúveis em água na sua composição com o uso de hidrocoloides (MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2004), sendo sua eficiência definida pela formação de uma estrutura com uma matriz impermeável para certos compostos orgânicos, bem como para o oxigênio (THIES, 1995).

As propriedades das partículas formadas pela gelificação iônica como a cinética da formação do gel, o volume, a estabilidade e a porosidade das cápsulas, assim como o índice de difusão de solutos para dentro ou fora da matriz polimérica, é influenciada diretamente pela concentração do polissacarídeo e dos cátions, pela força iônica e pelo pH (MESTDAGH & AXELOS, 1998).

Na área alimentícia os hidrocolóides mais utilizados como material de parede para a aplicação na gelificação iônica são as pectinas de baixo teor de esterificação e o alginato de sódio, pois são polieletrólitos naturais com capacidade de formação de hidrogéis sobre

adição de cátions divalentes como, por exemplo o Ca^{2+} (FANG *et al.*, 2008). A formação de hidrogéis possui características vantajosas de biocompatibilidade com membranas, devido a natureza hidrofílica do material, e da ausência de tensão interfacial com fluidos e tecidos circundantes, que minimiza a adesão celular (DE VOS *et al.*, 2006).

As partículas produzidas por essa técnica apresentam uma porosidade e difusividade expressivas, sendo a mesma inadequada para encapsulação de compostos de baixo peso molecular em especial os hidrofílicos. Por outro lado, é indicada para imobilização de compostos maiores como células e enzimas (GOUIN, 2004).

3.2 Interações eletrostáticas

Géis de alginato e ou pectina apresentam alta porosidade, e conseqüente elevado índice de difusão, podendo acelerar a liberação do material de recheio (SEZER & AKBUGA, 1999). Por esta razão, tem sido proposta a formação de complexos estáveis de alginato/pectato de cálcio com policátions, baseada principalmente na interação eletrostática entre dois polímeros de cargas opostas, resultando na formação de um complexo sobre a superfície da partícula de gelificação iônica (THU *et al.*, 1996).

A reticulação é um processo onde as cadeias poliméricas são unidas por ligações covalentes, através de uma reação química ou por interações físicas (interações iônicas) entre o polímero e o agente de reticulação, ou entre dois diferentes polímeros (NETO *et al.*, 2005). A interação eletrostática entre os biopolímeros apresenta situação otimizada quando existe equilíbrio entre cargas positivas e negativas, de modo que a maior parte dos sítios ativos esteja ligada, ou seja, na faixa de pH acima do pK_a da polissacarídeo e abaixo do ponto isoelétrico da proteína, onde o sistema possa apresentar uma quantidade de cargas similares, porém de sinais opostos (SCHMITT *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2010).

A formação de complexos através das interações eletrostáticas pode ser afetadas pelo pH, força iônica, pela razão entre os hidrocolóides utilizados bem como pela sua

concentração e pela temperatura da solução. A interação eletrostática ocorre entre as cargas dos biopolímeros, principalmente em sua superfície. No caso das proteínas, há uma distribuição heterogênea das cargas na superfície, com quantidades variáveis de regiões positivas e negativas, permitindo a sua interação com outras moléculas (JONES & MCCLEMENTS, 2010b).

A preparação de complexos polieletrólitos ocorre em meio aquoso, o que representa uma vantagem sobre os géis reticulados covalentemente e não exige o uso de catalisadores ou iniciadores (BERGER *et al.*, 2004). O recobrimento com aplicação de polissacarídeos como pectina e alginato, e proteínas como a gelatina e proteínas do soro do leite, para a encapsulação de substâncias e como sistema de liberação de drogas, têm sido promissora, devido as suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além da formação de membranas transparentes com boas propriedades mecânicas (BERNABÉ *et al.*, 2005).

A adsorção de proteínas na superfície da partícula irá depender das características físico-químicas da superfície, do tempo de reação, assim como o pH e a concentração de eletrólitos na solução, pois estes apresentam impacto na força e no tipo de cargas eletrostáticas formadas. A interação eletrostática em partículas pode ser controlada pela variação de cargas de superfície e pode ser determinada pelo potencial zeta das partículas (ROACH *et al.*, 2005).

Além das interações eletrostáticas outras ligações também estão envolvidas no processo de adsorção de proteínas na superfície de micropartículas, como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas, porém o mecanismo de interações químicas ainda não foi entendido completamente (ROACH *et al.*, 2005; ASKER *et al.*, 2011). Partículas produzidas por interações eletrostáticas têm mostrado resistência à ação das enzimas da parte superior do trato gastrointestinal, mostrando-se um bom veículo para fármacos e compostos bioativos, atraindo o interesse por pesquisas para aplicações nas áreas farmacêuticas e alimentícias (MATALANIS *et al.*, 2011).

4. Agentes encapsulantes

Os agentes encapsulantes são materiais com capacidade de formação de filme, sendo compostos por uma ampla variedade de polímeros, tendo sua composição variando dependendo do tipo de aplicação, abrangendo desde compostos comestíveis como gomas, amidos, lipídeos, proteínas, até compostos sintéticos como silicatos (JACKSON & LEE, 1991).

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. Alguns parâmetros devem ser considerados na escolha do material de parede para que se obtenha um processo de encapsulação eficiente, tais como: as características de superfície (carga, hidrofobicidade, absorção de outras substâncias), a resistência ao ataque químico e microbiano, assim como as propriedades mecânicas das cápsulas formadas, a forma física e tamanho, além de sua permeabilidade (TREVISAN, 1990).

O encapsulante ideal não deve ser reativo com o material a ser encapsulado, e preferencialmente deve apresentar polaridade oposta, possuindo a habilidade de manter o material ativo dentro da estrutura da cápsula, sendo de fácil manipulação durante o processo, proporcionando a máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos, possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo e ser econômico (SANTOS *et al.*, 2000).

4.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo hidrossolúvel de ocorrência natural encontrado em algumas bactérias e nas paredes celulares e intracelulares de algas marrons, principalmente *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (GOMBOTZ & WEE, 1998; ANNAN *et al.*, 2008).

Quimicamente é composto por polímeros lineares de alta massa molar com secções rígidas e regiões flexíveis, formados por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) (Figura 2) (THU *et al.*, 1996). A composição molecular dos ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) apresenta variações dependendo do tipo de alga de que foi extraído e do local de sua produção (FENNEMA, 1996). A composição e a extensão das seqüências, o peso molecular, a distribuição dos blocos M e G na estrutura e a proporção M e G influenciam fortemente suas propriedades físico-químicas em solução (GOMBOTZ & WEE, 1998).

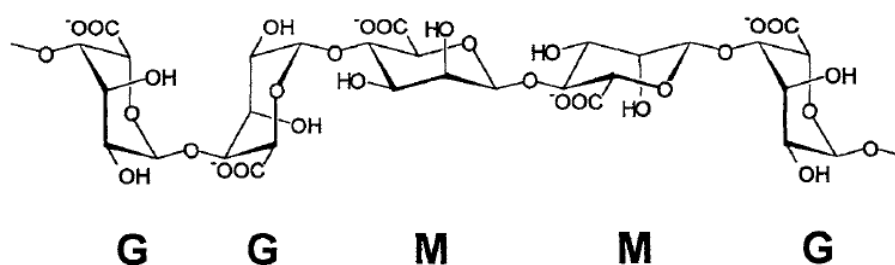


Figura 2 - Conformação da cadeia de alginato. Adaptado de THU *et al.*, 1996.

O alginato destaca-se por sua propriedade gelificante, formando géis pela reação com cátions divalentes, principalmente o Ca^{2+} , que induz a um efeito cooperativo entre os blocos G formando uma estrutura tridimensional conhecido como “modelo caixa de ovo” (AMICI *et al.*, 2008). Esse processo será dependente da disposição de cargas, pois em soluções acima do pH correspondente ao seu pKa (pH 3,38 – 3,65), está carregado negativamente e em baixos valores de pH a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida (SIMSEK-EGE *et al.*, 2003).

Micropartículas de alginato podem ser preparadas por extrusão de uma solução de alginato de sódio em uma solução contendo cátions divalentes. A reticulação do alginato com íons cálcio é estabelecida pelas unidades gulurônicas, sendo que a força e a porosidade das partículas formadas dependem da origem e da massa molar do polímero, da concentração do cloreto de cálcio e da dispersão do alginato (GOMBOTZ & WEE, 1998; PENICHE *et al.*, 2004).

Alginato apresenta características fundamentais para sua aplicação como material encapsulante, pois permite um processo de encapsulação livre de solventes orgânicos, além de promover um ambiente aquoso relativamente inerte dentro da matriz, assim como sua propriedade de biodegradação sob condições fisiológicas normais (GOMBOTZ & WEE, 1998). Outras características representam o grande potencial de aplicação, como sua fácil obtenção a partir de fontes naturais, baixo custo, facilidade para produção de hidrogéis, biocompatibilidade, não toxicidade, e sua estabilidade à temperatura, podendo ser armazenado à temperatura ambiente (DING & SHAH, 2007).

O alginato de cálcio tem sido utilizado principalmente pela área farmacêutica para uso em sistemas de liberação de fármacos, e na área alimentícia com objetivo da encapsulação de bactérias probióticas, e aplicada também como agente espessante, gelificante e estabilizador de soluções coloidais (ANAL & STEVENS, 2005; DING & SHAH, 2007).

A aplicação do alginato na microencapsulação é decorrente da estabilidade dos géis de alginato em condições ácidas, como no estômago, pois na redução do pH abaixo dos pKas do ácido D-manurônico e do ácido L- gulurônico, respectivamente 3,6 e 3,7, há a conversão do alginato para ácido algínico com liberação de íons cálcio, formando um gel mais denso devido à perda de água, porém o material de recheio continua aprisionado no interior do núcleo das cápsulas (ANNAN *et al.*, 2008). Entretanto, processos utilizando alginato como material encapsulante, resultam em partículas porosas (GOUIN, 2004).

A característica de porosidade das partículas pode ser minimizada adicionando outro composto polimérico com o alginato ou através de modificações estruturais no alginato como o uso de diferentes aditivos (GOUIN, 2004). Nessa mesma vertente, tem sido proposta a utilização de policátions para a formação de complexos estáveis de alginato, visando à diminuição da difusão através da partícula. O polication atua formando uma membrana complexa forte, que estabiliza e fortalece a rede do gel iônico, reduzindo e controlando a permeabilidade da partícula, conferindo proteção contra quelantes de Ca^{+2} (THU *et al.*, 1996).

4.2 Pectina

A pectina é um biopolímero, derivado das paredes celulares das plantas, obtida industrialmente por extração aquosa a partir de material péctico de algumas frutas cítricas e de maçãs. Esse heteropolissacarídeo é composto por resíduos de ácido D-galacturônico, contendo quantidades variadas de grupos carboxilas metil esterificados, em ligação α (1-4), no qual a cadeia linear é interrompida por resíduos de L-ramnose em intervalos regulares (Figura 3) (FENNEMA,1996; BRANDÃO & ANDRADE, 1999).

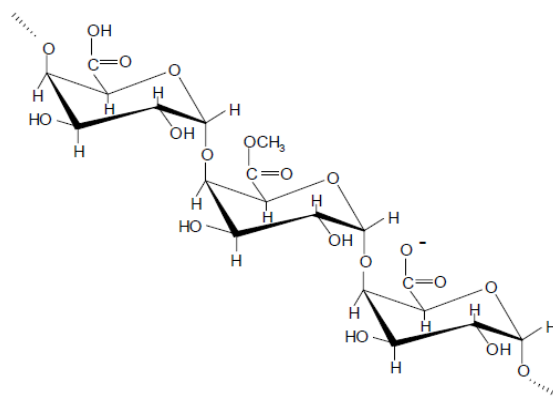


Figura 3. Estrutura química da cadeia de pectina. Adaptado Brandão & Andrade (1999).

A pectina pode ser classificada como de alto ou baixo teor de esterificação, que é definido pela porcentagem de ácidos galacturônicos que são metilesterificados (FENNEMA, 1996). O grau de esterificação pode ser controlado durante o processo de extração da pectina, variando entre 0-75% no produto final. Os metil ésteres formados ocupam um espaço similar, mas são mais hidrofóbicos e conseqüentemente tem um efeito diferente na estruturação (HOEFLER, 2004).

A formação de géis de pectinas de baixo teor de metoxilação (<50% de grupos metil esterificados) é resultado de ligações cruzadas entre os íons bivalentes, como o cálcio, e os grupos carboxila do ácido D-galacturônico. Um modelo “caixa de ovos” é usado para descrever a formação da rede de gel com íons cálcio, sendo induzida da mesma forma que os géis de alginato (BRACCINI & PÉREZ, 2001).

Os géis são geralmente formados em concentrações maiores do que 1% e a proporção de cálcio usada varia de 0,1 a 0,5% do peso do gel, sendo essa formação prejudicada na presença de um pH muito ácido (MUKAI-CORRÊA, 2003).

A pectina também é classificada de acordo com o grau de amidação, que consiste na porcentagem de grupos carboxil do ácido galacturônico que reagem com amônia. Pectina amidada com baixo teor de esterificação, forma géis mais firmes pela ação de íons cálcio, que à pectina não amidada necessitando, portanto, de uma menor concentração de cálcio para gelificar (OVODOV, 2009).

As propriedades do gel são afetadas pelo tipo de pectina (grau de esterificação), arranjo de ésteres metílicos, concentração do polissacarídeo e íon divalente, método de preparo do gel, além do tempo de reação ser o suficiente para a ligação cooperativa de íons Ca^{2+} (HOEFLER, 2004; FRAEYE *et al.*, 2010).

Sua capacidade de formação de complexos com outros polímeros, ocorre em função de seu balanço de cargas. Em pH acima de 2,9 encontra-se carregada negativamente, em pH abaixo deste valor, o polissacarídeo encontra-se não dissociado, portanto sem cargas, devido ao seu valor de pKa de 2,9. Mediante as suas características eletrostáticas e capacidade de formação de gel, a pectina intacta ou modificada, e pectina associada a outros polímeros naturais ou sintéticos tem sido estudada como material de revestimento em microcápsulas (RALET *et al.*, 2001; CAMILO, 2007).

4.3 Gelatina de Pele de Tilápia

A gelatina é uma proteína de origem animal derivada da hidrólise parcial do colágeno com a capacidade de formar um gel termo-reversível através de ligações de hidrogênio com a água (FENNEMA, 1996). É um polímero de caráter anfótero, com propriedades aniônicas ou catiônicas em condições ácidas ou básicas, respectivamente, que lhe confere um equilíbrio dinâmico associado à neutralização das soluções de gelatina (XING *et al.* 2005).

O ponto isoelétrico da gelatina pode variar em função do seu processo de obtenção. A extração via hidrólise ácida produz a gelatina tipo A, que apresenta ponto isoelétrico na faixa de pH alcalino (7,0-9,4), devido às condições do processamento brando, que minimiza modificações nos grupos aminas, o que mantém o valor próximo do pH do colágeno. Já o processo de hidrólise básica, apenas pequena porção dos grupos aminas resiste ao processo (90-95% de ácido carboxílico livre). Nesse caso é obtida a gelatina tipo B, que apresenta ponto isoelétrico na faixa de pH 4,8 e 5,2 (BERTAN, 2003; BUENO, 2008).

Durante o processo de obtenção da gelatina ocorre a desnaturação do colágeno, onde este é quebrado em pequenos fragmentos e as triplas hélices são separadas, resultando um produto de peso molecular menor do que o colágeno nativo. As principais frações resultantes são as formas α , β e γ , que apresentam peso molecular variando de 80 a 125 kDa, 160 a 250 kDa e 240 a 375 kDa, respectivamente (POPPE, 1997; KARIM & BHAT 2009).

A gelatina é uma proteína muito utilizada para a encapsulação devido as suas propriedades mecânicas, capacidade de gelificação e origem biológica natural. Sua aplicação nesse ramo também é sugerida pela sua capacidade de se associar com polissacarídeos, como o alginato e a pectina, e demais polímeros com cargas opostas através da interação eletrostática, formando assim microcápsulas resistentes, estáveis e pouco porosas (IWAMOTO *et al.*, 2002).

O tipo de gelatina usualmente comercializada é proveniente de mamíferos como bovinos e suínos, porém, há uma procura por novas fontes. Essa busca visa suprir demandas ambientais e socioculturais, como a proibição religiosa por parte dos muçulmanos e judeus, relacionada à gelatina de origem suína, e por parte dos hindus relacionado à de origem bovina, além da preocupações sobre a disseminação da encefalopatia espongiforme bovina (BSE). Por essas razões, as gelatinas obtidas de peixes tem ganhado um espaço no mercado, apresentando-se como uma potente alternativa. (SANTOS, 2012).

A indústria de pescado, principalmente o ramo de processamento de filé, produz uma grande quantidade de resíduos, incluindo a pele, na qual o seu alto conteúdo de colágeno revela expressivo potencial para a fabricação de gelatina. Podem ser também

obtidas principalmente de ossos, nadadeiras, escamas e bexigas natatórias (SHAKILA, 2012). Muitos estudos são conduzidos apresentando as diferenças entre gelatina extraída de peixe e as de uso convencional, extraída de mamíferos, com relação as suas características físico-químicas, composição aminoacídica e propriedades reológicas. (HAUG *et al.*, 2004; BUENO, 2008).

As gelatinas em geral são compostas por cerca de 20 aminoácidos, predominando a glicina e a prolina. O perfil de aminoácidos apresentado pela gelatina de peixe revela um menor conteúdo de prolina e hidroxiprolina, porém essa diferença é menor para gelatina de peixes de águas mornas, como a Tilápia, onde o conteúdo é de 22-25%, enquanto que para peixes de águas frias é cerca de 17%, comparadas as gelatinas de mamíferos que apresentam aproximadamente 30% desses aminoácidos (MUYONGA *et al.*, 2004). Esses aminoácidos são importantes para o processo de formação do gel, através da formação de ligações de hidrogênio, e esta diferença resulta na diminuição da temperatura de fusão e de gelificação da gelatina de peixe, conferindo propriedades diferentes da gelatina convencional (BAZIWANE & HE, 2003; HAUG *et al.*, 2004).

As propriedades reológicas da gelatina podem ser influenciadas pelo tipo de fonte, pelas condições de temperatura no processo de extração e pelo tempo de estocagem. Geralmente as gelatinas comerciais apresentam uma força de gel entre 50 a 300 g, aumentando com o tempo de maturação e diminuindo com a temperatura (GUDMUNDSSON, 2002). Esse parâmetro é utilizado para avaliar a resistência à degradação de géis, denominado valor *Bloom*, que consiste na avaliação da força do gel a partir de uma concentração de 6,67% de matéria-prima. Géis de gelatina de tilápia apresentam alta força de gel, cerca de 263 g (GROSSMAN & BERGMAN, 1992; BUENO, 2008).

Alguns estudos têm revelado aplicações para a gelatina de peixe em substituição à gelatina de mamíferos, na área de produtos alimentícios, formulação de filmes para produção de embalagens biodegradáveis (GÓMEZ-GUILÉN *et al.*, 2011, SHAKILA, 2012), produção de cápsulas (BUENO, 2008), e potencial aplicação na área farmacêutica (BAZIWANE & HE, 2003).

4.4. Isolado Proteico de Soja

A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa de extensiva produção mundial, que se destaca por suas propriedades nutricionais e funcionais. Os principais produtos proteicos derivados da soja são os concentrados e texturizados proteicos, farinhas desengorduradas e isolados proteicos, que apresentam vasta aplicação tecnológica na indústria de alimentos (MORAIS & SILVA, 1996).

O isolado proteico de soja (IPS) é um produto obtido a partir de flocos ou farinha desengordurada de soja, que sofre tratamento térmico para inativar fatores antinutricionais que interferem na qualidade nutricional de produtos formulados à base de soja (TAKEITI, 2002; RUFFI, 2011). Isolado proteico de soja apresenta em sua composição no mínimo 90% de proteína, sendo destacadas as frações glicinina e β -conglucina, que compreendem cerca de 70% das proteínas do grão, sendo potencialmente livres de lipídios e carboidratos (SINGH & MOHAMED, 2005).

O método de obtenção de isolado proteico de soja comumente utilizado inicia-se a partir de uma extração aquosa em pH variando de neutro a levemente alcalino (pH 7-10), visando a separação e remoção da fração insolúvel (polissacarídeos insolúveis e proteína residual) através de centrifugação. O extrato obtido é acidificado para pH 4,5, valor correspondente ao ponto isoelétrico, resultando na precipitação das proteínas. O precipitado proteico é separado por decantação mecânica, lavado e neutralizado, seguido da etapa de secagem ou desidratação (LIU, 1999).

O isolado proteico de soja é caracterizado pela presença de proteínas globulares, representadas pelas frações de globulina 11S (glicina) e 7S (β -conglucina). A fração 11S é composta principalmente pela glicina, um hexâmero de monômeros composto por polipeptídeos ácidos (40 kDa) e básicos (20 kDa) ligados por ponte dissulfeto (RENKEMA *et al.*, 2002). A β -conglucina é uma proteína glicosilada trimérica, contendo três subunidades diferentes, a α , α' e β , com massa molar de 62, 65 e 47 kDa , respectivamente. A funcionalidade da estrutura da glicina e sua solubilidade são alteradas pelo pH e pela força iônica (LAKEMOND *et al.*, 2000). As proteínas da soja revelam uma

elevada solubilidade em condições alcalinas (pH >7), porém há uma redução da solubilidade em pH próximo ao ponto isoelétrico (pH 4,5) (RENKEMA *et al*, 2002).

Os isolados proteicos são extensivamente utilizados para a formulação de produtos alimentícios mediante as suas propriedades nutricionais e funcionais, como suas propriedades emulsificante e estabilizante, capacidade de hidratação, solubilização e gelificação, além de apresentar sabor neutro (MORAIS & SILVA, 1996; MARTINS & NETTO, 2006). A propriedade tecnológica do isolado proteico dependerá das condições de obtenção, além da influência do grau de maturação do grão de soja e condições de armazenagem, interferindo diretamente nas propriedades emulsificante e na força do gel obtido. (YAO *et al.*, 1990).

As principais aplicações do isolado proteico de soja são para a formulação de produtos de panificação e confeitaria, produtos cárneos emulsionados e embutidos, e formulações de produtos lácteos como iogurtes e substitutivos de lácteos e farinhas (MORAIS & SILVA, 1996). Porém, ainda são escassos os estudos visando à aplicação do isolado proteico como matriz em produtos microencapsulados, apesar de ser uma fonte barata e renovável, além de sua capacidade emulsificante, formadora de filme, e características nutricionais benéficas (CHEN *et al.*,2006; ORTIZ *et al.*, 2009).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMICI, E.; TETRADIS-MERIS, G.; TORRES, P.C.; JOUSSE, F. Alginate gelation in microfluidic channels. **Food Hydrocolloids**, v.22,p. 97-104, 2008.

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.

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

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

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

BAZIWANE, D.; HE, O. Gelatin: The Paramount Food Additive . **Food Reviews International**, vol 19, nº 4, p. 423–435, 2003.

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

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

BERTAN, L. C. Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e complexos à base de gelatina, ácidos graxos e breu branco. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 157p., 2003.

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

BRANDÃO, E. M., ANDRADE, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 38-44, Jul/Set, 1999

BUENO, C. M. Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 133p., 2008.

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

CHANDRA, A.; NAIR, M. G.; IEZZONI, A.F. Isolation and stabilization of anthocyanins from tar cherries (*Prunus cerasus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p. 1062-1062, 1993.

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

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.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology** , v. 23, n. 7, p. 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**, v.25, p.1606-1617, 2011.

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

FANG, Y., AL-ASSAF, S., PHILLIPS, G. O., NISHINARI, K., FUNAMI, T., WILLIAMS, P. A. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. **Carbohydrate Polymers**, 72, p. 334–341, 2008.

FENNEMA, O. R. Food Chemistry. FENNEMA, O. R. ed Marcel Dekker Inc, New York, 1996.

FRAEYE, I., COLLE, I., VANDEVENNE, E., DUVETTER, T., BUGGENHOUT, S. V., MOLDENAERS, P., LOEY, A. V., HENDRICKX, M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11, p. 401–409, 2010.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coating and films based on proteins, in: **Edible Coatings and to Improve Food Quality**, KROCHTA J. M., BALDWIN E. A. & Nisperos-Carriedo M.O., Technomic Publishing Company, Ch 9, p. 201-277, 1994.

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

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011

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

GROSSMAN, S.; & BERGMAN, M. Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent 5,093,472 (1992).

GUDMUNDSSON M.; Rheological properties of fish gelatins. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2172-2176, 2002.

HAUG, I. J., DRAGET, K. I., & SMIDSROD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, 18, 203–213, 2004.

HOEFLER, A. C. **Hydrocolloids**. Eagen Press, Minnesota, 2004.

IWAMOTO, S.; NAKAGAWA, K.; SUGIURA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of gelatin microbeads with a narrow size distribution using microchannel emulsification, **AAPS PharmSciTech**, v. 3, p.72–76, 2002.

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

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

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D.J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, p. 374-397, 2010 (a).

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

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v.23 , p.563–576, 2009.

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

LAKEMOND, C. M. M.; DE JOUNG, H. H. J.; HESSING, M.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.1985–1990, 2000.

LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman and Hall, 1999, 532 p.

LIU, S.; CAO, Y. L.; GHOSH, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Intermolecular Interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum Arabic. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 552-556, 2010.

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

MARTINS, V.B.; NETTO, F.M. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. **Food Research International**, v.39, p. 145-153. 2006.

MATALANIS, A.; JONES, O.G.; MCCLEMENTS, D.J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.8, p.1865-1880, 2011.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. Revista **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, supl., p.102-105, 2003.

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

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.259, 1996.

MUKAI-CORRÊA. R. **Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização ionica para alimentação de larvas de peixe**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003, 173p.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM, I.D., GROSSO, C.R.F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. **Current Drug Delivery**, v.1, n.3, p. 265-273, 2004.

MUYONGA, J. H., COLE, C. G. B., & DUODU, K. G. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 581–592, 2004.

NETO, C.G.T.; DANTAS, T.N.C.; FONSECA, J.L.C.; PEREIRA, M.R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly (ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2630–2636, 2005.

ORTIZ, S.E.M.; MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, M.A.; SANTANA, A.S.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009.

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

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

PEDROZA-ISLAS, R.; ALVARES-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation – II. Dissolution and floatability kinetics as selection criteria. **Food Research International**, v. 33, p. 119-124, 2000.

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

PIMENTEL, L.F; JUNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.F; SANTOS-MAGALHÃES, N.C. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, vol.43 n.4 , 2007.

POPPE, J. Gelatin, In: Thickening and gelling agents for food, New York, Ed. Incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 171-180, 1997.

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

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.

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

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

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6064– 6071, 2002.

RIGHETTO, A.M.; NETTO, F. M. Vitamin C stability in encapsuted green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.8, p.1202-1208, 2006.

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

ROCHA, W.S. Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2001, 104p.

RUFFI, C.G. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de biscoito tipo cracker com incremento no teor de proteínas e de fibras pela incorporação de derivados de soja. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SANTOS, T. M. Influência de nanocristais de celulose sobre as propriedades de filmes de gelatina de resíduos de tilápia. Dissertação. Universidade Federal do Ceará, 96p.,2012.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P., GROSSO C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Rev Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 3(16), p. 26-30, 2000.

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

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESPOND, S.; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β - lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. **Food Hydrocolloids**, v.14, p. 403-413, 2000.

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

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

SHAKILA, R. J.; JEEVITHAN, E.; VARATHARAJAKUMAR, A.; JEYASEKARAN, G.; SUKUMAR, D. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 30-36, 2012.

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

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1 São Paulo, 2003.

SIMSEK-EGE, FA; GILLIAN M. BOND, GM; 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.

SINGH, M.; MOHAMED, A. **Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies**. Food Science and Technology, 2005.

TAKEITI, C.Y. **Influência do Tratamento Térmico nas Propriedades Funcionais de Isolados Proteicos de Soja e de seus Hidrolisados Enzimáticos**, 2002, 102 p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

THIES, C. **Microencapsulation: What it is and Purpose**. VISTRUP, P. ed Leatherhead Publishing, England, p. 1-53, 2001.

THU, B.; SMIDSRØD, P.; G.; SKJAK-BRÆK, G. Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. **Immobilized Cells: Basics and Applications, 1996**.

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

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

TREVISAN, H. C. **Imobilização de glicose oxidase em suportes sílicos**. 1990. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

TRINDADE, C. S. F.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. **Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

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

WIELAND-BERGHÄUSEN, S.; SCHÖTE U.; FREY, M.; SCHMIDT F. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCL. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1-3, p. 35-43, 2002.

XING, F.; CHENG, G.; YI, K. MA, L. Nanoencapsulaion of capsaicin by complex coaservation of gelatin, acacia and tannis. **Journal of Applied Polimer Science**, p.2225-2229, 2005.

YAO, J.J.; TANTEERATARM, K.; WEI, S. Effects of Maturation and Storage on Solubility, Emulsion Stability and Gelation Properties of Isolated Soy Proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 67, n. 12, 1990.

CAPÍTULO 2

MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA RECOBERTAS COM GELATINA DE PEIXE E ISOLADO PROTEICO DE SOJA: ESTUDO DA ADSORÇÃO PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

CAPÍTULO 2 - MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA RECOBERTAS COM GELATINA DE PEIXE E ISOLADO PROTEICO DE SOJA: ESTUDO DA ADSORÇÃO PROTEICA E CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

RESUMO

Partículas podem ser formadas a partir de misturas entre polissacarídeos e proteínas, baseando-se nas suas características físico-químicas e na interação entre esses biopolímeros. Os complexos insolúveis formados a partir dessa interação promovem propriedades funcionais potencialmente melhores do que da proteína e dos polissacarídeos utilizados individualmente. A formação de complexos estáveis entre mistura de polissacarídeos aniônicos e proteínas é tipicamente conduzida por interações eletrostáticas, que dependem de fatores como o valor de pH e da força iônica. Esse estudo teve como objetivo produzir partículas de pectina e alginato, com recobrimento por interação eletrostática utilizando o isolado proteico de soja (IPS), gelatina de pele de tilápia (GPT) ou uma mistura de gelatina e isolado proteico de soja (1:1). Foram analisadas a influência do pH e da proporção de polissacarídeo e de proteína sobre a carga elétrica livre no sistema, de modo a determinar as condições que otimizassem a interação entre os biopolímeros em sistemas diluídos. Após o estabelecimento dos parâmetros de interação eletrostática, foram produzidas partículas de pectina e alginato recobertas com GPT, IPS e IPS:GPT, onde foram analisados o teor de proteína adsorvido, a umidade, o tamanho médio e a morfologia das partículas. Os estudos do potencial zeta revelaram que ocorrem interações eletrostáticas entre a mistura de pectina e alginato com as proteínas em pH 4 quando utilizada a solução de GPT e em pH 3 quando utilizado o IPS ou a mistura das duas proteínas. A partir dos ensaios diluídos foram estabelecidas as seguintes proporções de polissacarídeo e proteína: 1:2 em pH 4 para recobrimento com gelatina de pele de tilápia, e 1:0,75 em pH 3 para interação com o isolado proteico de soja e para a mistura das duas proteínas. Utilizando essas proporções foi possível obter partículas com alto teor proteico. Foram testados quatro

níveis de proteína em solução (1, 2, 4 e 8 %) para recobrimento das partículas de pectina e alginato. As adsorções proteicas aumentaram com o acréscimo de proteína em solução. Maiores adsorções proteicas nas partículas foram obtidas quando se utilizou a concentração de 8% de proteína em solução, para o recobrimento por interação eletrostática, resultando no percentual de proteína adsorvida de 61,87%, 47,61% e 52,06% quando utilizadas as soluções de GPT, IPS e IPS:GPT, respectivamente. Com o aumento da adsorção proteica, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos teores de umidade das partículas, para todas as proteínas estudadas. As partículas de pectina e alginato apresentaram formato esférico. O recobrimento da partícula com proteína não alterou morfologicamente as partículas, porém foi verificada a presença de rugosidades na superfície das partículas liofilizadas, decorrente da alta deposição proteica sobre a partícula. O processo de secagem das partículas não alterou seu formato, revelando a resistência destas ao processo de secagem.

ABSTRACT

Particles may be formed from mixtures of polysaccharides and proteins, based on their physico-chemical characteristics and the interaction between these biopolymers. The insoluble complex formed from this interaction potentially promote better functional properties than the individual protein and polysaccharides used. The formation of stable complexes between mixture of anionic polysaccharides and proteins is typically driven by electrostatic interactions, which depend on factors such as pH and ionic strength. This study aimed to produce particles of pectin and alginate coating with electrostatic interaction by using isolated soy protein (IPS), tilapia skin gelatin (GPT) or a mixture of gelatin and soy protein isolate (1:1). The influence of pH and the proportion of polysaccharide and protein on the free electric charge in the system were analyzed in order to determine the conditions that optimized the interaction between biopolymers in dilute systems. After setting the parameters of electrostatic interaction, particles of pectin and alginate coated with GPT, IPS and IPS: GPT were produced, where the protein content of adsorbed moisture, the average

size and morphology of the particles were analyzed. Based on the zeta potential studies system, from the diluted test the following proportions of polysaccharide and protein were established: 1:2 at pH 4 for coating with tilapia skin gelatin, and 1:0.75 at pH 3 for interaction with the soy protein isolate and the mixture of the two proteins. Using these proportions was possible to obtain particles with high protein content. Four levels of protein in solution were tested (1, 2, 4 and 8%) for coating the particles of pectin and alginate. Protein adsorption increased with increasing protein in solution. Higher protein adsorption on the particles used were obtained when the concentration of 8% of protein in solution for coating by electrostatic interaction, resulting in the percentage of protein adsorbed 61.87%, 47.61% and 52.06% when solutions of GPT, IPS and IPS: GPT, were used respectively. With the increase in protein adsorption, there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the moisture content in all the proteins studied. The particles of pectin and alginate exhibited spherical shape. The protein coating did not change the morphology of the particles, but it was verified the presence of roughness on the surface of the lyophilized particles, due to the high protein deposition on the particle. The drying process of the particles did not change its shape.

1. INTRODUÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como um processo em que pequenas partículas ou gotículas são cercadas por um revestimento ou incorporadas em uma matriz homogênea ou heterogênea, formando pequenas cápsulas com diferentes propriedades funcionais (BANSODE, 2010).

Através da microencapsulação é possível alterar as propriedades coloidais e de superfície dos materiais, além de poder proporcionar uma barreira física entre o núcleo e outros componentes do produto dos fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perdas nutricionais e organolépticas, separando compostos reativos ou

incompatíveis, modulando a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo, melhorar a solubilidade do núcleo e aumentando a incorporação em sistemas secos (AZEREDO, 2005, GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Para sua produção existe um grande interesse no uso de biopolímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos, uma vez que são materiais biocompatíveis e podem ser inseridos em produtos destinados para o consumo humano (SCHMITT *et al.*, 2000; DEVOS *et al.*, 2010).

Os agentes encapsulantes comumente utilizados compreendem a diversos tipos de materiais, como por exemplo, polissacarídeos: goma arábica, alginato, amidos, pectina, carboximetilcelulose; proteínas: albumina, caseína, isolado proteico de soro de leite e gelatina; e lipídeos: ceras, mono e diglicerídeos, ácido esteárico, óleos e gorduras hidrogenadas (JACKSON & LEE, 1991; SHAHIDI & HAN, 1993). Os polissacarídeos pectina e o alginato atuam como encapsulantes mediante a propriedade de formar ligações cruzadas com os íons bivalentes, resultando em hidrogéis, permitindo um processo de encapsulação livre de solvente orgânico e biodegradável sob condições fisiológicas normais (GOMBOTZ & WEE, 1998).

O principal tipo de processo de encapsulação usado para obtenção de hidrogéis é através da técnica de gelificação iônica, que consiste na formação de um gel através da ligação cruzada formada entre uma solução polimérica carregada negativamente e íons bivalentes carregados positivamente, possibilitando a formação de uma malha tridimensional (GOUIN, 2004; FAN *et al.*, 2012).

As partículas de gelificação iônica produzidas com polissacarídeos formam uma matriz de gel porosa, sendo essa porosidade influenciada por fatores como o pH e concentração do hidrocolóide e do cátion, alterando dessa forma as propriedades difusivas da cápsula, determinando assim a quantidade de material de recheio aprisionado e o tempo de liberação do mesmo (GOUIN, 2004; MESTDAGH & AXELOS, 1998; SEZER, 1999). Devido a porosidade das partículas de gelificação iônica, tem sido proposta a formação de

um complexo sobre a superfície da partícula através de polycations, baseado na interação entre dois polímeros de cargas opostas, resultando em melhores propriedades de barreira da partícula (THU *et al.*, 1996).

Estudos revelam um progresso considerável na compreensão do fenômeno de interação entre biopolímeros em sistemas aquosos, como as interações entre proteínas e polissacarídeos, uma vez que estas podem afetar as propriedades macroscópicas de produtos alimentícios, como a textura, viscosidade e estabilidade dos sistemas (TOLSTOGUZOV, 1991; TUINIER *et al.*, 2002). Esse tipo de mudança pode ocorrer em três diferentes maneiras: pela separação de fases, por co-solubilidade ou pela complexação (KAZMIERSKI *et al.*, 2003).

A formação de complexos através da mistura de polissacarídeos aniônicos e proteínas é tipicamente conduzida por interações eletrostáticas, que são dependentes de parâmetros como o valor de pH e da força iônica (SYRBE *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 2000). Os complexos e os vários tipos de partículas formados a partir dessa interação promovem propriedades funcionais potencialmente melhores do que as da proteína e dos polissacarídeos utilizados individualmente (SCHMITT *et al.*, 2000). O estudo das interações entre esses tipos de biopolímeros é de grande relevância para a microencapsulação, principalmente na área de produtos alimentícios e farmacêuticos (SPERBER *et al.*, 2009).

Interações físicas e químicas podem ocorrer entre proteínas e polissacarídeos, produzindo partículas com diferentes composições e funcionalidades, baseando-se no estudo das características físico-químicas de cada material e da mistura entre eles formada, assim como na interferência da concentração e proporção utilizadas, e no valor de pH que possibilite a formação de um maior número de cargas opostas, otimizando assim a formação dos complexos eletrostáticos (JONES & MCCLEMENTS, 2010).

Nesse segmento, alguns tipos de proteínas vêm sendo estudadas para aplicação por interação eletrostática em micropartículas, como as proteínas do soro do leite (GEBARA

et al., 2013; SCHMITT *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2012) e a gelatina (LI *et al.*, 2009; QV *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2012). Porém, são escassos os estudos aplicando o isolado proteico de soja e gelatina de peixe como polímeros para a interação destes com partículas porosas de gelificação iônica. Assim, torna-se importante compreender como as características desses biopolímeros podem influenciar na formação, estrutura e propriedades dos complexos formados em partículas compostas de alginato e pectina.

O objetivo deste estudo foi produzir partículas de pectina de baixo teor de metoxilação amidada e alginato de sódio, com posterior recobrimento com isolado proteico de soja (IPS), gelatina de pele de tilápia (GPT) ou uma mistura de gelatina e isolado proteico de soja (1:1). Foram analisadas a influência do pH e da proporção de polissacarídeo e proteína sobre a carga elétrica livre no sistema, de modo a determinar as condições que otimizassem a interação entre os biopolímeros em sistemas diluídos, podendo essas condições serem reportadas para sistemas concentrados, viabilizando o recobrimento das partículas. As micropartículas foram preparadas pelo processo de gelificação iônica associado com recobrimento, por interação eletrostática, com diferentes concentrações proteicas em solução. A adsorção de proteína sobre a micropartícula em sistemas diluídos e concentrados foi avaliada, assim como sua influência no tamanho médio e na morfologia das partículas úmidas e secas dos sistemas concentrados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Os materiais utilizados para a elaboração das micropartículas foram os seguintes: pectina de baixo teor de metoxilação amidada GENU[®] (CP Kelco, Limeira-SP, Brasil, lote 8445875); alginato de sódio (Manugel DMB, lote G3512301); isolado proteico de soja (New Max Industrial, Americana-SP, Lote 051986); gelatina da pele de tilápia, cloreto de

cálcio anidro P.A. (Dinâmica, lote 36308, P.M. 110,99), óleo de girassol comercial, ácido clorídrico P.A (Merck), hidróxido de sódio a 50% (nuclear, P.M. 40, Diadema-SP), ácido sulfúrico (Synth, P.M. 98,08, Diadema, São Paulo, Brasil); kit para dosagem de proteína - ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich[®]); e os demais reagentes utilizados foram de grau analíticos.

2.2. Métodos

2.2.1 Composição centesimal

Os polímeros utilizados: alginato, pectina, gelatina de pele de tilápia (GPT) e isolado proteico de soja (IPS), foram caracterizados, em triplicata, em relação ao conteúdo total de proteína, umidade e cinzas, de acordo com AOAC (2006), e lipídeos, segundo Bligh e Dyer (1959). Para a quantificação de proteína, foi usada a metodologia de Kjeldahl, utilizando-se os fatores de correção de 5,55 e 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, para a GPT e IPS, respectivamente.

2.2.2. Obtenção da fração solúvel do isolado proteico de soja e da gelatina de pele de tilápia.

Mediante aos ensaios preliminares foi observado que o isolado proteico de soja apresentava uma solubilidade parcial em água. Para a realização dos experimentos foi obtido uma fração solúvel em água, visando uma melhor compreensão do efeito deste sobre a adsorção proteica em partículas de gelificação iônica. O isolado proteico de soja foi dissolvido em água deionizada, com o pH ajustado para 3, permanecendo por 6 horas sob agitação. A solução foi centrifugada a 35735G por 20 minutos (centrífuga modelo RC-5C Sorvall Instruments, rotor GSA, Wilmington, USA). O sobrenadante, constituído da fração

solúvel, foi então liofilizado (liofilizador Edwards Pirani 501), utilizando os seguintes parâmetros de secagem: temperatura inicial: - 40°C, temperatura final: 25°C/2 horas, tempo total do ciclo de secagem: 48 horas e pressão: 0,1 mmHg. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração. Esse material foi utilizado para todos os ensaios apresentados nesse trabalho.

A gelatina de pele de tilápia utilizada nos ensaios, foi produzida anteriormente no laboratório, segundo metodologia descrita na dissertação de BUENO (2008), e foi utilizada sem novas modificações.

2.2.3. Determinação da carga elétrica

As cargas das soluções do isolado proteico de soja (IPS), da gelatina de pele de tilápia (GPT) e da mistura binária de pectina e alginato (PEC:ALG, 1:1), foram determinadas utilizando o analisador de potencial zeta Zetasizer, modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.), diluindo-se as soluções (0,1% m/m), sendo os resultados expressos como média de 10 leituras em mV. A leitura foi realizada variando a faixa de pH das soluções de 3 a 7, com ajuste do pH através de titulador automático utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio a 0,1 N.

2.2.4. Produção de coacervados

Visando uma maior interação eletroestática entre os biopolímeros e a formação de coacervados insolúveis, foram testadas diferentes proporções entre polissacarídeos e as proteínas. A solução de polissacarídeo foi constituída de uma mistura de pectina e alginato (PEC:ALG), na proporção 1:1 (m/m), enquanto que a solução de proteína utilizada foi constituída de isolado proteico de soja (fração solúvel), ou gelatina de pele de tilápia, ou uma mistura das duas proteínas (IPS:GPT) na proporção 1:1 (m/m). Para otimizar o processo de interação eletroestática, diferentes proporções volumétricas (pectina e alginato: proteína, v/v) foram utilizadas, variando de 1:0 até 1:10 aumentando a quantidade de proteína em relação a mistura de polissacarídeos. Para uma melhor visualização das

mudanças ocorridas, antes das análises, imagens dos tubos contendo as diferentes relações foram captadas através de câmera fotográfica. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.4.1. Produção de coacervados pela mistura de solução de polissacarídeo e soluções de proteínas.

Para esta análise, prepararam-se soluções contendo a mistura de alginato e pectina 0,1% (m/m) e soluções de IPS, GPT e a mistura dessas proteínas a uma concentração 0,1% (m/m) de proteína. As soluções permaneceram em agitação magnética constante para completa dissolução. Após a dissolução, a solução de GPT teve seu pH ajustado para 4, enquanto que as soluções de IPS e a mistura (GPT:IPS) foram ajustadas para pH 3, utilizando ácido clorídrico 0,1 N e hidróxido de sódio 0,2 N. Em seguida, foram realizadas as misturas entre os biopolímeros, colocando primeiro a solução de polissacarídeo e depois a solução de proteína, simulando as condições de interação eletroestática em sistemas concentrados, utilizando diferentes proporções. Foram preparadas misturas volumétricas entre PEC:ALG_{Sol} e as soluções de proteína, utilizando-se as seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:4,5, 1:5, 1:5,5, 1:6, 1:8 e 1:10. Após a preparação, as misturas permaneceram em repouso por 12 horas para posterior determinação da carga elétrica e do tamanho médio dos coacervados conforme a metodologia apresentada no item 2.2.3 e 2.2.5, respectivamente. Cada tubo de ensaio foi agitado manualmente antes de cada análise.

2.2.4.2. Produção de coacervados pela mistura de emulsões de polissacarídeo e soluções de proteínas

A emulsão foi formulada a partir de solução PEC:ALG adicionada de óleo de girassol, ambos a 2% (m/m). A solução foi emulsionada em homogeneizador ultra turrax (IKA modelo T18) por 3 minutos a 14000 rpm. Após a homogeneização, a emulsão foi diluída para concentração final de 0,1% (m/m) e novamente homogeneizada por mais 2 minutos a 14000 rpm. Foram preparadas misturas volumétricas PEC:ALG_{Emul} : GPT_{Sol} e

PEC:ALG_{Emul}: IPS_{Sol} utilizando as seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:4,5, 1:5, 1:5,5, 1:6, 1:8 e 1:10, enquanto que para a mistura PEC:ALG_{Emul}: IPS:GPT_{Sol} foram utilizadas as proporções: 1:0,25, 1:0,5, 1:0,75, 1:1, 1:1,25, 1:1,50, 1:1,75, 1:2, 1:3 e 1:4, com ajuste de pH conforme descrito no item 2.2.4.1. Após 12 horas de repouso, foram realizadas a determinação da carga disponível e avaliação do tamanho médio dos coacervados produzidos conforme a metodologia descrita nos itens 2.2.3 e 2.2.5, respectivamente.

2.2.4.3 Produção de coacervados entre partículas de gelificação iônica e soluções de proteína.

Partículas de gelificação iônica foram produzidas conforme descrito no item 2.2.6.1. Soluções de IPS, GPT e IPS:GPT a uma concentração 0,1% (m/m) de proteína com pH ajustado, foram misturadas com suspensões de partículas de gelificação iônica na concentração de 0,1% (m/m). Foram preparadas misturas volumétricas entre PEC:ALG_{Part}: GPT_{Sol} utilizando-se as relações seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:4,5, 1:5, 1:5,5, 1:6, 1:8 e 1:10, enquanto que para a mistura PEC:ALG_{Part}: IPS_{Sol} e PEC:ALG_{Part}: IPS:GPT_{Sol} foram utilizadas as proporções: 1:0,25, 1:0,5, 1:0,75, 1:1, 1:1,25, 1:1,50, 1:1,75, 1:2, 1:3 e 1:4. Os sistemas foram mantidos em agitação durante 1 hora, em homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) e após este tempo as misturas permaneceram em repouso por 12 horas para posterior determinação do tamanho médio dos coacervados formados conforme descrito no item 2.2.5.

Mediante a impossibilidade de se obter uma medida eletroforética das amostras de coacervados produzidos, devido ao grande tamanho das partículas e sua rápida precipitação, em cada relação estudada foi avaliado o teor de proteína não adsorvida, ou seja, a quantidade de proteína que não interagiu com as micropartículas. Os coacervados foram centrifugados a 35735 G por 10 minutos em centrífuga sorvall RC5C (rotor SM-24, Sorvall Instruments. Dupont Company, Newton, CT).

Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e o teor de proteína não adsorvido foi analisado pelo método do ácido bicinconínico (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* –

BCA, Sigma), adaptado à microplaca de 96 poços, utilizando BSA (*bovine serum albumin*) como padrão. O protocolo realizado consiste em colocar 25µl da amostra (sobrenadante) e adicionar 200µl de uma solução de trabalho composta por 50 partes de solução BCA A e 1 parte de solução BCA B. A placa foi incubada durante 30 minutos a 37°C, após foi realizada a leitura em 562 nm de absorbância (SMITH *et al.*,1985). Esses resultados foram utilizados para o cálculo indireto da quantidade de proteína adsorvida na partícula, a partir da diferença entre a proteína do sobrenadante (não adsorvida) e a proteína total do sistema.

2.2.5. Tamanho médio e distribuição de tamanho (D 0,5)

O tamanho médio e a distribuição de tamanho dos coacervados formados foram medidos no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instrumentos, Malvern, 55 Worcestershire, U.K.), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Germany). Foi utilizada água deionizada com pH ajustado como material dispersante para realizar a leitura das amostras. A quantidade de amostra adicionada foi de acordo com a obscuração mínima exigida pelo equipamento. O instrumento analisa o tamanho da amostra através pelo método de difração de laser, que tem como princípio o espalhamento de luz ($\lambda = 632,8$ nm), relacionando o tamanho da partícula com a quantidade de luz espalhada.

2.2.6 Produção de micropartículas por gelificação iônica e avaliação da adsorção de proteína por interação eletroestática

Os estudos realizados nos itens 2.2.4.1, 2.2.4.2 e 2.2.4.3 foram empregados para determinar as condições de formação de partículas, bem como o seu recobrimento. As partículas foram produzidas por gelificação iônica, utilizando como materiais de parede a mistura binária de pectina com alginato (1:1 m/m), e posterior revestimento por interação eletrostática utilizando diferentes concentrações de GPT, IPS e mistura GPT: IPS (1:1 m/m).

2.2.6.1. Produção de micropartículas por gelificação iônica

Uma solução aquosa contendo a mistura pectina e alginato (2% m/m), adicionadas de óleo de girassol (2% m/m) foi emulsificada por 3 minutos a 14.000 rpm (IKA, Works do Brasil, RJ) e atomizada sobre uma solução de cloreto de cálcio (2% m/m) mantida em agitação constante. A emulsão foi atomizada através de um bico atomizador duplo fluido de 1 mm de diâmetro, com altura de 12 cm entre o bico e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 0,125 kgf/cm² e uma bomba peristáltica (velocidade de 555 mL/hora) que conduziu a emulsão até o bico, conforme otimizado anteriormente por Mukai-Corrêa (2003). Devido a sua viscosidade, a emulsão foi mantida sob agitação e temperatura de 40°C. Após a atomização, as micropartículas foram mantidas por mais 30 minutos em banho iônico (cloreto de cálcio) para cura das mesmas. Posteriormente, foram escorridas em peneiras de malha de aço, diâmetro de 125 µm, imersas durante 5 minutos em água deionizada com pH 3 ou pH 4, visando a remoção do cloreto de cálcio não ligado. A eficiência de encapsulação em relação ao óleo foi calculada pela determinação do óleo presente na partícula em relação ao óleo inicial utilizado para produzir as emulsões, ambos expressos em relação ao total de sólidos presentes nos dois sistemas.

2.2.6.2 Recobrimento de micropartículas com proteínas por interação eletrostática

Após o processo de gelificação iônica, foi realizada a adsorção proteica na superfície das micropartículas, utilizando soluções de GPT, IPS, e mistura GPT: IPS (1:1), nas concentrações 1%, 2%, 4% e 8% (m/m) de proteína. A concentração e o pH utilizados, foram definidos após a realização dos testes de relações de misturas e potencial zeta, descritos anteriormente nos itens 2.2.4.1., 2.2.4.2 e 2.2.4.3. As soluções contendo diferentes concentrações de proteína e partículas de gelificação iônica foram mantidas sob agitação magnética, durante 30 minutos, para que a interação eletrostática ocorresse. No caso da gelatina de pele de tilápia, esse processo foi mantido a temperatura de 38°C ±2,0, enquanto

que os demais foram feitos em temperatura ambiente. Após este período as partículas foram escorridas em peneiras de malha de aço, diâmetro de 125 μm , lavadas novamente com água deionizada com pH ajustado até que todo o conteúdo de proteína não adsorvido sobre a superfície das micropartículas fosse removido.

2.2.7 Secagem das micropartículas

Parte das micropartículas produzidas foi seca em liofilizador Edwards Pirani 501, conforme condições estabelecidas por Mukai-Corrêa (2003). Foram utilizados os seguintes parâmetros de secagem: temperatura inicial: -40°C , temperatura final: $25^{\circ}\text{C}/2$ horas, tempo total do ciclo de secagem: 48 horas e pressão: 0,1 mmHg. O material seco foi acondicionado em frascos com tampa e mantidos em refrigeração.

2.2.8. Caracterização das micropartículas

2.2.8.1. Composição centesimal

As micropartículas de gelificação iônica produzidas foram caracterizadas, em triplicata, em relação ao teor lipídico segundo metodologia Bligh & Dyer (1959), ao conteúdo de nitrogênio total e umidade, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006). A umidade das partículas de gelificação e com interação eletroestática foram obtidas por secagem em estufa a temperatura de 105°C . O teor de proteína adsorvido pela partícula foi quantificado através do conteúdo de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de correção 5,55 para conversão de nitrogênio para partículas recobertas com GPT, 6,25 para o isolado proteico de soja e 5,9 para a mistura de proteínas (IPS:GPT). O teor de nitrogênio presente na partícula de gelificação

contendo as misturas de polissacarídeos foi determinada e utilizada (descontada) para os cálculos de adsorção proteica.

2.2.8.2. Tamanho médio das micropartículas (D 0.5)

O tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas úmidas (recém-processadas), foram medidos no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Germany), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Germany). O equipamento determina o tamanho das partículas por difração a laser, utilizando água deionizada como material dispersante para fazer a leitura das amostras. As micropartículas úmidas foram suspensas em água deionizada com pH de 3,0 ou 4,0, conforme o pH utilizado na interação eletrostática.

2.2.8.3. Morfologia e microestrutura

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada por microscopia ótica em microscópio óptico (JENAVAL, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 x, e optovar de 1 e 1,25 x. A captação das imagens foi realizada utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

As micropartículas liofilizadas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo JMS – 5800 LV (Jeol - Tóquio, Japão), com uma aceleração de voltagem de 20kV. As amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (180 segundos e corrente de 40mA), por meio de um evaporador Baltzer SCD50 (Baltec, Liechtensten).

2.2.9. Análise estatística

Os ensaios foram realizados produzindo três lotes independentes, com todas as determinações realizadas em triplicata. Para determinar diferenças significativas entre os valores médios obtidos para a quantidade de proteína adsorvida sobre as partículas, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey utilizando um intervalo de 95% de confiança ($p < 0,05$) para cada conjunto de experimentos, através do programa estatístico SAS[®] versão 9.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal dos biopolímeros

Os resultados da composição centesimal dos biopolímeros utilizados na produção das micropartículas estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal (%) em base seca dos produtos utilizados para elaboração das micropartículas.

| Biopolímeros | Composição centesimal | | | |
|--------------|-----------------------|--------------|-------------|-------------|
| | Umidade | Proteína | Lipídeo | Cinzas |
| ALG | 12,51 ±0,07 | ND | ND | 23,69±2,63 |
| PEC | 13,00 ± 0,10 | 1,02 ± 0,07* | ND | 3,16 ± 0,02 |
| GPT | 9,56 ± 0,17 | 88,95±0,32 | 0,15 ± 0,04 | 1,75 ±0,03 |
| IPS | 5,73±0,69 | 91,64±1,93 | 0,30±0,01 | 5,68±0,02 |

ALG=alginate; PEC= pectina ; IPS= isolado proteico de soja; GPT= gelatina de pele de tilápia.

ND= Não determinado

* Valor de nitrogênio não proteico.

Como as matérias-primas utilizadas não são totalmente constituídas por proteína, a determinação do teor de proteína torna-se necessária para adequação do valor proteico das soluções utilizadas nos ensaios. O valor encontrado para o isolado proteico de soja está em conformidade com o estabelecido para esse tipo de produto, apresentando um valor acima de 90% (SINGH & MOHAMED, 2005). Seguindo o mesmo perfil, a gelatina de pele de tilápia também apresentou um alto conteúdo proteico, similar ao encontrado por Songchotikunpan *et al.* (2008), que obteve uma concentração proteica de 89,4%. O teor de nitrogênio não proteico da pectina foi utilizado para a caracterização das microcápsulas, sendo descontado no cálculo da quantidade de proteína presente na micropartícula formada.

O elevado conteúdo de cinzas obtido na análise do alginato é justificado por este ser um sal derivado do ácido algínico, apresentando um valor de umidade de acordo com o sugerido pela FAO (Food and Agriculture Organization), encontrando-se na faixa de 10% - 13% de umidade.

3.2 Determinação da carga elétrica

O pH do meio é capaz de determinar a densidade de carga elétrica de compostos anfóteros e pode até induzir transições estruturais de proteínas e polissacarídeos (TURGEON *et al.*, 2007). Dessa forma a determinação do comportamento eletroestático das soluções de biopolímeros é importante para identificar as condições experimentais onde a formação de complexos eletrostáticos entre diferentes tipos de materiais possa ser otimizada. Portanto, foi realizado o estudo da carga elétrica disponível das soluções de biopolímeros, submetidos a diferentes valores de pH (figura 1).

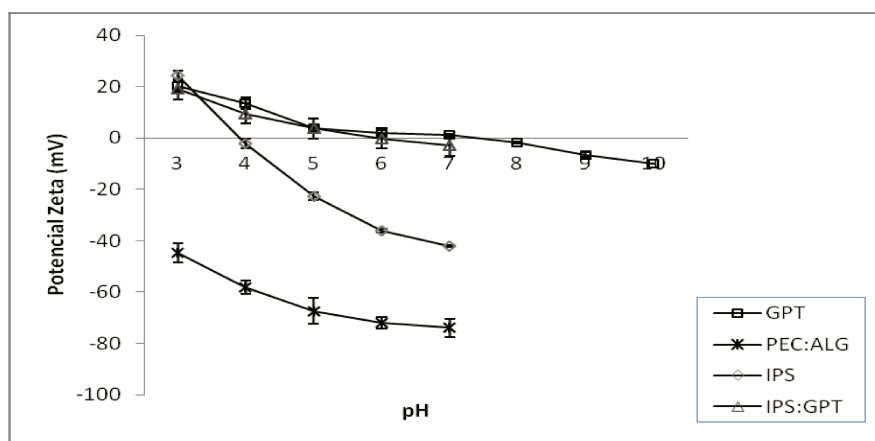


Figura 1. Potencial zeta das soluções de PEC:ALG, GPT, IPS e IPS:GPT na concentração de 0,1% (m/m) em função do pH.

A solução contendo a mistura de polissacarídeos (PEC:ALG) a 0,1% (m/m) apresentou uma elevação da eletronegatividade conforme o aumento do pH, tendo uma variação da carga líquida de $-44,73 \pm 3,80$ mV (pH 3) a $-73,93 \pm 3,52$ mV (pH 7). Esse aumento da carga elétrica negativa é decorrente dos grupamentos carboxila carregados negativamente em solução com pH acima do pKa dos polissacarídeos, sendo a eletronegatividade aumentada conforme ocorre o aumento do pH (HARNASILAWAT *et al.*, 2006). No estudo o aumento adicional na eletronegatividade pode ser decorrente do sinergismo alcançado pela mistura entre a pectina e o alginato.

As soluções de proteínas apresentaram cargas positivas aumentadas à medida que o pH encontrava-se abaixo do ponto isoelétrico (pI), variando de 20,03 a -10,04 mV na varredura de pH de 3 a 10 para GPT, de 19,1 a -2,99 mV em pH 3 a 7 para a mistura IPS:GPT, e de 24,4 a -42,2 mV em pH 3 a 7 para IPS. Esse comportamento pode ser justificado, pelo fato de que em pH inferior ao ponto isoelétrico (pI) os grupamentos amina das proteínas estão carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$), enquanto os grupos carboxilas estão neutros ($-\text{COOH}$). Na faixa de pH acima do pI da proteína, a carga tende a ficar negativa, pois os grupamentos carboxila encontram-se carregados negativamente ($-\text{COO}^-$) e parte dos grupos amina tornam-se neutros ($-\text{NH}_2^+$). No ponto isoelétrico, há um equilíbrio entre os grupos carregados positivamente e os grupos carregados negativamente, e a carga elétrica das proteínas torna-se zero, diminuindo assim a solubilidade proteica (FENNEMA, 1996). O ponto isoelétrico das soluções de proteínas GPT, IPS e IPS:GPT (0,1% m/m) encontrado foi de $7,30 \pm 0,03$ para GPT, $3,90 \pm 0,05$ pra IPS e $6,08 \pm 0,06$ para a mistura de proteínas (IPS:GPT).

A análise do potencial zeta das soluções permitiu observar a melhor faixa de pH para que ocorra a interação eletrostática entre os biopolímeros. Em função dos resultados apresentados acima, para otimizar a interação da solução PEC:ALG com as proteínas, para os testes seguintes foram usados como parâmetros os valores de pH 4 para os ensaios com a solução de GPT e pH 3 para as soluções de IPS e IPS:GPT.

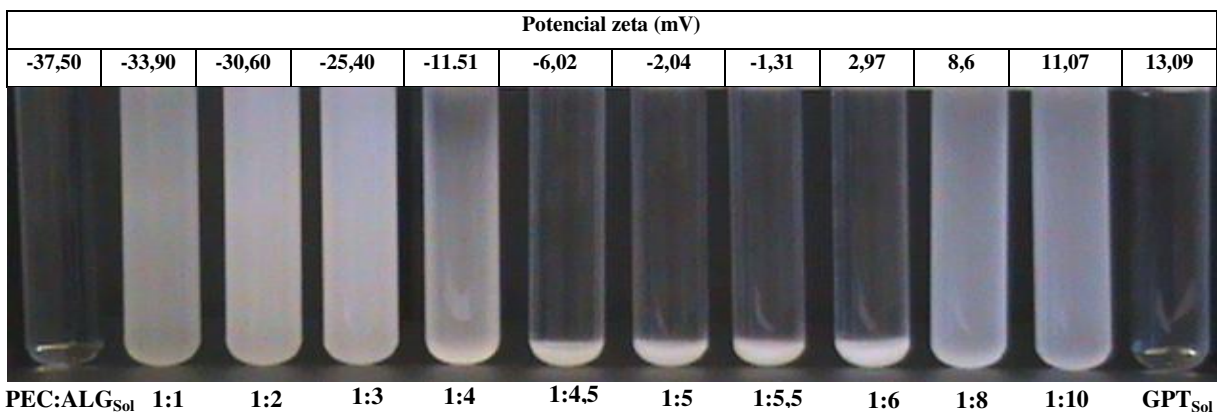
3.3 Produção de coacervados

3.3.1 Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG_{Sol} e soluções de proteína.

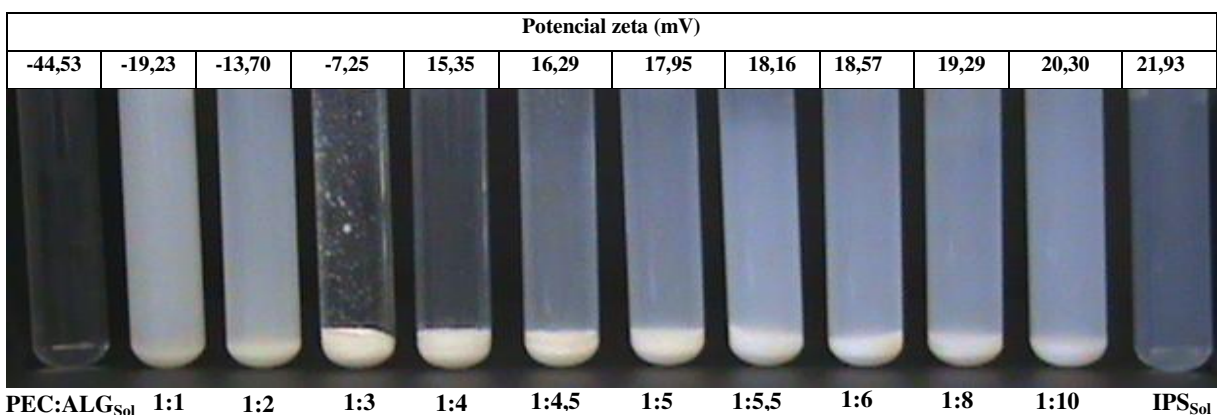
A proporção de mistura dos biopolímeros é um ponto crítico para controlar os parâmetros de equilíbrio de carga entre as proteínas e polissacarídeos, a intensidade das interações e o grau complexação entre estes (YE, 2008). Foram realizados experimentos para identificar a proporção de polissacarídeo e proteína necessários para que ocorresse uma máxima complexação, com cargas elétricas próximas a neutralidade em função do pH. Diferentes relações entre a solução de pectina e alginato (PEC:ALG_{Sol}) e solução de proteína foram testadas, os resultados estão apresentados na Figura 2.

A análise das imagens permite observar expressivas mudanças físicas e elétricas decorrente do acréscimo proporcional de proteína em relação à solução de polissacarídeos. A partir das fotografias é possível observar a formação de soluções turvas de intensidades diferentes, quando tanto o polissacarídeo quanto a proteína se encontram em excesso. Esses complexos solúveis podem ser formados a partir da presença de cargas não neutralizadas, ou seja, quando os biopolímeros encontram-se em concentrações elevadas e não ocorre a complexação (YE, 2008).

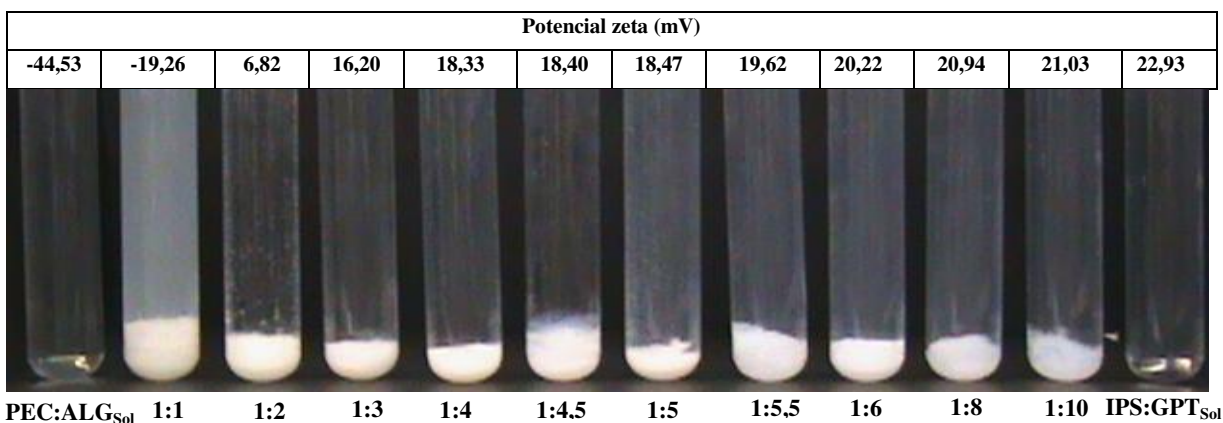
As análises permitem observar uma melhor relação entre biopolímeros (polissacarídeo: proteína) quando o potencial zeta (mV) da mistura encontra-se próximo de zero, e da observação da separação de fases com um sobrenadante límpido. Esse resultado está claramente apresentado quando as misturas precipitaram no fundo dos tubos, indicando um equilíbrio de cargas e a formação de complexos insolúveis, os quais podem ser observados nas proporções: 1:5,5, 1:3 e 1:2 para os ensaios com as soluções GPT_{Sol}, IPS_{Sol} e IPS:GPT_{Sol}, respectivamente (Figura 2).



A- mistura entre PEC:ALG_{sol} e GPT_{sol} em diferentes proporções em pH 4.



B- mistura entre PEC:ALG_{sol} e IPS_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.



C- mistura entre PEC:ALG_{sol} e IPS:GPT_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.

Figura 2. Influência da concentração de proteína na aparência visual e no potencial zeta das misturas de solução de pectina com alginato e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.

Os complexos eletrostáticos são obtidos quando os grupos funcionais carregados negativamente dos polissacarídeos interagem com os grupos catiônicos das moléculas de proteínas, fenômeno que é alcançado quando as soluções diluídas de um polissacarídeo aniônico e de uma proteína estão em um meio no qual o pH promove a formação destas cargas líquidas opostas (TOLSTOGUZOV, 1991; TURGEON, 2007). O pH desempenha um papel fundamental nesse processo através da influencia no grau de ionização do grupo funcional da proteína (NH_3^+) e no polissacarídeo (COO^-) (SCHMITT *et al.*, 1998).

As mudanças no tamanho dos coacervados formados com as diferentes proporções de polissacarídeo e proteína estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho dos coacervados obtidos entre as misturas de solução de polissacarídeos e solução de proteína.

| Proporção PEC:ALG _{sol} : PTN _{Sol} | Tamanho médio (μm) | | |
|--|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | GPT | IPS | IPS+GPT |
| 1:1 | 16,21 \pm 2,88 ^{CD} | 78,33 \pm 5,28 ^A | 161,82 \pm 22,24 ^{AB} |
| 1:2 | 18,21 \pm 2,65 ^{CD} | 55,90 \pm 2,20 ^C | 117,20 \pm 12,25 ^C |
| 1:3 | 15,05 \pm 5,49 ^D | 50,73 \pm 2,95 ^E | 134,33 \pm 14,23 ^{CB} |
| 1:4 | 25,51 \pm 1,77 ^{AB} | 69,32 \pm 5,58 ^B | 122,49 \pm 11,23 ^C |
| 1:4,5 | 29,54 \pm 4,29 ^A | 54,20 \pm 2,55 ^{CD} | 177,41 \pm 12,32 ^A |
| 1:5 | 27,76 \pm 2,27 ^A | 53,86 \pm 3,40 ^{CDE} | 125,18 \pm 20,55 ^{BC} |
| 1:5,5 | 24,53 \pm 2,39 ^{ABC} | 52,69 \pm 1,87 ^{CDE} | 132,28 \pm 24,69 ^{BC} |
| 1:6 | 19,03 \pm 1,96 ^{BCD} | 44,27 \pm 2,25 ^F | 141,08 \pm 30,35 ^{ABC} |
| 1:8 | 16,73 \pm 3,23 ^{CD} | 30,85 \pm 1,58 ^G | 137,21 \pm 12,05 ^{BC} |
| 1:10 | 12,78 \pm 5,12 ^D | 50,60 \pm 4,04 ^E | 133,12 \pm 20,03 ^{BC} |

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

Coacervados insolúveis de diferentes tamanhos foram produzidos, variando de 12,78 μm – 29,54 μm ; 30,85 μm – 78,33 μm e 117,20 μm – 177,41 μm para misturas contendo PEC:ALG_{sol}:GPT_{sol}, PEC:ALG_{sol}:IPS_{sol} e PEC:ALG_{sol}:GPT:IPS_{sol}, respectivamente.

Nori et al. (2011) utilizando misturas entre isolado proteico de soja e pectina obtiveram coacervados com tamanhos variando entre 10 e 90 μm , utilizando diferentes proporções dos biopolímeros. Porém, a formação de coacervados pode variar de 1-500 μm (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

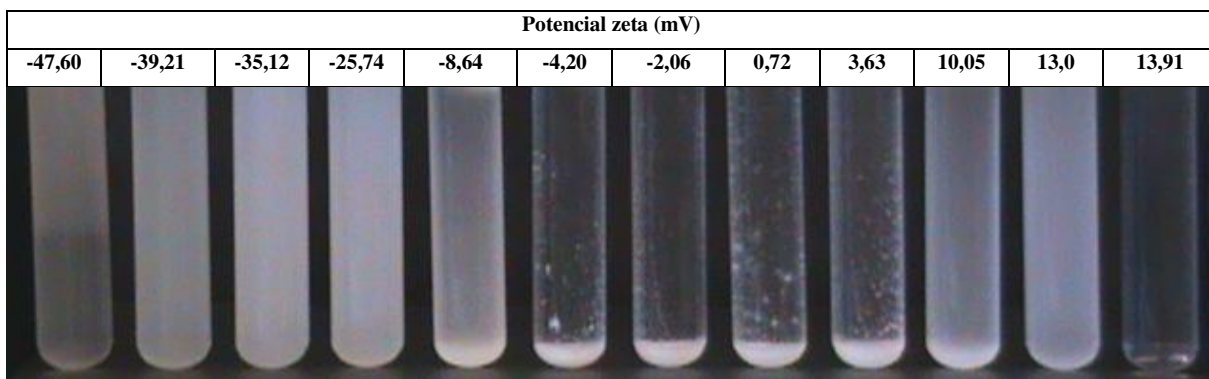
3.3.2 Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG_{Emul} e solução de proteína

Diferentes misturas entre emulsão de pectina com alginato (PEC:ALG_{Emul}) e solução de proteína (GPT, IPS e GPT:IPS) foram testadas e os resultados de potencial zeta estão apresentados na Figura 3.

Através da análise das imagens é possível observar que os sistemas apresentaram mudanças físicas acompanhadas de alterações elétricas, à medida que a quantidade de proteína aumentou em relação ao conteúdo de emulsão, revelando a formação de precipitados no fundo dos tubos.

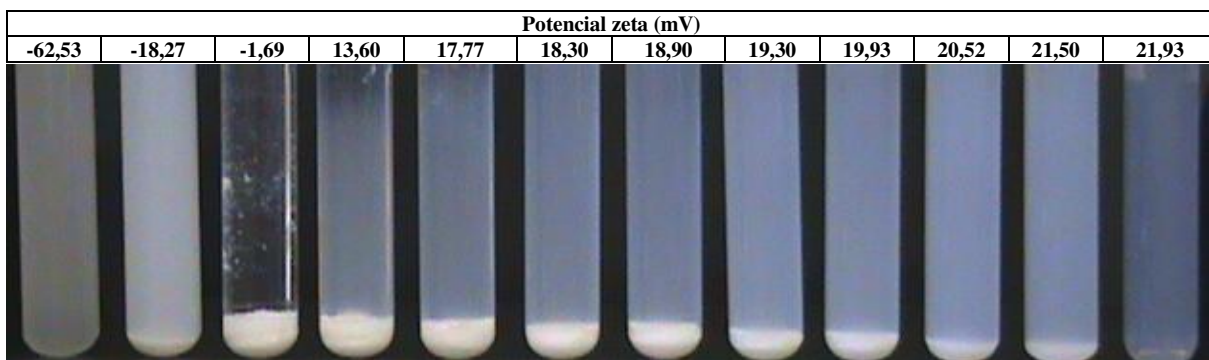
Essa formação de complexos é baseada na interação eletrostática entre a mistura de soluções de substâncias com cargas opostas, formando coacervados, que precipitam mediante a repulsão do solvente, formando duas fases, uma rica em polímeros (coacervado) e outro com uma menor quantidade de polímeros, contendo o solvente da solução (GOUIN, 2004).

Com um potencial de zeta próximo ao zero, as misturas precipitaram no fundo dos tubos pela formação de complexos insolúveis, apresentando um maior equilíbrio de cargas, os quais podem ser observados nas proporções: 1:5,5, 1:2 e 1:1 para os ensaios com as soluções GPT_{sol}, IPS_{sol} e IPS:GPT_{sol}, respectivamente (Figura 3). Este resultado é similar ao obtido com as soluções de mistura de polissacarídeos, indicando que a presença de óleo na emulsão tem pouco efeito sobre a carga das soluções da mistura de pectina com alginato.



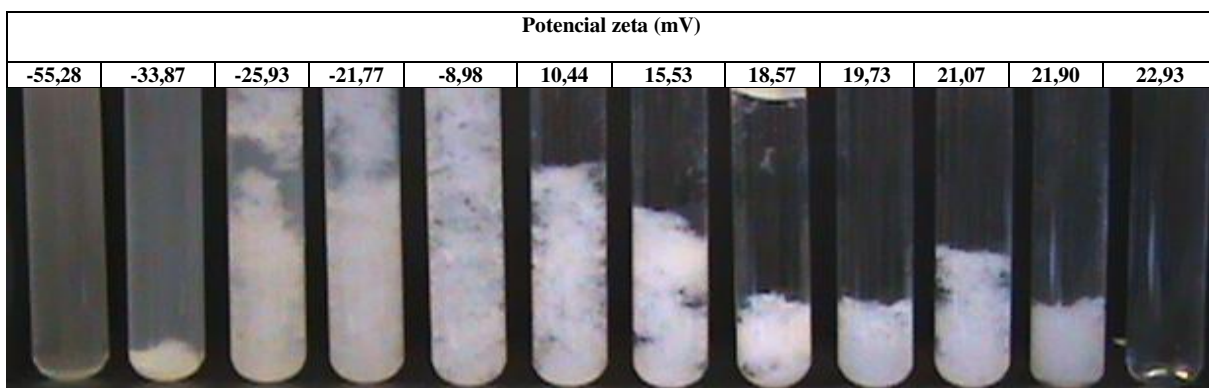
PEC:ALG_{Emul} 1:1 1:2 1:3 1:4 1:4,5 1:5 1:5,5 1:6 1:8 1:10 GPT_{Sol}

A - mistura entre PEC:ALG_{Emul} e GPT_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 4.



PEC:ALG_{Emul} 1:1 1:2 1:3 1:4 1:4,5 1:5 1:5,5 1:6 1:8 1:10 IPS_{Sol}

B- mistura entre PEC:ALG_{Emul} e IPS_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.



PEC:ALG_{Emul} 1:0,25 1:0,50 1:0,75 1:1 1:1,25 1:1,50 1:1,75 1:2 1:3 1:4 IPS:GPT_{Sol}

C- mistura entre PEC:ALG_{Emul} e IPS:GPT_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.

Figura 3. Influência da concentração de proteína na aparência visual das misturas de emulsão da mistura de pectina com alginato e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.

A intensidade das interações e o grau de auto-agregação formados durante a complexação são influenciados pelo pH e pela proporção da mistura entre os biopolímeros, uma vez que estes parâmetros têm efeito sobre o equilíbrio de cargas entre a mistura do polissacarídeo com a proteína (TOLSTOGUZOV, 1991; SCHMITT *et al.*, 1999).

Os tamanhos médios dos coacervados estão apresentados na tabela 3. Os tamanhos variaram de 16,60 - 65,72 μ m; 18,93 - 69,98 μ m e 18,23 - 359,28 μ m para misturas contendo PEC:ALG_{Part} : GPT_{Sol}, PEC:ALG_{Part} : IPS_{Sol} e PEC:ALG_{Part} : GPT:IPS_{Sol}, respectivamente.

Tabela 3. Tamanho dos coacervados obtidos entre as misturas de PEC:ALG_{Emul} e solução de proteína.

| Proporção PEC:ALG _{Emul} : PTN _{Sol} | Tamanho médio (μ m) | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | GPT _{Sol} | IPS _{Sol} | IPS:GPT _{Sol} |
| 1: 0,25 | ND | ND | 18,23 \pm 3,67 ^E |
| 1: 0,50 | ND | ND | 126,68 \pm 7,40 ^D |
| 1: 0,75 | ND | ND | 125,91 \pm 4,70 ^D |
| 1: 1 | 16,78 \pm 0,27 ^E | 46,61 \pm 1,32 ^{BC} | 242,80 \pm 8,66 ^{CB} |
| 1: 1,25 | ND | ND | 359,28 \pm 19,45 ^A |
| 1: 1,50 | ND | ND | 299,55 \pm 17,65 ^{AB} |
| 1: 1,75 | ND | ND | 233,72 \pm 20,98 ^C |
| 1: 2 | 16,60 \pm 0,37 ^E | 69,94 \pm 3,79 ^A | 295,98 \pm 34,34 ^B |
| 1: 3 | 18,12 \pm 3,45 ^E | 69,98 \pm 2,86 ^A | 302,06 \pm 37,65 ^{AB} |
| 1: 4 | 42,29 \pm 1,62 ^C | 59,52 \pm 2,48 ^A | 284,53 \pm 49,84 ^{BC} |
| 1: 4,5 | 53,54 \pm 2,42 ^B | 49,50 \pm 2,95 ^B | ND |
| 1:5 | 65,72 \pm 2,71 ^A | 38,44 \pm 0,98 ^{CD} | ND |
| 1:5,5 | 49,02 \pm 2,86 ^{BC} | 39,06 \pm 4,15 ^{CD} | ND |
| 1:6 | 50,99 \pm 2,47 ^B | 34,70 \pm 4,86 ^D | ND |
| 1:8 | 26,09 \pm 2,14 ^D | 18,93 \pm 1,29 ^E | ND |
| 1:10 | 16,91 \pm 3,66 ^E | 20,60 \pm 1,35 ^E | ND |

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

** ND: não determinado.

Foram observadas mudanças no tamanho dos coacervados à medida que aumentaram as quantidades de proteína em solução. Houve um aumento significativo no tamanho a partir das relações 1:4 utilizando a solução de gelatina de pele de tilápia, na proporção 1:2 no ensaio com a solução de isolado proteico de soja e na proporção de 1:0,50 quando utilizada a mistura das duas proteínas.

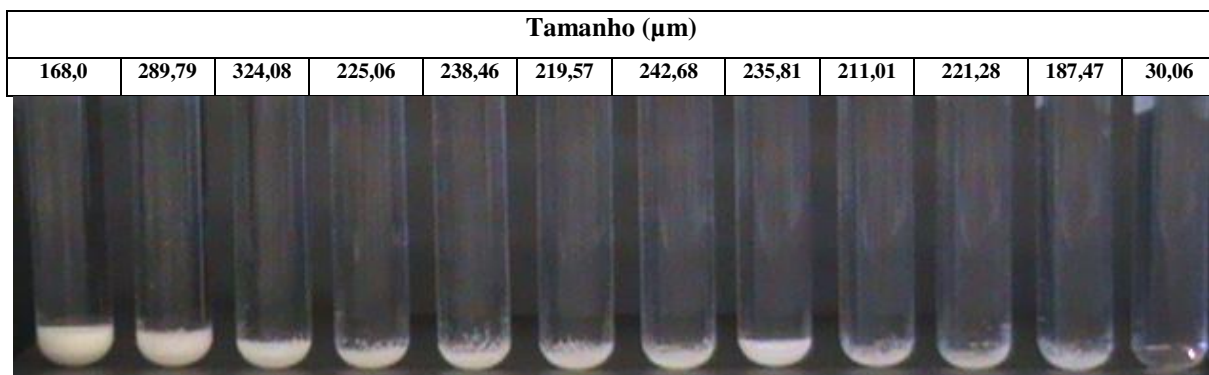
3.3.3 Avaliação de diferentes relações de PEC:ALG_{part} e soluções de proteína

As condições de coacervação avaliadas no item anterior fornecem informações sobre a carga livre dos polímeros quando estão em solução. Ao se produzir partículas por gelificação iônica, parte das cargas negativas correspondente aos grupamentos carboxílicos da mistura de pectina com alginato são complexadas com íons cálcio, assim a superfície da partícula apresenta uma menor carga disponível para complexação. Porém, quando todo o sistema é ajustado para o pH ótimo de interação entre os polímeros, estes podem estar disponíveis para complexar sobre a superfície da micropartícula.

Para avaliar o efeito da alteração na quantidade de cargas disponíveis para interação, misturas entre a suspensão de partículas de gelificação iônica 0,1% (m/m) e a soluções de proteínas a 0,1% (m/m) foram analisadas.

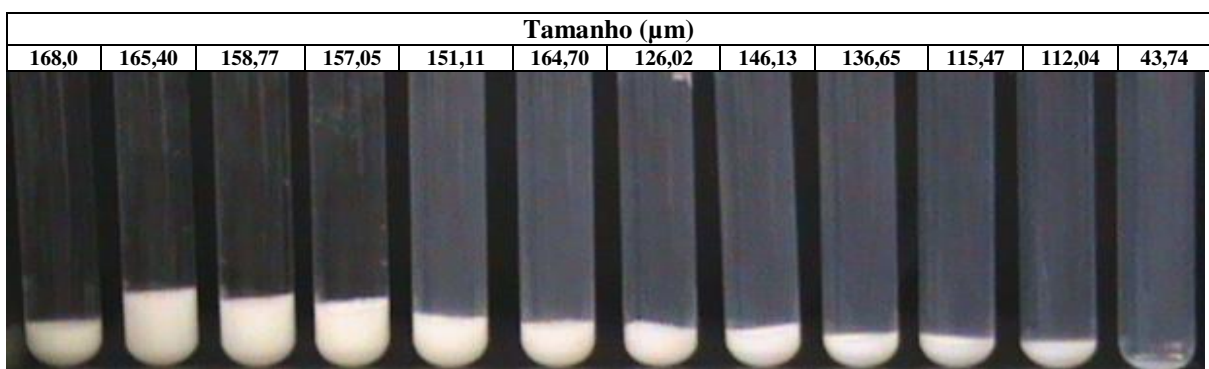
Na Figura 4, os tamanhos de partículas estão apresentados na parte superior da imagem (expressos em μm) e na parte inferior as relações volumétrica (v/v) entre solução de partículas de pectina com alginato e as soluções de proteína.

O tamanho dos coacervados formados variou de 187,47 μm a 324,08 μm para misturas contendo solução de partículas e solução de gelatina de pele de tilápia, de 112,04 μm a 165,40 μm para mistura com isolado proteico de soja, e de 150,64 μm a 162,29 μm para misturas contendo as duas proteínas juntas.



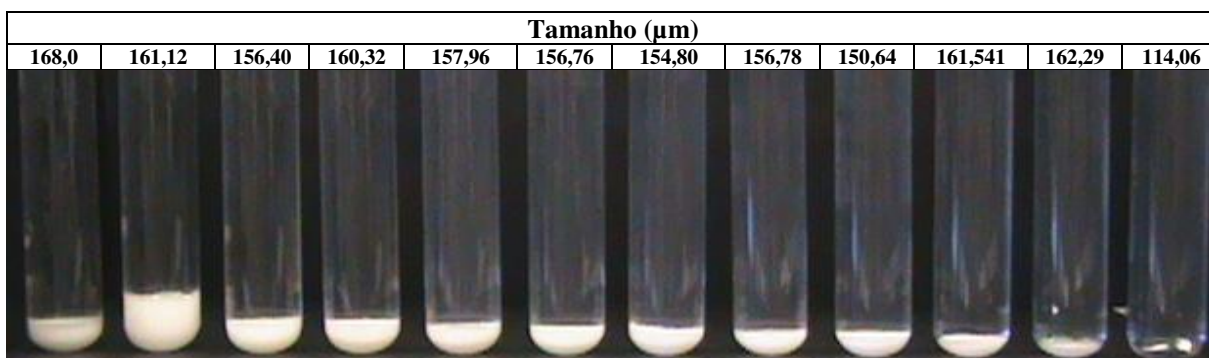
PEC:ALG_{part} 1:1 1:2 1:3 1:4 1:4,5 1:5 1:5,5 1:6 1:7 1:8 GPT_{Sol}

A- mistura entre PEC:ALG_{part} e GPT_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 4.



PEC:ALG_{part} 1:0,25 1:0,50 1:0,75 1:1 1:1,25 1:1,5 1:1,75 1:2 1:3 1:4 IPS_{Sol}

B- mistura entre PEC:ALG_{part} e IPS_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.



PEC:ALG_{part} 1:0,25 1:0,50 1:0,75 1:1 1:1,25 1:50 1:75 1:2 1:3 1:4 IPS:GPT_{Sol}

C- mistura entre PEC:ALG_{part} e IPS:GPT_{sol} (0,1%) em diferentes proporções em pH 3.

Figura 4. Influência da concentração de proteína na aparência visual e tamanho médio dos coacervados das misturas de suspensão de partículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{part}) (0,1% m/m) e solução de proteína na concentração de 0,1% (m/m) em diferentes valores de pH. Imagens obtidas após 12 horas de repouso.

Mediante a impossibilidade da determinação da carga dos coacervados formados, uma vez que estes apresentaram tamanhos maiores que o tamanho limite (10 μm) para permitir o uso no aparelho eletroforético, para estipular a proporção onde houve maior interação entre os polímeros foi realizada a avaliação da proteína remanescente no sobrenadante através do método ácido bicinconínico (BCA). Esse método baseia-se na redução do íon Cu^{2+} a Cu^+ provocada pelas proteínas em meio alcalino, quando o íon cobre (Cu^+) reage com as moléculas de ácido bicinconínico forma um composto púrpura hidrossolúvel, que é detectado a um comprimento de onda de 562 nm. A absorvância nesse comprimento de onda é diretamente proporcional à concentração das proteínas da amostra (BATISTA, 2008).

Como as soluções de proteínas utilizadas eram diluídas (0,1% m/m) esse método apresenta-se adequado mediante a sua alta capacidade de detecção de quantidades mínimas de proteína em solução. A partir dos resultados obtidos pelo método BCA, foi calculada a diferença entre a proteína do sobrenadante (não adsorvida) e a proteína total do sistema, para verificar de forma indireta o percentual de proteína adsorvida por interação eletrostática sobre as partículas de gelificação iônica. Os resultados apresentados na Tabela 4 revelam uma alta adsorção proteica sobre as partículas utilizando solução com pequenas concentrações de proteína.

A adsorção proteica máxima obtida foi de 98,2 %, 85,9 % e 98,2 % da proteína presente em solução, para os ensaios com gelatina de pele tilápia, isolado proteico de soja e a mistura das duas proteínas, respectivamente. Comparando com os resultados obtidos utilizando emulsão (item 3.3.2), observa-se que é necessária uma menor quantidade de proteína no sistema quando se utiliza partícula de gelificação iônica, uma vez que há uma redução das cargas presentes na superfície para interação, já que durante o processamento das partículas parte dos grupamentos carboxílicos se complexam com os íons Ca^{+2} . Portanto, resulta na diminuição da proporção de proteína para que ocorra a interação eletroestática e consequente neutralização das cargas (SCHMITT et al., 2008; SMERDEL et al., 2008).

Tabela 4. Resultados da adsorção proteica em solução de micropartículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}).

| Proporção PEC:ALG _{Part} : PTN _{Sol} | Proteína adsorvida (%) | | |
|---|------------------------|-------|---------|
| | GPT | IPS | IPS:GPT |
| 1: 0,25 | ND | 85,9 | 99,84 |
| 1: 0,50 | ND | 83,34 | 99,10 |
| 1: 0,75 | ND | 83,34 | 98,92 |
| 1:1 | 97,9 | 49,1 | 98,10 |
| 1: 1,25 | ND | 73,8 | 98,31 |
| 1: 1:50 | ND | 60,5 | 98,10 |
| 1: 1,75 | ND | 43,7 | 97,0 |
| 1:2 | 98,23 | 32,8 | 96,06 |
| 1:3 | 94,55 | 52,5 | 94,37 |
| 1:4 | 76 | 34,2 | 93,91 |
| 1:4,5 | 87 | ND | ND |
| 1:5 | 43 | ND | ND |
| 1:5,5 | 62,1 | ND | ND |
| 1:6 | 53 | ND | ND |
| 1:7 | 40 | ND | ND |
| 1:8 | 16,1 | ND | ND |

* ND: não determinado

Mediante os resultados de adsorção proteica obtidos foram escolhidas as seguintes proporções polissacarídeo: proteína: 1:2 para recobrimento com GPT, e 1:0,75 para interação com IPS e mistura IPS: GPT, sendo essas relações utilizadas para os subseqüentes ensaios concentrados.

3.4. Avaliação da adsorção proteica nas micropartículas

3.4.1. Caracterização das micropartículas e adsorção proteica

3.4.1.1. Teor de matéria seca e adsorção proteica das micropartículas

Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, realizaram-se testes em sistemas concentrados produzindo partículas de gelificação iônica, com a avaliação posterior da adsorção de proteína sobre a superfície da partícula a partir da interação eletrostática.

Foram produzidas partículas por gelificação iônica, utilizando a mistura binária de pectina com alginato (1:1 m/m), nas condições de pH 3 e 4, resultando em um percentual de umidade de $94,44 \pm 0,21$ e $94,18 \pm 0,18$, respectivamente. As partículas apresentaram um conteúdo lipídico (%) de $46,50 \pm 2,28$ e $47,44 \pm 3,46$, apresentando uma alta eficiência de encapsulação, cerca de 92,9% e 94,9%, produzidas em pH 3 e pH 4, respectivamente. Esse resultado revela uma alta capacidade de retenção do óleo de girassol utilizado como material de recheio das partículas. A formação da partícula de gelificação ocorre a partir da ligação entre o ácido gulurônico (alginato) e ácido galacturônico (pectina) com os cátions divalentes de Ca^{+2} presentes na solução de cloreto de cálcio, resultando no empilhamento destes grupos na forma uma estrutura em gel tridimensional, descrita anteriormente como “modelo caixa de ovos” (BRACCINI & PEREZ, 2001).

As partículas de gelificação foram recobertas com as diferentes proteínas, utilizando as concentrações de 1, 2, 4 e 8 % de proteína para realizar a interação eletrostática entre os grupos amina das proteínas em solução e os grupos carboxílicos disponíveis nas partículas, sob diferentes condições de pH. Para o recobrimento com gelatina de pele de tilápia, foi utilizada a proporção de 1:2 (m/m) de partículas de gelificação (PEC:ALG_{part}) e solução de GPT, realizando o ajuste da solução para o pH 4. Já para a interação utilizando as soluções de isolado proteico de soja (IPS) e a mistura das duas proteínas (IPS:GPT) foi utilizada a proporção de 1:0,75 (m/m) de PEC:ALG_{part} e solução proteica sob pH 3.

Os teores de umidade e proteína adsorvida das micropartículas com interação eletroestática encontram-se na Tabela 5 e Tabela 6. À medida que o teor de proteína em solução aumentou, houve uma diminuição na umidade das partículas. As partículas com recobrimento de gelatina de pele de tilápia e com o isolado proteico de soja apresentaram uma redução de umidade significativa a partir de 4% de proteína em solução, enquanto que o recobrimento com mistura IPS:GPT houve uma diminuição a partir de 2% de proteína em solução. Comparada à umidade da partícula de gelificação iônica inicial, o recobrimento com GPT, IPS e com a mistura IPS:GPT, ambos a 8%, resultaram em uma redução significativa da umidade.

Tabela 5. Teor de umidade nas micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).

| % Proteína em solução | Umidade (%) | | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | GPT _{Part} | IPS _{Part} | IPS:GPT _{Part} |
| 1 | 89,51 ± 1,34 ^A | 92,45 ± 0,52 ^A | 91,59 ± 0,35 ^A |
| 2 | 89,15 ± 0,63 ^A | 91,60 ± 0,38 ^A | 90,24 ± 0,09 ^B |
| 4 | 79,52 ± 1,41 ^B | 90,08 ± 0,29 ^B | 88,36 ± 0,19 ^C |
| 8 | 80,24 ± 1,80 ^B | 91,84 ± 0,33 ^A | 90,20 ± 0,65 ^B |

* 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 36,37 a 61,87 % para partículas recobertas com GPT em pH 4, e de 17,63 a 47,61% para o recobrimento com IPS e de 18,14 a 52,06 % quando foi usada a mistura de IPS:GPT, ambos em pH 3 (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da adsorção proteica em micropartículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}) utilizando diferentes concentrações proteicas.

| % Proteína em solução | Proteína adsorvida (%) | | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | GPT _{Part} | IPS _{Part} | IPS:GPT _{Part} |
| 1 | 36,37 ± 2,52 ^C | 17,63 ± 0,49 ^D | 18,14 ± 0,16 ^C |
| 2 | 44,49 ± 2,77 ^B | 22,53 ± 0,21 ^C | 21,60 ± 0,17 ^C |
| 4 | 58,74 ± 3,15 ^A | 35,32 ± 0,61 ^B | 32,51 ± 0,72 ^B |
| 8 | 61,87 ± 0,39 ^A | 47,61 ± 0,67 ^A | 52,06 ± 0,84 ^A |

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

Com o acréscimo do percentual de proteína em solução, em todos os casos ocorreu um aumento significativo da adsorção proteica sobre as partículas de gelificação iônica, demonstrando a formação de partículas com altos percentuais proteicos. Porém, nas partículas recobertas com GPT nas concentrações 4 e 8% os percentuais de adsorção não diferiram entre si. O fenômeno de adsorção de proteína é um complexo processo que envolve as propriedades químicas da molécula de proteína e diferentes forças de sua superfície, incluindo as interações eletrostática e hidrofóbica, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (ROACH et al, 2005).

3.4.1.2. Tamanho médio das micropartículas obtidas por gelificação iônica e recobertas com proteína.

As partículas de gelificação iônica sem recobrimento proteico (PEC:ALG_{Part}) apresentaram tamanho médio de 124,89 ± 3,46µm e 121,48 ± 2,8µm para o pH 3 e pH 4, respectivamente. O diâmetro médio de partículas de polissacarídeos, produzidas por

gelificação iônica pode ser afetado por alguns parâmetros, tais como o diâmetro do bico do atomizador e a distância do mesmo em relação à solução catiônica, a concentração, a viscosidade e estrutura dos polissacarídeos (SMRDEL et al., 2008).

As partículas quando recobertas com as proteínas sofreram um acréscimo no seu tamanho em relação à partícula de PEC:ALG inicial (Tabela 7). O recobrimento com gelatina de pele de tilápia em pH 4 nas concentrações 4 e 8%, promoveram um aumento significativo no tamanho médio em relação as partículas de gelificação.

Partículas recobertas pelo isolado proteico de soja apresentaram um aumento significativo em relação à partícula de gelificação em todas as concentrações proteicas testadas (1% a 8%). Enquanto que a interação utilizando a mistura de proteínas (IPS: GPT) apresentou aumento significativo nos ensaios com 1, 2 e 4 % de proteína em solução, porém as partículas no ensaio com 8% de proteína apresentou tamanho similar ao da partícula de gelificação inicial. Os tamanhos médios das partículas recobertas situaram entre 121,54 e 140,40 μm para partículas de GPT (pH 4), entre 145,52 a 179,05 μm para IPS (pH 3) e entre 125,25 a 177,42 μm para a mistura IPS:GPT (pH 3).

Tabela 7. Tamanho médio das micropartículas em função da concentração de proteína em solução (%).

| % Proteína em solução | Tamanho médio (μ) | | |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | GPT _{Part} | IPS _{Part} | IPS:GPT _{Part} |
| 1 | 121,54 \pm 3,54 ^B | 145,52 \pm 2,76 ^C | 177,42 \pm 4,67 ^A |
| 2 | 122,18 \pm 6,97 ^B | 169,02 \pm 4,30 ^B | 151,13 \pm 23,57 ^B |
| 4 | 133,53 \pm 3,76 ^B | 179,05 \pm 6,30 ^A | 161,05 \pm 12,31 ^{AB} |
| 8 | 140,40 \pm 3,30 ^A | 162,70 \pm 3,14 ^B | 125,25 \pm 2,99 ^C |

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

Aguilar (2013) ao produzir partículas de gelificação iônica constituídas de pectina e alginato recobertas com concentrado proteico do soro de leite, também relata um aumento significativo à medida que se aumenta o teor de proteína empregado na interação eletrostática, obtendo tamanhos entre 190,34 a 197,47 μ m utilizando de 1,7 a 4% de proteína em solução.

3.4.2. Morfologia e Microestrutura

A morfologia e a microestrutura das micropartículas obtidas por gelificação iônica podem ser visualizadas na Figura 5. As imagens da microscopia óptica das partículas úmidas permitem a avaliação da morfologia e da estrutura interna, revelando a formação de uma matriz multinucleada, com gotas lipídicas distribuídas pela extensão da partícula.

Em ambas condições de pH (3 e 4), as partículas de gelificação iônica apresentaram formato que variava de esférico a oval. Através da microscopia eletrônica de varredura observa-se resistência das partículas ao processo de secagem, mantendo a sua forma próxima a original (Figura 5). Na superfície das micropartículas desidratadas é possível observar a presença de rugosidades e irregularidades provenientes principalmente de gotículas de óleo presentes no interior da partícula.

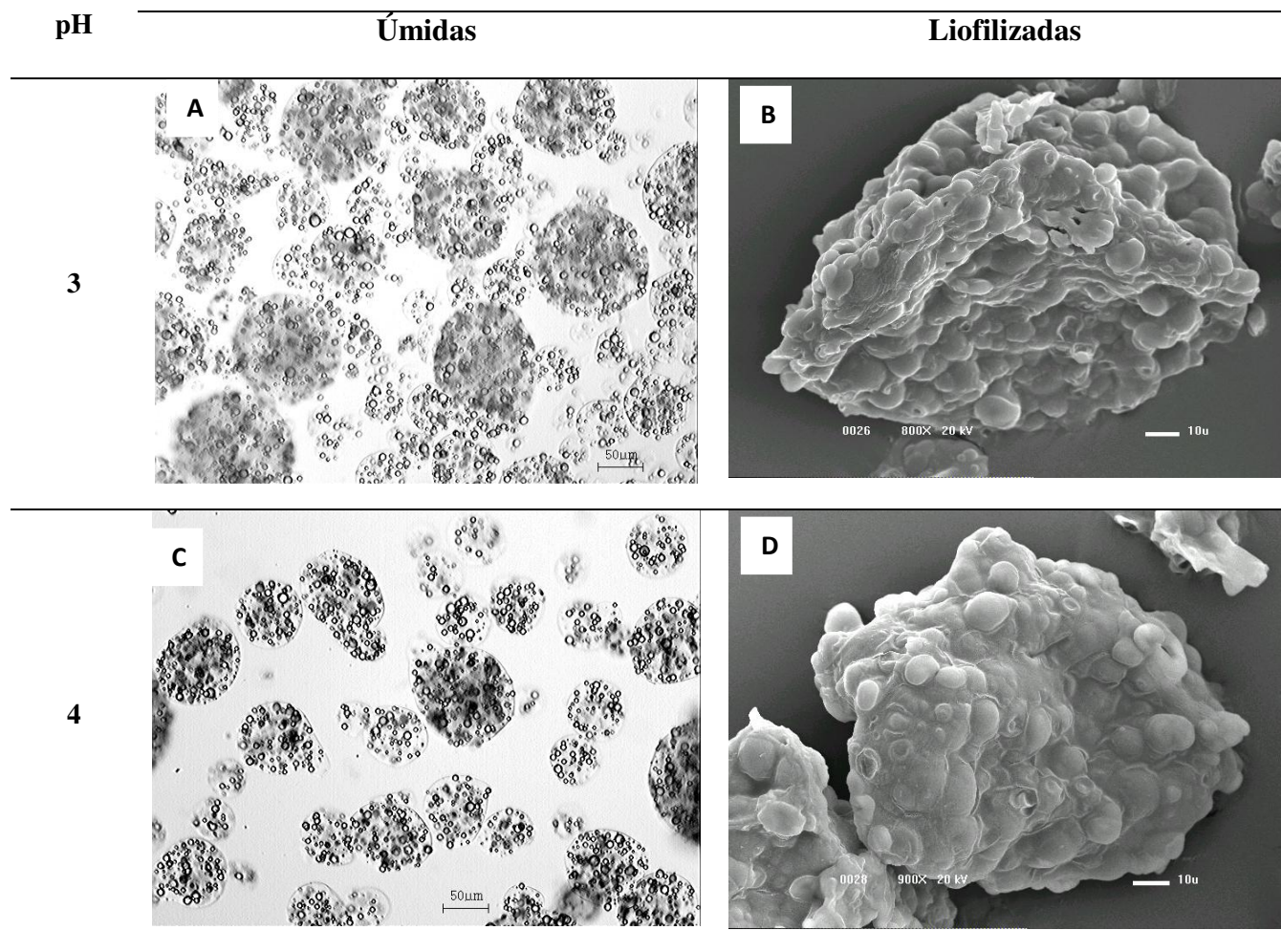


Figura 5. Morfologia das partículas úmidas e microestrutura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica utilizando a mistura binária de pectina e alginato (PEC:ALG_{part}) em pH 3 e pH 4. A e C Barra = 50 μm. B e D Barra = 10 μm.

Avaliando as partículas que sofreram recobrimento proteico por interação eletroestática, observa-se que não houve alteração na morfologia em nenhuma das concentrações proteicas testadas. Mesmo com o uso de diferentes proteínas e condições de pH, as características das partículas úmidas foram similares, havendo a manutenção de uma forma esférica a oval, com conteúdo lipídico distribuído na matriz da partícula, como pode ser observado nas figuras 6, 7 e 8.

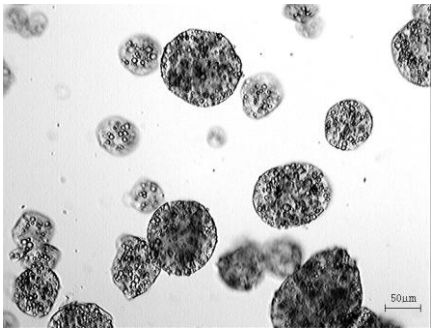
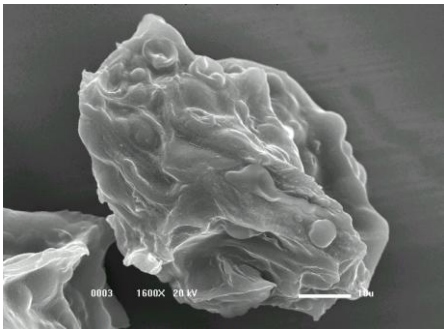
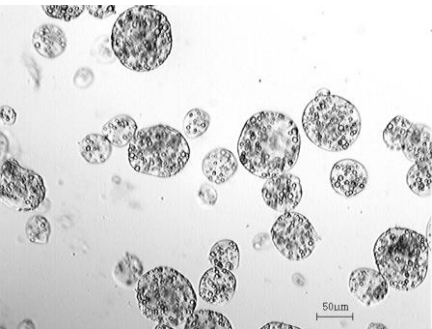
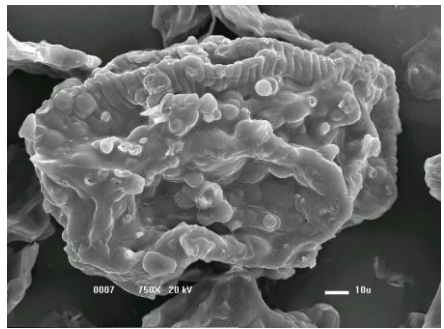
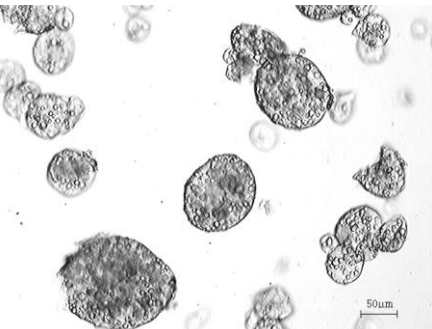
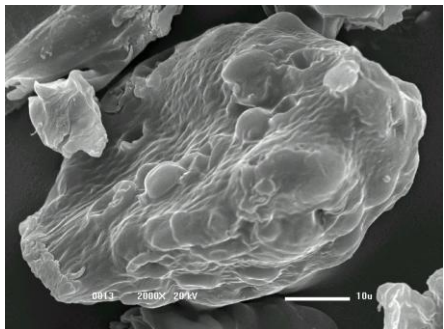
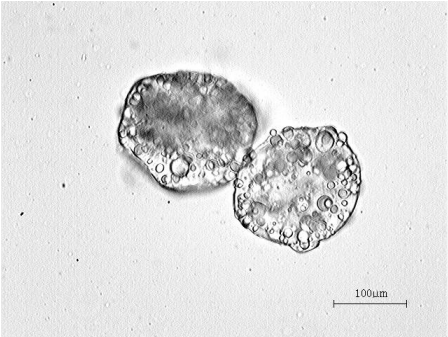
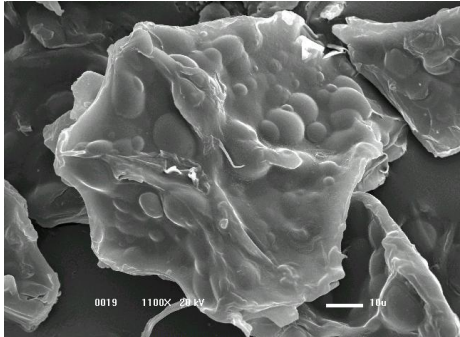
| GPT (%) | Partícula úmida | Partículas liofilizadas |
|---------|---|--|
| 1,0 |  |  |
| 2,0 |  |  |
| 4,0 |  |  |
| 8,0 |  |  |

Figura 6. Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com GPT com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 4.

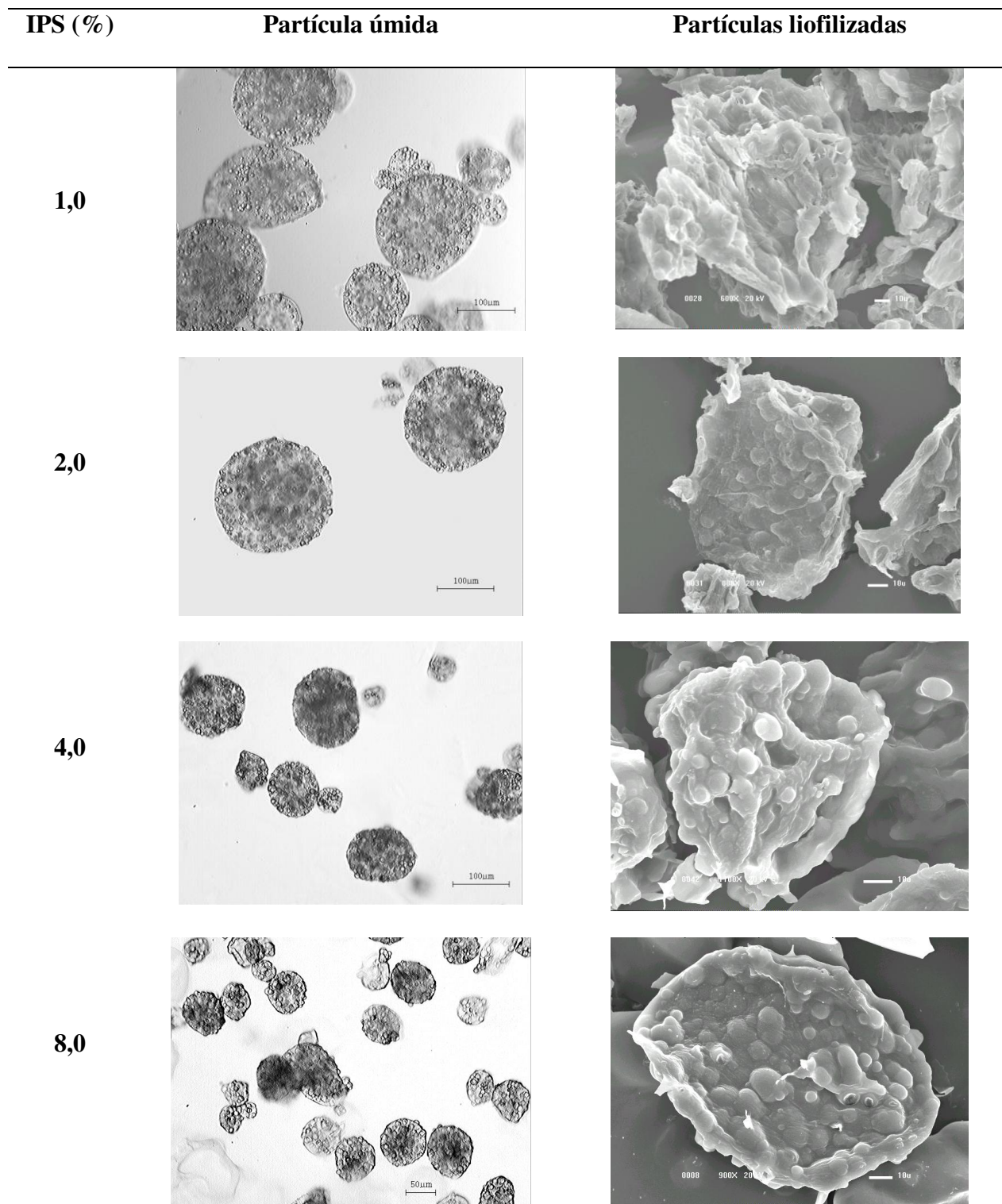


Figura 7. Microscopia ótica das partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com IPS com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 3.

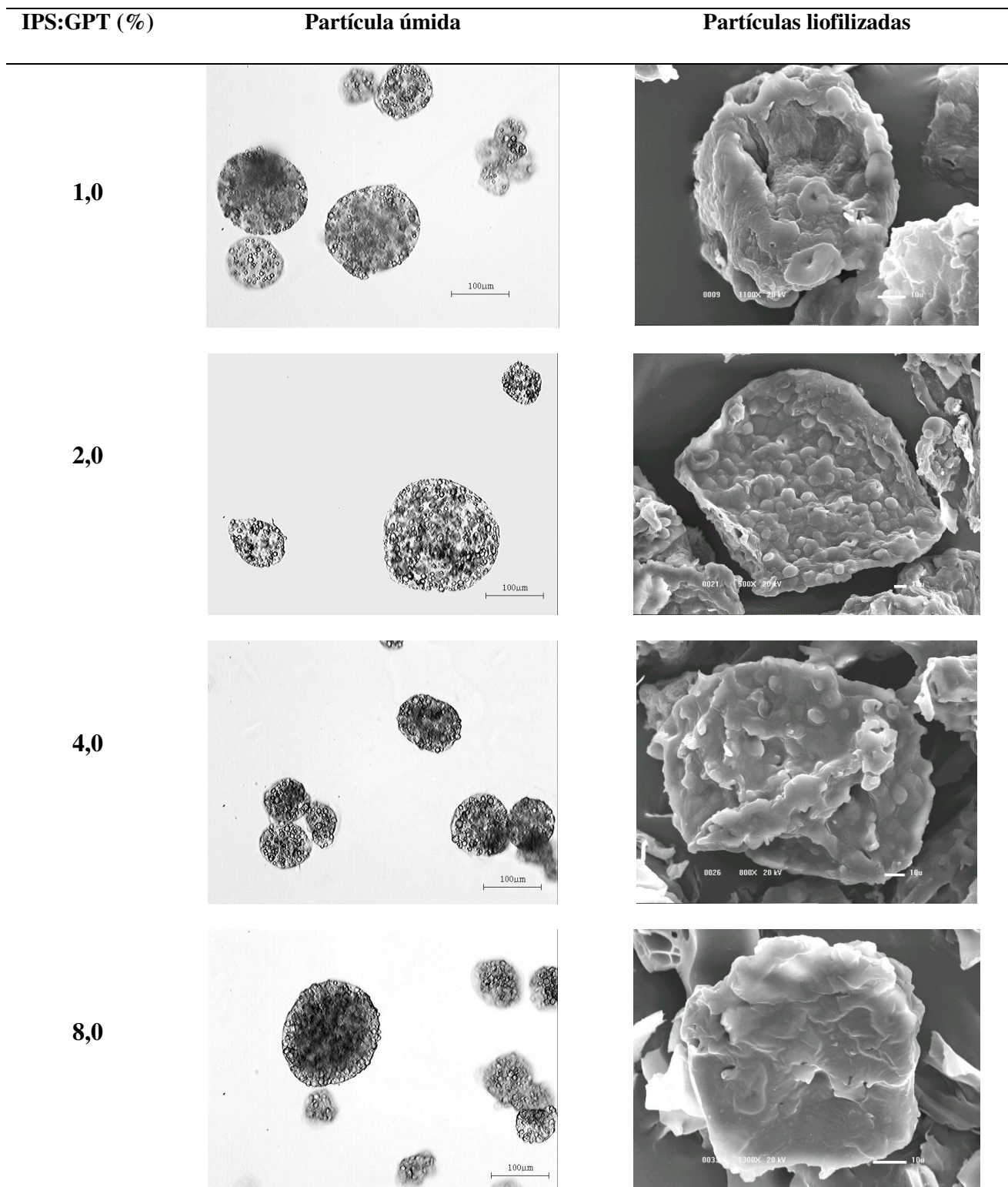


Figura 8. Microscopia ótica de partículas úmidas e microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas produzidas por gelificação iônica recobertas com IPS:GPT com diferentes concentrações de proteína (%) em pH 3.

Avaliando a microestrutura das partículas observa-se a presença de rugosidades na sua superfície. Essa presença de irregularidades e de rugas é proveniente das vesículas de óleo e do alto teor proteico na superfície da partícula. O recobrimento proteico gerou uma superfície densa, que provavelmente pode auxiliar na redução da porosidade da partícula, conferindo uma maior proteção do óleo encapsulado no interior da partícula. Após o processo de secagem as partículas mantiveram características similares à partícula úmida com o seu formato próximo ao esférico.

Esse tipo de morfologia foi similar aos resultados encontrados por Mendanha *et al.* (2009), que ao encapsular por coacervação complexa o hidrolisado de caseína utilizando pectina e isolado proteico de soja como materiais de parede, obtiveram partículas de formato arredondado.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos ensaios com os sistemas diluídos, as soluções de pectina com alginato são capazes de interagir com a solução de gelatina de pele de tilápia no valor de pH 4, enquanto que as soluções de isolado proteico de soja e mistura das duas proteínas reagem em pH 3, mediante a presença de cargas opostas entre os biopolímeros. Misturas de PEC:ALG_{Sol} e solução de proteína apresentam um potencial zeta próximo ao zero, formando complexos insolúveis, nas proporções: 1:5,5, 1:2 e 1:1 para os ensaios com as soluções GPT_{Sol}, IPS_{Sol} e IPS:GPT_{Sol}, respectivamente. Quando foram testadas misturas entre partículas de gelificação iônica (PEC:ALG_{Part}) e as soluções de proteína, foi observada a necessidade de uma menor quantidade de proteína para interação, uma vez que a ligação dos polissacarídeos com os íons cálcio durante a gelificação reduz a carga livre total na partícula. Em função disso, visando uma maior adsorção proteica foram estabelecidas as seguintes proporções polissacarídeo: proteína: 1:2 para recobrimento com GPT, 1:0,75 para interação com IPS e IPS: GPT, sendo estas reportadas para os ensaios concentrados. Utilizando essas proporções foi possível obter partículas com alto teor proteico. As adsorções proteicas aumentaram com o acréscimo de proteína em solução, sendo obtidas partículas com alto conteúdo proteico utilizando 8% de proteína em solução para o recobrimento por interação eletrostática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, K. C. **Adsorción de proteína em hidrogéis de alginato pectina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán - Mexico, 2013, 66 p.

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

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

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.1, p.38-43, 2010.

BATISTA, S. I. M. **Efeito da substituição da farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (*Sparus aurata*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). UNIVERSIDADE DO ALGARVE. Faro - Portugal, 2008, 72 p.

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.

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

BUENO, C. M. Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 133p., 2008.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20 p.292–302, 2010.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.90, p. 21-27, 2012.

FAVARO-TRINDADE, C. S., PINHO, S. C., ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n.2, p.103-112, 2008.

GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. . Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872-878, 2013.

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

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

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

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D. J. Influence of pH and ionic strength on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-alginate interfaces, **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2052-2058, 2006.

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

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D.J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, p. 374-397, 2010.

KAZMIERSKI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of β -Lactoglobulin and Highmethoxyl Pectins in Acidified Systems. **Journal of Food Science**, v.68, n. 5, 2003.

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

LI, X. Y.; CHEN, X. G.; CHA, D. S; PARK, H. J.; LIU, C. S. microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n.4, p.315–324, 2009.

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**, v.42, p.1099–1104, 2009.

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

MUKAI-CORRÊA. R. **Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003, 173p.

NORI, M.P.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44 , p429-435, 2011.

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.

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127(22), p. 8168-8173, 2005.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESPOND, D.; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. **Food Hydrocolloids**,14:403–13, 2000.

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

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

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. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 33, n.6, p.501-547, 1993.

SMITH O.K., KROHON R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J., KLENK D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochemistry**. 150: 76-85, 1985.

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

SONGCHOTIKUNPAN, P.; TATTIYAKUL, J.; SUPAPHOL, P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 42, p. 247-255, 2008.

SOUZA, F. N.; GEBARA, C.; 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**, v.49, p. 560-566, 2012.

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**, v.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. **International Journal**, v.8 p.179–193, 1998.

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

TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, v.4 n.6 p.429-468, 1991.

TUINIER, R.; ROLIN, C.; KRUIF, C. G. Electrosorption of pectin onto casein micelles. ***Biomacromolecules*** 3(3):632–8, 2002.

TURGEON, S. L., SCHMITT, C., & SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 166–178, 2007.

YAO, R.; ZHANG, R.; LUAN, J.; FENG, L. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. ***Biofabrication***, v.4, 2012.

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

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA E INTERAÇÃO ELETROESTÁTICA COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA E INTERAÇÃO ELETROESTÁTICA COM ALTO TEOR DE PROTEÍNA SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS

RESUMO

Mediante a diversidade de aplicações requeridas para área de microencapsulação, as partículas devem apresentar características específicas de resistência e liberação, visando contemplar diferentes funcionalidades. No entanto, a partícula deve permanecer estável no meio inserido, com a liberação do composto encapsulado em seu sítio de ação. Portanto, a avaliação das interferências de fatores como pH, enzimas e concentração de sais, nas características funcionais dessas partículas, é importante para observação de possíveis modificações em sua estrutura quando submetidas a diferentes tratamentos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo produzir partículas por gelificação iônica utilizando a mistura binária de pectina e alginato, e posterior recobrimento por interação eletrostática utilizando isolado proteico de soja, gelatina de pele de tilápia e a mistura das duas proteínas e avaliar a estabilidade frente a diferentes tratamentos. As partículas de pectina e alginato foram recobertas com solução de proteína na concentração de 8%, resultando em partículas com alto teor proteico. O teor de proteína adsorvido nas partículas foi de aproximadamente 60% para o recobrimento com a gelatina de pele de tilápia, de 50% com o isolado proteico de soja e de 51% com a mistura de proteínas (IPS:GPT). A estabilidade dessas partículas úmidas recém processadas, foram avaliadas mediante a inserção em diferentes pHs, variadas concentrações molares de NaCl e sob simulação *in vitro* das condições gastroentéricas, caracterizando-as quanto ao tamanho, morfologia e solubilidade da camada proteica. A variação de pH e das concentrações de NaCl influenciaram na solubilidade da camada proteica das diferentes partículas. Em condições de extrema acidez (pH 1) e com o acréscimo na concentração de sal, as partículas apresentaram um aumento na solubilidade proteica. Nas faixas de pH (1 a 7) e nas diferentes concentrações de NaCl (0 a 584mM)

estudadas, independente do valor da solubilidade proteica obtida, todas as partículas permaneceram íntegras, com o conteúdo lipídico retido em seu interior. As partículas de pectina e alginato (PEC:ALG_{Part}) sem recobrimento e as partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) foram resistentes as condições de pH e enzimáticas no ensaio gastroentérico *in vitro*, mantendo a integridade da estrutura da partícula, com o óleo retido em seu interior. As partículas recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{Part}) e com a mistura de proteínas (IPS:GPT_{Part}), foram resistentes às condições gástricas, porém quando submetidas às condições intestinais, foram sensíveis a atividade enzimática e desfizeram-se, liberando o material encapsulado.

ABSTRACT

Through the diversity of applications required for the area of microencapsulation, the particles must present specific characteristics of resistance and release, seeking cover different functionalities. However, the particle must remain stable in the through inserted, with the release of the encapsulated compound to its site of action. Therefore, the evaluation of the interference of factors such as pH, enzymes and salt concentration, on the functional characteristics of these particles, it is important to observe possible changes in its structure when subjected to different treatments. This study aimed to produce particles by ionic gelation using binary mixture of pectin and alginate, and subsequent coating by electrostatic interaction using isolated soy protein, tilapia skin gelatin and the mixture of the two proteins and assess the stability against different treatments. The pectin and alginate particles were coated with the protein solution at a concentration of 8%, resulting in particles with a high protein content. The amount of adsorbed protein on the particles was about 60% for the particles covered with tilapia skin gelatin, 50% with isolated soy protein and 51% with the mixture of proteins (IPS:GPT). The stability of these newly wet processed particles were measured by inserting it different pHs, varying molar NaCl concentration and under simulated *in vitro* gastroenteric conditions, characterizing them with respect to the size, morphology and solubility of the protein layer. The variation of pH

and NaCl concentrations influenced the solubility of the protein layer of the different particles. Under conditions of extreme acidity (pH 1) and the increase in salt concentration, the particles showed an increase in protein solubility. In the pH ranges (1-7) and different concentrations of NaCl (0 to 584mm) studied, regardless of the amount of protein solubility obtained, all particles remained intact, with the lipid content trapped inside. The particles of pectin and alginate (PEC: ALG_{Part}) uncoated and coated particles with tilapia skin gelatin (GPT_{Part}) were resistant to pH conditions of the gastrointestinal and enzymatic in vitro assay while maintaining the structural integrity of the particle. The coated particles with isolated soy protein (IPS_{Part}) and a mixture of proteins (IPS: GPT_{Part}) were resistant to gastric conditions, but when subjected to intestinal conditions, were susceptible to enzymatic activity and solubilized completely, releasing the encapsulated oil material.

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de microencapsulação vem sendo estudada para aplicação em diversos segmentos industriais. Na área alimentícia muitos trabalhos são conduzidos para a formulação de produtos para veiculação de compostos bioativos e funcionais como ácidos graxos essenciais, vitaminas e probióticos, enquanto que o segmento farmacêutico enfoca a veiculação de fármacos, produção de cosméticos e terapia celular. Na agroindústria possíveis aplicações são estabelecidas, como para formulação de pesticidas e outros insumos agrícolas, além da aplicação na área de construções para elaboração de tintas e revestimentos (SUAVE *et al.*, 2006).

Muitos métodos de encapsulação têm sido propostos para a área de alimentos, porém nenhum deles pode ser considerado como um processo universalmente aplicável para todos os componentes de alimentos. Isto ocorre mediante o fato de que os compostos presentes nos alimentos apresentam variada estrutura molecular, mostrando diferenças de

peso molecular, polaridade, solubilidade, etc, o que implica na necessidade de diferentes abordagens aplicadas para a encapsulação, de modo a satisfazer os requisitos físico-químicos e moleculares específicos para o componente presente no interior da partícula. Além disso, o processo deve resultar em um produto com capacidade de resistir às interferências do ambiente e satisfazer as características funcionais requeridas (SHAHIDI & HAN, 1993; AUGUSTIN & HEMAR, 2009).

O processo de encapsulação deve ser capaz de proteger o composto encapsulado durante todo o período de processamento, armazenamento e transporte. Uma das exigências principais do sistema de encapsulação é a proteção do material encapsulado da degradação química, por exemplo, via oxidação ou hidrólise. Estudos vêm explorando como a principal característica das micropartículas a resistência contra a degradação química e enzimática na parte superior do trato gastrointestinal, mantendo o composto encapsulado protegido até que atinja o seu local de ação (DE VOS, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; GEBARA *et al.*, 2013).

No entanto, este é apenas um dos desafios, pois a partícula deve resistir aos eventos que ocorrem durante a passagem através do trato gastrointestinal, sendo o composto encapsulado liberado no seu sítio de ação. Outra característica relevante é que a partícula deve se manter estável no meio inserido, seja na própria constituição do produto que irá veicular as partículas, ou no meio onde esta partícula será aplicada. Sendo assim devem ser avaliadas a interferências de fatores como concentração de sais, pH e acidez, nas características funcionais dessas partículas (DE VOS, 2010).

As propriedades funcionais de partículas de polissacarídeos em combinação com polieletrólitos são amplamente estudadas. Alguns polieletrólitos utilizados incluem a quitosana (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; PENICHE *et al.*, 2004; IYER *et al.*, 2005), gelatina (SARAVANAN & PANDURANGA, 2010; GÓMEZ-GUILÉN *et al.*, 2011; LV *et al.*, 2012) e a proteína do soro de leite (PICOT & LACROIX, 2004; WEINBRECK *et al.*, 2004; DOHERTY *et al.*, 2011). Na maioria dos estudos as modificações nas propriedades da partícula são avaliadas a partir do seu grau de resistência ao ambiente gástrico e o perfil

de liberação no ambiente entérico, além de outras avaliações conduzidas sobre a resistência em diferentes condições de temperatura e pH.

É crescente no segmento da microencapsulação a necessidade da aplicação de outros tipos de biopolímeros como a gelatina extraída de peixe, mediante as demandas ambientais e socioculturais, além de preocupações sobre a disseminação da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) pelo uso da gelatina de origem bovina (KARIM & BHAT 2009), fazendo-se necessária a avaliação de suas características funcionais e de resistência para aplicação em produtos alimentícios. Nessa mesma via, o desenvolvimento da aplicação de proteínas vegetais em combinação com polissacarídeos para a microencapsulação, como o isolado proteico de soja, se revela interessante, tratando-se de uma matéria-prima de fonte renovável, barata e biodegradável (NESTERENKO *et al.*, 2013). Alguns estudos relatam a aplicação do isolado proteico de soja em partículas (MENDANHA *et al.*, 2009; NORI *et al.*, 2010), porém há uma escassez de trabalhos que avaliem as possíveis modificações na estrutura da partícula sob condições adversas.

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo produzir micropartículas por gelificação iônica utilizando a mistura binária de pectina e alginato, e posterior recobrimento por interação eletrostática utilizando isolado proteico de soja, gelatina de pele de tilápia e a mistura das duas proteínas, obtendo-se partículas com uma alta adsorção proteica. As partículas foram caracterizadas quanto aos teores de proteína adsorvida, umidade, tamanho e morfologia. A estabilidade das partículas foi avaliada mediante a inserção em diferentes pHs, variadas concentrações molares de NaCl em solução aquosa e na simulação das condições gastroentéricas, caracterizando-as quanto ao tamanho, morfologia e solubilidade da camada proteica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Os materiais utilizados para a elaboração das micropartículas foram os seguintes: pectina de baixo teor de metoxilação amidada GENU[®] (CP Kelco, Limeira-SP, Brasil, lote 8445875); alginato de sódio (Manugel DMB, lote G3512301); isolado proteico de soja (New Max Industrial, Americana-SP, Lote 051986); gelatina da pele de tilápia (produzida anteriormente no laboratório), cloreto de cálcio anidro P.A. (Dinâmica, lote 36308, P.M. 110,99), óleo de girassol comercial, ácido clorídrico P.A (Merck), hidróxido de sódio a 50% (nuclear, P.M. 40, Diadema-SP), ácido sulfúrico (Synth, P.M. 98,08, Diadema, São Paulo, Brasil); pancreatina de pâncreas suíno Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA, cod. P-1625, lote:017K1291); pepsina de mucosa de estômago suíno Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA, cod. P-7012, lote: 09K7356) e e os demais reagentes utilizados foram de grau analíticos.

2.2. Métodos

2.2.1 Produção de micropartículas

As micropartículas foram produzidas pela combinação da técnica de gelificação iônica com posterior recobrimento por interação eletrostática, conforme descrito no item 2.2.6 do Capítulo 2. Mediante aos resultados de adsorção proteica (%) obtidos no capítulo anterior, foi selecionada a concentração de 8% de proteína em solução para realizar o recobrimento das partículas de pectina e alginato obtidas por gelificação iônica. Para a produção das partículas recobertas por interação eletrostática foram usadas as mesmas condições operacionais descritas anteriormente, sendo que a interação eletrostática utilizando a gelatina de pele de tilápia (GPT) foi realizado em pH 4, enquanto que o

recobrimento com isolado proteico de soja (IPS) e o com a mistura das duas proteínas (IPS:GPT) foram realizados em pH 3. Foram produzidos partículas de alta adsorção proteica para a aplicação em diferentes testes de estabilidade.

2.2.2. Caracterização das micropartículas

2.2.2.1. Conteúdo de proteína e umidade das micropartículas

As micropartículas produzidas foram caracterizadas em relação ao conteúdo de umidade e nitrogênio total, segundo metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2006). O teor de proteína da partícula foi quantificado pelo conteúdo de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de correção 5,55 para conversão de nitrogênio para partículas recobertas com GPT, 6,25 para o isolado proteico de soja e 5,9 para a mistura de proteínas (IPS:GPT).

2.2.2.2. Tamanho médio das micropartículas

O tamanho médio das partículas úmidas (recém-processadas) foi medido no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Germany), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Germany). As partículas úmidas foram suspensas em água deionizada com pH ajustado conforme o valor utilizado na interação eletrostática. No caso das partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) foi ajustado para o valor 4,0 e para as recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{Part}) e com a mistura das proteínas ($IPS:GPT_{Part}$) forma em pH de 3,0.

2.2.2.3. Morfologia das micropartículas

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada por microscopia ótica em microscópio óptico (JENAVAL, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) utilizando-se objetivas de

12,5 e 25 x, e optovar de 1 e 1,25 x. A captação das imagens foi realizada utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System.

2.2.3 Avaliação da estabilidade da micropartícula em diferentes condições.

A partir das partículas de pectina e alginato (ALG:PEC_{Part}) recobertas com as diferentes proteínas, foram realizados testes de estabilidade das partículas úmida em diferentes pHs, variadas concentrações molares de NaCl e sob simulação *in vitro* das condições gastrointestinais. Para estes ensaios, três lotes independentes de partículas foram produzidos e avaliados em triplicata para cada lote.

2.2.3.1 Estabilidade sob diferentes concentrações de NaCl

O efeito da concentração de NaCl sobre as partículas foi avaliado através da morfologia, tamanho e solubilidade proteica. Foram realizados ensaios adicionando 2 g de partículas úmidas em 20 mL de solução aquosa sem sal, e em soluções de NaCl com diferentes concentrações: 100 mM (0,6%), 200 mM (1,2%), 400 mM (2,4%) e 580 mM (3,5%). As partículas foram mantidas em solução de NaCl sob agitação constante em um homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas. O tamanho médio (D 0,5) foi obtido por difração a laser utilizando-se o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, UK). A morfologia foi observada através da captação de imagens em microscopia óptica conforme o item 2.2.2.3. A solubilidade proteica foi avaliada a partir da centrifugação das amostras a 35735 G por 10 minutos (centrífuga sorvall RC5C, rotor SM-24, Sorvall Instruments, Newton, CT), onde se quantificou o teor de proteína que se despreendeu das partículas (sobrenadante) 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.

2.2.3.2. Estabilidade em diferentes valores de pH

O efeito do pH sobre as partículas foi avaliado através da morfologia, tamanho e solubilidade proteica. Aproximadamente 2 g de partículas úmidas foram suspensas em 20 mL de água deionizada com pH ajustado para 1, 4 e 7. A suspensão permaneceu sob agitação constante em um homogeneizador de soluções rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas. Foi realizada a avaliação do tamanho das partículas por difração a laser, conforme item 2.2.2.2, e a observação da morfologia por microscopia óptica conforme o item 2.2.2.3. As amostras foram centrifugadas, e a partir do sobrenadante, foi calculada a solubilidade proteica mediante a relação da quantidade presente no sobrenadante e o valor de proteína inicial presente na massa da partícula, conforme o item 2.2.3.1.

2.2.3.3 Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em simulação das condições gastrointestinais

As partículas úmidas recém-processadas foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas para avaliar sua resistência. Em tubos de vidro de 30 mL, foram adicionados 2 g de micropartículas úmidas e 20 mL de suco gástrico artificial (SGA) com pH ajustado para 2, e incubados a 37 °C, em banho-maria sob 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 (MOZZI et al., 2009). Decorridas às 2 horas de incubação, alterou-se o pH para 7 com a solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) na concentração de 20% (p/v) e adicionou-se a pancreatina na concentração de 1,95 g/L. As amostras foram incubadas por mais 22 horas a 37 °C. Após intervalos de tempo de 2, 7 e 24 horas de simulação das condições gastrointestinais, os tubos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos, para inativação das enzimas. Nestes intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas para avaliação da solubilidade proteica das partículas. A amostra foi centrifugada a 35735 G por

20 minutos (centrífuga sorvall RC5C, rotor SM-24, Sorvall Instruments, Newton, CT). A partir do sobrenadante quantificou-se o teor de proteína que se despreendeu das micropartículas, através do método de Kjeldalh (AOAC,2006). Foi preparado um branco, contendo apenas SGA e a pancreatina para descontar o nitrogênio proveniente de enzimas. A solubilidade proteica foi calculada pela quantidade determinada no sobrenadante, comparada a composição proteica inicial presente na micropartícula. Foi avaliada a morfologia das partículas após os tempos de 2, 7 e 24 horas de simulação gastroentérica por microscopia óptica conforme item 2.2.2.3.

2.2.4 Análise estatística

O cálculo da análise de variância, ANOVA, foi realizado pelo programa estatístico SAS versão 9.2 e as comparações entre os valores das médias foram avaliadas de acordo com o teste TUKEY, considerando um nível de significância de 5%. As partículas foram produzidas em três lotes independentes e todas as determinações foram feitas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da estabilidade das micropartículas

Baseado nos resultados de adsorção proteica apresentados no capítulo anterior, foi selecionado o ensaio no qual houve maior adsorção proteica (%) das partículas quando recobertas com as diferentes proteínas estudadas. Para tanto, utilizou-se o para o recobrimento a concentração de 8% de gelatina de pele de tilápia (GPT), de isolado proteico de soja (IPS) e da mistura das duas proteínas (IPS:GPT). Os ensaios foram realizados utilizando partículas úmidas e recém-processadas. Mediante a escassez de trabalhos com esses biopolímeros, é importante o estudo tanto dos parâmetros para a

formulação de partículas recobertas com esses tipos proteínas, como é necessário a avaliação das modificações que possam ser geradas quando estas são colocadas em diferentes condições ambientais.

Estudos avaliando as possíveis alterações promovidas pela variação do pH do meio, pela temperatura, por diferentes concentrações osmóticas, e pela presença de enzimas são relevantes para direcionar a aplicação da partícula, além de predizer as condições de solubilização destas (DE VOS *et al.*, 2010).

3.1.1. Morfologia e solubilidade proteica da micropartícula sob diferentes concentrações molares de NaCl.

A análise do comportamento das partículas sob diferentes concentrações molares de NaCl é capaz de revelar a influência que a força iônica possa ter sobre a interação eletrostática da proteína com a partícula de pectina e alginato, predizendo as características de solubilidade e inchamento da partícula.

Modificações no tamanho das partículas foram ocasionadas com o aumento da concentração de cloreto de sódio em solução, as quais podem ser observadas na figura 1. As partículas apresentaram variação de tamanho de 146,77 a 188,20 μ m quando recobertas com gelatina de pele de tilápia, de 137,60 a 147,60 μ m quando recobertas com o isolado proteico de soja, e de 131,30 a 146,53 μ m com a utilização da mistura das duas proteínas (IPS:GPT), ao serem submetidas a soluções aquosas com concentrações molares de NaCl variando de 0 a 584 mM por 12 horas.

As partículas recobertas com GPT apresentaram aumento significativo de tamanho ($p < 0,005$) quando submetidas à concentração de 400 mM alterando de 137,70 μ m (200mM) para 188,15 μ m. Porém, quando aumentada a concentração molar para 584mM o tamanho foi similar a concentração de 400mM, resultando no valor de 188,20 μ m.

As partículas recobertas com IPS tiveram aumento significativo quando submetidas a concentração de 584 mM, resultando em uma tamanho de 147,60 μ m. As partículas recobertas com a mistura de isolado proteico de soja e a gelatina (IPS:GPT) apresentaram aumento significativo quando submetidas a 200mM e 400mM. Provavelmente esse

acréscimo no tamanho das partículas é decorrente do aumento das forças eletrostáticas repulsivas promovido pelo aumento da força iônica. É conhecido que o efeito da força iônica e do pH nas interações eletrostáticas pode atuar induzindo o inchamento ou encolhimento de partículas (OCHS *et al.*, 2010).

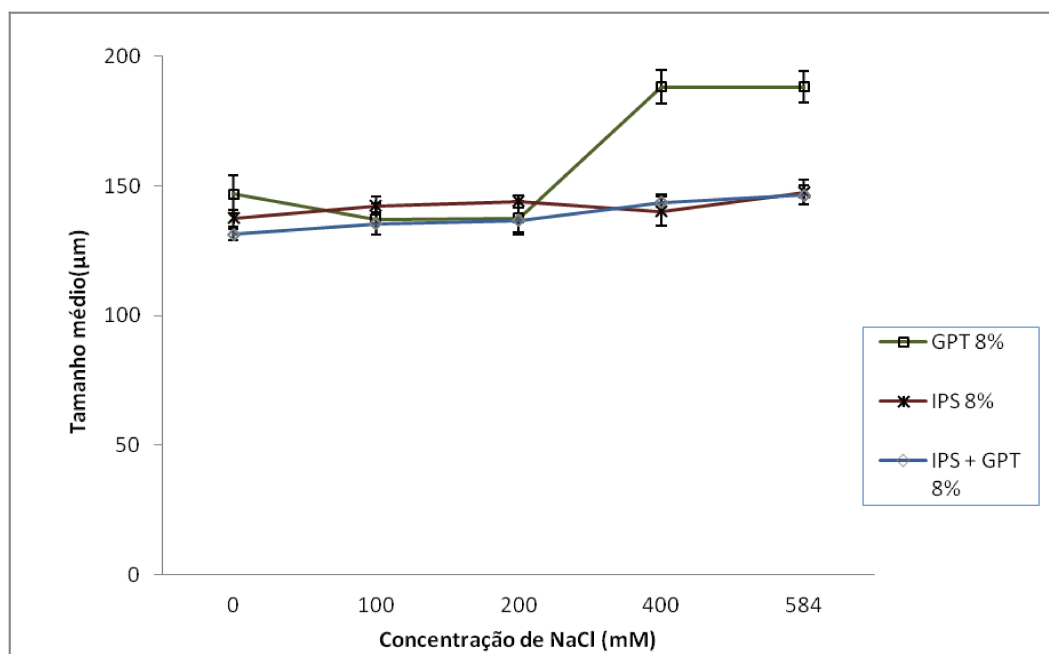


Figura 1. Tamanho médio (μm) das partículas úmidas de pectina e alginato recobertas com GPT, IPS e IPS:GPT, suspensas em diferentes concentrações molares de NaCl, mantidas por 12 horas de agitação.

O aumento na concentração molar de NaCl em solução produziu diferentes efeitos sobre a solubilidade proteica das partículas. Esses efeitos podem ser observados na Tabela 1.

Foram observados um aumento da solubilidade proteica da superfície da partícula para o meio, com o aumento da concentração molar de cloreto de sódio. A solubilidade variou de 1,21 a 69,18%, de 1,49 a 6,85% e de 1,58 a 13,48% nas partículas recobertas por GPT, IPS e IPS:GPT, respectivamente, quando submetidas as diferentes concentrações de NaCl.

A adição de altas concentrações molares de NaCl pode influenciar a permeabilidade da partícula, mediante a ruptura das ligações entre os polieletrólitos de cargas opostas, alterando não somente o tamanho das partículas, podendo ocasionar o inchamento destas, como pode ocorrer a solubilização da proteína para o meio salino (SHE et al., 2010).

Tabela 1- Teor de proteína solúvel (%) das micropartículas obtidas por interação eletroestática suspensas em soluções aquosas com diferentes concentrações de NaCl.

| Amostra | % proteína solúvel | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | sem sal | 100 mM NaCl | 200 mM NaCl | 400 mM NaCl | 584 mM NaCl |
| GPT _{Part} | 1,21 ± 0,36 ^{Ac} | 5,69 ± 0,48 ^{Ad} | 54,64 ± 1,01 ^{Ac} | 63,73 ± 1,82 ^{Ab} | 69,18 ± 0,96 ^{Aa} |
| IPS _{Part} | 1,49 ± 0,45 ^{Ad} | 4,46 ± 0,67 ^{Bc} | 4,32 ± 0,59 ^{Cc} | 5,66 ± 0,59 ^{Cb} | 6,85 ± 0,45 ^{Ca} |
| IPS:GPT _{Part} | 1,58 ± 0,57 ^{Ad} | 5,30 ± 0,43 ^{Ac} | 5,62 ± 0,22 ^{Bb} | 13,05 ± 0,43 ^{Ba} | 13,48 ± 0,6 ^{Ba} |

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

** As partículas utilizadas nesse experimento apresentaram um total de proteína inicial de, respectivamente, GPT_{Part}: 59,84 ± 0,85 IPS_{Part}: 50,14 ± 0,50 e IPS:GPT_{Part}: 51,30 ± 1,55.

As partículas recobertas com GPT sofreram maiores perdas proteicas comparadas aos demais tipos de partícula (IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part}), sofrendo alteração significativa ($p < 0,05$) a partir da concentração de 200 mM de NaCl, alcançando uma solubilidade máxima de 69,18% quando submetidas a concentração 584 mM, revelando uma maior susceptibilidade quando exposta a maiores forças iônicas. Esse resultado provavelmente é decorrente da estrutura química da gelatina possuir uma conformação aberta, com aminoácidos dispostos de forma aleatória na cadeia peptídica, o que facilita a desestabilização da interação da proteína com a partícula (CHOI & REGENSTEIN, 2000). Outra analogia ao resultado obtido pode ser feito, com relação ao processo de obtenção desse tipo de gelatina, pois quando há um aumento na concentração de NaCl, maior é o

rendimento da extração, ou seja, a gelatina é um produto bastante solúvel em condições salinas (GIMÉNEZ *et al.*, 2005).

A partícula recoberta com IPS apresentou uma menor solubilidade proteica em altas concentrações molares de sal (584mM), com manutenção de 94,34% da proteína aderida na partícula, uma possível justificativa é que a configuração química globular e organizada da proteína, que confere uma maior resistência a entrada dos íons salinos, dificultando assim a solubilização proteica. A literatura descreve uma diminuição da solubilidade proteica de proteínas globulares quando são utilizadas concentrações acima de 500mM de cloreto de sódio (RENKEMA *et al.*, 2002).

As partículas recobertas com a mistura de proteínas (IPS:GPT) apresentaram uma solubilidade de 13,48% quando submetidas a alta concentração de sal (584 mM). Foi obtida uma solubilidade de valor intermediário comparado aos resultados obtidos com as partículas recobertas somente com GPT ou IPS. Talvez pela mistura de proteínas globulares e abertas, o efeito de solubilização proteica foi minimizado, pois a proteína da soja tenha conferido uma maior resistência à solubilização proteica na superfície a partícula de pectina e alginato, permitindo assim que cerca de 86,52% da proteína continuasse adsorvida na partícula.

Na observação das microscopias ópticas, independente da concentração de NaCl empregada, após 12 de horas de imersão na solução salina, mesmo com a solubilidade proteica, aparentemente todas as partículas mantiveram integridade, com a manutenção do conteúdo lipídico no interior da partícula.

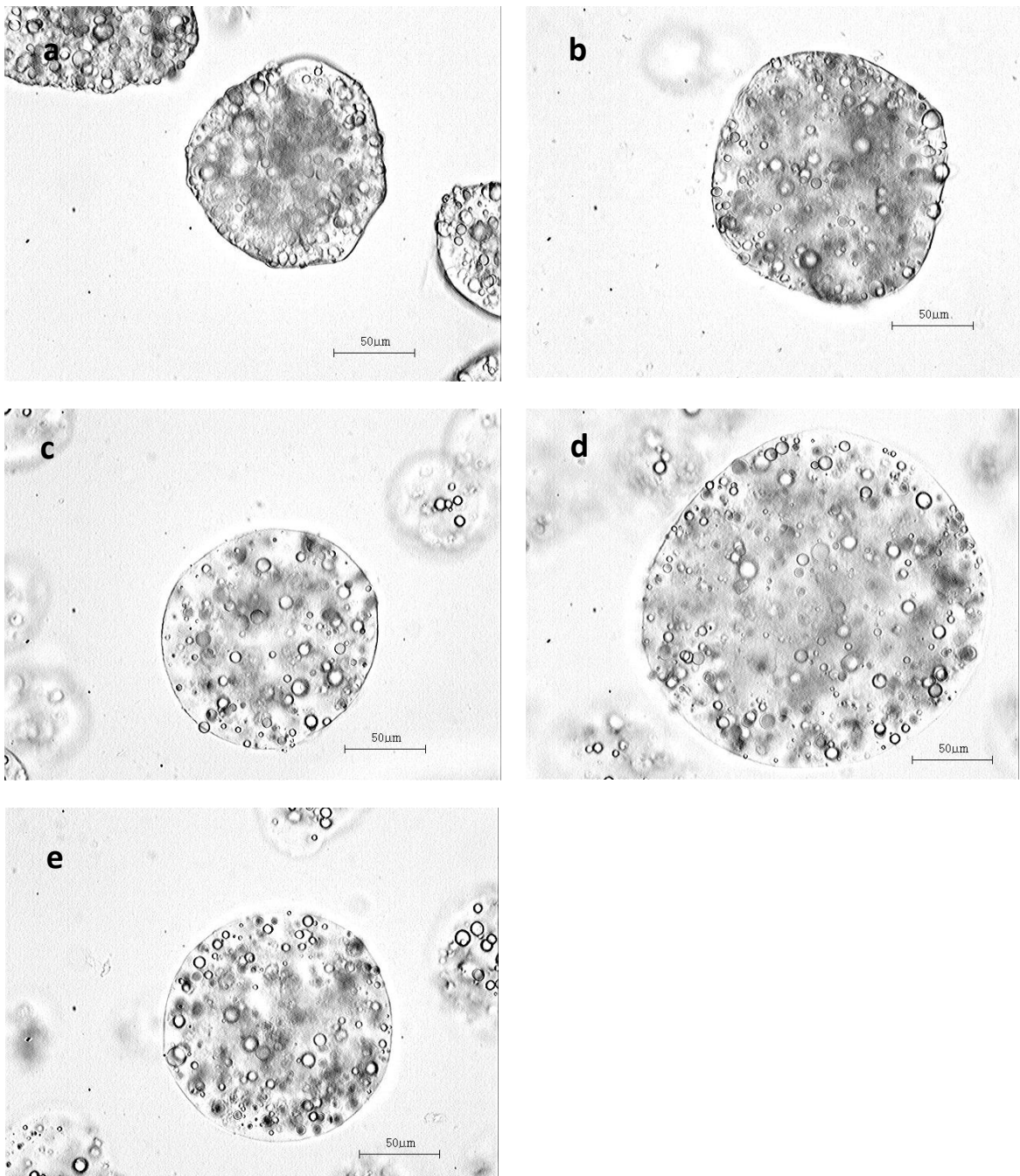


Figura 2. Microscopia óptica das partículas recobertas com GPT 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas.

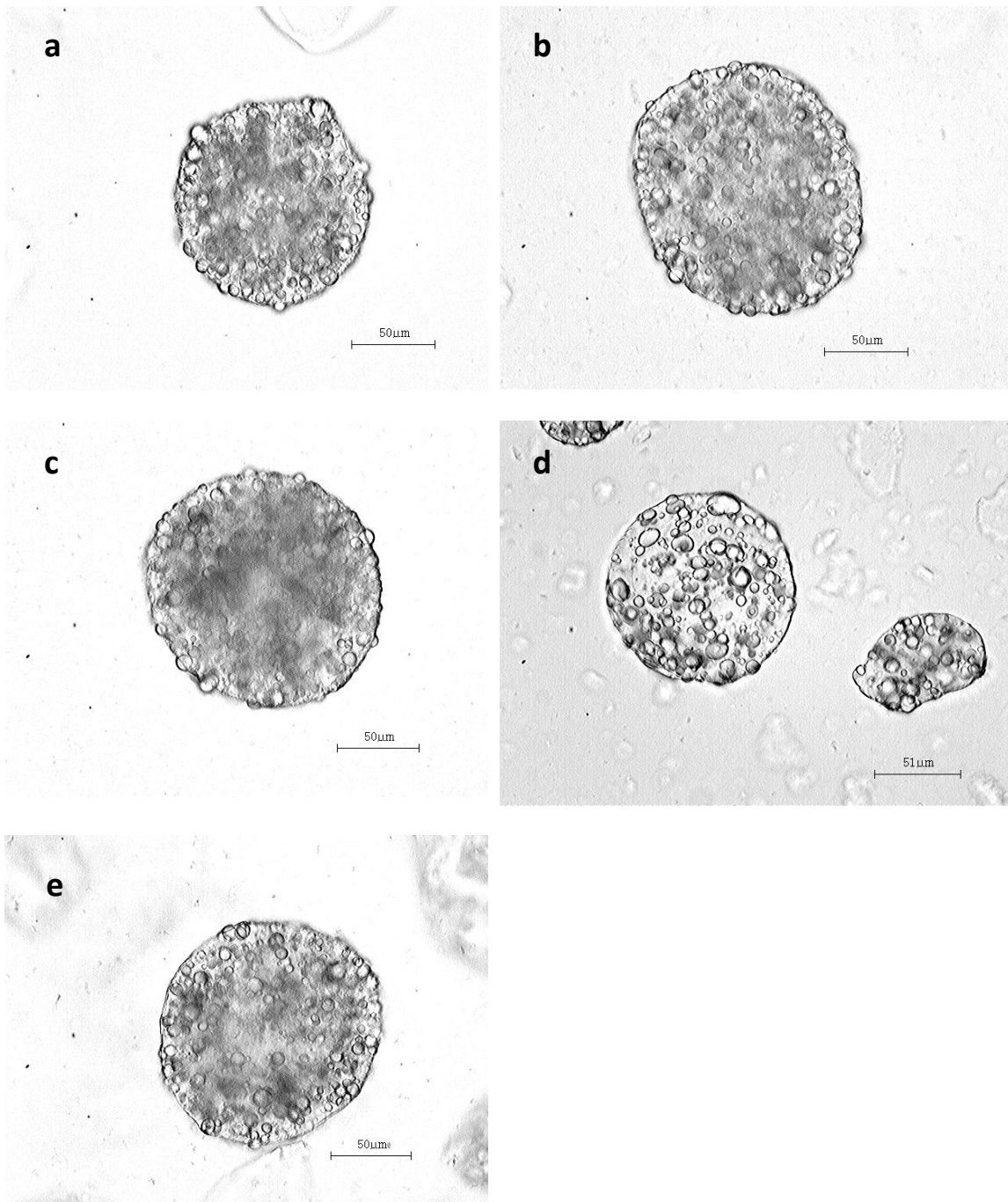


Figura 3. Microscopia óptica das partículas recobertas com IPS 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas.

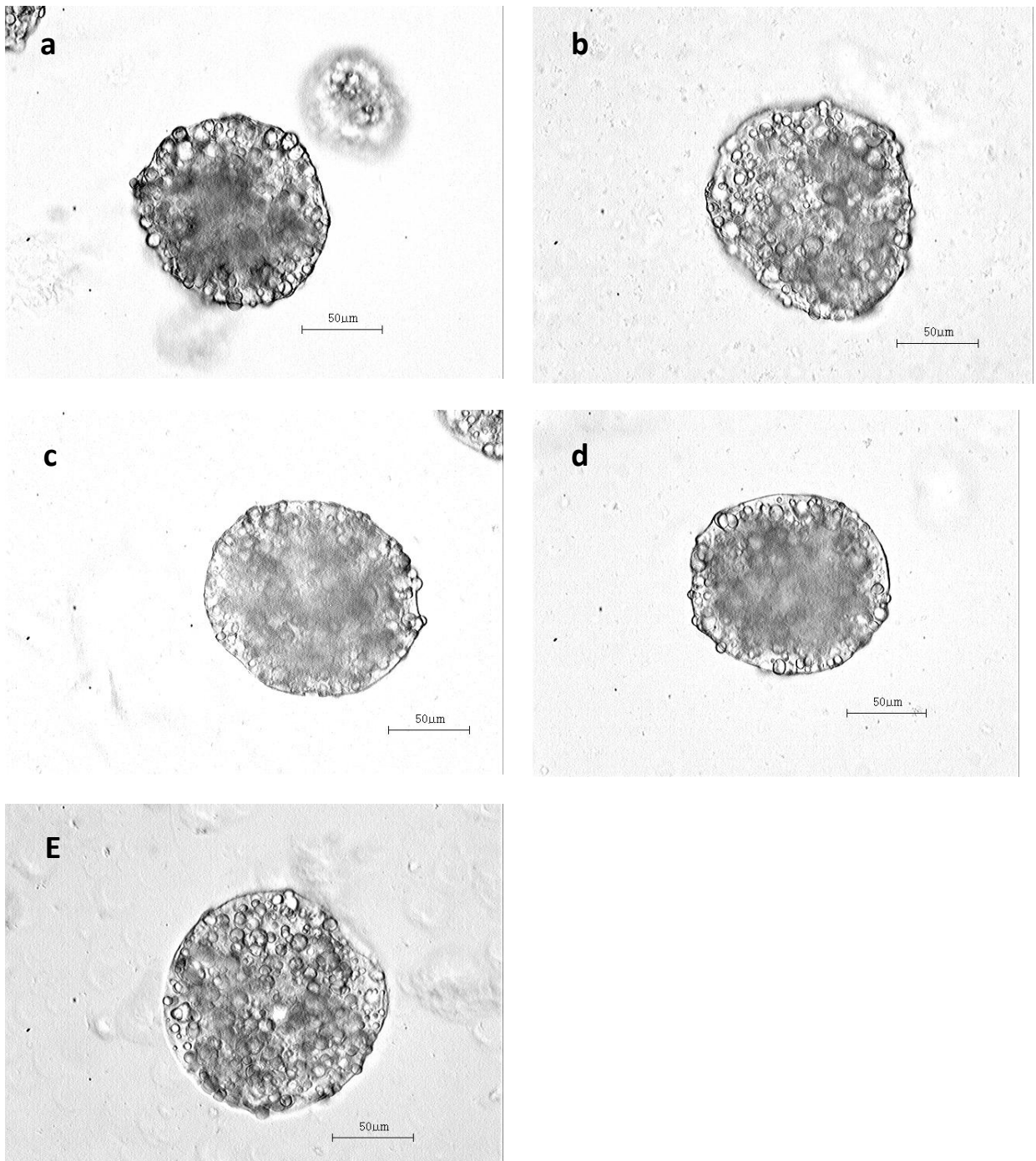


Figura 4. Microscopia óptica das partículas recobertas com IPS:GPT 8% submetidas a diferentes concentrações molares de NaCl: a) sem sal; b) 100 mM; c) 200mM; d) 400 mM; e) 584 mM, após 12 horas.

Na morfologia das partículas recobertas com a gelatina de pele de tilápia (Figura 2), é possível observar a perda de parte da camada proteica na concentração 200 mM de sal, com uma visível diminuição da espessura da parede ao redor da partícula. Quando a partícula foi submetida a 584mM de NaCl, mesmo com a alta solubilidade proteica, cerca de 69,18%, a partícula manteve sua integridade, com o material lipídico disperso em seu interior. Essa morfologia foi similar ao observado com as partículas recobertas com o isolado proteico de soja e com a mistura das proteínas (IPS:GPT), independente da quantidade de proteína liberada no meio salino, mantendo-se íntegra, com formato arredondado e com o recheio lipídico retido no seu interior.

3.1.2. Morfologia e solubilidade proteica da micropartícula sob diferentes valores de pH

A avaliação da resistência de partículas frente a diferentes valores de pH mostra-se relevante diante da diversidade de aplicações industriais que estas possam ter, pois dependendo do produto no qual possam ser inseridas, as condições do meio podem variar entre condições ácidas, neutras e alcalinas.

Para a avaliação do efeito do pH, partículas úmidas recém produzidas de alginato e pectina recobertas com as diferentes soluções de proteína (GPT, IPS e IPS:GPT), foram dispersas em pH 1, 4 e 7. Após 12 horas de imersão sob agitação constante, foram avaliados o tamanho médio das partículas e a solubilidade proteica, sendo os resultados apresentados na Figura 5 e na Tabela 2, respectivamente.

O comportamento de inchamento das partículas foi diferente em cada tipo de recobrimento proteico. As partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tamanho médio quando solubilizadas em pH 1, enquanto que em pH 4 e pH 7 o tamanho manteve-se similar ao tamanho original que foi de $146,40\mu m$ (Tabela 2). As partículas recobertas com o isolado proteico (IPS_{Part}) mantiveram o tamanho similar ao da partícula inicial ($138,73\mu m$) quando submetidas aos pHs 1 e 4, sofrendo uma diminuição significativa em pH 7 ($123,37\mu m$).

Esse comportamento foi similar as partículas recobertas com a mistura das duas proteínas (IPS:GPT_{Part}) Estas sofreram uma redução significativa de tamanho ($p < 0,05$) quando submetidas as condições alcalinas, passando de 140,53 μm para 117,46 μm em pH 7, e houve a manutenção do tamanho similar ao inicial quando submetida as outras condições de pH.

Esses resultados são diferentes aos relatados pela literatura, onde é sugerido que partículas quando submetidas a pHs altamente ácidos, os grupos carboxílicos dos polissacarídeos apresentam-se não dissociados, induzindo a proteína a apresentar uma grande quantidade de cargas positivas, o que deveria provocar repulsão eletrostática, e consequente aumento no tamanho médio das partículas (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008)

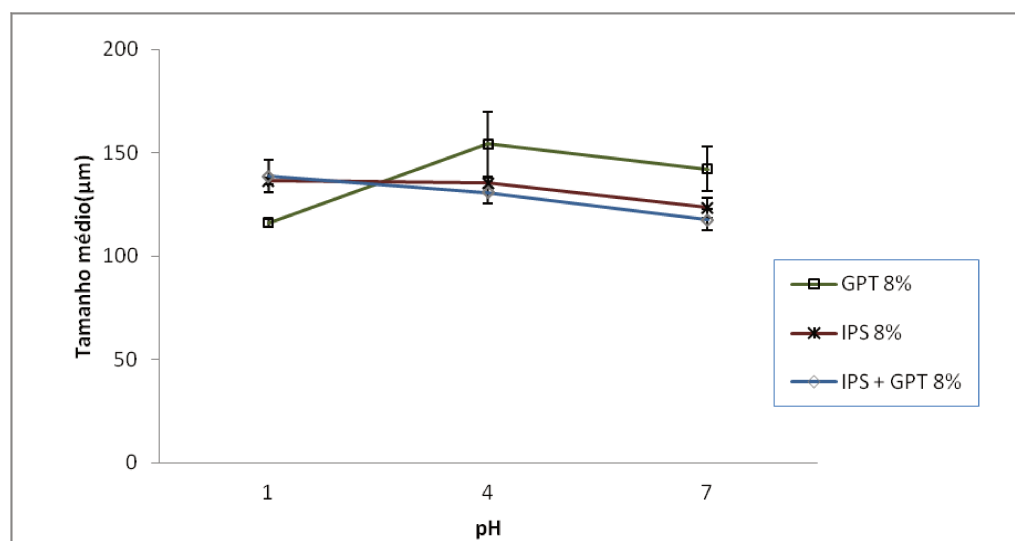


Figura 5. Tamanho médio (μm) das partículas úmidas de GPT_{Part}, IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part} suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH por 12 horas de agitação.

Provavelmente nas partículas IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part} a interação eletrostática responsável pela adsorção da proteína na superfície tenha sido intensa e estável, pois mesmo em pH 1, estas foram tão resistentes ao ponto de impedir o acesso de grupos H⁺, e desta forma não ocorreram mudanças na carga da proteína, impedindo assim a repulsão

eletroestática e o possível inchamento da partícula. Em relação ao resultado obtido com as partículas recobertas com a gelatina de peixe de tilápia, estudos conduzidos por Rosenberg & Lee (2004) verificaram um comportamento similar, no qual ao observar o grau de inchamento de partículas de WPC recobertas com uma camada de alginato, onde foram encontrados tamanhos menores quando solubilizadas em pH 2,5, enquanto que houve um maior inchamento das partículas a medida que o pH aumentava até a condição alcalina (pH 7).

Na avaliação da solubilidade proteica das partículas, observou uma considerável solubilização da proteína quando estas foram submetidas a condições de extrema acidez. No valor de pH 1, as partículas IPS_{Part} e $IPS:GPT_{Part}$ apresentaram uma perda de 15,48% e 13,05% da proteína adsorvida, respectivamente, enquanto que a GPT_{Part} apresentou perdas muito maiores, atingindo a 85,54% (Tabela 2). Essa alta perda proteica nas partículas recobertas pela gelatina de pele de tilápia também pode justificar a diminuição de seu tamanho quando submetidas a esse valor de pH (Figura 5).

Tabela 2- Teor de proteína solúvel (%) das diferentes micropartículas de interação eletroestática suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH.

| Amostra | % proteína solúvel | | |
|------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | pH 1 | pH 4 | pH 7 |
| GPT_{Part} | 85,54 ± 1,45 ^{Aa} | 1,33 ± 0,48 ^{Bb} | 2,40 ± 0,03 ^{Ab} |
| IPS_{Part} | 15,48 ± 0,97 ^{Ba} | 2,83 ± 0,45 ^{Ab} | 2,53 ± 0,45 ^{Ab} |
| $IPS:GPT_{Part}$ | 13,05 ± 0,43 ^{Ca} | 3,01 ± 0,65 ^{Ab} | 2,86 ± 0,57 ^{Ab} |

*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 utilizadas nesse experimento apresentaram um total de proteína inicial, respectivamente, GPT_{Part} : 59,84 ± 0,85; IPS_{Part} : 50,14 ± 0,50 e $IPS:GPT_{Part}$: 51,30 ± 1,55.

As principais justificativas pela alta solubilidade da gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) comparada as partículas de IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part} pH 1, além de sua característica altamente hidrofílica, pode estar no fato de sua estrutura química ser aberta facilita uma maior interação com os íons H⁺, aumentando sua solubilidade em meio ácido, além das condições de processamento utilizadas para esse tipo de gelatina, uma vez que esta foi produzida sob hidrólise ácida (ARVANITOYANNIS, 2002; POPPE, 1997).

As suspensões de IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part} sob as condições de pH 1 apresentaram uma menor solubilidade proteica. Esse resultado pode ter sido decorrente das características estruturais do isolado de soja, apresentando uma conformação globular das proteínas, portanto mais resistente ao ataque de íons H⁺ (RENKEMA *et al.*, 2002; SCHMIDT & VAN MARKWIJK, 1993), efeito semelhante observado para as partículas recobertas com a mistura dos tipos de proteína (IPS:GPT_{Part}). Aparentemente o comportamento das proteínas globulares constituintes do isolado proteico de soja foi predominante quando a mistura de proteínas foi utilizada.

Em relação ao ensaio utilizando o pH 4 e pH 7 o comportamento dos diferentes tipos de proteína foi similar, havendo uma baixa solubilidade proteica, indicando uma maior estabilidade das proteínas utilizadas frente as condições de pH pouco ácidas e alcalinas (Tabela 2). A partícula recoberta com a gelatina de pele de tilápia apresentou uma menor solubilidade proteica ($p < 0,05$) em pH 4, comparada as IPS_{Part} e IPS:GPT_{Part}. Provavelmente esse resultado é devido ao processo de interação eletrostática com a gelatina ter ocorrido no pH 4, ou seja, esse tipo de partícula apresenta maior resistência quando submetida as mesmas condições em que ocorreu a complexação proteica com a superfície da partícula de pectina e alginato. As partículas recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{Part}) apresentaram baixa solubilidade (cerca de 2,53 %). Além do efeito eletrostático, interações hidrofóbicas podem ter auxiliado na forte resistência a solubilização proteica. A presença de uma região hidrofóbica no núcleo da estrutura globular de proteína de soja, permite que mesmo sob condições alcalinas esta seja capaz de resistir à desnaturação, mantendo-se fortemente ligada na partícula (MOHAMED & XU, 2003).

Na análise das microscopias pode ser observado que a morfologia das diferentes partículas foram similares, independente do valor de pH estudado (1,4 e 8), apresentando formato arredondado e com a manutenção do material lipídico espalhado no seu interior (Figura 6).

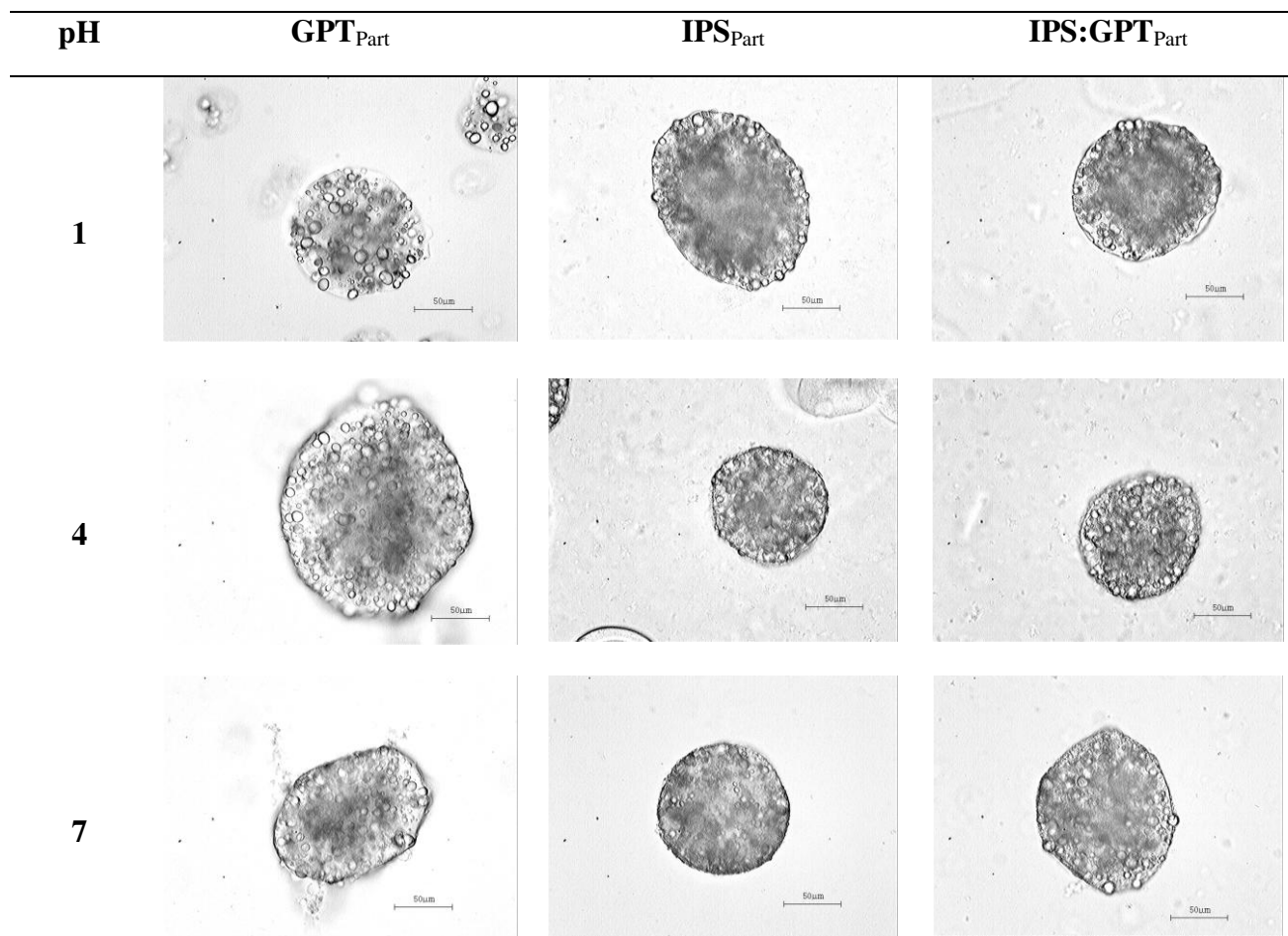


Figura 6. Microscopias das micropartículas suspensas em diferentes pHs sob agitação por 12h.

A partir das imagens de microscopia, pode ser observado que mesmo com a alta solubilidade proteica da partícula recoberta com a gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) observada em pH 1, a estrutura esférica da partícula não foi danificada. Porém, sua redução de tamanho pode ser evidenciada quando comparada as microscopias em pH 4 e pH 7. A

partir dessa avaliação pode-se perceber que independente do valor da solubilidade proteica da partícula, ou seja, se esta foi alta ou baixa, as partículas mantiveram sua estrutura íntegra, com o material encapsulado retido em seu interior, indicando que a estrutura da partícula de gelificação iônica não foi sensibilizada pelas condições de pH estudadas.

3.1.3. Avaliação da solubilidade proteica das micropartículas em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

Para a avaliação do comportamento das partículas frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, foram produzidas partículas de pectina e alginato (PEC:ALG_{Part}), onde estas foram avaliadas qualitativamente através da modificação na sua morfologia por microscopia óptica. Adicionalmente, as partículas de alginato e pectina recobertas com as proteínas, foram avaliadas pela sua morfologia e pela quantificação do percentual de proteína que se despreendeu após as condições simuladas no período de 24 horas.

As partículas de alginato e pectina (PEC:ALG_{Part}) sem revestimento proteico, após o ensaio gastroentérico permaneceram intactas, apresentando resistência ao pH e as enzimas gástricas e entéricas (Figura 7).

A análise microscópica revela a manutenção do recheio lipídico no interior da partícula. A manutenção da integridade das partículas pode estar relacionada com a intensa interação dos grupos carboxílicos do alginato e da pectina com os íons cálcio durante o processo de gelificação (BRACCIANI & PÉREZ, 2001). A observação do processo de inchamento das partículas nas condições intestinais é resultante da presença de sais, que leva a uma maior repulsão eletrostática entre os grupos carboxílicos e os contra-íons, mas pode também ocorrer devido a uma troca entre os íons cálcio com os íons sódio da solução tampão fosfato (BAJPAI & TANKHIWALE, 2006; LIN *et al.*, 2005).

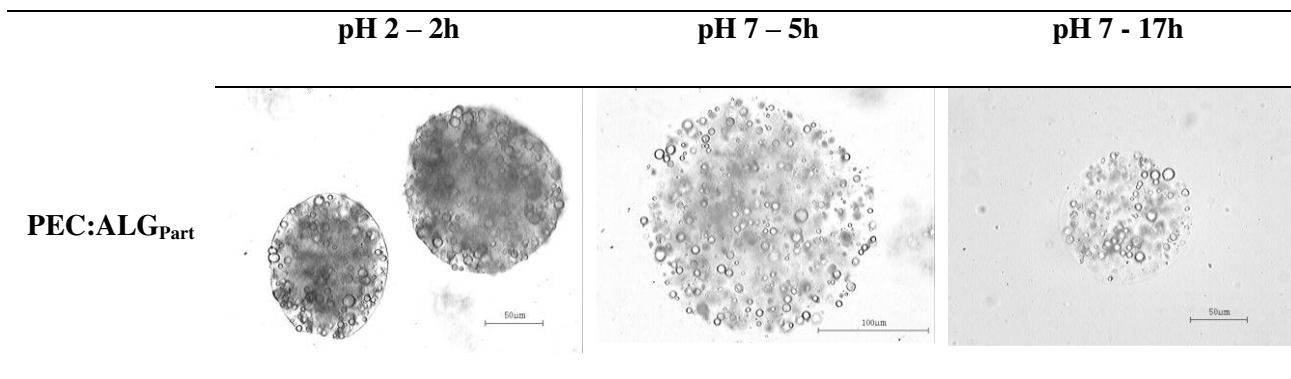


Figura 7. Morfologia das partículas de alginato e pectina durante a simulação gastrointestinal, após 2 horas em SGA com pepsina em pH 2 a 37 °C; após 5 e 17 horas com pancreatina em pH 7 a 37°C, totalizando 24h de ensaio.

Possivelmente a digestão total das partículas de alginato e pectina poderia ser alcançada *in vivo*, através do processo fermentativo desempenhado pelas bactérias da microflora presente na região do cólon, necessitando de um tempo maior de permanência da partícula em ambiente intestinal, para que esta seja desestabilizada, e assim ocorra a liberação total do composto encapsulado (LIU *et al.*, 2007).

Em relação às partículas recobertas com as proteínas, diferenças expressivas foram observadas no ambiente gástrico e entérico simulados, revelando a influência que o tipo de proteína e seu processo de solubilização promovem na estrutura da partícula de alginato e pectina. Essas diferenças morfológicas podem ser visualizadas na Figura 7, enquanto que a solubilidade proteica é apresentada na Tabela 3.

As partículas de alginato recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}), após 2 horas de simulação em pH 2 com pepsina, apresentaram uma perda de proteína de 78,75%. Essa solubilidade foi significativamente maior ($p < 0,05$) comparada aos resultados obtidos com as partículas recobertas com IPS e IPS:GPT, que tiveram uma perda de proteína de 62,51 e 65,05 %, respectivamente, nas condições gástricas (Tabela 3). Essa diferença pode ser justificada pela atuação preferencial da pepsina por proteínas altamente desordenadas, uma vez que a gelatina apresenta conformação aberta, com a disposição aleatória dos

aminoácidos, facilitando assim a sua atuação (SCHMIDT & VAN MARKWIJK, 1993). Outro fator importante na alta solubilização da gelatina é seu baixo ponto de fusão, que promove sua liquefação na temperatura de 37°C, um ponto importante, pois esta simula a temperatura do corpo humano sob condições normais (SAKAI *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Teor de proteína solúvel (%) das micropartículas após avaliação em condição gastrointestinal simulada.

| Amostra | % proteína solúvel | | |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | pH 2, 2h | pH 7, 5h | pH 7, 17h |
| GPT _{Part} | 78,75 ± 1,03 ^{Ac} | 94,15 ± 2,57 ^{Ab} | 97,69 ± 1,81 ^{Aa} |
| IPS _{Part} | 62,51 ± 1,68 ^{Bc} | 84,09 ± 2,52 ^{Bb} | 95,30 ± 3,03 ^{Aa} |
| IPS:GPT _{Part} | 65,05 ± 1,22 ^{Bc} | 86,74 ± 2,15 ^{Bb} | 95,95 ± 2,44 ^{Aa} |

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

**As partículas utilizadas nesse experimento apresentaram um conteúdo de proteína inicial (%): GPT_{Part}: 60,05 ± 0,38; IPS_{Part}: 49,91 ± 0,42 e IPS:GPT_{Part}: 51,34 ± 1,58.

A proteína do isolado de soja apresenta estrutura globular com parte dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos no interior da cadeia. A pepsina atua preferencialmente em os aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos disponíveis e, portanto, a conformação dos aminoácidos do isolado de soja dificulta a ação da enzima (CHEN & SUBIRADE, 2005). Entretanto a condição de pH ácido auxilia na destruição da estrutura nativa das proteínas da soja, pela quebra das ligações dissulfeto, facilitando a ação da pepsina (BOONVISCUT & WHITAKER, 1976), dessa forma ocorre a solubilização parcial da proteína presente na superfície da partícula (IPS_{Part}). Na avaliação do comportamento da partícula recoberta com a mistura das proteínas (IPS:GPT_{Part}), observa-se que a característica da proteína da soja foi

predominante, sendo a solubilidade proteica similar ($p > 0,05$) a da partícula recoberta somente com o isolado proteico de soja.

Independente do valor da solubilidade proteica das partículas na simulação das condições gástricas (pH 2, 2h), as partículas recobertas com IPS, GPT e IPS:GPT permaneceram intactas, conforme observado nas microscopias ópticas (Figura 8). Portanto, mesmo com a alta solubilidade proteica, a estrutura da partícula não foi alterada, havendo a manutenção da forma arredondada e do conteúdo lipídico espalhado em seu interior.

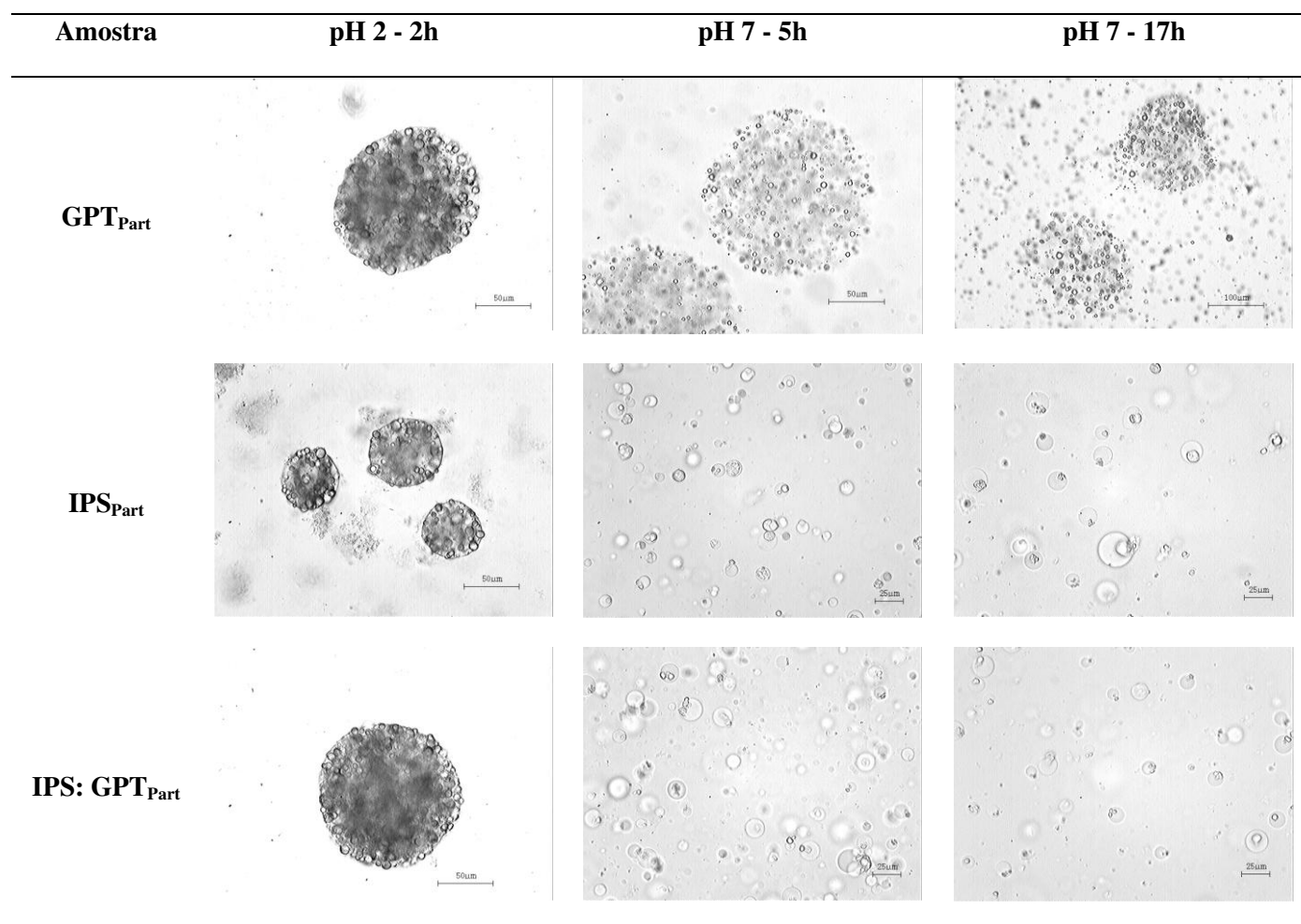


Figura 8. Morfologia das partículas recobertas com proteína durante a simulação gastrointestinal: após 2 horas em SGA com pepsina em pH 2 a 37 °C; após 5 e 17 horas com pancreatina em pH 7 a 37°C; totalizando 24h de ensaio.

Na simulação das condições intestinais, após 5 e 17 horas foram observadas diferenças significativas tanto na morfologia quanto na solubilidade proteica das partículas. A solubilidade proteica variou de 94,15 a 97,69% para as partículas recobertas com GPT, de 84,09 a 95,30% recobertas com IPS e de 86,74 a 95,95% quando utilizada as misturas das duas proteínas (IPS:GPT). Após 5 horas de ensaio, a perda de proteína da superfície para o meio foi maior ($p > 0,05$) nas partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia, comparada às partículas recobertas com o isolado proteico de soja e a mistura das duas proteínas. Porém, após as 17 horas de simulação das condições intestinais, todas as partículas apresentaram uma solubilidade similar ($p > 0,05$), resultando na liberação de praticamente todo o conteúdo proteico da superfície da partícula de alginato e pectina.

Na Figura 8 é possível notar que as partículas recobertas com IPS e IPS:GPT desintegraram-se após 5 horas de ensaio das condições intestinais (pH 7, com pcreatina), liberando todo o seu conteúdo lipídico para o meio. Por outro lado, as partículas recobertas com a gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) mantiveram alguma integridade após 5 horas de ensaio, sofrendo uma parcial desintegração somente após as 17 horas de simulação intestinal, totalizando 24 horas de ensaio gastroentérico.

As partículas recobertas com GPT tiveram comportamento similar às partículas de pectina e alginato sem recobrimento proteico ($PEC:ALG_{Part}$), revelando que a interação da proteína na superfície não desestabilizou completamente as ligações dos ácidos carboxílicos dos polissacarídeos com os íons cálcio, formados no processo de gelificação, havendo a manutenção parcial de sua estrutura mesmo após a simulação das condições intestinais. O recobrimento com as proteínas do isolado de soja e a mistura de proteínas (IPS:GPT) alterou as ligações dos grupos carboxílicos com os íons cálcio, enfraquecendo a estrutura da partícula de pectina e alginato, fazendo com que estas fossem mais frágeis às condições intestinais, solubilizando completamente a partícula.

As partículas de pectina e alginato ($PEC:ALG_{Part}$) sem recobrimento e as partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) apresentaram-se resistentes às condições gástricas (pH 2, com pepsina) e intestinais (pH 7, pancreatina) simuladas. Portanto, a digestão completa da partícula *in vivo* necessitaria de um tempo maior de permanência em ambiente intestinal, onde a partir da fermentação dos polissacarídeos pelas

bactérias da região do cólon, ocorreria a liberação do composto encapsulado (LIU *et al.*, 2007; HOAD *et al.*, 2009). As partículas de pectina e alginato recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{Part}) e com a mistura de proteínas ($IPS:GPT_{Part}$), apesar da alta solubilidade da proteína da superfície da partícula, não foram digeridas pelas enzimas gástricas e permanecem intactas na parte superior do trato gastrointestinal. Porém, quando submetidas às condições intestinais, as imagens microscópicas (Figura 8) comprovam seu rompimento e liberação do material de recheio no meio intestinal.

As pesquisas vêm sendo conduzidas com a finalidade de se obter partículas com diferentes formas de liberação, onde o ativo seja liberado no local de ação e na velocidade de liberação desejada, com a manutenção da funcionalidade do composto encapsulado (CHEN & SUBIRADE, 2005; LIU *et al.*, 2007; HOAD *et al.*, 2009; SAKAI, *et al.*, 2010 GEBARA *et al.*, 2013). Essa diferença no comportamento das partículas frente às condições intestinais é importante para o tipo de aplicação que se objetiva, ou seja, se há a necessidade de um produto que se solubilize rapidamente no intestino, como o caso de ácidos graxos essenciais, ou de liberação lenta, como alguns fármacos e hormônios.

4. CONCLUSÕES

Foram produzidas partículas de pectina e alginato por gelificação iônica, sendo estas recobertas por interação eletroestática utilizando gelatina de pele de tilápia, isolado proteico de soja e a mistura dessas duas proteínas, na concentração de 8% em solução, resultando em partículas com alto teor proteico. O teor de proteína adsorvido nas partículas foi de aproximadamente 60% para o recobrimento com a gelatina de pele de tilápia, de 50% com o isolado proteico de soja e de 51% com a mistura de proteínas (IPS:GPT), e partir das partículas úmidas recém processadas, foi avaliado o comportamento destas a diferentes tratamentos.

Quando submetidas a diferentes condições de sal em solução, houve uma perda proteica da partícula para o meio, à medida que aumentaram-se as concentrações molares

de NaCl. Maior solubilidade proteica foi obtida com a partícula recoberta com gelatina de pele de tilápia, comparado às partículas recobertas com o isolado proteico de soja e com a mistura. A estrutura química da gelatina facilitou o rompimento da interação da proteína com a superfície da partícula. Mesmo com o aumento da força iônica, as partículas se mostram resistentes, independente do tipo de proteína usada e do grau de solubilidade proteica, permanecendo íntegras e com o lipídeo retido no seu interior.

As partículas recobertas com as diferentes proteínas foram estáveis em pH 4 e 7, apresentando uma baixa solubilidade da camada proteica para o meio. A solubilidade da partícula foi maior quando o pH foi alterado para 1, sendo as partículas recobertas com gelatina de pele tilápia mais sensíveis à condição de extrema acidez, com uma perda proteica de 85,54%. Porém, mesmo com as diferentes solubilidades proteicas, as partículas se mantiveram íntegras nas faixas de pH 1 a 7 estudados.

As partículas de alginato e pectina sem recobrimento proteico e partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) foram resistentes as condições gastroentéricas simuladas. As partículas recobertas com o isolado proteico de soja e com a mistura das duas proteínas (IPS: GPT_{Part}) foram parcialmente resistentes às condições gástricas, com uma alta perda proteica, sendo sensíveis a atividade proteolítica do ambiente intestinal, ocasionando a desintegração da estrutura da partícula e a liberação total do óleo encapsulado.

CONCLUSÕES FINAIS

Através da gelificação iônica utilizando a mistura binária de pectina e alginato com posterior recobrimento, com isolado proteico de soja, gelatina de pele de tilápia ou com a mistura dessas proteínas, é possível a formação de partículas com altas adsorções proteicas, que apresentam diferentes funcionalidades.

Após ensaios preliminares, as condições de processamento que otimizaram a interação das cargas da partícula de pectina e alginato com as cargas das proteínas foram: proporção 1:2 e pH 4 para o revestimento com a gelatina de pele de tilápia, e a proporção 1:0,75 e pH 3 para o recobrimento tanto com o isolado proteico de soja quanto para a utilização da mistura de proteínas (IPS:GPT).

Foram testadas as concentrações de 1, 2, 4, e 8% de proteína em solução para o recobrimento por interação eletroestática, resultando em um acréscimo na adsorção proteica sobre a partícula, à medida que aumentava a concentração proteica em solução. Com percentual de 8% de proteína em solução foram alcançadas as adsorções máximas de 61,87%, 47,61% e 52,06% quando recobertas por GPT, IPS e IPS:GPT, respectivamente.

A variação de pH e das concentrações de NaCl influenciaram na solubilidade da camada proteica das diferentes partículas. Em condições de extrema acidez (pH 1) e com o acréscimo na concentração de sal, as partículas apresentaram um aumento na solubilidade proteica. As partículas recobertas com gelatina apresentaram maiores perdas de proteína comparada às partículas constituídas de isolado proteico de soja e da mistura das duas proteínas, indicando a maior resistência da proteína da soja ao ataque de íons H^+ e sobre a variação da força iônica. Independente do tipo de proteína utilizada e do valor da solubilidade proteica obtida, todas as partículas permaneceram íntegras, nas faixas de pH (1- 7) e NaCl (0 – 584 mM) estudadas, com a manutenção da forma esférica e do conteúdo lipídico retido em seu interior.

No ensaio gastroentérico *in vitro*, as partículas de pectina e alginato (PEC:ALG_{Part}) sem recobrimento e as partículas recobertas com gelatina de pele de tilápia (GPT_{Part}) revelaram resistência as condições de pH e enzimáticas que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal, permanecendo com o óleo encapsulado retido em seu interior. As

partículas recobertas com isolado proteico de soja (IPS_{Part}) e com a mistura de proteínas ($IPS:GPT_{Part}$), apesar da alta solubilidade proteica, foram resistentes às condições gástricas, porém quando submetidas às condições intestinais, foram sensíveis a atividade enzimática e desfizeram-se, liberando o material encapsulado.

Os dados comportamentais das partículas frente às condições gastrointestinais simuladas revelam que o tipo de proteína de recobrimento pode refletir nas características de resistência e liberação da partícula, dessa forma auxilia no direcionamento da partícula para a sua aplicação em produtos, mediante a funcionalidade requerida para o composto que será encapsulado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ARVANITOYANNIS, I. S. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In A. Gennadios (Ed.), **Protein-based films and coatings**. Boca Raton: CRC Press Lancaster EUA, p. 275-304, 2002.

AUGUSTIN, M. A., & HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, 38, p.902–912, 2009

BAJPAI S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: part A. **Reactive and Functional Polymer** , v. 66, p. 645-658, 2006.

BOONVISCT, S., & WHITAKER, J. Effect of heat, amylase, and disulfide bond cleavage on the in vitro digestability of soy bean proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, n.6, p1130–1135, 1976.

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

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

CHOI S. S.; REGENSTEIN J. M.; Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 194-199, 2000.

DE VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20 p.292–302, 2010.

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

GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. . Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872-878, 2013.

GIMÉNEZ B.; GÓMEZ-GUILLÉN M.C.; MONTERO P.; The role of salt of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 951-957, 2005.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

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

IYER, C., PHILLIPS, M., & KAILASAPATHY, K. Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate–starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, 493–497, 2005.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v.23 , p.563–576, 2009.

LIN, C. C.; METTERS, A, T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1379–1408, 2006.

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

LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, 2012. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.02.030.

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**, v.42, p.1099–1104, 2009.

MOHAMED, A.; XU, J. Effect of ionic strength and pH on the thermal and rheological properties of soy protein–amylopectin blend. **Food Chemistry**, v.83, p.227–236, 2003.

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.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v.42 p.469– 479, 2013.

NORI, M.P., FAVARO-TRINDADE, C.S., ALENCAR, S.M., THOMAZINI, S.M., BALIEIRO, J.C.C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science Technology**, 44, p. 429–435, 2010.

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

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

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

POPPE, J. Gelatin, In: Thickening and gelling agents for food, New York, Ed. Incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 171-180, 1997.

RENKEMA, J. M. S., GRUPPEN, H., VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6064– 6071, 2002.

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.23-30, 2008.

SARAVANAN, M.; PANDURANGA RAO, K. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808 -816, 2010.

SAKAI, S.; ITO, S.; KAWAKAM, K. Calcium alginate microcapsules with spherical liquid cores templated by gelatin microparticles for mass production of multicellular spheroids. **Acta Biomaterialia**, v.6 , n.8, p.3132 -3137, 2010.

SCHMIDT, D. G.; VAN MARKWJK, B. W. Enzymatic hydrolysis of whey protein. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. **Neth Milk Dairy Journal**, v. 47, p. 15-22, 1993.

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

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

SOUZA, F. N.; GEBARA, C.; 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**, v.49, p. 560-566, 2012.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. LIBECON; Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

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