



FERNANDO TELLO CÉLIS

PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA PRODUZIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA E RECOBERTAS COM PROTEÍNAS

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

FERNANDO TELLO CÉLIS

PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA PRODUZIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA E RECOBERTAS COM PROTEÍNAS

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Alimentos de Nutrição, na área de concentração Consumo e Qualidade de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDO
TELLO CÉLIS, E ORIENTADO PELO PROF. DR.
CARLOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO.

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza – CRB 8/5816

T239p	Tello Célis, Fernando, 1966- Partículas de alginato e pectina produzidas por gelificação iônica e recobertas Com proteínas / Fernando Tello Célis. – Campinas, SP : [s.n.], 2014. Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1. Encapsulação. 2. Gelificação iônica. 3. Interação eletrostática. 4. Oxidação lipídica. 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: Alginate and pectin particles produced by ionic gelation and coated with proteins

Palavras-chave em inglês:

Encapsulation

Ionic gelation

Electrostatic interaction

Lipid oxidation

Área de concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora:

Carlos Raimundo Ferreira Grosso [Orientador]

Ana Silvia Soares Prata

Francisco Benedito Texeira Pessine

Vânia Regina Nicoletti Telis

Antonio Carlos Siani

Data de defesa: 28-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Soares Prata
Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP
Membro Titular

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine
Instituto de Química – UNICAMP
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti Telis
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
Membro Titular

Prof. Dr. Antonio Carlos Siani
Fundação Oswaldo Cruz
Membro Titular

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro Suplente

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Membro Suplente

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues
CPQBA – UNICAMP
Membro Suplente

RESUMO GERAL

A encapsulação permite a formação de estruturas que apresentam propriedades como proteção e liberação controlada do material encapsulado. As características do material encapsulado determinam a escolha do material de parede da matriz encapsulante e da técnica de encapsulação. Proteínas e polissacarídeos têm sido investigados para a formação destas matrizes. Diferentes técnicas de encapsulação produzem partículas com diferentes propriedades. A associação de técnicas de encapsulação permite a obtenção de matrizes com melhores propriedades tecnológicas. A gelificação iônica é uma técnica de encapsulação branda, simples e rápida onde polissacarídeos aniônicos interagem com íons divalentes como o Ca^{2+} para a encapsulação de diversos tipos de compostos, incluindo lipídicos. Neste estudo, pectina e alginato foram utilizados para produção de partículas por gelificação iônica. Na primeira parte do estudo, partículas produzidas por gelificação iônica com alginato ou pectina foram revestidas com proteínas da clara de ovo, do soro do leite e da mistura (1:1) das referidas proteínas utilizando diferentes concentrações de proteínas em solução em pH 4,0. Partículas de alginato aumentaram de tamanho após revestimento proteico enquanto partículas de pectina diminuíram de tamanho. Aumento da concentração da proteína na solução produziu aumento na quantidade de proteína adsorvida e de matéria seca nas partículas. Para o maior nível de adsorção proteica, um óleo modelo contendo alto teor de ácidos graxos insaturados foi utilizado como material de recheio e as partículas avaliadas quanto à estabilidade oxidativa. Partículas sem recobrimento proteico foram menos protetivas e quando recobertas com proteínas, apresentaram menor formação de peróxidos quando clara de ovo foi utilizada. Na segunda parte do estudo as partículas obtidas por gelificação iônica foram recobertas com diferentes quantidades de gelatina tipo A, proteínas do soro do leite e mistura das proteínas (1:1). A complexação eletrostática foi estimada pelo potencial Zeta e pela quantidade de proteína adsorvida, avaliando o efeito do pH e das diferentes relações estequiométricas proteína: polissacarídeo. Partículas que apresentaram maior adsorção proteica foram adicionalmente avaliadas quanto à resistência física e solubilidade proteica quando submetidas a condições gastrointestinais *in vitro*. O aumento da quantidade de proteína em solução produziu aumento da proteína adsorvida produzindo também aumento de tamanho da partícula quando alginato foi utilizado.

Morfologicamente as partículas sem revestimento proteico foram resistentes às condições gastrointestinais *in vitro*. Independente da proteína utilizada partículas com alginato revestidas com proteína mantiveram integridade física após ensaio intestinal simulado e ao contrário partículas com pectina revestidas com gelatina foram destruídas e muito danificadas quando proteínas do soro do leite e mistura gelatina:proteínas do soro do leite foram utilizadas. Quando a solubilidade proteica foi utilizada como parâmetro no ensaio gastrointestinal *in vitro*, partículas de pectina revestidas com gelatina, a mistura proteica e a proteína do soro do leite apresentaram solubilidades no ambiente gástrico de ~ 56, 38 e 37% enquanto as partículas de alginato recobertas liberaram ~ 32, 12 e 11%, respectivamente. No ensaio intestinal simulado, partículas de pectina liberaram praticamente todo o conteúdo proteico adsorvido (> 96%) enquanto partículas de alginato liberaram quantidades superiores a 82%.

Palavras chaves: Encapsulação, gelificação iônica, interação eletrostática, oxidação lipídica.

ABSTRACT

Encapsulation allows the formation of structures with properties such as protection and controlled release of the encapsulated material. The characteristics of the core material determine the choice of the wall material and encapsulation technique. Proteins and polysaccharides have been investigated for the formation of these matrices. Different techniques yield particles with different properties. The association of encapsulation techniques allows obtaining matrices with better technological properties. The ionic gelation is a gentle, simple and rapid encapsulation technique in which anionic polysaccharides interact with divalent ions such as Ca^{2+} for the encapsulation of various types of materials including lipid compounds. In this study, alginate and pectin have been used to produce particles through ionic gelation. In the first part of the study, gelling ionic particles produced with alginate or pectin were coated with proteins from egg white, whey protein and mixture (1:1) of these proteins using different concentrations of proteins in solution at pH 4.0. Particle size increased after coating alginate particles with protein and coated pectin particles had their size reduced. Increasing the protein concentration of the solution produced an increase in the amount of adsorbed protein and dry matter in the particles. For the highest level of protein adsorbed, a model oil containing high content of unsaturated fatty acids was used as core material and the particles evaluated with respect to oxidative stability. Particles without protein coating were less protective and when coated with proteins, showed lower peroxide formation when egg white proteins were used. In the second part of the study the particles obtained by ionic gelation were coated with different amounts of gelatin type A, whey protein and a mixture of both (1:1). The electrostatic complexation was estimated by Zeta potential and the amount of adsorbed protein, assessing the effect of pH and the stoichiometry of the various proteins: polysaccharide ratios. Particles showing higher protein adsorption were further evaluated for physical resistance and protein solubility when subjected to *in vitro* gastrointestinal conditions. The increased amount of protein in solution also increased the adsorbed protein causing an increase in particle size when alginate was used. Morphologically, the protein particles without coating were resistant to gastrointestinal conditions *in vitro*. Independent of protein

used, alginate particles coated with protein maintained physical integrity after intestinal assay, while pectin particles coated with gelatin were destroyed after intestinal assay and damaged when the whey protein or and gelatin: whey protein mixture were used. When protein solubility was used as a parameter in the gastrointestinal *in vitro* assay, pectin particles coated with gelatin, whey protein and gelatin: whey proteins mixture showed solubility in the gastric environment of 56, 38 and 37% while the coated alginate particle released 32, 12 and 11%, respectively. After passage through the intestinal tract, coated pectin particles released substantially all adsorbed protein content (> 96%). Coated alginate particles released quantities above 82%.

Key words: Encapsulation, ionic gelation, electrostatic interaction, lipid oxidation.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE ABREVIACÕES	xxvii
ESTRUTURA DA TESE.....	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 Introdução	14
1.2 Técnicas para obtenção de partículas	15
1.2.1 Gelificação iônica.....	15
1.3 Interações entre biopolímeros	17
1.4 Parâmetros que influenciam a complexação entre proteínas e polissacarídeos	19
1.4.1 Influência da acidez	19
1.4.2 Relação dos biopolímeros	20
1.4.3 Influência da temperatura	20
1.5 Complexação de partículas produzidas por gelificação iônica com polieletrólitos catiônicos	21
1.6 Biopolímeros formadores de partículas	23
1.6.1 Polissacarídeos	23
1.6.1.1 Alginato	24
1.6.1.2 Pectina.....	25
1.6.2 Proteínas.....	26
1.6.2.1 Proteínas da clara de ovo	27
1.6.2.2 Proteínas do soro do leite.....	28
1.6.2.3 Gelatina.....	29
1.7 Oxidação lipídica.....	31
1.8 Resistência das partículas submetidas à passagem pelo trato gastrointestinal.....	32
1.9 Conclusões	34
1.10 Referências.....	35

CAPÍTULO 2 – PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM PROTEÍNAS DA CLARA DE OVO E DO SORO DO LEITE: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	55
RESUMO	56
ABSTRACT	58
2.1 Introdução	60
2.2 Material e métodos	62
2.2.1 Material	62
2.2.2 Métodos	62
2.2.2.1 Caracterização dos biopolímeros.....	62
2.2.2.2 Potencial Zeta.....	63
2.2.2.2.1 Potencial Zeta das soluções	63
2.2.2.2.2 Potencial Zeta das emulsões	63
2.2.2.2.3 Potencial Zeta das partículas de alginato e pectina	63
2.2.2.3 Determinação do teor de cálcio das partículas de alginato e pectina	64
2.2.2.4 Produção de partículas de alginato e pectina	64
2.2.2.5 Recobrimento de partículas de alginato e pectina, com OVA, OVA:WPC e WPC.....	65
2.2.2.6 Características físico-químicas das partículas.....	65
2.2.2.6.1 Composição centesimal das partículas de alginato e pectina, recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC	65
2.2.2.6.2 Eficiência de encapsulação das partículas de alginato e pectina.....	66
2.2.2.6.3 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento de proteínas.....	66
2.2.2.6.4 Morfologia das partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento de proteínas, úmidas e secas	66
2.2.2.6.5 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) de partículas de alginato recobertas com proteínas	67
2.2.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida	67
2.2.2.8 Composição de ácidos graxos do óleo modelo	68
2.2.2.9 Monitoramento da estabilidade oxidativa do óleo modelo livre e encapsulado	68
2.2.2.10 Análise estatística	69
2.3 Resultados e discussão.....	70

2.3.1	Caracterização dos biopolímeros e do óleo modelo	70
2.3.2	Determinação do potencial Zeta das soluções dos biopolímeros.....	71
2.3.3	Determinação do potencial Zeta das partículas de alginato e pectina	74
2.3.4	Teor de cálcio das partículas de alginato e pectina	76
2.3.5	Produção de partículas de alginato e pectina	80
2.3.6	Caracterização das partículas de alginato e pectina	80
2.3.6.1	Teor de umidade das partículas	80
2.3.6.2	Tamanho médio das partículas	80
2.3.6.3	Eficiência de encapsulação das partículas	81
2.3.6.4	Microestrutura e morfologia das partículas	82
2.3.7	Adsorção de proteínas da clara de ovo e do soro do leite em partículas de alginato e pectina.....	84
2.3.8	Elektroforese em gel de poliacrilamida	93
2.3.9	Microscopia confocal de varredura laser	96
2.3.10	Teor de matéria seca das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas.....	99
2.3.11	Tamanho médio, morfologia e microestrutura das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas	99
2.3.11.1	Tamanho médio das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas.....	99
2.3.11.2	Morfologia e microestrutura das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas	102
2.3.12	Monitoramento da estabilidade oxidativa do óleo modelo	106
2.3.13	Conclusões	111
2.3.14	Referências.....	112
CAPÍTULO 3 – PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM GELATINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RESISTENCIA GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>		129
RESUMO		130
ABSTRACT		132
3.1	Introdução	134
3.2	Material e métodos	136
3.2.1	Material	136

3.2.2	Métodos	137
3.2.2.1	Caracterização dos biopolímeros.....	137
3.2.2.2	Determinação do potencial Zeta.....	137
3.2.2.2.1	Potencial Zeta das soluções	137
3.2.2.2.2	Potencial Zeta das emulsões	138
3.2.2.3	Potencial Zeta das relações entre solução de GEL, GEL:WPC, WPC, e emulsão de alginato e pectina	138
3.2.2.4	Complexação eletrostática entre solução de GEL, GEL:WPC, WPC, e partículas de alginato e pectina	139
3.2.2.5	Recobrimento de partículas de alginato e pectina com GEL, GEL:WPC e WPC.....	139
3.2.2.6	Caracterização físico-químicas das partículas	140
3.2.2.6.1	Composição centesimal das partículas de alginato e pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC	140
3.2.2.6.2	Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas de alginato e pectina, com ou sem recobrimento proteico.....	140
3.2.2.6.3	Morfologia das partículas com ou sem recobrimento proteico.....	140
3.2.2.7	Avaliação da solubilidade proteica das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas submetidas às condições gastrointestinais	140
3.2.2.8	Análise estatística	141
3.3	Resultados e discussão.....	142
3.3.1	Caracterização dos biopolímeros.....	142
3.3.2	Potencial Zeta dos biopolímeros	142
3.3.3	Complexação eletrostática entre soluções de GEL, GEL:WPC, WPC e emulsões de alginato e pectina	145
3.3.4	Complexação eletrostática entre soluções de GEL, GEL:WPC, WPC e partículas de alginato e pectina	155
3.3.5	Adsorção de gelatina e proteínas do soro do leite em partículas de alginato e pectina.....	165
3.3.6	Teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC	167
3.3.7	Tamanho médio e morfologia das partículas de alginato e pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC	168
3.3.8	Partículas de alginato e pectina, com ou sem revestimento proteico, submetidas às condições gastrointestinais	172

3.3.9 Solubilidade das proteínas adsorvidas em partículas de alginato e pectina, submetidas às condições gastrointestinais	174
3.3.10 Conclusões	179
3.3.11 Referências.....	180
CONCLUSÕES GERAIS	189

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, pela oportunidade e orientação que possibilitou a realização desta tese. Pela sua competência, paciência, incentivo, pelo seu exemplo de dedicação, entusiasmo, exigência, crítica e criatividade ao discutir as ideias apresentadas, nortearam a finalização desta tese.

Aos integrantes da banca examinadora: Prof^a. Dr^a. Ana Silvia Soares Prata, Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine, Prof^a. Dr^a Vânia Regina Nicoletti Telis, Prof. Dr. Antonio Carlos Siani, Prof^a. Dr^a Adriana Zerlotti Mercadante, Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira e Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, pela atenção e pelas sugestões apresentadas para a finalização desta tese.

A todos os funcionários do DEPAN – Departamento de Alimentos e Nutrição. Meu agradecimento especial a Yara, pela sua ajuda e amizade e a Cidinha por sempre ser atenciosa.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Cosme e Marcos pela dedicação em auxiliá-me quando foi necessário.

A Cinthia pela amizade e apoio incondicional desde que cheguei ao Brasil.

As companheiras de laboratório: Gislaine, Joelma, Talita e Bianca pelos bons momentos compartilhados e vividos durante estes 4 anos.

A CAPES (PEC-PG) pela concessão da bolsa de doutorado.

As empresas CPKelco (pectina), FMC Biopolymer (alginato) e a Salto's (proteínas da clara de ovo) que contribuíram com a doação de materiais utilizados no desenvolvimento desta tese.

A Anton Paar GmbH (Austria) pela medida do potencial Zeta das partículas.

E a todos que de maneira direta e indireta contribuíram para a realização desta tese.

Meus sinceros agradecimentos

Fernando

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Principais tendências no comportamento de misturas de proteínas: polissacarídeos	18
Figura 1.2 - Estrutura química da gelatina	30
Figura 2.3.1 - Potencial Zeta dos biopolímeros (A) solução e emulsão de alginato (B) solução e emulsão de pectina (C) proteínas (OVA, OVA:WPC, WPC) na concentração de 0,2% (m/m), pH 3,0 a 7,0.....	72
Figura 2.3.2 – Fotos obtidas por MO (coluna 1) e MEV (coluna 2) de partículas de alginato e pectina. A e C Barra = 100 μ m. B e D Barra = 10 μ m.	83
Figura 2.3.3 – Fotos obtidas por microscopia confocal de partículas de alginato: Alginato sem coloração e óleo de girassol – vermelho do nilo: A – Óleo – vermelho do nilo; B – observação por transmitância; C – Sobreposição do óleo. Barras = 20 μ m. Observação e captação da foto aproximadamente na metade da altura da partícula.....	84
Figura 2.3.4 – Quantidade de proteína adsorvida e teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC	86
Figura 2.3.5 – Eletroforese em gel SDS-PAGE: A) P _{ALG} e B) P _{PEC} . P – padrões de massa molar, 97,4 kDa fosforilase b, 66,2 kDa albumina sérica, 45,0 kDa ovalbumina, 31,0 kDa anidrase carbônica, 21,5 kDa inibidor de tripsina e 14,4 kDa lisozima. Coluna 1 fração de OVA, coluna 3 fração da mistura OVA:WPC (1:1), coluna 5 fração de WPC	95
Figura 2.3.6 – Fotos obtidas por microscopia confocal de partículas de alginato: OVA-Rodamina + alginato sem coloração (fluorescência observada na cor vermelha) + óleo sem coloração + WPC-FITC (fluorescência observada na cor verde): A – OVA- Rodamina; B – Sobreposição de OVA-Rodamina + WPC- FITC; C – WPC-FITC. Barras = 20 μ m. Observação e captação da foto aproximadamente na metade da partícula.....	98

Figura 2.3.7 – Tamanho médio (μm) das partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento de OVA, OVA:WPC, WPC.....	101
Figura 2.3.8 – Fotos obtidas por MO (colunas 1 e 3) e por MEV (coluna 2) de partículas de alginato recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μm e MEV = 10 μm	104
Figura 2.3.9 – Fotos obtidas por MO (colunas 1 e 3) e por MEV (coluna 2) de partículas de pectina recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μm e MEV = 10 μm	105
Figura 2.3.10 – Variações no índice de peróxido do óleo livre e encapsulado avaliado durante quatro semanas de armazenamento, à 45 °C.	107
Figura 3.3.1 – Potencial Zeta das proteínas (GEL, GEL:WPC e WPC) e emulsões de alginato e pectina, na concentração de 0,2% (m/m).....	144
Figura 3.3.2 – Influência da acidez e da relação $\text{SOL}_{\text{GEL}}:\text{EMUL}_{\text{PEC}}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	147
Figura 3.3.3 – Influência da acidez e da relação $\text{SOL}_{\text{GEL:WPC}}:\text{EMUL}_{\text{PEC}}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	148
Figura 3.3.4 – Influência da acidez e da relação $\text{SOL}_{\text{WPC}}:\text{EMUL}_{\text{PEC}}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	149

Figura 3.3.5 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:EMUL_{ALG}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	151
Figura 3.3.6 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:WPC:EMUL_{ALG}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	152
Figura 3.3.7 – Influência da acidez e da relação $SOL_{WPC}:EMUL_{ALG}$ no aspecto visual e potencial Zeta das misturas. (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	153
Figura 3.3.8 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:P_{PEC}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso	159
Figura 3.3.9 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:WPC:P_{PEC}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	160
Figura 3.3.10 – Influência da acidez e da relação $SOL_{WPC}:P_{PEC}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso	161
Figura 3.3.11 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:P_{ALG}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso	162
Figura 3.3.12 – Influência da acidez e da relação $SOL_{GEL}:WPC:P_{ALG}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.....	163

Figura 3.3.13 – Influência da acidez e da relação $SOL_{WPC}:P_{ALG}$ no aspecto visual das misturas (tamanho em μm indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso	164
Figura 3.3.14 – Fotos obtidas por MO (A, C e E) e MEV (B, D e F) de partículas de alginato recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC na concentração de 8%, de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μm e MEV = 10 μm	170
Figura 3.3.15 – Fotos obtidas por MO (A, C e E) e MEV (B, D e F) de partículas de pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC na concentração de 8%, de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μm e MEV = 10 μm	171
Figura 3.3.16 – Fotos obtidas por MO das partículas de alginato e pectina submetidas à simulação sequencial ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A e C: Imediatamente após exposição ao SGA; B e D: Imediatamente após exposição ao SAI. Barra MO = 100 μm	173
Figura 3.3.17 – Fotos obtidas por MO das partículas de alginato recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC submetidas à simulação sequencial, ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A, C e F: Imediatamente após a exposição ao SGA; B, D e F: Imediatamente após exposição ao SAI. Barra MO = 100 μm	177
Figura 3.3.18 – Fotos obtidas por MO das partículas de pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC submetidas à simulação sequencial, ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A, C e F: Imediatamente após exposição ao SGA; B, D e F: Imediatamente após exposição ao SIA. Barra MO = 100 μm	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1 – Composição centesimal dos biopolímeros (base seca).....	70
Tabela 2.3.2 – Composição de ácidos graxos do óleo modelo.....	70
Tabela 2.3.3 – Potencial Zeta dos biopolímeros na concentração de 0,2% (m/m), pH 4,0.....	74
Tabela 2.3.4 – Teor de cálcio em partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica, em pH 4,0.....	76
Tabela 3.3.1 – Composição centesimal dos biopolímeros (base seca)	142
Tabela 3.3.2 – Relações ótimas entre soluções de proteínas e emulsão de pectina	146
Tabela 3.3.3 – Relações ótimas entre soluções de proteínas e emulsão de alginato	154
Tabela 3.3.4 – Características das partículas de alginato e pectina produzidas em diferentes pHs.....	156
Tabela 3.3.5 – Teor de GEL, GEL:WPC e WPC adsorvidas em partículas de alginato e pectina em função da concentração de proteína em solução (%), pH 4,0.....	167
Tabela 3.3.6 – Teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC em função da concentração de proteína em solução (%), pH 4,0.....	168
Tabela 3.3.7 – Tamanho médio (μm) das partículas de alginato e pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC	169
Tabela 3.3.8 – Solubilidade de GEL, GEL:WPC e WPC adsorvidas em partículas de alginato e pectina após serem submetidas as condições gastrointestinais	176

LISTA DE ABREVIações

ALG	Alginato
EMUL _{ALG}	Emulsão de alginato
EMUL _{PEC}	Emulsão de pectina
GEL	Gelatina
GEL:WPC	Mistura de gelatina e proteínas do soro do leite (1:1)
MO	Microscopia ótica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OVA	Proteínas da clara de ovo
OVA:WPC	Mistura de proteínas da clara de ovo e do soro do leite (1:1)
P _{ALG}	Partículas de alginato
P _{ALG-OVA}	Partículas de alginato recobertas com proteínas da clara de ovo
P _{ALG-OVA:WPC}	Partículas de alginato recobertas com a mistura OVA:WPC
P _{ALG-WPC}	Partículas de alginato recobertas com proteínas do soro do leite
P _{ALG-GEL}	Partículas de alginato recobertas com gelatina
P _{ALG-GEL:WPC}	Partículas de alginato recobertas com a mistura GEL:WPC
PEC	Pectina
pI	Ponto isoelétrico
P _{PEC}	Partículas de pectina
P _{PEC-WPC}	Partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite
P _{PEC-OVA}	Partículas de pectina recobertas com proteínas da clara de ovo
P _{PEC-OVA:WPC}	Partículas de pectina recobertas com a mistura OVA:WPC
P _{PEC-GEL}	Partículas de pectina recobertas com gelatina
P _{PEC-GEL:WPC}	Partículas de pectina recobertas com a mistura GEL:WPC

RM	Relação mássica proteína:polissacarídeo
SGA	Suco gástrico artificial
SIA	Suco intestinal artificial
SOL _{ALG}	Solução de alginato
SOL _{OVA}	Solução de proteínas da clara de ovo
SOL _{OVA:WPC}	Solução de proteínas da mistura OVA:WPC
SOL _{PEC}	Solução de pectina
SOL _{WPC}	Solução de proteínas do soro do leite
WPC	Proteínas do soro do leite

ESTRUTURA DA TESE

Este estudo foi organizado em Capítulos que estão descritos a seguir:

Introdução geral: na introdução estão descritas a justificativa do trabalho com seus objetivos gerais e específicos.

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica: Principais fundamentos teóricos que abrangem este estudo estão concentrados neste Capítulo, referente a biopolímeros biodegradáveis, metodologias utilizadas para elaboração das partículas incluindo a gelificação iônica e a, interação eletrostática e materiais encapsulantes, oxidação lipídica e resistência gastrointestinal.

Capítulo 2 – Partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas da clara de ovo e do soro do leite: obtenção, caracterização e propriedades antioxidantes: neste capítulo estão descritas as etapas de desenvolvimento e caracterização das partículas obtidas por gelificação iônica e posteriormente recobertas com proteínas da clara de ovo, proteínas do soro do leite e uma mistura de proteínas da clara de ovo: proteínas do soro do leite. Após a otimização da adsorção proteica, um óleo modelo foi encapsulado e a estabilidade oxidativa foi avaliada para as partículas com e sem recobrimento com proteínas através do monitoramento do índice de peróxidos formados.

Capítulo 3 – Partículas de alginato e pectina, recobertas com gelatina e proteínas do soro do leite: produção, caracterização e resistência gastrointestinal *in vitro*: neste capítulo são estudados os fatores que determinam a adsorção proteica (potencial Zeta, relações estequiométricas proteína:polissacarídeo, pH e concentração de proteína em solução). Partículas contendo a máxima quantidade de proteína adsorvida foram avaliadas quanto a mudanças morfológicas e solubilidade das proteínas adsorvidas submetidas a um ensaio gastrointestinal *in vitro*.

Conclusões gerais: neste item são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

INTRODUÇÃO GERAL

A encapsulação é uma técnica originada a partir da idealização de um modelo celular, onde o núcleo envolvido por uma membrana semipermeável encontra-se protegido do meio extracelular e, simultaneamente, controla a entrada e saída de substâncias na célula. Na encapsulação, de maneira similar, uma parede isola o material ativo e controla a liberação sob estímulos específicos. Desta maneira, a encapsulação tem por finalidade proteger o conteúdo da cápsula do ambiente, que pode ser destrutivo, permitindo trocas pela membrana (JIZMOTO *et al.*, 1993).

A tecnologia de encapsulação tem sido utilizada em diversas indústrias, como por exemplo, na farmacêutica, agrícola, alimentos, gráfica e cosmética. São diversas as aplicações da encapsulação na indústria de alimentos, incluindo a estabilização de material ativo, controle de reações oxidativas, liberação sustentada ou controlada do princípio ativo, mascaramento de sabores, cores ou odores, aumento da vida de prateleira e proteção contra a perda de componentes nutricionais (ANAL, SINGH, 2007).

Para que a comercialização de cápsulas de grau alimentício seja viável, estas necessitam ser preparadas inteiramente a partir de biopolímeros comestíveis como proteínas e polissacarídeos, por meio de operações de processamento econômicas e confiáveis (BENICHO, ASERIN, GARTI, 2002; BUREY *et al.*, 2008). Existem muitas técnicas disponíveis, sendo que algumas apresentam importância biológica, pois são capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos; dentre estas, a gelificação iônica utilizando polissacarídeos aniônicos como o alginato e pectina se encontra inserida (PEPPAS *et al.*, 2000).

A gelificação iônica ocorre através da reticulação de grupos carboxilato da cadeia polimérica do hidrocolóide com íons divalentes como Ca^{2+} (GLICKSMAN, 1983; HOEFLER, 2004; SMRDEL *et al.*, 2008). Essas matrizes de gel propiciam a encapsulação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (GUZEY, McCLEMENTS, 2007). Entretanto, a alta porosidade da partícula permite, por exemplo, a permeação de oxigênio, que pode inviabilizar a proteção de compostos lipídicos e acelerar a liberação de ativos de baixa

massa molar (SEZER, AKBUĞA, 1999). Para contornar esse inconveniente e melhorar a funcionalidade das partículas a literatura propõe a mistura com outros biopolímeros (DEVI, KAKATI, 2013; KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003) ou o revestimento com uma camada de polieletrólitos com carga oposta, por complexação eletrostática (BURGAIN *et al.*, 2011; GBASSI *et al.*, 2011; HÉBRARD *et al.*, 2009; HÉBRARD *et al.*, 2013).

Alginato e pectina são amplamente utilizadas como agentes encapsulantes para proteção e liberação modificada de compostos bioativos (DRAGET *et al.*, 1998; JAYA, DURANCE, WANG, 2009; THAKUR, SINGH, HANDA, 1997). A utilização destes biopolímeros deve-se à capacidade de formar géis na presença de cátions divalentes em especial íons cálcio e grupos carboxilato do ácido galacturônico (DURAND *et al.*, 1990; ROLIN, 1993) e ácido gulurônico (SMIDSRØD, DRAGET, 1996) da pectina e alginato, respectivamente. Além disso, polissacarídeos aniônicos como alginato e pectina são amplamente utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica, pois não apresentam riscos para o consumo humano (COVIELLO *et al.*, 2007).

Adsorção proteica a superfícies sólidas é usualmente irreversível, conceito ainda sem consenso na literatura (HAYNES, NORDE, 1994) e a maior parte sobre estudos de adsorção proteica foi realizada sobre superfícies planas e superfícies não porosas (SUKHORUKOV *et al.*, 1998) onde a atração eletrostática parece determinar a adsorção de proteínas estruturalmente estáveis sobre superfícies hidrofílicas carregadas (HAYNES, NORDE, 1994). Adsorção de proteínas e interações sobre superfícies sólidas está envolvida em várias situações de interesse científico como compatibilidade de sangue-tecido, incrustação de proteínas na indústria de alimentos, métodos de diagnósticos clínicos antígeno-anti-corpos, biossensores, cromatografia líquida, purificação de proteínas, membranas de diálise, implantes cirúrgicos e sistemas de liberação modificada entre outros (LUNDSTRON *et al.*, 1987; RAMSDEN, 1995).

As proteínas da clara de ovo (DELBEN, STEFANCICH, 1998) e as proteínas de soro do leite (DONNELLY, DECKER, McCLEMENTS, 1998) são duas fontes de

proteínas globulares em produtos alimentícios. A ovalbumina é a principal proteína da clara de ovo, com massa molar de 45,00 kDa. Possui capacidade de formação de gel após aquecimento, sendo frequentemente utilizada como agente estabilizador de emulsão (HAGOLLE *et al.*, 1997; NEMOTO *et al.*, 1993). As proteínas do soro do leite contêm mistura de β -lactoglobulina (82%), α -lactoalbumina (15%) e traços de lactose, albumina e sais, apresentando propriedades emulsificantes, gelificantes e espessantes (DONNELLY, DECKER, McCLEMENTS, 1998).

A gelatina é um biopolímero de estrutura aberta, amplamente utilizada na preparação de produtos farmacêuticos, alimentícios e em aplicações não alimentares como, por exemplo, regeneração de tecidos, indústria cosmética e fotográfica (CHATTERJEE, BOHIDAR, 2008). Além disso, a gelatina é uma proteína derivada do colágeno, com diferentes propriedades que incluem solubilidade em água, biodegradabilidade, biocompatibilidade e carga de superfície em função do pH do meio (YOUNG *et al.*, 2005). Geralmente a gelatina é dividida, com base no processo de produção, em dois tipos: A e B. A gelatina tipo A é produzida a partir de um processo ácido, enquanto a gelatina tipo B é obtida a partir de processo alcalino.

Um dos materiais amplamente utilizados na indústria de alimentos como ingrediente funcional são os ácidos graxos poli-insaturados tendo-se observado um aumento significativo de seu consumo por meio de suplementos dietéticos (O'BRIEN, 2009). Os ácidos graxos poli-insaturados apresentam efeitos benéficos para a saúde como, por exemplo, atuam na prevenção de doenças coronarianas além de apresentarem efeitos sobre o cérebro e o sistema nervoso, bem como estimulam o sistema imunológico (BOISSONNEAULT, 2000; NARAYAN, MIAYSHITA, HOSAKAWA, 2006). No entanto, há na composição destes ácidos graxos elevado teor de poli-insaturados de cadeia longa, os quais são altamente suscetíveis à oxidação. A oxidação lipídica é geralmente induzida pelas condições de processamento e armazenamento, resultando em redução da vida útil do produto, devido à formação de radicais livres ou compostos com sabor indesejável (O'BRIEN, 2009). Uma maneira de proteger os lipídios da oxidação é a encapsulação em matrizes que funcionem como barreira, reduzindo o contato entre o lipídio

e os agentes oxidantes (ABANG, 2012). Neste sentido, recentemente foram desenvolvidas microesferas de alginato para aumentar a estabilidade de óleo de canola (WANG, WATERHOUSE, SUN-WATERHOUSE, 2013) e de azeite de oliva (SUN-WATERHOUSE *et al.*, 2011).

O revestimento com proteínas pode ser utilizado quando se deseja que o princípio ativo seja liberado em áreas específicas do corpo. Um exemplo disso seria a liberação de materiais encapsulados instáveis em ambiente neutro/básico no intestino. Para que isso seja possível, necessita-se de uma partícula que passe pelo estômago, sem que o conteúdo gástrico afete o princípio ativo, e então este seja liberado no intestino, por ação mecânica, química ou por biodegradação (ANAL, STEVENS, 2005).

Diante disso, uma primeira hipótese do presente estudo, foi que partículas produzidas por gelificação iônica com estrutura modificada com a adsorção de uma camada proteica possuísem propriedades de proteção contra oxidação, especialmente quando comparadas com partículas sem cobertura. A segunda hipótese foi de que proteínas aderidas às partículas gelificadas melhorassem a estabilidade das partículas, facilitando a passagem pelos ambientes gástrico e intestinal.

Para testar a primeira hipótese partículas produzidas por gelificação iônica utilizando alginato e pectina foram recobertas com proteínas da clara de ovo, proteínas do soro do leite e uma mistura proteínas da clara de ovo:proteínas do soro do leite (1:1, m/m) buscando avaliar os fatores (potencial Zeta e concentração de proteína em solução) que determinam maior adsorção proteica sobre as partículas de gelificação iônica. A partir destas informações foram produzidas partículas por gelificação iônica encapsulando um óleo modelo com alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. Estas partículas foram revestidas com as máximas adsorções proteicas possíveis (proteínas da clara de ovo, proteínas do soro do leite e mistura proteínas da clara de ovo: proteínas de soro do leite 1:1). Partículas com e sem revestimento proteico foram avaliadas com relação à estabilidade oxidativa (índice de peróxidos) do óleo modelo encapsulado em condições controladas de temperatura.

INTRODUÇÃO GERAL

Para testar a segunda hipótese partículas produzidas por gelificação iônica utilizando alginato e pectina foram recobertas com gelatina, proteínas do soro do leite e uma mistura gelatina:proteínas do soro do leite (1:1, m/m). Fatores incluindo o pH, concentração de proteína em solução, relação estequiométrica proteína:polissacarídeo foram avaliados para maximizar a adsorção proteica sobre as partículas produzidas por gelificação iônica. As partículas contendo a máxima quantidade de proteína possível foram submetidas a um ensaio *in vitro* de resistência gastrointestinal. Mudanças morfológicas nas partículas e a medida da solubilidade das partículas durante o ensaio gastrointestinal foram utilizadas para comparar a resistência das partículas produzidas por gelificação iônica (alginato e pectina) sem recobrimento e as recobertas com proteínas (gelatina, proteínas do soro do leite e mistura gelatina: proteínas do soro do leite 1:1).

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o comportamento das partículas produzidas por gelificação iônica com polissacarídeos aniônicos (alginato e pectina) frente ao recobrimento com proteínas de estruturas diferentes. Para isso, serão avaliadas proteínas com estrutura globular (proteínas da clara de ovo e do soro do leite) e aberta (gelatina). A efetividade do recobrimento das partículas com as proteínas da clara de ovo e do soro do leite será avaliada pela formação de peróxidos em um óleo modelo encapsulado, assim como pela solubilidade da gelatina e das proteínas do soro do leite adsorvidas nas partículas submetidas às condições gastrointestinais e pelas mudanças morfológicas observadas durante o experimento gastrointestinal *in vitro*.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a carga líquida dos biopolímeros utilizados na produção e recobrimento das partículas.
- ✓ Avaliar o efeito do pH na complexação de proteína com as emulsões dos polissacarídeos e óleo e posteriormente com partículas de alginato e pectina emulsionadas com óleo.

INTRODUÇÃO GERAL

- ✓ Determinar a estequiometria entre proteínas e os polissacarídeos para a formação de complexos eletrostáticos.
- ✓ Determinar o teor de cálcio nas partículas de alginato e pectina.
- ✓ Avaliar o efeito da adsorção de proteína na morfologia das partículas em função da concentração da proteína em solução.
- ✓ Avaliar a morfologia e microestrutura das partículas com e sem cobertura de proteína.
- ✓ Produzir e caracterizar partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento quanto ao tamanho, matéria seca e proteína adsorvida.
- ✓ Avaliar a efetividade do recobrimento
- ✓ Determinar a estabilidade oxidativa do óleo modelo encapsulado em partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento proteico, estocados a 45 °C durante quatro semanas.
- ✓ Avaliar a resistência das partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento proteico submetidas a condições gastrointestinais *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABANG, S., CHAN, E. -S., PONCELET, D. Effect of process variables on the encapsulation of oil in Ca-alginate capsules using an inverse gelation technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 29(5), p. 417-428, 2012.

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

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

BENICHO, A., ASERIN, A., GARTI, N. Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23(1-3), p. 93-123, 2002.

BOISSONNEAULT, G. A. Dietary fat, immunity and inflammatory disease. In: Fatty acids in foods and their health implications. C. K. Chow (Ed.), Marcel Dekker, New York, 2000, p. 777–795.

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

BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M., SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104(4), p. 467–483, 2011.

CHATTERJEE, S., BOHIDAR, H. B. Effect of cationic size on gelation temperature and properties of gelatin hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35(1-2), p. 81-88, 2005.

COVIELLO, T., MATRICARDI, P., MARIANECCI, C., ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119(1), p. 5–24, 2007.

DELBEN, F., STEFANCICH, S. Interaction of food polysaccharides with ovalbumin. **Food Hydrocolloids**, v. 12 (3), p. 291-299, 1998.

DEVI, N., KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, v. 117(2), p. 193–204, 2013.

DONNELLY, J. L., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J. Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. **Journal of Food Science**, v. 63(6), p. 997–1000, 1998.

DRAGET, K. I., STEINSVAG, K., ONSØYEN, O., SMIDSRØD, O. Na- and K- alginate; effect on Ca^{2+} - gelation, **Carbohydrate Polymers**, v. 35(1-2), p. 1-6, 1998.

DURAND, D., BERTRAND, C., CLARK, A. H., LIPS, A. Calcium-induced gelation of low methoxy pectin solutions - thermodynamic and rheological considerations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 12(1), p. 14-18, 1990.

GBASSI, G. K., VANDAMME, T., YOLOU, F. S., MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21(2), p. 97-102, 2011.

GLICKSMAN, M. Red seaweed extracts (agar, carrageenans, furcellaran). In: Food Hydrocolloids. M. Glicksman (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 1983, v.2, p. 73-113.

GUZEY, D., McCLEMENTS, D. J. Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by β -lactoglobulin-pectin complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55(2), p. 475-485, 2007.

HAGOLLE, N., RELKIN, P., DALGLEISH, D. G., LAUNAY, B. Transition temperatures of heat-induced structural changes in ovalbumin solutions acid and neutral pH. **Food Hydrocolloids**, v.11(3), p. 311-317, 1997.

HAYNES, C. A., NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2(6), p. 517-566, 1994.

HÉBRARD, G., HOFFART, V., CARDOT, J. M., SUBIRADE, M., ALRIC, M., BEYSSAC, E. Investigation of coated whey protein/alginate beads as sustained release dosage form in simulated gastrointestinal environment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35(9), p. 1103-1112, 2009.

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

HOEFLER, A. C. Hydrocolloids. Eagan Press, Minnesota, 2004, p.78-82.

JAYA, S., DURANCE, T., WANG, R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 26(2), p. 143-153, 2009.

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

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

LUNDSTRÖM, I., IVARSSON, B., JONSSON, U., ELWING, H. Protein adsorption and interactions at solid surfaces, In: Polymer surfaces and interfaces. W. J. Feast and H. S. Munro (Ed.). Jhon Wiley & Sons Ltd., 1987, p. 201-230.

NARAYAN, B., MIAYSHITA, K., HOSAKAWA, M. Physiological effects of eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA). review. **Food Reviews International**, v. 22(3), p. 291–306, 2006.

NEMOTO, N., KOIKE, A., OSAKI, K., DOI, E. Dynamic light scattering of aqueous solutions of linear aggregates induced by thermal denaturation of ovalbumin. **Biopolymers**, v. 33(4), p. 551-559, 1993.

O'BRIEN, R. D. Fats and oils: formulating and processing for applications. Third Edition, CRC press, Boca Raton, 2009.

PEPPAS, N. A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50(1), p. 27-46, 2000.

RAMSDEN, J. J. Puzzles and paradoxes in protein adsorption, **Chemical Society Reviews**, v. 24(1), p. 73-78, 1995.

ROLIN, C. Pectin. In: Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives. R. L. Whistler and J. N. BeMiller (Eds.). Academic Press, New York, 1993, p. 258–293.

SEZER, A. D., AKBUĞA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads. **Journal of microencapsulation**, v. 16(6), p. 687- 696, 1999.

SMIDSRØD, O., DRAGET, K. I. Chemistry and physical properties of alginates. **Carbohydrates in Europe: Challenges in Alginate Research**, v. 14, p. 6–13, 1996.

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

SUKHORUKOV, G. B., DONATH, E., DAVIS, S., LICHTENFELD, H., CARUSO, F., POPOV, V. I., MOHWALD, H. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design. **Polymers for advanced technologies**, v. 9(10-11), p. 759-767, 1998.

SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J., MISKELLY, G. M., WIBISONO, R., WADHWA, S. S. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v.126(3), p. 1049–1056, 2011.

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

WANG, W., WATERHOUSE, G. I. N., SUN-WATERHOUSE, D. Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. **Food Research International**, v. 54(1), p. 837–851, 2013.

YOUNG, S., WONG, M., TABATA, Y., MIKOS, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 109(1-3), p. 256–274, 2005.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Introdução

Partículas produzidas em meio aquoso utilizando biopolímeros são redes tridimensionais capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (TAN, MARRA, 2010). Sua capacidade de absorver água é atribuída à presença de porções hidrofílicas, como grupos carboxila, hidroxila, éteres, aminas e sulfatos presentes nas estruturas que formam as partículas.

Há uma tendência crescente na indústria de alimentos para o desenvolvimento de produtos inovadores por meio do projeto de partículas baseadas na aplicação de princípios físico-químicos fundamentais (McCLEMENTS, DECKER, PARK, 2009). A principal razão para esta tendência é que atualmente existe apenas um número limitado de substâncias que são permitidas por lei para serem utilizadas nos alimentos, sendo extremamente custoso e dispendioso a obtenção de novos ingredientes.

Entre os biopolímeros utilizados para obtenção de partículas, os polissacarídeos se destacam, pois são abundantes, disponíveis a partir de fontes renováveis, como, algas, frutas e plantas. Além disso, possuem estruturas complexas com propriedades específicas que não podem ser facilmente sintetizadas, sendo geralmente mais baratos (COVIELLO *et al.*, 2007; SANDOLO *et al.*, 2007). Adicionalmente sua utilização na medicina experimental permite uma vasta gama de aplicações, das quais pode-se incluir sua utilização na engenharia de tecidos, imobilização de células e liberação de fármacos (HOARE; KOHANE, 2008). Todas essas abordagens exigem conhecimento das propriedades dos biopolímeros e suas possíveis interações na construção da matriz da partícula.

1.2 Técnicas para a obtenção de partículas

Diversos segmentos industriais, dentre eles o alimentício, utilizam encapsulação para obtenção de produtos diferenciados. As principais técnicas utilizadas para a encapsulação de ativos incluem a coacervação simples ou complexa, gelificação iônica, separação por fase orgânica, envolvimento lipossômico, *spray drying* (atomização), *spray coating*, *spray chilling*, extrusão, *freeze drying* (liofilização), polimerização interfacial e inclusão molecular (JACKSON; LEE, 1991). As características do ativo e do tipo de partícula procurada influenciam a escolha da técnica de encapsulação (AZEREDO, 2005).

Muitos estudos foram desenvolvidos para produzir partículas nutricionalmente eficientes, protetivas, por meio de diferentes técnicas, como secagem por atomização (PICOT, LACROIX, 2004), gelificação iônica utilizando polissacarídeos associados a íons cálcio (MAESTRELLI *et al.*, 2008) e métodos combinados, como leite fluidizado mais coacervação complexa (LAMBERT, WEINBRECK, KLEEREBEZEM, 2008), coacervação complexa mais secagem por *spray drying* (BARACAT *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007) e gelificação iônica mais complexação eletrostática (GBASSI *et al.*, 2009). As partículas podem ser produzidas a partir de biopolímeros comestíveis como proteínas e polissacarídeos e são, portanto, adequadas para uso na indústria alimentícia (BUREY *et al.*, 2008; MALONE, APPELQVIST, 2003; McCLEMENTS *et al.*, 2007).

Em geral, a encapsulação é utilizada quando o ativo requer proteção e/ou isolamento de condições extremas como umidade, pH, calor, oxigênio e luz (BARANAUKEINÉ *et al.*, 2007; RENARD *et al.*, 2002; DESAI, PARK, 2005). Na área de alimentos a encapsulação aplica-se como forma de reter compostos voláteis, proteção contra perdas nutricionais, além de incorporar aos alimentos mecanismos de controle de liberação de ativos (RÉ, 2000).

1.2.1 Gelificação iônica

A gelificação iônica é baseada na capacidade de polissacarídeos aniônicos, como a pectina, alginato, goma carragena e goma gelana de formar gel na presença de íons como o cálcio (BUREY *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2006). Os mecanismos de gelificação iônica

para a formação de partículas têm sido realizados principalmente por dois processos, sendo estes a gelificação interna e a externa.

O processo de formação de gel é iniciado a partir de uma solução de polissacarídeo e uma fonte de íons divalentes como o cálcio, externa ou interna, que se difunde para a cadeia do biopolímero; Como resultado da complexação ocorre rearranjo estrutural, produzindo uma matriz sólida, com características de um gel (FUNAMI *et al.*, 2009).

Para obtenção de partículas utilizando gelificação iônica externa uma solução de biopolímero contendo o material de interesse é gotejada sobre uma solução iônica em concentrações adequadas podendo-se obter razoáveis níveis do ativo encapsulado e partículas de diferentes formas e tamanhos. As interações dos íons com os grupos carboxilato dos polissacarídeos resultam na formação de géis insolúveis. O endurecimento das partículas ocorre em intervalos mínimos de tempo, começando na superfície na qual os íons divalentes reagem com as cadeias biopoliméricas carregadas negativamente, formando uma estrutura tridimensional rígida, com alto teor de água, a qual é utilizada pelos íons para difundir-se para o interior da partícula, favorecendo a reticulação do exterior para o interior (HELGERUD *et al.*, 2010; SCHOUBBEN *et al.*, 2010; SMRDEL *et al.*, 2008).

O processo de gelificação iônica interna envolve liberação dos íons cálcio a partir de uma fonte interna de um sal de cálcio que é insolúvel na solução do polissacarídeo. Um ácido orgânico é adicionado à solução, para acidificação do meio, que permite solubilizar os íons de cálcio. À medida que o ácido penetra na fase aquosa, ele reage com o sal de cálcio e libera os íons, resultando na formação da matriz do gel (HELGERUD *et al.*, 2010).

A principal diferença entre a gelificação externa e interna é a cinética do processo. Se o objetivo é controlar a transição sol-gel, no processo de gelificação externa os fatores a manipular são a concentração de cálcio e a composição do biopolímero, enquanto que, para o processo de gelificação interna os fatores a considerar são a solubilidade e concentração do sal de cálcio e a concentração do ácido orgânico (DRAGET, 2000).

A gelificação iônica é um processo simples, que não requer o uso de solventes orgânicos nem de temperatura ou pH extremos, tornando-se de baixo custo em comparação com outras técnicas (PATIL *et al.*, 2010). Além disso, a gelificação iônica permite encapsular substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas (McCLEMENTS, 2005). Por outro lado, apesar das partículas de gelificação iônica serem adequadas para a encapsulação, estas são sensíveis a valores de pH extremos. Além disso, seu principal diferencial é a porosidade da matriz, a qual determina a liberação da substância encapsulada. Para superar essa limitação pode-se modificar a estrutura do gel, a partir da combinação de diferentes tipos de biopolímeros, de forma a garantir o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto ou pela complexação com polieletrólitos catiônicos como proteínas (PATIL *et al.*, 2010).

1.3 Interações entre biopolímeros

Biopolímeros naturais como proteínas e polissacarídeos podem ser utilizados para formar complexos através de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações covalentes (SCHMITT *et al.*, 1998). Entre essas interações, os complexos estabilizados eletrostaticamente são sensíveis à dissociação devido a mudanças no meio. Geralmente estes biopolímeros são amplamente utilizados como ingredientes funcionais nas áreas de alimentos, farmacêutica e biomédica.

Quando proteínas e polissacarídeos são misturados, três diferentes cenários são possíveis (Figura 1.2) (1) incompatibilidade termodinâmica (segregação), as moléculas se repelem e duas fases são formadas, uma fase concentrada em polissacarídeos e outra fase em proteínas (TOLSTOGUZOV, 1991); (2) co-solubilidade; quando ambas as moléculas apresentam cargas negativas (WEINBRECK *et al.*, 2003); (3) complexação ou separação de fase associativa, as moléculas atraem-se mutuamente e formam uma fase concentrada e uma fase diluída (DE KRUIF, WEINBRECK, DE VRIES, 2004; POLYAKOV, GRINBERG, TOLSTOGUZOV *et al.*, 1997).

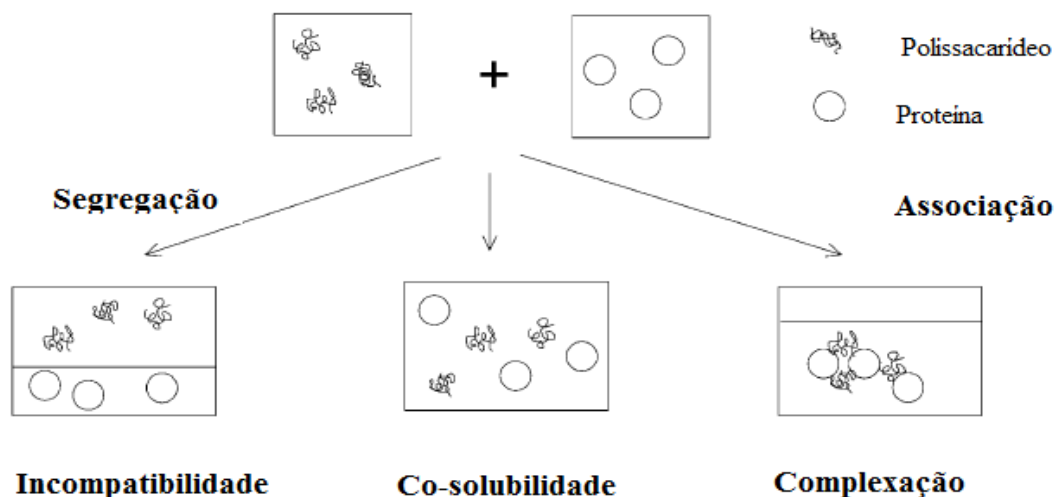


Figura 1.1 - Principais tendências no comportamento de misturas de proteínas:polissacarídeos. Adaptada de De Kruif, Tuiner (2001).

A separação de fase associativa ou coacervação complexa ocorre geralmente em concentrações relativamente pequenas, baixas forças iônicas e quando ambos os biopolímeros apresentam cargas opostas. Portanto, a atração eletrostática entre os biopolímeros ocorre a um pH entre o ponto isoelétrico (pI) da proteína e o pKa do polissacarídeo (DE KRUIF *et al.*, 2004; DOUBLIER *et al.*, 2000; SCHMITT *et al.*, 1998).

Complexos de proteínas e polissacarídeos formam-se espontaneamente em solução aquosa por interação eletrostática entre os grupos de cargas opostas dos biopolímeros (TOLSTOGUZOV, 2003). A formação dos complexos é influenciada pelas características dos biopolímeros como densidade de carga, massa molar, concentração, natureza química e estequiometria, assim como por condições ambientais como pH, força iônica e tipo de íon (DE KRUIF *et al.*, 2004; WEINBRECK *et al.*, 2003). Os complexos resultantes de interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos podem ser solúveis ou insolúveis, formando duas fases, uma contendo alta concentração do complexo biopolimérico e a outra relativamente livre de complexo (WEINBRECK *et al.*, 2003).

A interação eletrostática entre biopolímeros pode ser controlada por variação nas suas cargas de superfície, o que pode ser determinado através da medição do potencial Zeta. O potencial Zeta representa a carga da superfície, que ocorre em solução aquosa. A variação do pH da fase aquosa é utilizada para influenciar dois mecanismos: a dissociação dos grupos funcionais e a adsorção de íons (SALGIN, SALGIN, BAHADIR, 2012). O potencial Zeta é um parâmetro utilizado para várias aplicações, incluindo a caracterização de biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos. O conhecimento dos valores do potencial Zeta e do ponto isoeletrico das proteínas pode ser valioso para a identificação do pH da solução que vai possibilitar a separação das misturas de biopolímeros. O ponto isoeletrico (pI) é o pH de uma solução de proteína em que a carga líquida da proteína é zero (PATIL *et al.*, 2007).

1.4 Paramêtros que influenciam a complexação entre proteínas e polissacarídeos

Diferentes tipos de biopolímeros podem formar complexos em soluções aquosas, utilizando parâmetros em que as interações são promovidas como temperatura, pH, força iônica, relação de quantidades entre os biopolímeros e concentração dos biopolímeros (COVIELLO *et al.*, 2007).

1.4.1 Influência da acidez

A carga das proteínas pode variar de positiva a negativa dependendo do ajuste do pH em relação a seu ponto isoeletrico. Assim, a tendência para a ocorrência de agregação pode ser controlada através da manipulação do pH da solução (JONES, DECKER, McCLEMENTS, 2010).

Maior rendimento na complexação entre proteínas e polissacarídeos é obtido em valores de pH abaixo do ponto isoeletrico das proteínas, condição esta em que as proteínas possuem carga positiva oposta ao polissacarídeo aniônico, produzindo assim máxima atração de carga elétrica (GALAZKA *et al.*, 1999).

A formação de complexos entre β -lactoglobulina e pectina indicou a presença de coacervados em valores de pH ~ 5 . Quando o pH foi abaixado de 5 para 3,5 a turbidez aumentou gradativamente, indicando a formação de complexos insolúveis (SPERBER *et al.*, 2009).

1.4.2 Relação dos biopolímeros

O máximo rendimento em processos de coacervação é obtido por uma relação específica dos biopolímeros envolvidos. Por exemplo, a quantidade de moléculas de proteína disponíveis por cadeia de pectina é importante na formação de complexos eletrostáticos (GIRARD, TURGEON, GAUTHIER, 2002). Schmitt *et al.* (1998) observaram que para a formação de complexos entre a β -lactoglobulina e goma arábica a relação ótima é 4:1.

A estequiometria de um complexo eletrostático depende da conformação e da carga total dos biopolímeros. Proteínas globulares e polissacarídeos aniônicos rígidos não promovem contato entre todos seus grupos carregados, comportamento contrário ao observado com estruturas de proteínas desdobradas (caseína, gelatina e algumas globulinas desnaturadas em meio ácido) que tendem a promover o máximo de contato com polissacarídeos com carga oposta (TOLSTOGUZOV, 2003).

1.4.3 Influência da temperatura

A temperatura influencia a formação de complexos entre proteínas e polissacarídeos. Kelly *et al.* (1994) verificaram que o aumento de temperatura e o conteúdo total de biopolímeros apresentam um efeito sinérgico na separação de fases. Nanopartículas de biopolímeros podem ser formadas por tratamento térmico dos complexos eletrostáticos de proteínas globulares e polissacarídeos aniônicos. Jones, Decker, McClements (2010) estudaram as propriedades físico-químicas de partículas biopoliméricas por meio de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Medidas de DSC revelaram que a pectina de alto teor de metoxilação (HMP), pectina de baixo teor de metoxilação (LMP) e carragena (C) apresentam pouco impacto sobre a temperatura de desnaturação térmica da β -

lactoglobulina (78 °C) em pH 4,75, condições estas nas quais são formados os complexos eletrostáticos. A medida de temperatura indicou que a maior agregação de biopolímeros ocorreu acima da temperatura de desnaturação para sistemas de β -lactoglobulina/pectina, mas não para os sistemas de β -lactoglobulina/carragena.

1.5 Complexação de partículas produzidas por gelificação iônica com polieletrólitos catiônicos

A adsorção de uma molécula de proteína envolve a transferência desta molécula de uma fase (solução) para a superfície sólida da fase adjacente; a acumulação destas moléculas na interface resultante ocorre devido às forças de ligação entre a molécula de proteína e a superfície do sólido. A adsorção de proteína em partículas pode (1) proteger ativos funcionais e aumentar sua estabilidade, (2) favorecer a liberação modificada, e (3) melhorar a propriedade de superfície da partícula aumentando sua biodisponibilidade (KHEIREDDIN, ZHANG, AKBULUT, 2013).

Embora os mecanismos de adsorção não sejam totalmente compreendidos, existem algumas características físico-químicas conhecidas que influenciam esse fenômeno (NAKANISHI, SAKIYAMA, IMAMURA, 2001; VAN TASSEL, 2003). Dentre estas características pode-se citar: tamanho, estabilidade e concentração da proteína na fase aquosa, funcionalidades e interações proteína-proteína, carga na superfície, interações eletrostáticas relacionadas à natureza química, densidade e mobilidade de grupos funcionais da superfície, energia livre de superfície, características topográficas da superfície, tempo de desdobramento, meio circundante (pH, sais, temperatura, etc.). Por outro lado, na adsorção a partir de uma solução contendo várias proteínas, como por exemplo, no plasma sanguíneo, fatores cinéticos, como as taxas relativas de espalhamento das diferentes moléculas de proteína na superfície e as alterações de conformação das proteínas adsorvidas são também importantes (KRISHNAN, 2013).

A adsorção de proteína em superfícies sólidas desempenha um papel importante devido às diferentes aplicações em áreas que incluem dispositivos biomédicos, diagnóstico de doenças, biossensores, processamento de alimentos, incrustação e biorreatores (HIRSH

et al., 2013). Por outro lado, na área biomédica a adsorção de proteínas nas superfícies de biomateriais é indesejável e, portanto, há interesse em desenvolver materiais que sejam resistentes à adsorção de proteínas (ANDRADE, HLADY, 1986; ELWING, 1998; GARLAND, SHEN, ZHU, 2012).

Para a encapsulação de princípios ativos, o polissacarídeo mais comum para a obtenção de partículas é o alginato de sódio, devido à sua simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo (KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003). No entanto, essas partículas podem fornecer proteção limitada a ativos sensíveis à oxidação como os lipídios, devido a suas características de estrutura como a porosidade, que pode ser considerada uma desvantagem quando o objetivo é proteger as células contra condições desfavoráveis do meio (GOUIN, 2004).

A porosidade das partículas de alginato pode permitir a difusão de íons H^+ de fora para dentro das partículas facilmente. Esta desvantagem pode ser superada depositando uma camada de revestimento proteico (BURGAIN *et al.*, 2011; KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003; RAJAM *et al.*, 2012). Desta maneira, há relatos na literatura da utilização de microesferas de alginato-amido (SULTANA *et al.*, 2000), proteína do soro do leite e alginato (RAJAM *et al.*, 2012) e alginato-glicerol (TRUELSTRUP-HANSEN *et al.*, 2002).

A deposição da proteína sobre a superfície do material é espontânea e ocorre em frações de tempo muito pequenas, após o contato, enquanto que o relaxamento exige períodos muito mais longos. A primeira camada de proteínas pode ser adsorvida de forma reversível ou irreversível, enquanto que a segunda camada tem tendência para absorver reversivelmente devido a pouca ou nenhuma afinidade entre as moléculas. Essa reversibilidade da segunda camada proteica se deve à retenção de água, ao estado compacto e ao desdobramento incompleto da proteína (NORDE, HAYNES, 1995).

A força de adsorção de uma proteína é determinada inicialmente pelas propriedades da superfície. Portanto, várias rotas são possíveis. Em contato com superfícies hidrofóbicas é adsorvida por meio de pequenos domínios hidrofóbicos. Depois disto, a proteína irá se

desdobrar permitindo maior exposição de resíduos hidrofóbicos internos, favorecendo a interação mais forte com a superfície (AKKERMANS *et al.*, 2008; CASTELLS, VAN TASSEL, 2005). Por outro lado, superfícies hidrofílicas interagem com grupos funcionais polares e carregados da superfície da proteína. Neste caso, a superfície hidrofílica interage favoravelmente com água, quando em contato com uma solução aquosa. Isso cria uma barreira que as moléculas de proteína adsorvida devem romper antes de interagir com a superfície (WERTZ, SANTORE, 2001). Assim, moléculas de proteína adsorvem mais fracamente sobre superfícies hidrofílicas do que o fazem com superfícies hidrofóbicas. Além disso, proteínas com alta estabilidade estrutural adsorvem sobre superfícies com cargas opostas com menos perda conformacional que em superfícies hidrofóbicas, mas adotam a orientação determinada pela superfície (HAYNES, NORDE, 1994).

1.6 Biopolímeros formadores de partículas

Partículas de biopolímeros podem ser preparadas a partir de uma variedade de macromoléculas, sendo as mais utilizadas os polissacarídeos e proteínas de grau alimentício, por exemplo, proteínas do soro do leite, caseína, gelatina, proteína de soja, proteínas da clara do ovo, alginato, pectina, amido, celulose e vários outros hidrocolóides. As partículas podem conter também outros componentes, como água, lipídios, minerais e açúcares, produzindo diferentes interações moleculares que atuam entre os componentes. Portanto, a funcionalidade de uma partícula depende da sua composição, propriedades físico-químicas e características estruturais dos biopolímeros utilizados na sua produção (JONES, McCLEMENTS, 2010). Como unidades moleculares, as partículas podem ser usadas para fornecer diferentes atributos funcionais, como estabilidade, textura e percepção diferencial em muitos sistemas alimentares (TOLSTOGUZOV, 2003).

1.6.1 Polissacarídeos

A principal funcionalidade dos polissacarídeos é a possibilidade de serem utilizados para interação com íons divalentes na formação do gel ou para complexar com polieletrólitos de carga oposta. Polissacarídeos são extraídos de fontes naturais renováveis,

como exudados de plantas, de animais, de microrganismos, sementes, frutas, algas e microalgas (COVIELLO *et al.*, 2007; LAURIENZO, 2010; VENUGOPAL, 2011).

As diferenças químicas dos polissacarídeos promovem diferenças nas propriedades moleculares, tais como massa molar, conformações, ramificação, estrutura, características elétricas e de interação, as quais determinam as propriedades físico-químicas e funcionais das partículas, como solubilidade, capacidade de ligação de água, viscosidade, gelificação e atividade de superfície (BELITZ, GROSCH, SCHIEBERLE, 2009). Devido à sua característica hidrofílica os polissacarídeos são adequados para a obtenção de partículas como carregador de ativos e os mais comumente utilizados são o alginato e a pectina (CENSI *et al.*, 2012).

1.6.1.1 Alginato

O alginato quimicamente é um copolímero que possui estrutura linear de alta massa molar com secções rígidas e flexíveis, formadas por dois tipos de ácidos urônicos, uma unidade de ácido β -D manurônico (M) e ácido α -L gulurônico (G) com blocos que podem ser homopoliméricos ou heteropoliméricos (COTTRELL, KOVACS, 1980; DRAGET, TAYLOR, 2011). Assume-se que as unidades G são as únicas moléculas do alginato que formam reticulação com íons divalentes e, portanto, é a principal característica estrutural que contribui para a formação de gel (STRÖM *et al.*, 2009). Em geral, alginatos com elevado teor de unidades G formam géis estáveis, com permeabilidade elevada quando comparada com alginatos com um alto teor de unidades M (MARTINSEN, SKJÅK-BRÆK, SMIDSRØD, 1989). Em geral, alginatos formam géis segundo o modelo “caixa de ovos” (GRANT *et al.*, 1973) e apresentam valor de pKa entre 3,20 – 3,38 (MARTINSEN, STORRØ, SKJÅK-BRÆK, 1992).

Recentemente, matrizes de alginato têm sido utilizadas na viabilização da encapsulação de probióticos para a alimentação de humanos (ZHANG *et al.*, 2011). Partículas de alginato têm sido utilizadas para imobilização de ilhotas pancreáticas e bactérias probióticas, assim como na aplicação de liberação controlada (BREKKEN *et al.*,

2004; DRAGET, SKJÅK-BRAEK, SMIDSRØD, 1997). Partículas de alginato obtidas por gelificação iônica recobertas com proteínas do soro do leite sem desnaturação térmica têm sido elaboradas para encapsulação de probióticos com objetivo específico de produzir proteção gástrica aos microorganismos (GBASSI *et al.*, 2011). Estas partículas podem, ainda, ser utilizadas para melhorar as propriedades qualitativas de vários lipídios funcionais, como óleos de peixes e azeite de oliva (SUN-WATERHOUSE *et al.*, 2011).

1.6.1.2 Pectina

A pectina é um polissacarídeo encontrado na parede celular na maioria das plantas (BACIC, HARRIS, STONE, 1988). A cadeia linear da pectina é formada por unidades monoméricas de ácido α -(1→4)-D-galacturônico, parcialmente esterificados com grupos metoxílicos (BOBBIO, 1989). Alguns açúcares neutros como galactose, glicose, raminose, arabinose e xilose também podem estar presentes na cadeia, sendo que no ponto de ligação da raminose ocorre, necessariamente quebra na linearidade da estrutura molecular (RALET *et al.*, 2003).

A formação de gel é a principal característica funcional da pectina e depende essencialmente das características do meio: pH, teor de sólidos solúveis, cátions divalentes, grau de metoxilação (GANCZ, ALEXANDER, CORREDIG, 2006), grau de amidação, massa molar (KIM *et al.*, 2008), número e arranjo das cadeias laterais e densidade de carga líquida na molécula (THAKUR, SINGH, HANDA, 1997).

Grupos carboxílicos dos monômeros do ácido galacturônico podem ou não estar esterificados com metanol sendo a porcentagem dos grupos esterificados expressa como grau de metoxilação (FISHMAN *et al.*, 2006; MESBAHI, JAMALIAN, FARAHNAKY, 2005; YAPO *et al.*, 2007). As pectinas são classificadas em função de seu grau de metoxilação. Quando a esterificação dos grupos carboxilas é aproximadamente igual ou superior a 50%, são chamadas pectinas de alto teor de metoxilação. A pectina de baixo teor de metoxilação tem menos de 50% dos grupos carboxilas esterificados (POMERANZ, MELOAN, 2000).

As pectinas de baixo teor de metoxilação, amidadas ou não, são polissacarídeos muito utilizados industrialmente no setor de alimentos por sua capacidade de formar gel na presença de íons Ca^{2+} em ampla faixa de pH. Os íons divalentes Ca^{2+} combinam com os grupos carboxilato da cadeia da pectina encaixando-se nas estruturas do ácido galacturônico formando uma estrutura tridimensional com características de uma “caixa de ovos” (BRACCINI, PÉREZ, 2001).

Pectina é um poliânion que possui pKa em torno de 2,9 e em valores de pH superiores ao pKa apresentam carga elétrica negativa. Em pHs próximos ao valor do seu pKa ocorre perda da carga elétrica, enquanto em valores abaixo do pKa a dissociação dos grupos carboxílicos é suprimida (RALET *et al.*, 2001).

Diferentes estudos utilizando microesferas de pectina foram otimizados com objetivo de minimizar a liberação de fármacos em meio gástrico e atingir completa liberação no ambiente intestinal (DAS, NG, 2010; JAIN, GUPTA, JAIN, 2007; SRIAMORNSAK, 1998) devido à sua degradação seletiva pela microflora presente no cólon (*Bacterioides ovatus*), bem como sua resistência a proteases e amilases do trato gastrointestinal (CHOURASIA, JAIN, 2004; WONG, COLOMBO, SONVICO, 2011).

1.6.2 Proteínas

Uma das características importantes das moléculas de proteína é que podem ser utilizadas como material de parede para fornecer proteção ao pH, barreira contra o oxigênio, luz e vapor de água. Podem ser aderidas às partículas utilizando vários mecanismos físico-químicos ou podem ser adsorvidas à matriz por interações específicas, ligação covalente ou não covalente. Proteínas são macromoléculas compostas de vários aminoácidos unidos por ligações covalentes denominadas peptídicas (DAMODARAN, 2008).

Segundo Verbeek e van den Berg (2010), proteínas apresentam estrutura macromolecular tridimensional, que abrange as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. Esta estrutura tridimensional é estabilizada por interações hidrofóbicas,

eletrostáticas, ligações covalentes, ligações de hidrogênio e ligações dissulfídicas entre os grupos laterais dos aminoácidos. O tipo, número e sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica determinam uma variedade de diferentes estruturas, por exemplo, proteínas de configuração aleatória, abertas ou globulares (BELITZ, GROSCH, SCHIEBERLE, 2009).

Proteínas globulares apresentam cadeia polipeptídica normalmente dobrada, em uma conformação compacta esferóide, com a maior parte dos aminoácidos apolares confinados no interior da molécula e os aminoácidos polares expostos para o exterior (SENO, TROVATO, 2007). As interações entre proteínas podem ser complexas, envolvendo, por exemplo, sítio de ligação específica (NICOLAI, DURAND, 2007). Esta propriedade irá influenciar sua estabilidade e, por conseguinte, o grau de alteração conformacional no momento de sua adsorção nas superfícies sólidas (NORDE, ANUSIEM, 1992).

1.6.2.1 Proteínas da clara do ovo

A clara de ovo é composta de 9,7-10,6% de proteína em massa. Mais de 24 proteínas diferentes foram identificadas e isoladas a partir da clara de ovo (MINE, SHAHIDI, 2006). Algumas das principais proteínas incluem ovalbumina (54%), conalbumina (12%), ovomucóide (11%), ovomucina (3,5%), e lisozima (3,4%) (MINE, 1995).

A proteína mais abundante e fundamental para as propriedades funcionais da clara de ovo é a ovalbumina, a qual possui estrutura globular, com alto valor nutritivo e propriedades funcionais, tais como a atividade de superfície (DELBEN, STEFANCICH, 1998). Ovalbumina tem massa molar 44,5 kDa e é uma fosfoglicoproteína monomérica com uma sequência de 385 resíduos de aminoácidos (DOI, KITABATABE, 1997) e ponto isoelétrico (pI) de 4,8 (OAKENFULL, PEARCE, BURLEY, 1997). Seus monômeros apresentam forma elipsoidal, com dimensões de 7,0 nm x 4,5 nm x 5,0 nm (MATSUMOTO, INOUE, 1993). Apresenta em sua estrutura pontes dissulfeto (S-S) em cistina e quatro grupos sulfidril livres (-SH) (DOI, KITABATAKE, 1997; FOTHERGILL,

FOTHERGILL, 1970). A estrutura secundária é composta de 30,6% de α -hélices e de 31,4% de β -folha (HU, DU, 2000).

Partículas produzidas por camadas múltiplas com fibrilas de ovalbumina e pectina de alto grau de metoxilação apresentaram distribuição de tamanho normal com diâmetro médio disperso, observando-se também que o incremento do número de camadas diminuiu a taxa de liberação do ativo (HUMBLET-HUA *et al.*, 2011). A ovalbumina pode ser utilizada como material carregador para entrega de fármacos devido à sua disponibilidade e baixo custo em comparação com outras proteínas. Além disso, apresenta várias características importantes, incluindo a capacidade para formar redes de gel, de estabilização de emulsões e espumas e a liberação modificada de fármacos (WONGSASULAK *et al.*, 2010).

1.6.2.2 Proteínas do soro do leite

As proteínas do soro do leite são biopolímeros, amplamente utilizadas na área de alimentos, devido a seu elevado valor nutricional e propriedades funcionais para formar hidrogéis e emulsões (LEFÈVRE, SUBIRADE, 2000). Geralmente são comercializadas como isolados (WPI), concentrados (WPC) e hidrolisado proteico de soro (HWP) produtos estes que podem apresentar diferentes propriedades funcionais, devido às diferenças na composição do leite e nas condições de produção (HUFFMAN, 1996; MORR, FOEGEDING, 1990).

As proteínas do soro do leite são a principal fonte de proteínas globulares em produtos alimentícios, representando entre 18-20% do total de proteínas do leite, composto por quatro principais proteínas: β -lactoglobulina (50-75%), α -lactoalbumina (15-25%), albumina de soro bovino (10%) e imunoglobulina (10%) (DONOVAN, MULLHUILL, 1987; VERHEUL, ROEFS, 1998). As demais proteínas incluem lactoferrina, lactoperoxidase (MARSHALL, 2004) e traços de lactose e sais também estão presentes (DONNELLY, DECKER, McCLEMENTS, 1998).

A β -lactoglobulina é a principal proteína do soro do leite. Contém 162 aminoácidos, um grupo tiol livre, duas pontes dissulfeto e massa molar de 18,30 kDa (THOMPSON, BOLAND, SINGH, 2009). A estrutura quaternária da proteína varia entre monômeros, dímeros ou oligômeros, dependendo do pH, temperatura e força iônica. O dímero é a forma predominante em condições fisiológicas (THOMPSON, BOLAND, SINGH, 2009), enquanto a dissociação em monômeros é reforçada pela baixa concentração de proteína, baixa força iônica, acidez/alcalinidade extremas e aumento da temperatura (VERHEUL, ROEFS, 1998).

Proteínas do soro do leite são utilizadas na obtenção de micro ou nanopartículas para encapsulação e liberação modificada de compostos bioativos (GUNASEKARAN, KO, XIAO, 2007), sendo que esses materiais podem apresentar características hidrofílicas e hidrofóbicas (CHEN, REMONDETTO, SUBIRADE, 2006). Proteínas do soro podem ser utilizadas apenas como material único de cobertura (HOGAN, MCNAMEE, HÉBRARD *et al.*, 2006; O'RIORDAN, O'SULLIVAN, 2001) ou em misturas (WICHCHUKIT *et al.*, 2013). Em função do caráter catiônico podem também ser complexadas com polissacarídeos aniônicos (DOHERTY *et al.*, 2012), como sistema de proteção no transporte de leveduras através do sistema gástrico (HÉBRARD *et al.*, 2006) e como material para encapsular gordura de leite (MOREAU, ROSENBERG, 1996). Há relatos de que o isolado proteico do soro apresenta uma barreira eficaz contra a oxidação de óleo de laranja encapsulado (KIM, MORR, 1996).

1.6.2.3 Gelatina

A gelatina é uma proteína de alta massa molar obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno, derivado de pele animal, tecido conjuntivo e ossos (GÓMEZ-GUILLEN *et al.*, 2011; MORRISON *et al.*, 1999). Contém teores elevados de hidroxiprolina, prolina e glicina (OKUYAMA *et al.*, 2006). A presença da prolina e da hidroxiprolina atribui à gelatina conformação aberta, formando uma estrutura tripla hélice distendida, que apresenta cadeias laterais de aminoácidos na parte externa da molécula (Figura 1.1) (KOMMAREDDY, SHENOY, AMIJI, 2005). O teor de prolina e hidroxiprolina é

particularmente importante na gelificação, facilitando a interação proteína-proteína (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; LI, GU, 2011).

A gelatina é produzida em dois tipos principais: Tipo A, que é derivada de colágeno quando o pré-tratamento é realizado por um ácido e possui ponto isoelétrico de 7-9, e do tipo B, quando o pré-tratamento é realizado por uma base (hidróxido de cálcio), possuindo ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,2 (SCHRIEBER, GAREIS, 2007; TAHERIAN *et al.*, 2011). A gelatina como as demais proteínas é um polieletrólito anfótero, pois apresenta carga elétrica negativa ou positiva dependendo do valor do pH em relação ao seu ponto isoelétrico (ARVANITOYANNIS, 2002). Por esta razão, a gelatina apresenta alta capacidade em formar complexos com outros biopolímeros (LI *et al.*, 2011). A gelatina é uma proteína solúvel em água quente e capaz de formar géis por meio de resfriamento. É útil como agente de gelificação para a encapsulação e tem sido usada em muitas aplicações de engenharia de tecidos, devido a sua biocompatibilidade. Além disso, devido à sua funcionalidade, é amplamente utilizada na área de alimentos para uma variedade de aplicações (KARIM, BHAT, 2008). Na área farmacêutica é utilizada principalmente na fabricação de microcápsulas (JONES, 2004).

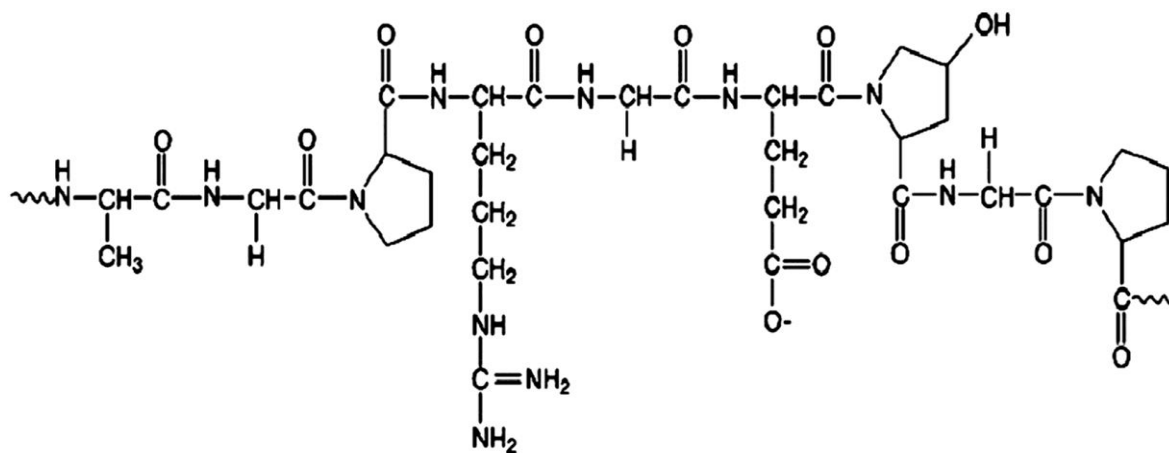


Figura 1.2 – Estrutura química da gelatina. Fonte: Kommareddy, Shenoy, Amiji (2005).

1.7 Oxidação lipídica

Reações de oxidação de lipídios levam à geração de compostos tóxicos, sendo os ácidos graxos poli-insaturados altamente suscetíveis à oxidação, o que pode levar à formação de radicais livres que podem ter efeitos adversos sobre a saúde (LEE, YING, 2008), além da perda da qualidade sensorial devido à rancificação que causa odores e sabores indesejados (LEE, YING, 2008; LUKASZEWIC *et al*, 2004).

Dessa forma, a estabilidade oxidativa do alimento é um fator importante na determinação de sua vida de prateleira. A maioria dos métodos usados para determinar o ponto de indução e a sensibilidade dos óleos e gorduras à oxidação baseia-se principalmente na determinação dos compostos oxidados, como índice de peróxidos, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, índice de anisidina, quantidade de dienos conjugados ou por meio da análise dos produtos voláteis de oxidação (VERLEYEN *et al.*, 2005).

Um dos mecanismos para controle da oxidação é a utilização de antioxidantes. Outro método para proteger os lipídios insaturados da oxidação é por meio da encapsulação. Este processo tem sido utilizado em vários estudos para encapsular lipídios bioativos com objetivo de protegê-los da oxidação, uma vez que a encapsulação proporciona uma barreira ao oxigênio e a outros fatores ambientais responsáveis pela oxidação (AHN *et al*, 2008; AUGUSTIN *et al.*, 2006; BERISTÁIN *et al.*, 2001). A encapsulação também pode ser utilizada para mascarar sabores e aromas indesejáveis da oxidação lipídica, de forma a manter o apelo sensorial e a satisfação do consumidor em relação ao alimento (CHAMPAGNE, FUSTIER, 2007).

Há várias vias para o desenvolvimento da oxidação dependendo do meio e dos agentes catalisadores. Nos sistemas biológicos, os lipídios sofrem oxidação por três principais meios: foto-oxidação, autooxidação e oxidação enzimática (LAGUERRE, LECOMTE, VILLENEUVE, 2007; WÓJCIAK, DOLATOWSKI, 2012).

A autooxidação é o mecanismo mais reconhecido para a oxidação lipídica, que consiste em três fases principais: iniciação, propagação e terminação (LAGARDE, 2010). A taxa de oxidação lipídica depende de vários fatores como o grau de insaturação dos ácidos graxos. Lipídios poli-insaturados são mais rapidamente oxidados que os monoinsaturados; já os saturados praticamente são estáveis (KANNER, 1994).

Na primeira fase, a reação entre o oxigênio singlete e uma insaturação da molécula de lipídio gera peróxidos instáveis que se decompõem rapidamente para produzir espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila (-OH), hidroperoxila (-OOH) e alcóxila (-OOR). Estes compostos reagem com os lipídios insaturados na fase de propagação, de modo a produzir mais radicais livres. A reação de propagação continua até que a concentração das espécies de radicais sejam suficientes para resultar em reações entre si, de modo a produzir as espécies não radicais (fase de terminação), como aldeídos e cetonas (McCLEMENTS, DECKER, 2000).

A típica curva cinética de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados pode ser dividida em três fases: a fase de indução (ou fase lag), onde a taxa de oxidação é extremamente baixa; uma segunda fase de propagação (fase exponencial), na qual a taxa de oxidação aumenta drasticamente até um valor máximo de peróxidos, posteriormente a taxa de decomposição de hidroperóxidos é reduzida e quantidades pequenas de produtos de oxidação secundários são formadas. A terceira fase é a de decomposição dos hidroperóxidos (ou fase estacionária), no qual a taxa de degradação dos hidroperóxidos é maior do que a sua taxa de formação. Essa etapa é terminada quando dois radicais reagem entre si para formar um não radical (KAMAL-ELDIN, YANISHLIEVA, 2005).

1.8 Resistência das partículas submetidas à passagem pelo trato gastrointestinal

Partículas à base de polissacarídeos apresentam características favoráveis como carregadoras de substâncias sensíveis para a liberação em locais específicos, devido às suas propriedades, tais como sensibilidade ao pH, inchamento, estabilidade na seção superior do trato gastrointestinal e adequada degradabilidade pelas enzimas específicas do intestino

delgado ou do cólon (KIM *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2007; TAVAKOL *et al.*, 2009; VANDAMME *et al.*, 2002).

O princípio desta tecnologia envolve a proteção de compostos biologicamente ativos ou células, tais como bactérias probióticas para liberação em sítios específicos. Em geral os compostos ativos precisam de liberação gradual como no caso de vitaminas e outros ingredientes funcionais no trato gastrointestinal, com baixa permeabilidade em condições ácidas do estômago e alta permeabilidade ao ambiente neutro do intestino (SAUER, STREICH, MEIER, 2001). Além disso, as substâncias sensíveis às enzimas no trato gastrointestinal, baixa absorção, e capacidade limitada para ser transportada por meio da barreira epitelial intestinal, precisam de matrizes capazes de fornecer proteção.

Portanto, é necessário que as matrizes permaneçam intactas à passagem pelo trato gastrointestinal superior, a fim de proteger os ativos incorporados da degradação química e enzimática. Em segundo lugar, devem liberar o ativo imediatamente após atingir o segmento do trato gastrointestinal inferior (LIU *et al.*, 2003).

A simulação das condições adversas quando os ativos encapsulados são submetidos à passagem pelo trato gastrointestinal é utilizada como referência para avaliar a resistência das partículas de biopolímeros na liberação de ativos em diferentes locais. Diferentes condições incluem variações de pH, como do estômago que foi relatado na faixa de pH 1 a 2,5, o pH do intestino delgado de 6,15-7,35 (EVANS *et al.*, 1988) e a presença de enzimas proteolíticas, como a pepsina, pancreatina e sais biliares (PRESS *et al.*, 1998). Após a passagem através do intestino delgado, as partículas atingem o intestino grosso no qual o pH diminui ligeiramente para 5,26 - 6,72 no cólon (PRESS *et al.*, 1998). De forma geral, diversos estudos indicam que a passagem pelo trato gástrico é prejudicial à viabilidade dos ativos sensíveis e probióticos (CORONA-HERNANDEZ *et al.*, 2013).

Por este motivo, considera-se importante que uma matriz apropriada para sistemas de liberação gastro-resistente, seja capaz de proteger o ativo durante a sua passagem pelo estômago. Estudo recente com partículas de pectina utilizadas para liberação de indometacina sob as condições gastrointestinais *in vitro* mostrou liberação acumulada de menos de 15% nas condições gástricas utilizadas (JUNG *et al.*, 2013).

O efeito protetor conferido a probióticos frente a condições ácidas (pH 1,5 por 2 horas) foi avaliado após recobrimento de partículas de pectina. Os resultados indicaram que as partículas recobertas com proteínas do soro do leite não conferiram maior proteção para os probióticos quando comparados com as partículas sem cobertura (GEBARA *et al.*, 2013).

A grande maioria dos estudos mostra que a encapsulação de ativos confere maior viabilidade aos mesmos durante a exposição às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal, sendo efetiva sua proteção às condições adversas. Entretanto, a eficiência dessa proteção depende de diversos fatores como a técnica e os materiais utilizados na encapsulação.

1.9 Conclusões

Partículas podem ser produzidas a partir de biopolímeros, como polissacarídeos e proteínas, utilizando diferentes técnicas. Entretanto, a produção de partículas de biopolímeros com atributos específicos funcionais ainda é bastante limitada e uma melhor compreensão de relações estrutura-função é necessária. A identificação dos materiais encapsulantes e as condições requeridas para produzir uma partícula com propriedades adequadas requer o conhecimento das características moleculares e funcionais dos biopolímeros a serem utilizados, bem como dos mecanismos físico-químicos envolvidos na formação de partículas por gelificação iônica e a complexação com polieletrólitos catiônicos. Futuros estudos sobre sistemas de partículas para aplicações em alimentos devem ser focados na utilização de técnicas combinadas.

1.10 Referências

AHN, J. H., KIM, Y. P., LEE, Y. M., SEO, E. M., LEE, K. W., KIM, H. S. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 107(1), p. 98-105, 2008.

AKKERMANS, C. A., VAN DER GOOT, A. J., VENEMA, P., VAN DER LINDEN, E., BOOM, R. M. Formation of fibrillar whey protein aggregates: Influence of heat and shear treatment and resulting rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 22(7), p.1315-1325, 2008.

ANDRADE, J. D.; HLADY, V. Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses. **Advances in Polymer Science**, v. 79, p. 1-63, 1986.

ARVANITOYANNIS, I. S. Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: Protein-based films and coatings. A. Gennadios (Ed.). Chapter 11. CRC Press, Boca Raton, 2002, p. 275-304.

AUGUSTIN, M. A., SANGUANSRI, L., BODE, O. Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. **Journal of Food Science**, v. 71(2), p. E25- E32, 2006.

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

BACIC, A., HARRIS P. J., STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. The Biochemistry of Plants: Carbohydrates. In: J. Preiss (Ed.). Academic Press, New York, 1988, v. 14, p. 273-371.

BARACAT, M. M., NAKAGAWA, A. M., FREITAS, L. A. P., DE FREITAS, O. Microcapsule processing in a spouted bed. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 82(1), p. 134-141, 2004.

BARANAUSKIENÉ, R., BYLAITÉ, E., ZUKAUSKAITĖ, J., VENSKUTONIS, R. P. Flavor retention of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified

starches during encapsulation and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55(8), p. 3027-3036, 2007.

BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. Food chemistry. 4th Ed. Springer-Verlag, New York, 2009, 1070 p.

BERISTAIN, C. I., GARCIA, H. S., VERNON-CARTER, E. J. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. **LWT-Food Science and Technology**, v. 34(6), p. 398-401, 2001.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. Introdução a Química de Alimentos. 1ª Ed., Varela: SÃO PAULO, 1989, 228 p.

BRACCINI, I., PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2(4), p. 1089-1096, 2001.

BREKKEN, C., THUEN, M., SINGSTAD, T. E., HARALDSETH, O., SANDVIG, A., BERRY, M. A novel probe for localized manganese delivery. Third annual meeting of the Society for Molecular Imaging, St. Louis, p. 9-12, 2004.

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

BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M., SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104(4), p. 467-483, 2011.

CASTELLS, V., VAN TASSEL, P. R. Conformational transition free energy profiles of an adsorbed, lattice model protein by multicanonical Monte Carlo simulation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 122(8), p. 84707(1-9), 2005.

CENSI, R., DI MARTINO, P., VERMONDEN, T., HENNINK, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 161(2), p. 680-692, 2012.

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

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

CHOURASIA, M. K., JAIN, S. K. Polysaccharides for colon targeted drug delivery. **Drug Delivery**, v. 11(2), p. 129-148, 2004.

CORONA-HERNANDEZ, R. I., ALVAREZ-PARRILLA, E., LIZARDI-MENDOZA, J., ISLAS-RUBIO, A. R., DE LA ROSA, L. A., WALL-MEDRANO, A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12(6), p. 614 – 628, 2013.

COTTRELL, I. W., KOVACS, P. Alginates. In: Handbook of water-soluble gums and resins. H. B. Crawford and J. Williams (Eds.), Mc Graw-Hill, Auckland, 1980, p. 21-43.

COVIELLO, T., MATRICARDI, P., MARIANECCI, C., ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119(1), p. 5-24, 2007.

DAMODARAN, S. Amino acids peptides and proteins. In: Food Chemistry. O. Fennema 4th (Ed.), Marcel Dekker, New York, 2008, p. 179-262.

DAS, S., NG, K. Y. Resveratrol-loaded calcium-pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and beads characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99(2), p. 840-860, 2010.

DE KRUIF, C. G., WEINBRECK, F., DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9(5), p. 340-349, 2004.

DE KRUIF, C. G., TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 15(4-6), p. 555-563, 2001.

DELBEN, F., STEFANCICH, S. Interaction of food polysaccharides with ovalbumin. **Food Hydrocolloids**, v. 12(3), p. 291-299, 1998.

DESAI, K. G. H., PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology: an International Journal**, v. 23(7), p. 1361-1394, 2005.

DOHERTY, S. B., AUTY, M. A., STANTON, C., ROSS, R. P., FIZGERALD, G. F., BRODKORD, A. Application of whey protein micro-bead coating for enhanced strength and probiotic during fruit juice storage and gastric incubation. **Journal of Microencapsulation**, v. 29(8), p. 713-728, 2012.

DOI, E., KITABATAKE, N. Structure and functionality of egg proteins. In: Food proteins and their applications. S. Damodaran and A. Paraf (Eds.). Marcel Dekker, New York, 1997, p. 325- 340.

DONNELLY, J. L., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J. Iron-catalyzed oxidation of Menhaden oil as affected by emulsifiers. **Journal of Food Science**, v. 63(6), p. 997-1000, 1998.

DONOVAN, M., MULVIHILL, D. M. Thermal denaturation and aggregation of whey proteins. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v. 11, p. 87-100, 1987.

DOUBLIER, J. L., GARNIER, C., RENARD, D., SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5(3-4), p. 202-214, 2000.

DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21(1-2), p. 47-55, 1997.

DRAGET, K. I., TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 25(2), p. 251-256, 2011.

DRAGET, K. I. Alginates In: Handbook of Hydrocolloids. G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.). CRC Press, Boca Raton, 2000, p. 379-395.

ELWING, H. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. **Biomaterials**, v. 19(4-5), p. 397-406, 1998.

EVANS, D. F., PYE, G., BRAMLEY, R., CLARK, A. G., DYSON, T. J., HARDCASTLE, J. D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human-subjects. **Gut** v. 29(8), p. 1035-1041, 1988.

FISHMAN, M. L., CHAU, H. K., HOAGLAND, P. D., HOTCHKISS, A. T. Microwave-assisted extraction of lime pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20(8), p. 1170-1177, 2006.

FOTHERGILL, L. A., FOTHERGILL, J. E. Thiol and disulphide contents of hen ovalbumin. C-terminal sequence and location of disulphide bond. **Biochemical Journal**, v. 116(4), p. 555-561, 1970.

FUNAMI, T., FANG, Y., NODA, S., ISHIHARA, S., NAKAUMA, M., DRAGET, K. I., NISHINARI, K., PHILLIPS, G. O. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca^{2+} binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23(7), p. 1746-1755, 2009.

GALAZKA, V. B., SMITH, D., LEDWARD, D. A., DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: Effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 64(3), p. 303-310, 1999.

GANCZ, K., ALEXANDER, M., CORREDIG, M. *In situ* study of flocculation of whey protein-stabilized emulsions caused by addition of high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20(2-3), p. 293-298, 2006.

GARLAND, A., SHEN, L., ZHU, X. Mobile precursor mediated protein adsorption on solid surfaces. **Progress in Surface Science**, v. 87(1-4), p. 1-22, 2012.

GBASSI, G. K., VANDAMME, T., YOLOU, F. S., MARCHIONI, E. *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21(2), p. 97-102, 2011.

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

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

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(8), p. 1813- 1827, 2011.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15(7-8), p. 330-347, 2004.

GRANT, G. T., MORRIS, E. R., RESS, D. A., SMITH, P. J. C., THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letter**, v. 32(1), p. 195-198, 1973.

HAYNES, C. A., NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2(6), p. 517-566, 1994.

HÉBRARD, G., BLANQUET, S., BEYSSAC, E., REMONDETTO, G., SUBIRADE, M., ALRIC, M. Use of whey protein beads as a new carrier system for recombinant yeasts in human digestive tract. **Journal Biotechnology**, v. 127 (1), p.151-160, 2006.

HELGERUD, T., GÅSERØD, O., FJÆREIDE, T., ANDERSEN, P. O., LARSEN, C. K. Alginates. In: Food stabilizers thickeners and gelling agents. A. Imeson (Ed.). Wiley-Blackwell: United Kingdom, 2010, p. 50-72.

HIRSH, S. L., MCKENZIE, D. R., NOSWORTHY, N. J., DENMAN, J. A., SEZERMAN, O. U., BILEK, M. M. M. The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 395-404, 2013.

HOARE, T. R., KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49(8), p. 1993-2007, 2008.

HOGAN, S. A., MCNAMEE, B. F., O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. Microencapsulating properties of whey protein concentrate 75. **Journal of Food Science**, v. 66(5), p. 675-680, 2001.

HU, H. Y., DU, H. N. α -to- β structural transformation of ovalbumin: heat and pH effects. **Journal of Protein Chemistry**, v. 19(3), p. 177-183, 2000.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, v. 50(2), p. 49-52, 1996.

HUMBLET-HUA, K. N. P., SCHELTENS, G., VAN DER LINDEN E., SAGIS L. M. C. Encapsulation system based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 25(3), p. 307-314, 2011.

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

JAIN, A., GUPTA, Y., JAIN, S. K. Potential of calcium pectinate beads for target specific drug release to colon. **Journal of Drug Targeting**, v. 15(4), p. 285-294, 2007.

JONES, O. G., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344(1), p. 21-29, 2010.

JONES, R. T. Gelatin: manufacture and physical-chemical-chemical properties. In: Pharmaceutical capsules. F. Podczek and B. E. Jones (Eds.). Pharmaceutical Press, Grayslake, 2004, p. 23-60.

JUNG, J., ROBERT, D., ARNOLD, R. D., WICKER, L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116-121, 2013.

KAMAL-ELDIN, A., YANISHLIEVA, N. Kinetic analysis of lipid oxidation data. In: Analysis of Lipid Oxidation. A. K. Eldin and J. Pokorný (Eds.). AOCS Press, Illinois, 2005, p. 234-262.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v. 36(1-2), p. 169-189, 1994.

KARIM, A. A., BHAT, R. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments challenges and prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19(12), p. 644-656, 2008.

KELLY, R., KUDO, E. S., MITCHELL, J. R., HARDING, S. E. Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 115-120, 1994.

KHEIREDDIN, B., ZHANG, M., AKBULUT, M. Adhesion friction and lubrication of polymeric nanoparticles and their application. In: Polymer adhesion friction and lubrication. H. Zeng (Ed.). John Wiley & Sons Inc., New York, 2013, p. 617-657.

KIM, Y. D., MORR, C. V. Microencapsulation properties of gum Arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44(5), p. 1314-1320, 1996.

KIM, Y., YOO, Y. H., KIM, K. O., PARK, J. B., YOO, S. H. Textural properties of gelling system of low-methoxy pectins produced by demethoxylating reaction of pectin methyl esterase. **Journal of Food Science**, v. 73(5), p. C367-C372, 2008.

KIM, M. S., PARK, S. J., GU, B. K., KIM, C. H. Ionically crosslinked alginate–carboxymethyl cellulose beads for the delivery of protein therapeutics. **Applied Surface Science**, v. 262, p. 28–33, 2012.

KOMMAREDDY, S., SHENOY, D. B., AMIJI, M. M. Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization. In: Nanotechnologies of the Life Sciences. C.S.S.R. Kumar (Ed.) VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2005, p. 330-352.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13(1), p. 3-13, 2003.

KRISHNAN, S. Marine bioadhesion on polymer surfaces and strategies for its prevention. In: Polymer adhesion friction and lubrication. H. Zeng (Ed.). John Wiley & Sons Inc., New York, 2013, p. 617-658.

LAGARDE, M. Oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids: Formation and function in blood and vascular cells. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 941-947, 2010.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46(50), p. 244-282, 2007.

LAMBERT, J. M., WEINBRECK, F., KLEEREBEZEM, M. *In vitro* analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein-gum arabic microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56(18), p. 8360-8364, 2008.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. **Marine Drugs**, v. 8(9), p. 2435-2465, 2010.

LEE, S. J., YING, D. Y. Encapsulation of fish oils. In: *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*. N. Garti (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 2008, p. 370-403.

LEFÈVRE, T., SUBIRADE, M. I. Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28(1), p. 59-67, 2000.

LI, Z., GU, L. Effects of mass ratio, pH, temperature, and reaction time on fabrication of partially purified pomegranate ellagitannin-gelatin nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59(8), p. 4225-4231, 2011.

LI, Y., JIA, H., CHENG, Q., PAN, F., JIANG, Z. Sodium alginate-gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. **Journal of Membrane Science**, v. 375(1-2), p. 304-312, 2011.

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

LIU, M., FAN, J., WANG, K., HE, Z. Synthesis, characterization, and evaluation of phosphated cross-linked konjac glucomannan hydrogels for colon-targeted drug delivery. **Drug Delivery**, v. 14(6), p. 397–402, 2007.

LUKASZEWICZ, M., SZOPA, J., KRASOWSKA, A. Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. **Food Chemistry**, v. 88(2), p. 225-231, 2004.

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

MALONE, M. E., APPELQVIST, I. A. M. Gelled emulsion particles for the controlled release of lipophilic volatiles during eating. **Journal of Controlled Release**, v. 90(2), p. 227-241, 2003.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9(2), p. 136-156, 2004.

MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. correlation between chemical and physical properties of alginate beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33(1), p. 79-89, 1989.

MARTINSEN, A., STORRØ, I., SKJÅRK-BRÆK, G. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39(2), p. 186-194, 1992.

MATSUMOTO, T., INOUE, H. Analysis of a novel phenomenon in a solidlike structure in ovalbumin aqueous colloids using the yukawa potential. **Journal of Applied Physics**, v. 74(4), p. 2415-2419, 1993.

McCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65(8), p.1270-1282, 2000.

McCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A., PARK, Y., WEISS, J. Designing food structure to control stability digestion release and absorption of lipophilic food components. In: 2nd International symposium on delivery of functionality in complex food systems, 2007. p. 219-228.

McCLEMENTS, D. J. Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. **Langmuir**, 21(21), p. 9777-9785, 2005.

MESBAHI, G., JAMALIAN, J., FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, v. 19(4), p. 731-738, 2005.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6(7), p. 225-232, 1995.

MINE, Y., SHAHIDI, F. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Y. Mine and F. Shahidi (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 2006, 688 p.

MOREAU, D. L., ROSENBERG, M. Oxidative stability of anhydrous milkfat microencapsulated in whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 61(1), p. 39-43, 1996.

MORR, C. V., FOEGEDING, E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. **Food Technology**, v. 44(4), p. 100-112, 1990.

MORRISON, N. A., CLARK, R. C., CHEN Y. L., TALASHEK T., SWORN, G. Gelatin alternatives for the food industry. In: Physical chemistry and industrial application of gellan gum. K. Nishinari, F. Kremer and G. Lagaly (Eds.), 1999. v. 114, p. 127-131.

NAKANISHI, K., SAKIYAMA, T., IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces a common but very complicated phenomenon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91(3), p. 233-244, 2001.

NICOLAI, T., DURAND, D. Protein aggregation and gel formation studied with scattering methods and computer simulations. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12(1), p. 23-28, 2007.

NORDE, W., ANUSIEM, A. C. I. Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. **Colloids and Surfaces**, v. 66(1), p. 73-80, 1992.

NORDE, W., HAYNES, C. A. Reversibility and the mechanism of protein adsorption. In: *Proteins Interfaces II: Fundamentals and Applications*. T. A. Horbett and J. L. Brash (Eds.). ACS Symposium Series 602 American Chemical Society, Washington, 1995, p. 26-40.

OAKENFULL, D., PEARCE, J., BURLEY, R. W. Protein gelation. In: *Food proteins and their applications*. S. Damodaran & A. Paraf (Eds.). Marcel Dekker, New York, 1997, p. 111-142.

OKUYAMA, K., WU, G., JIRAVANICHANUN, N., HONGO, C., NOGUCHI, K. Helical twists of collagen model peptides. **Biopolymers**, v. 84(4), p. 421-432, 2006.

OLIVEIRA, A. C., MORETTI, T. S., BOSHINI, C., BALIERO, J. C., FREITAS, O., FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulation *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24(7), p. 685-693, 2007.

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

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

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

POLYAKOV, V. I., GRINBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 11(2), p. 171-180, 1997.

POMERANZ, Y., MELOAN, C. E. Food Analysis: Theory and Practice. 3ª Ed., Chapman and Hall, New York, 2000.

PRESS, A. G., HAUPTMANN, I. A., HAUPTMANN, L., FUCHS, B., FUCHS, M., EWE, K., RAMADORI, G. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 12(7), p. 673-678, 1998.

RAJAM, R., KARTHIK, P., PARTHASARATHI, G. S., JOSEPH, G. S., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4(4), p. 891-898, 2012.

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

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

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

RENARD, D., ROBERT, P., LAVENANT, L., MELCION, D., POPINEAU, Y., GUÉGUEN, J., DUCLAIR, C., NAKACHE, E., SANCHEZ, C., SCHMITT, C.

Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242(1-2), p. 163-166, 2002.

SALGIN, S., SALGIN, U., BAHADIR, S. Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: The effects of ion types and ionic strengths. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7(12), p. 12404-12414, 2012.

SANDOLO, C., COVIELLO, T., MATRICARDI, P., ALHAIQUE, F. Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery. **European Biophysics Journal**, v. 36(7), p. 693-700, 2007.

SAUER, M., STREICH, D., MEIER, W. pH-Sensitive Nanocontainers. **Advanced Materials**, v. 13(21), p. 1649-1651, 2001.

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

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(1), p. 363-369, 2010.

SCHREIBER, R., GAREIS, H. The raw material "Ossein". In: Gelatin handbook - Theory and industrial practice. R. Schreiber and H. Gareis (Eds.). Wiley-VCH: Weinheim, 2007, p. 63-71.

SENO, F., TROVATO, A. Minireview: the compact phase in polymers and proteins. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 384(1), p. 122-127, 2007.

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

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

SPERBER, B. L. H. M., SCHOLS, H. A., STUART, M. A. C., NORDE, W., VORAGEN, A. G. J. Influence of the overall charge and local charge density of protein on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 23(3), p. 765-772, 2009.

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

STRÖM, A., BOERS, H. M., KOPPERT R., MELNIKOV, S. M., WISEMAN, S., PETERS, H. P. F. Physico-chemical properties of hydrocolloids determine their appetite effects. In: Gums and stabilizers for the food industry. P. A. Williams and G. O. Phillips (Eds.), 2009, v. 15, p. 341-355.

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

SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J., MISKELLY, G. M., WIBISONO, R., WADHWA, S. S. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 126(3), p. 1049-1056, 2011.

TAHERIAN, A. R., BRITTEN, M., SABIH, H., FUSTIER, P. Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 25(5), p. 868-878, 2011.

TAN, H., MARRA, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3(3), p. 1746-1767, 2010.

TAVAKOL, M., VASHEGHANI-FARAHANI, E., DOLATABADI-FARAHANI, T., HASHEMI-NAJAFABADI, S. Sulfasalazine release from alginate-N, O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 77(2), p. 326–330, 2009.

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

THOMPSON, A., BOLAND, M., SINGH, H. Milk proteins from expression to food. Elsevier Inc., San Diego, 2009.

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

TOLSTOGUZOV, V. B. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17(1), p. 1-23, 2003.

TRUELSTRUP HANSEN, L., ALLAN-WOJTAS, P. M., JIN, Y.-L.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19(1), p. 35-45, 2002.

VAN TASSEL, P. R. Statistical mechanical modeling of protein adsorption. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, v. 34(12), p. 1129-1132, 2003.

VANDAMME, T. F., LENOURRY, A., CHARRUEAU, C., CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48(8), p. 219–231, 2002.

VENUGOPAL, V. Polysaccharides: their characteristics and marine sources. In: Marine polysaccharides food applications. CRC Press: New York, 2011.

VERBEEK, C. J. R., VAN DEN BERG, L. E. Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. Review. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 295(1), p. 10-21, 2010.

VERHEUL, M., ROEFS S. P. F. M. Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 12(1), p. 17-24, 1998.

VERLEYEN, T., VAN DYCK, S., ADAMS, C. A. Accelerated stability tests. In: Analysis of lipid oxidation, A. K. Eldin and J. Pokorný (Eds.), AOCS Press, Illinois, 2005, p. 210-233.

WEINBRECK, F., DE VRIES, R., SCHROOYEN, P., DE KRUIF, C. G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4(2), p. 293-303, 2003.

WERTZ, C. F., SANTORE, M. M. Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: single-species and competitive behavior. **Langmuir**, v. 17(10), p. 3006-3016, 2001.

WICHCHUKIT, S., OZTOP, M. H., McCARTHY, M. J., McCARTHY, K. L. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33(1), p. 66-73, 2013.

WÓJCIAK, K. M., DOLATOWSKI, Z. J. Oxidative stability of fermented meat products. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 11(2), p. 99-109, 2012.

WONG, T. W., COLOMBO, G., SONVICO, F. Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. **AAPS- American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12(1), p. 201-214, 2011.

WONGSASULAK, S., PATAPEEJUMRUSWONG, M., WEISS, J., SUPAPHOL, P., YOOVIDHYA, T. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. **Journal of Food Engineering**, v. 98(3), p. 370-376, 2010.

YAPO, B. M., ROBERT, C., ETIENNE, I., WATHELET, B., PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100(4), p.1356-1364, 2007.

ZHANG, F., ZHAO, M., WANG, W., HU, T. Encapsulation of *Bifidobacterium bifidum* in improved alginate microcapsules to prolonging viability. **Advanced Materials Research**, v. 183-185, p. 1481-1485, 2011.

CAPÍTULO 2

**PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM
PROTEÍNAS DA CLARA DE OVO E DO SORO DO LEITE:
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES**

CAPÍTULO 2**PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM PROTEÍNAS DA CLARA DE OVO E DO SORO DO LEITE: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES****RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar partículas obtidas por gelificação iônica com pectina de baixo teor de esterificação amidada ou alginato, recobertas com proteínas da clara de ovo (OVA), do soro do leite (WPC) e uma mistura de ambas (OVA:WPC,1:1) e adicionalmente avaliar sua proteção contra a oxidação lipídica. Soluções de pectina ou alginato de sódio (2%, m/m) foram emulsificadas com óleo de girassol (1,65%, m/m) e pulverizadas em solução de cloreto de cálcio (2%, m/m) utilizando um atomizador duplo fluido. As partículas formadas foram recobertas com proteínas (OVA, WPC e OVA:WPC) em diferentes concentrações de proteína em solução (2, 4, 6 e 8%) em pH 4,0. Posteriormente, o óleo de girassol foi substituído por um óleo modelo rico em ácidos graxos poli-insaturados e as partículas sem cobertura e as recobertas com as maiores quantidades de proteínas adsorvidas foram liofilizadas e armazenadas (45 °C), durante quatro semanas, para avaliação da estabilidade oxidativa do óleo encapsulado através da formação de peróxidos. Inicialmente, o potencial Zeta das soluções proteicas, dos polissacarídeos e das emulsões foi determinado na faixa de pH de 3,0 – 7,0. Partículas úmidas e liofilizadas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio ($d_{0,5}$), teor de sólidos totais e morfologia. A eficiência de encapsulação em relação ao óleo de girassol encapsulado e o teor de cálcio foram determinados nas partículas obtidas por gelificação iônica. Os teores de proteína adsorvida e de sólidos foram determinados para as partículas úmidas recobertas em função das diferentes quantidades de proteína em solução. Partículas contendo maior quantidade adsorvida da mistura OVA:WPC foram avaliadas por microscopia confocal de varredura e por eletroforese em gel de poliacrilamida. As maiores adsorções proteicas foram obtidas quando a maior concentração de proteína em solução foi

utilizada. Elevadas eficiências de encapsulação, $91,70 \pm 1,80\%$ e $95,50 \pm 2,42\%$, foram observadas para partículas de alginato e pectina, respectivamente. O tamanho médio das partículas de gelificação iônica foi de $140,09 \pm 10,05 \mu\text{m}$ para partículas de alginato e $215,41 \pm 10,05 \mu\text{m}$ para partículas de pectina. Após o recobrimento proteico as partículas produzidas com alginato aumentaram de tamanho, enquanto partículas produzidas com pectina recobertas diminuíram de tamanho, indicando que partículas produzidas com pectina em mais frágeis. Independentemente do tipo de proteína, o aumento da quantidade de proteína em solução aumentou a quantidade de proteína adsorvida e o teor de matéria seca nas partículas. Observou-se menor quantidade de cálcio nas partículas produzidas com pectina ($1,44 \pm 0,02 \mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$ de partículas em base seca) comparado às partículas produzidas com alginato ($2,48 \pm 0,10 \mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$ de partículas em base seca). Avaliação por eletroforese das partículas contendo maior quantidade de proteína adsorvida da mistura OVA:WPC, indicou que ambas as proteínas foram adsorvidas nas partículas e que aparentemente as proteínas também difundiram para o seu interior conforme observado por microscopia confocal. As partículas recobertas com proteína, independentemente do tipo, apresentaram maior proteção frente à oxidação lipídica comparada com as partículas sem recobrimento. Maior capacidade protetiva após quatro semanas foi observada para partículas produzidas com pectina e recobertas com proteínas da clara de ovo.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce and characterize particles obtained by ionic gelation with low methoxyl amidated pectin or alginate coated with proteins from egg white (OVA), whey (WPC) and a mixture of both (OVA:WPC, 1:1) and further assessing its protection against lipid oxidation. Solutions of pectin or sodium alginate (2% w/w) were emulsified with sunflower oil (1.65% w/w) and sprayed into a calcium chloride solution (2% w/w) using a double fluid atomizer. The particles were coated with proteins (OVA, OVA:WPC and WPC) at different protein concentrations in solution (2, 4, 6 and 8%) at pH 4.0. Thereafter the sunflower oil was replaced by a model oil and particles lyophilized uncoated and coated with larger amounts of adsorbed proteins were stored (45 °C) for four weeks to assess the oxidative stability of the encapsulated oil through the formation of peroxides. Initially, the Zeta potential of protein solutions, and emulsions of polysaccharides was determined in the pH range 3.0 to 7.0. Moist and lyophilized particles were characterized by medium size ($d_{0.5}$), content of total solids and morphology. The encapsulation efficiency of sunflower oil and calcium content were determined in the particles obtained by ionic gelation. The amount of adsorbed protein and solids were measured for the wet coated particles according to the different amounts of protein in solution. Particles containing higher amount of adsorbed OVA:WPC were evaluated by confocal scanning microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis. The major protein adsorption was obtained when higher concentrations of protein in solution were used. High encapsulation efficiencies, $91.70 \pm 1.80\%$ and $95.50\% \pm 2.42\%$ were observed for particles of alginate and pectin respectively. The average particle size of ionic gelation was $140.09 \pm 10.05 \mu\text{m}$ for particles of alginate and $215.41 \pm 10.05 \mu\text{m}$ for particles of pectin. After the protein coating, the particles produced with alginate increased in size, while particles produced with pectin and coated with protein decreased in size, indicating that particles produced with pectin were more fragile. Regardless of the type of protein, the increased amount of protein in solution increased the amount of adsorbed protein and dry matter content of the particles. Lower amount of calcium was observed for particles made with pectin ($\text{Ca } 1.44 \pm 0.02 \mu\text{mol Ca/mg}$ of particle dry basis) compared with particles produced with alginate (Ca

2.48 ± 0.10 mg of particle dry basis). Evaluation by electrophoresis of particles containing greater amounts of protein adsorbed OVA:WPC indicated that both proteins were adsorbed on the particles and proteins also appear to spread inside them as observed by confocal microscopy. The particles coated with protein, regardless of type, showed greater protection against the lipid oxidation compared with the uncoated particles. Higher protective capacity after four weeks was observed for particles made with pectin and coated with egg white protein.

2.1 Introdução

A encapsulação apresenta-se como uma das técnicas de preservação da qualidade de substâncias sensíveis e é um método para a produção de materiais com novas propriedades (JYOTHI *et al.*, 2012). A tecnologia de encapsulação tem aplicações na medicina, indústria farmacêutica, de cosméticos, produtos químicos, agrícolas e na indústria de alimentos (CHAMPAGNE, FUSTIER, 2007; MADENE *et al.*, 2006).

Os objetivos da tecnologia de encapsulação na indústria de alimentos incluem o mascaramento de odores ou sabores, interações com agentes ativos, liberação modificada em determinados sítios de ação, proteção contra umidade, calor, oxigênio e luz (GIBBS *et al.*, 1999; UBBINK, KRUGER, 2006), de maneira a reduzir os processos de degradação química durante o processamento, armazenamento e, também, a compatibilidade com outras substâncias do meio (McCLEMENTS, DECKER, 2000; WEISS, TAKHISTOV, McCLEMENTS, 2006).

Novos materiais e tecnologias de encapsulação têm sido propostos para produzir matrizes encapsulantes, para a obtenção de nano e micropartículas a partir de biopolímeros reconhecidos como seguros para alimentos (RACOVITĂ *et al.*, 2009). Alginato, pectina ou uma mistura deles pode ser utilizada para formação das partículas (MESTDAGH, AXELOS, 1998).

Alginatos são polissacarídeos extraídos de algas marrons, compostos de ácidos gulurônicos e manurônicos formando regiões de blocos manurônicos, gulurônicos e regiões de sequência e quantidades alternadas, que são determinadas pelo tipo de alga de onde o alginato é extraído (MARTINSEN, SKJÅK-BRAEK, SMIDSRØD, 1989).

Pectinas são componentes estruturais de paredes celulares, cujas fontes principais de extração são subprodutos cítricos. A pectina é um polissacarídeo aniônico composto basicamente por ácidos galacturônicos (α , 1-4) contendo açúcares neutros como arabinose, galactose e xilose, além de resíduos de ramnose (THAKUR, SINGH, HANDA, 1997).

Alginatos e pectinas podem se associar com íons bivalentes através de interações iônicas fortes formando gel após a adição de cátions bivalentes. Essas matrizes de gel propiciam a encapsulação de compostos hidrofóbicos, como ácidos graxos poli-insaturados (SMRDEL *et al.*, 2006; YOO *et al.*, 2006). A técnica tem sido utilizada para encapsular óleos; no entanto, apresenta uma desvantagem frente à oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa, devido à alta porosidade da superfície da partícula, quando expostos a temperaturas elevadas e a presença de oxigênio (BEINDORFF, ZUIDAM, 2010).

Ácidos graxos poli-insaturados são suscetíveis à deterioração oxidativa e consequente produção de odores indesejados. Assim há necessidade de proteger esses óleos de forma a torná-los mais estáveis durante manuseio, processamento e estocagem (CARNEIRO *et al.*, 2013). A encapsulação de óleos com propósitos nutricionais, terapêuticos e de aromatização tem sido reportada na literatura incluindo óleo de peixe, tocoferol, óleo de germe de trigo, limão e citronela entre outros, utilizando também óleos modelo encapsulados em partículas de alginato de cálcio (CHAN, 2011).

A busca de uma melhor funcionalidade das partículas tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Entre elas, a utilização de técnicas combinadas, que incluem a gelificação iônica e a complexação com polieletrólitos catiônicos, incluindo proteínas (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008; PATIL *et al.*, 2010). Embora os mecanismos de complexação não sejam totalmente compreendidos, existem características que influenciam esse fenômeno, como as características moleculares das proteínas, do meio circundante e a topografia da superfície (ROACH, FARRAR, PERRY, 2005; VAN TASSEL, 2003).

A hipótese deste estudo foi que a adsorção de uma camada de proteína à partícula de gelificação iônica pode melhorar a proteção do óleo encapsulado contra a oxidação. Adsorções proteicas (OVA, WPC e mistura OVA:WPC, 1:1) sobre partículas produzidas por gelificação iônica com alginato ou pectina foram avaliadas. Partículas foram caracterizadas, bem como as melhores condições de adsorção eletrostática das proteínas sobre a superfície das partículas. Um óleo modelo contendo ácidos graxos poli-insaturados foi encapsulado e a deterioração oxidativa foi monitorada durante quatro semanas a 45 °C através da formação de peróxidos.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material

Os materiais utilizados foram: alginato de sódio (ALG) (alta massa molar, alto conteúdo de ácido gulurônico, lote G4200301 MANUGEL DMB, FMC Biopolymer, Campinas, SP, Brasil), pectina cítrica (PEC) GENU® de baixo teor de metoxilação amidada (conteúdo de ácido galacturônico $81,3 \pm 1,2\%$, grau de esterificação $30,4 \pm 1,6\%$ e grau de amidação $10,1 \pm 1,0\%$ determinado de acordo com FAO, (2009), CP Kelco, Limeira, SP, Brasil). Para o recobrimento, concentrado proteico do soro do leite (WPC) (Lacprodan - lote: Lac804U17601, 76, Arla Foods Ingredients, Porteña, Provincia de Córdoba, Argentina) e proteínas da clara de ovo (OVA) (Salto's Alimentos Ltda., Salto, SP, Brasil) foram utilizados, óleo de girassol comercial e um óleo modelo foram utilizados como ativos, cloreto de cálcio anidro (M.M: 110,99, lote 36308, Dinâmica, Diadema - SP, Brasil), ácido clorídrico (M.M.: 36,46, Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (M.M: 40, Diadema, SP, Brasil), ácido sulfúrico (Synth, Diadema, SP, Brasil), isotiocianato de fluoresceína FITC (lote 90K5316, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil), rodamina (lote 47H3506, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil), vermelho do nilo (lote 47H3425, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil). Água deionizada e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Caracterização dos biopolímeros

Concentrado proteico de soro do leite (WPC) e proteínas da clara de ovo (OVA) foram caracterizados com relação ao teor de proteína e umidade segundo metodologia da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2006) e quanto ao conteúdo de lipídios, segundo Bligh e Dyer (1959). Utilizou-se a metodologia de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total, adotando-se 6,38 e 6,68 para WPC e OVA respectivamente, como fator de conversão de nitrogênio em proteína.

2.2.2.2 Potencial Zeta

Inicialmente foi determinado o potencial Zeta das soluções das proteínas (SOL_{OVA}, SOL_{OVA:WPC} e SOL_{WPC}) e dos polissacarídeos (SOL_{ALG} e SOL_{PEC}), bem como nas emulsões contendo o óleo de girassol. Todas as determinações do potencial Zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.), em triplicata.

2.2.2.2.1 Potencial Zeta das soluções

Soluções de OVA, mistura OVA:WPC e WPC, PEC e ALG foram preparadas na concentração de 0,2% (m/m) e mantidas sob agitação *overnight*. O potencial Zeta das soluções foi medido na faixa de pH de 3,0 a 7,0 à temperatura ambiente. O pH das soluções foi ajustado manualmente, utilizando ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N e 0,5 N.

2.2.2.2.2 Potencial Zeta das emulsões

Foram preparadas três soluções de alginato e pectina na concentração de 2% (m/m). As soluções foram então emulsificadas com 1,65% (m/m) de óleo de girassol em agitador Turrax 14000 rpm por 3 minutos (IKA, Works do Brasil, RJ). As emulsões de alginato e pectina foram diluídas para a concentração de 0,2% (volume de emulsão /volume de água) e suas cargas superficiais foram medidas, variando o pH de 3,0 a 7,0 à temperatura ambiente.

2.2.2.2.3. Potencial Zeta das partículas de alginato e pectina

O potencial Zeta das partículas foi determinado usando um equipamento SurPASS Electrokinetic Analyzer (Anton Paar GmbH, Austria) equipado com uma célula cilíndrica. O potencial de fluxo foi medido por eletrodos de Ag/AgCl. Para cada determinação, ~0,5 mL de partículas úmidas foram transferidas para o cilindro de vidro na célula de medida. Antes de iniciar as determinações, as partículas foram lavadas com água deionizada. Um eletrólito de 1 mmol/L de solução de KCl foi utilizado. O potencial Zeta foi obtido a partir

da medida do potencial de fluxo baseado na equação de Smoluchowski conforme procedimento descrito por Xie *et al.* (2009). Esta determinação somente foi possível pela gentileza da Anton Paar, que a realizou em seus laboratórios na Austria. As determinações foram feitas em triplicata.

2.2.2.3 Determinação do teor de cálcio das partículas de alginato e pectina

A concentração de cálcio nas partículas foi determinada utilizando espectrofotômetro de absorção atômica (Analytik Jena AG-NOVAA300, JENA, ALEMANHA) e solução padrão de cálcio (1000 µg/mL, SCP Science, lot S120221015) no modo de absorção com detector de chama ar-acetileno. Amostras de partículas úmidas (400 mg) foram dissolvidas em 25 mL de solução de citrato de sódio a 3% (SRIAMORNSAK e KENNEDY, 2008). Testes preliminares mostraram que a solução de citrato de sódio não interfere com a análise do cálcio. Cada determinação foi realizada em triplicata.

2.2.2.4 Produção de partículas de alginato e pectina

As emulsões foram preparadas com soluções aquosas de alginato ou pectina (2%, m/m de solução), contendo óleo de girassol ou óleo modelo (1,65% m/m), a 25 °C utilizando homogeneizador Ultra Turrax a 14000 rpm durante 3 minutos (IKA, Works do Brasil, RJ). A emulsão foi atomizada sobre uma solução de cloreto de cálcio (2%, m/m) com pH ajustado para 4,0 utilizando atomizador duplo fluido com orifício de 1 mm de diâmetro, altura de 12 cm entre o bico atomizador e a solução de cloreto de cálcio, pressão do ar de 0,185 kgf/cm² e velocidade de atomização de 555 mL/hora. Durante a atomização, a emulsão permaneceu em agitação constante à temperatura de 25 °C para a EMUL_{PEC} e 50 °C para EMUL_{ALG}, considerando que a emulsão com alginato era mais viscosa. Após a atomização, as partículas foram mantidas em solução de cloreto de cálcio por mais 30 minutos (*hardening time*). Posteriormente, as partículas foram separadas e lavadas em peneiras de malha de aço (ϕ 53 µm) com água deionizada (pH 4,0). Foram feitas três produções independentes de partículas. Uma fração das partículas úmidas foi congelada e liofilizada (Mod. 501, Edwards Pirani, Crawley, West Sussex, UK) à -40 °C, pressão de 0,1

mmHg, tempo total do ciclo de 48 h. As partículas secas foram acondicionadas em frascos com tampa e mantidas sob refrigeração.

2.2.2.5 Recobrimento de partículas de alginato e pectina, com OVA, OVA:WPC e WPC

A cobertura de 40 e 50 g de partículas úmidas de alginato ou pectina obtidas no item 2.2.2.4, foi feita transferindo-se as partículas para 200 mL de solução aquosa de proteína (SOL_{OVA}, SOL_{OVA:WPC} e SOL_{WPC}) ajustadas a pH 4,0. Foram utilizadas as concentrações de 2, 4, 6 e 8% (m/m) para as soluções proteicas. As partículas foram mantidas nas soluções contendo proteína durante 30 minutos, em agitação constante (500 rpm), à temperatura ambiente. As partículas foram posteriormente lavadas em peneiras de malha de aço (ϕ 53 μ m) com água deionizada (pH 4,0) para remover a proteína que não foi adsorvida nas partículas. Foram feitas três produções independentes de partículas para cada concentração avaliada. As partículas foram analisadas em triplicata em relação ao seu tamanho e teor de proteína e umidade. Uma fração das partículas úmidas foi congelada e liofilizada. As partículas secas foram acondicionadas em frascos com tampa e mantidas sob refrigeração.

2.2.2.6 Características físico-químicas das partículas

2.2.2.6.1 Composição centesimal das partículas de alginato e pectina, recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC

O teor de proteína e matéria seca das partículas foi determinado de acordo com a *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2006). Para determinar o teor de proteína presente nas partículas, utilizou-se a metodologia de Kjeldahl, com fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,68; 6,53 e 6,38 para OVA, OVA:WPC e WPC, respectivamente. O teor de nitrogênio das partículas de pectina foi determinado e utilizado para correção do conteúdo total de nitrogênio das partículas contendo proteína adsorvida. As partículas também foram caracterizadas, em triplicata em relação ao teor de lipídios segundo Bligh e Dyer (1959).

2.2.2.6.2 Eficiência de encapsulação das partículas de alginato e pectina

Para determinação do óleo total das partículas utilizou-se a seguinte metodologia. Adicionou-se uma solução aquosa de citrato de sódio na concentração de 3% (m/m) a 5g. de partículas úmidas, para liberação do óleo. Após essa etapa, a quantificação do óleo foi feita segundo a metodologia de Bligh e Dyer (1959). A eficiência de encapsulação foi determinada pela relação:

$$EE(\%) = \frac{\text{Óleo total das partículas (g)} / \text{sólidos totais (g)}}{\text{Óleo inicial (g)} / \text{sólidos totais (g)}} \times 100$$

2.2.2.6.3 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas com e sem recobrimento proteico

O tamanho médio (d 0,5) das partículas úmidas foi determinado utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, WR, UK), unidade de amostragem Hydro 2000S (Malvern, Worcestershire, WR, UK). O material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água deionizada em pH 4,0. A leitura foi realizada, em triplicata, adicionando a amostra dentro da unidade de amostragem na quantidade adequada, atingindo a faixa de obscuração de 3 a 20%, conforme recomendação do fabricante.

2.2.2.6.4 Morfologia das partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento de proteínas, úmidas e secas

A morfologia das partículas úmidas com e sem cobertura foi observada em microscópio ótico (JENVAL, Carl Zeiss, Toronto, Canada) utilizando objetivas de 12,5 e 25 X, e Optovar de 1,0 e 1,25 x. A captação das imagens foi realizada com a utilização do software EDN-2 – Microscopy Image Processing System. As partículas liofilizadas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo JMS – T300 Jeol, Tokyo, Japan). As amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e

recobertas com uma fina camada de ouro (180 segundos e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Balzer (Baltec SCD50, Liechtenstein). As condições de análise foram aceleração de voltagem de 15 e 20 kV.

2.2.2.6.5 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) de partículas de alginato recobertas com proteínas

A análise de microscopia confocal foi baseada na metodologia proposta por Lamprecht, Schäfer e Lehr (2000) com algumas adaptações. As partículas foram produzidas com materiais corados previamente. A solução de ovalbumina foi corada com dois tipos de corantes: isotiocinato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil) e a Rodamina B Isotiocianato (RBITC) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil). A solução de WPC foi corada com Isotiocinato de fluoresceína (FITC) e o óleo de girassol corado com vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil). A morfologia das partículas úmidas produzidas com as proteínas e o óleo associados aos corantes foi observada em microscópio confocal modelo Zeiss LSM780 – NLO (Carl Zeiss, Alemanha), objetiva EC Plan – Neofluar 40x/1.3 Oil DIC. As imagens foram coletadas utilizando lasers com comprimentos de onda de 488 e 543 nm para excitação do FITC e da Rodamina, respectivamente e 528 nm para vermelho do nilo.

2.2.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Partículas úmidas com aproximadamente 0,4% de proteína foram adicionadas a um tubo contendo solução de citrato de sódio a 3% (m/m). As amostras foram agitadas durante 10 minutos até se observar completa dissolução das partículas. A eletroforese foi feita segundo o método de Laemmli (1970) e Hames e Rickwood (1990), conduzida em gel de 10%, (SDS-PAGE) a 120 V, com amostras de 0,1 mg de proteínas dispersas em tampão redutor (Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; 5% de β -mercaptoetanol; 20% de glicerol; SDS 10%; azul de bromofenol 0,1%) e desnaturadas à 95 °C por 5 minutos, aplicando 10 μ L de amostra. A análise foi conduzida em um sistema miniprotean II (Biolaboratories Ltda, cod. 165-2940) com gel de 0,75 mm de espessura. O gel foi corado em solução contendo metanol (40%),

ácido acético (10%) e Comassie Brilliant Blue –G250 (0,1%), sendo o excesso de corante removido com a mesma solução sem o corante. As massas molares das bandas observadas foram estimadas por comparação com padrão de massa molar contendo fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa) (padrões, BIO RAD).

2.2.2.8 Composição de ácidos graxos do óleo modelo

As análises de ácidos graxos do óleo modelo foram determinadas em cromatógrafo a gás capilar (CGC Agilent 6850 Series GC System, Santa Clara, CA, USA). As amostras foram preparadas na forma de metil-ésteres de ácidos graxos, segundo o método de Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento da AOCS Ce 1f96- (2009) em coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl – 1metilpolysiloxan, Santa Clara, CA, USA) de dimensões: 60 m x 0,25 mm ϕ interno x 0,25 μ m filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: vazão da coluna = 1,0 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do detector 280 °C; temperatura do injetor 250 °C. A temperatura da coluna foi mantida inicialmente à 110 °C por 5 min, depois programada com rampa de 5 °C/min até 215 °C, depois mantida à 215 °C por 24 min; gás de arraste hélio; volume de injeção 1 μ L. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões Nu Check Inc. (Elysian, IL) e a quantificação realizada por normalização de área.

2.2.2.9 Monitoramento da estabilidade oxidativa do óleo modelo livre e encapsulado

A estabilidade oxidativa do óleo modelo livre e encapsulado nas partículas com e sem recobrimento de proteínas foi avaliada pela determinação do índice de peróxidos estocadas durante quatro semanas, a 45 °C. Essa temperatura de armazenamento foi empregada com objetivo de acelerar o processo de oxidação. A primeira etapa foi a extração do óleo das partículas. Para as partículas sem cobertura, 0,5g de partículas liofilizadas foi suspensa em 8 mL de água deionizada e hidratada por 18 h. Após essa etapa, foi adicionado citrato de sódio na concentração de 3%, para liberação do óleo. Para as

partículas recobertas com proteínas, 0,5g de partículas liofilizadas foi suspensa em 8 mL de água deionizada e então foi realizada uma digestão enzimática. Para isso, o pH foi ajustado para 7,0, com NaOH 0,5 N e foi adicionada pancreatina na concentração de 0,5 mg/mL, sendo essa reação mantida à 37 °C, por 18 h. Após essa etapa, foi adicionado citrato de sódio na concentração de 3%, para liberação do óleo. Após essa etapa, o meio de extração, que contém o óleo foi obtido segundo a metodologia de Bligh e Dyer (1959). As extrações foram realizadas em duplicata para cada amostra. A determinação do valor de peróxidos foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o método padrão IDF 74A:1991. 0,01 g óleo modelo foi pesado e diluído em 4 mL da mistura de clorofórmio/metanol (7:3, v:v) e uma alíquota de 200 µL foi retirada para reação. No caso das partículas, à uma alíquota de 200 µL do meio de extração, descrito acima, foi adicionada 9,6 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (7:3, v:v). Para a formação de cor, foram adicionados 50 µL de soluções de cloreto de ferro (II) e 50 µL de tiocianato de amônia 3,94 M. A amostra foi agitada, mantida em repouso, no escuro por 5 minutos e então medida a absorbância a 500 nm, em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP 220, Merse, SP, Brasil). As medidas foram realizadas em triplicata. A quantidade de peróxidos foi determinada usando uma curva padrão de Fe^{3+} , com concentrações variando de 1 a 20 µg, de acordo com Shantha e Decker (1994).

2.2.2.10 Análise estatística

Diferenças significativas entre as médias para os valores obtidos foram avaliadas utilizando ANOVA e teste de Tukey com o auxílio do programa SAS, em nível de 5% de significância. Cada tipo de partícula foi produzido em três lotes independentes e para cada lote, as determinações foram feitas em triplicatas.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização dos biopolímeros e do óleo modelo

A composição centesimal dos biopolímeros utilizados esta apresentada na Tabela 2.3.1 confirmando o alto teor de proteína das fontes proteicas utilizadas.

Tabela 2.3.1 – Composição centesimal dos biopolímeros (base seca)

Produtos	Composição centesimal (%)			
	Proteína	Lipídios	Carboidratos*	Cinzas
WPC	80,53 ± 0,35	7,58 ± 0,31	7,96	3,93 ± 0,04
OVA	90,48 ± 0,78	0,44 ± 0,06	4,10	4,98 ± 0,12

(*) por diferença

As emulsões para a produção e caracterização das partículas foram preparadas com óleo de girassol e, posteriormente para a avaliação da estabilidade oxidativa, o óleo foi substituído por um óleo modelo. A composição dos ácidos graxos do óleo modelo é do óleo de girassol são apresentados na Tabela 2.3.2.

Tabela 2.3.2 - Composição de ácidos graxos do óleo modelo

Óleo	Ácidos graxos (%)				
	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico
Modelo	10,04 ± 0,07	5,13 ± 0,68	20,17 ± 0,40	50,68 ± 0,07	10,18 ± 0,30
Girassol (*)	6,4	4,2	26,9	61,4	0,3

(*) Fonte. Peterson, Wagner, Auld (1983).

Neste estudo para avaliar a estabilidade oxidativa do óleo encapsulado, foi escolhido um óleo com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, devido à avaliação e controle da oxidação lipídica ser de grande significância porque resulta em perda de valor nutricional e desenvolvimento de compostos voláteis que podem ser prejudiciais à saúde (O'BRIEN, 2009). Com a encapsulação, a oxidação de óleos poli-insaturados pode ser inibida e a vida de prateleira dos produtos durante o armazenamento e o processamento

pode ser melhorada. O nível de proteção contra a oxidação depende do encapsulante utilizado e da integridade da partícula (ANDERSEN, 1998).

2.3.2 Determinação do potencial Zeta das soluções dos biopolímeros

O potencial Zeta permitiu determinar a quantidade de carga líquida em solução e emulsão dos polissacarídeos e soluções das proteínas podendo, assim, identificar em que faixa de pH pode ocorrer maior intensidade de interação dos grupos funcionais carregados nos biopolímeros utilizados neste estudo. Os valores do potencial Zeta estão apresentados na Figura 2.3.1. Ao analisar o potencial Zeta da solução e emulsão de alginato (Figura 2.3.1-A) observou-se que ambas apresentaram carga negativa em toda a faixa do pH estudada, tendo sua eletronegatividade aumentada com elevação do pH, variando de $-36,10 \pm 5,8$ mV e $-34,70 \pm 6,3$ mV (pH 3,0) a $-74,50 \pm 4,20$ mV e $-71,60 \pm 6,8$ mV (pH 7,0) respectivamente, apresentando praticamente os mesmos valores de carga, sem diferenças significativas, indicando desta forma, que a adição do óleo não alterou a carga total do polissacarídeo (Figuras 2.3.1 A e B).

A Figura 2.3.1-B mostra os valores de potencial Zeta da solução e emulsão de pectina. Observa-se que a pectina também apresentou valores de potencial Zeta negativos em toda faixa de pH avaliada, variando de $-19,20 \pm 4,30$ mV e $-18,80 \pm 3,90$ mV (pH 3) a $-51,60 \pm 4,80$ mV e $-50,90 \pm 5,30$ mV (pH 7,0). Também neste caso a adição do óleo não alterou significativamente o total de cargas da solução comparada à emulsão quando a pectina foi utilizada. Ao se comparar os valores de potencial Zeta da pectina com os valores obtidos para o alginato observou-se que a pectina apresentou menor valor, o que pode ter sido decorrência da menor quantidade de grupos carboxilatos na cadeia da pectina.

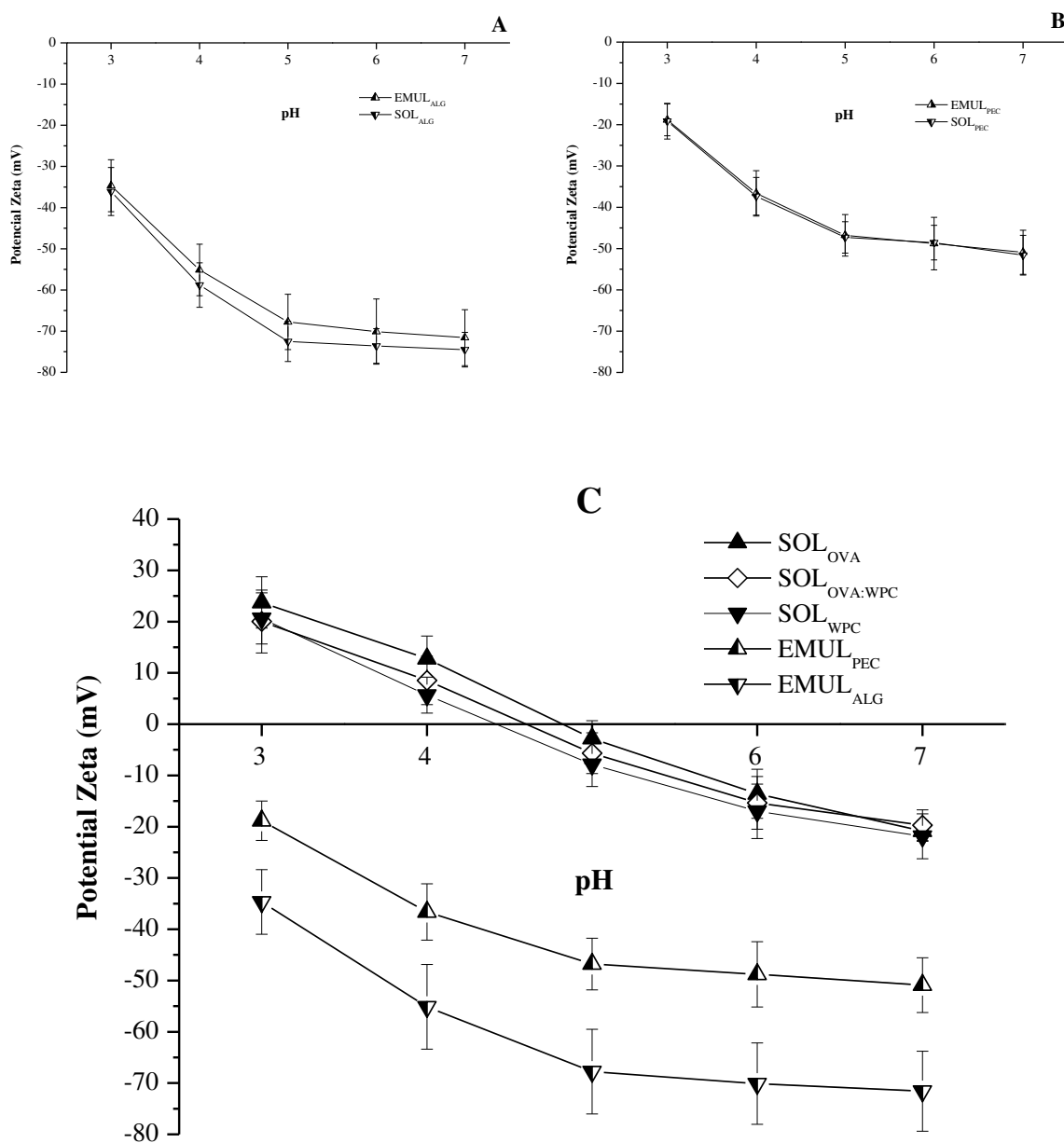


Figura 2.3.1 - Potencial Zeta dos biopolímeros (A) solução e emulsão de alginato (B) solução e emulsão de pectina (C) proteínas (OVA, OVA:WPC, WPC), na concentração de 0,2% (m/m), pH 3,0 a 7,0.

Estes resultados, como esperado, indicam que, quando o pH do meio foi aumentado e portanto se distanciando do pKa da pectina (~2,9, RALET *et al.*, 2001) ou do alginato (pKa 3,20 – 3,38, MARTINSEN, STORRØ, SKJÅRK-BRÆK, 1992), os ácidos carboxílicos tornam-se mais dissociados ($-\text{COO}^-$, H^+), resultando em aumento da carga negativa. Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, foram reportados na literatura, variando para a solução de alginato de -8,7 mV para -68,4 mV, quando o pH foi incrementado de 2 para 8 (HARNASILAWAT, PONGSAWATMANIT, McCLEMENTS, 2006). As pequenas diferenças de valores encontradas podem ser devida a diferentes alginatos e aos diferentes pHs considerados pelos diferentes trabalhos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Opanasopit *et al.* (2008) avaliando o potencial Zeta de soluções de pectina de baixo teor de metoxilação amidada a 0,1%. Os autores encontraram valores de -4 a -54 mV, quando o pH variou de 2,0 a 5,5. Jones *et al.* (2010) encontraram valores negativos para o potencial Zeta das soluções de pectina na faixa de pH 3,0 a 7,0.

O potencial Zeta da solução das proteínas do soro do leite variou de $20,61 \pm 4,99$ mV (pH 3) a $-19,70 \pm 3,00$ mV (pH 7,0), sendo que o ponto isoelétrico foi aproximadamente 4,35 (Figura 2.3.1.C). Esse resultado é similar ao ponto isoelétrico reportado na literatura para as proteínas do soro do leite, que varia de 4,4 a 5,2 (CHEN, *et al.*, 2012; LY *et al.*, 2008; WALKENSTRÖM, HERMANSSON, 1997). Os valores encontrados são também próximos ao determinado anteriormente para o ponto isoelétrico da β -lactoglobulina, ~4,6 (CHANASATTRU *et al.*, 2009). Em pHs inferiores ao pI, a solução proteica apresentou-se carregada positivamente. Em pH mais baixo que o ponto isoelétrico os grupos ácidos e básicos de uma proteína estão totalmente protonados, o que confere carga positiva à molécula. À medida que o pH aumenta, a proteína perde prótons, como um ácido poliprótico, e torna-se menos positiva, devido aos grupos carboxila desprotonados ($-\text{COO}^-$) e, em parte, porque alguns dos grupos amina tornam-se neutros ($-\text{NH}_2$), até atingir seu ponto isoelétrico (pI). Para valores de pH maiores que pI, a carga da proteína torna-se cada vez mais negativa, dada à perda de íons H^+ (KULMYRZAEV, CHANAMAI, McCLEMENTS, 2000).

Para as proteínas da clara de ovo o potencial Zeta variou de $23,74 \pm 5,00$ mV (pH 3,0) a $-20,85 \pm 2,00$ mV, sendo que o equilíbrio entre cargas negativas e positivas (ponto isoelétrico) foi de 4,80. A mistura das proteínas OVA:WPC (1:1) apresentou valores de potencial Zeta positivos em pHs 3,0 e 4,0 ($20,10 \pm 6,10$ mV e $8,50 \pm 4,70$ mV) e negativos em pHs 5,0, 6,0 e 7,0 ($-5,67 \pm 3,97$ mV, $-15,35 \pm 5,14$ mV e $-19,70 \pm 3,00$ mV) respectivamente, sendo que a carga líquida zero (pI) foi encontrada em pH 4,50.

De acordo com os resultados obtidos em função da distribuição de carga dos biopolímeros observada nos diferentes pH, para a complexação das partículas com as soluções de proteínas, o pH das soluções foi ajustado para 4,0. Este valor de pH foi previamente utilizado para avaliar interações entre pectina de beterraba e β -lactoglobulina (SANTIPANICHWOHG *et al.*, 2008). Os valores do potencial Zeta para os biopolímeros a pH 4,0 são apresentados na Tabela 2.3.3. Neste pH, as soluções proteicas apresentaram carga líquida positiva e as emulsões de polissacarídeos apresentaram carga líquida negativa.

Tabela 2.3.3 - Potencial Zeta dos biopolímeros na concentração de 0,2% (m/m), pH 4,0.

Concentração	Potencial Zeta (mV)				
	SOL _{OVA}	SOL _{OVA:WPC}	SOL _{WPC}	EMUL _{ALG}	EMUL _{PEC}
0,2 %	$12,76 \pm 4,44$	$8,54 \pm 4,74$	$5,66 \pm 3,49$	$-55,14 \pm 9,26$	$-36,63 \pm 5,49$

2.3.3 Determinação do potencial Zeta das partículas de alginato e pectina

A carga líquida, determinada pelo potencial Zeta das soluções de polissacarídeos é produzida pelos grupos carboxilato (COO^-) para valores de pH acima de seu pKa. Soluções de pectina com pKa $\sim 2,9$ (RALET *et al.*, 2001) apresentaram valores de potencial Zeta $-37,34 \pm 4,56$ a pH 4,0 enquanto as soluções de alginato (pKa 3,20 – 3,38, MARTINSEN, STORRØ, SKJÅRK-BRÆK, 1992), apresentaram potencial Zeta $-58,80 \pm 5,41$ a pH 4,0. A avaliação dos potenciais Zeta mostrou que o alginato é mais eletronegativo que a pectina de baixo teor de metoxilação amidada.

O potencial Zeta, medido a pH 4,0, de partículas produzidas com alginato foi $-0,68 \pm 0,08$ mV, enquanto o potencial Zeta das partículas de pectina foi $-3,8 \pm 1,7$ mV. Em outro estudo, foram obtidos valores de potencial Zeta para partículas de alginato -1,5, -5, -9 e -14 para valores de pH de 2,67, 4,82, 6,75 e 7,92 respectivamente. O potencial Zeta das partículas decresceu com o decréscimo do pH, como esperado (YOU *et al.*, 2001).

Os valores do potencial Zeta para as partículas determinados no presente trabalho podem estar subestimados, uma vez que para a passagem do eletrólito através da amostra, é necessário compactá-la, o que pode ter diminuído a área de superfície disponível para a passagem do eletrólito. Menor adsorção do polieletrólito produz, como consequência, menor valor do potencial Zeta. Durante a gelificação iônica, nem todos os grupos carboxilato interagem com os íons cálcio, conferindo um excedente de carga negativa na partícula, que pode permitir associação com polieletrólitos carregados positivamente (DE VOS *et al.*, 2007; MAESTRELLI *et al.*, 2008). A comparação dos resultados do potencial Zeta para as soluções dos polissacarídeos sem adição de cálcio (Figura 2.3.1 - C) e os valores encontrados para as partículas, mostra diminuição significativa de carga nas partículas, corroborando a diminuição de cargas negativas após a gelificação iônica. Opanasopit *et al.* (2008) utilizando pectina com baixo teor de esterificação amidada obtiveram um valor para o potencial Zeta -30 mV para uma solução de pectina de 0,1% em pH 4,0 e potencial Zeta de $-10,4 \pm 0,8$ mV quando partículas de pectina foram avaliadas, indicando que a complexação com íons cálcio durante a gelificação iônica, comprometeu grupos carboxilato livres, diminuindo assim a carga líquida das partículas comparada à solução de pectina sem adição de íons cálcio.

A gelificação iônica entre o polissacarídeo e íons Ca^{2+} utiliza grupos carboxilato livres diminuindo a carga líquida do sistema após a formação das partículas. (MAESTRELLI *et al.*, 2008; SMRDEL, BOGATAJ, MRHAR, 2008).

Quando as soluções são comparadas, o valor do potencial Zeta para o alginato é muito mais eletronegativo que o valor do potencial Zeta obtido para pectina (Figura 3.2.1.C, Tabela 2.3.3) indicando maior quantidade de grupos carboxilato disponíveis. No

entanto, o potencial Zeta das partículas de pectina é um pouco mais eletronegativo que o da partícula de alginato, uma indicação que menos grupos carboxilato foram ligados ao cálcio ou que uma menor quantidade de cálcio foi ligada durante a gelificação iônica nas partículas de pectina. A observação visual e a textura das partículas, mostrou que as partículas produzidas com pectina foram mais frágeis em comparação às de alginato.

2.3.4 Teor de cálcio em partículas de alginato e pectina

O teor de cálcio nas partículas de alginato e pectina sem adição de óleo, para evitar interferências na determinação do íon, foi quantificado após a formação das partículas utilizando-se solução de polissacarídeo (2%) que foi atomizada numa solução de cloreto de cálcio na concentração de 2%. Os teores de cálcio em partículas de alginato e pectina, obtidas por gelificação iônica, estão apresentados na Tabela 2.3.4. A associação com íons cálcio dos grupos carboxílicos da cadeia polimérica do exterior das gotas pulverizadas dos polissacarídeos é imediatamente formada devido à alta solubilidade do cloreto de cálcio na solução aquosa, mas no interior da gota é dependente do processo de difusão de íons cálcio (CHAI *et al.*, 2004).

Tabela 2.3.4 - Teor de cálcio em partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica em pH 4.0.

Partículas	Matéria seca g/100g	$\mu\text{mol Ca} / \text{mg de matéria seca}$
P _{ALG}	3,75	$2,48 \pm 0,10^a$
P _{PEC}	2,83	$1,44 \pm 0,02^b$

Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

As partículas produzidas com pectina apresentaram teor de cálcio significativamente menor (Tabela 2.3.4.) quando comparado ao teor de cálcio obtido nas partículas produzidas com alginato ($p < 0,05$). Estes resultados podem ser devido a um número inferior de ligações dos grupos carboxilato da pectina com íons cálcio. Além disso, a presença de grupos amida

na estrutura da pectina pode ter conduzido a uma diminuição de grupos carboxilato livres para a reticulação iônica (KIM, RAO, SMIT, 1978). Menor quantidade de íons cálcio nas partículas de pectina pode ter sido responsável pela maior fragilidade das partículas de pectina comparada as partículas de alginato.

Resultados semelhantes foram observados por Sriamornsak e Kennedy (2008) que avaliaram o inchamento e difusão de cálcio em filmes de pectina e alginato. Os autores encontraram maior teor de cálcio em filmes de alginato quando comparado com os de pectina, observando menor inchamento nos filmes de alginato. Esse comportamento pode ser devido ao maior teor de cálcio que pode ter contribuído para uma reticulação mais eficaz. O alginato é caracterizado pela sua proporção M/G e o tamanho dos blocos G, enquanto a pectina é geralmente caracterizada pelo seu grau de esterificação e, em alguns casos, também pelo seu grau de amidação. Sabe-se também que os mecanismos de gelificação da pectina são influenciados por fatores como a distribuição de carga ao longo da cadeia principal (CAPEL *et al.*, 2006; LÖFGREN, GUILLOTIN, HERMANSSON, 2006). Filmes de pectina, apesar de utilizar o mesmo processo de reticulação apresentaram teores de cálcio inferiores, quando comparados com filmes de alginato, indicando reticulação menos eficaz para os filmes de pectina (DA SILVA, BIERHALZ, KIECKBUSCH, 2009).

Em outro estudo com pectinas amidadas e não amidadas onde o conteúdo de cálcio foi quantificado, pectinas não amidadas permitiram melhor encapsulação da proteína que a pectina amidada. Somente uma pequena quantidade de cálcio ficou retida nas partículas, representando aproximadamente 10% do total de cálcio antes e após lavagem das partículas. Em relação ao cálcio presente nas partículas foi observado que somente uma pequena parte de íons cálcio disponível foi utilizada na formação da matriz, onde a grande maioria estava na forma livre (BORUGEOIS, 2006).

Pectinas são polissacarídeos contendo principalmente unidades de ácidos galacturônicos. Os grupos carboxílicos presentes nos ácidos urônicos podem estar na forma de um sal com sódio, potássio, cálcio ou amônio, ou naturalmente esterificados com

metanol. A presença de alguns grupos na forma amidada (tipicamente entre 15 – 18%), como a pectina utilizada no presente trabalho, permite que a pectina tolere maior variação na quantidade de cálcio e que produza géis com maior grau de termo-reversibilidade. É geralmente aceito que os grupos amida desempenham papel importante na gelificação, usualmente requerendo menos cálcio para a gelificação e produzindo géis mais elásticos e transparentes que aqueles produzidos com pectinas com baixo teor de metoxilação (LOPES DA SILVA, RAO, 2006).

Adicionalmente, a amidação aumenta a habilidade de formação de géis de pectinas de baixo teor de metoxilação resultando em maior temperatura de gelificação e decréscimo na quantidade de cálcio necessária para a formação do gel. Neste caso, os grupos amida favorecem a ocorrência de outros tipos de associação em adição às interações eletrostáticas mediadas por íons cálcio, especialmente através de ligações de hidrogênio (RACAPÉ *et al.*, 1989). Apesar de ter uma reduzida capacidade de ligação do cálcio, a pectina forma partículas estáveis através da formação de ligações de hidrogênio entre as regiões amidadas (ALONSO-MOUGAN *et al.*, 2002). No entanto, o maior teor de cálcio em partículas de alginato pode ser devido a presença de resíduos de longos blocos G presentes na sua estrutura (MOE *et al.*, 1995), que podem conduzir à reticulação mais eficaz. Tem sido demonstrado que os blocos-G são os mais importantes para a formação das zonas de junção em géis de alginato (BRACCINI, GRASSO, PÉREZ, 1999; DRAGET *et al.*, 1996), especialmente quando o cálcio é usado para reticulação iônica (MØRCH *et al.*, 2006).

Fang *et al.* (2007) propuseram um modelo de reticulação com cálcio para alginato, consistindo de uma mono-complexação, dimerização e posterior associação lateral, para formar géis como base para funções biológicas e aplicações tecnológicas. Em outro estudo, Fang *et al.* (2008) compararam esses resultados utilizando pectina com baixo teor de metoxilação, observando menos dimerização e nenhuma associação lateral significativa, para a pectina. Segundo os autores, esse comportamento pode ser interpretado em termos de características estruturais da pectina, que induz a defeitos na formação de dímeros do modelo “caixa de ovos” e ainda dificulta a associação posterior dos dímeros laterais. A distribuição aleatória dos grupos éster e dos grupos amidas na cadeia da pectina com baixo

teor de esterificação amidada introduz muito mais defeitos na formação de dímeros no modelo caixa de ovos e adicionalmente pode impedir/dificultar a subsequente associação lateral em contraste ao alginato. A gelificação induzida pelo cálcio resulta de interações específicas e fortes entre os íons cálcio e blocos gulurônicos e galacturônicos no alginato e na pectina, respectivamente. Segundo os autores, o conteúdo de resíduos gulurônicos em alginatos varia de 46 a 64% (m/m). O conteúdo de ácidos galacturônicos de pectinas com baixo teor de esterificação e de alto teor de esterificação é de 46,2 e 26,1% (m/m), respectivamente. Desta forma pectinas com baixo teor de metoxilação e alginato apresentam proporções semelhantes de sítios específicos para associação com íons cálcio. No entanto apresentam comportamento de associação ao cálcio diferente, e estas diferenças podem ser decorrentes de diferenças estruturais entre pectina de baixo teor de metoxilação e alginato.

Alginatos apresentam em geral, uma distribuição em blocos de sítios de ligação guluronatos enquanto pectina apresenta uma distribuição de resíduos galacturônicos totalmente ao acaso. Em relação à distribuição em blocos dos ácidos gulurônicos para o alginato, à distribuição ao acaso dos grupos galacturônicos observada na pectina pode introduzir mais defeitos durante a formação da estrutura caixa de ovos, podendo também suprimir a dimerização das cadeias em alguma extensão. O padrão de distribuição ao acaso poderia também ser responsável pela ausência de associações laterais na pectina desde que este arranjo dos sítios de ligação poderia criar impedimento estérico pelas unidades éster e amidas na formação de associações laterais dos dímeros “caixa de ovos” (FANG *et al.*, 2008; SRIAMORNSAK, KENNEDY, 2008). O modelo “caixa de ovos” tem sido questionado por argumentos teóricos e experimentais com relação à gelificação de pectinas com baixo teor de esterificação e/ou amidada. O argumento mais importante é com relação à coordenação do íon cálcio e a detalhes conformacionais relacionados aos sítios de ligação (BRACCINI, GRASSO, PÉREZ, 1999).

2.3.5 Produção de partículas de alginato e pectina

As partículas de alginato recobertas, apresentaram intensidade de coloração diferenciada ligeiramente amarelada, em função do tipo de proteína ($P_{\text{ALG-OVA}} < P_{\text{ALG-OVA:WPC}} < P_{\text{ALG-WPC}}$) utilizada, semelhante à cor das proteínas (OVA, OVA:WPC, WPC) em pó, e um aspecto mais seco quando comparado às partículas de gelificação iônica, que aparentemente são brancas, macias e úmidas. As partículas de pectina recobertas ($P_{\text{PEC-OVA}}$, $P_{\text{PEC-OVA:WPC}}$, $P_{\text{PEC-WPC}}$) apresentaram maior intensidade de coloração após recobrimento com as proteínas quando comparadas com as partículas de alginato recobertas.

O recobrimento de partículas de alginato e pectina com polieletrólitos catiônicos foi amplamente utilizado em numerosas aplicações, na tentativa de modificar a funcionalidade da partícula (XIE *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2012), liberação controlada de moléculas bioativas (YU *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2010), proteção de probióticos (GBASSI *et al.*, 2011; GEBARA *et al.*, 2013; GEREZ *et al.*, 2012).

2.3.6 Caracterização das partículas de alginato e pectina

2.3.6.1 Teor de umidade das partículas

O teor de umidade das partículas de alginato e de pectina obtidas por gelificação iônica variam entre $94,17 \pm 0,07\%$ e $95,01 \pm 0,79\%$, respectivamente, sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Esses resultados mostram que as partículas obtidas com biopolímeros como o alginato e pectina são redes tridimensionais hidrofílicas, com alta capacidade de retenção de água, mimetizando tecidos biológicos (LIU, FISHMAN, HICKS, 2007; PEPPAS *et al.*, 2000; SAKIYAMA-ELBERT, HUBBELL, 2001).

2.3.6.2 Tamanho médio das partículas

O diâmetro médio das partículas de polissacarídeos, produzidas por gelificação iônica, é afetado por muitos parâmetros, como diâmetro da agulha do atomizador, distância da agulha ao nível da solução catiônica, concentração e estrutura dos polissacarídeos

(SMRDEL, BOGATAJ, MRHAR, 2008), sendo que os tamanhos médios foram $140,09 \pm 10,05 \mu\text{m}$ e $215,41 \pm 16,26 \mu\text{m}$ para partículas de alginato e pectina, respectivamente.

Em geral, os tamanhos médios das partículas de pectina foram maiores em 53,80% quando comparado com as partículas de alginato. Esse resultado provavelmente poderia atribuir-se a uma maior quantidade de ligação de moléculas de água, formando uma estrutura menos reticulada influenciada pela estrutura da pectina. Resultado semelhante também é reportado na literatura. Partículas produzidas com alginato também apresentaram tamanho menor quando comparado com partículas de pectina ou mistura de pectina e alginato (SANDOVAL-CASTILLA *et al.*, 2010). O tamanho da partícula também determina a área de superfície, partículas de tamanhos menores apresentam maior área de superfície por unidade de massa, enquanto as maiores apresentam maior área de superfície por partícula (VAN TOMME *et al.*, 2008).

2.3.6.3 Eficiência de encapsulação das partículas

Neste estudo, a quantidade de óleo utilizada inicialmente foi 45,20% dos sólidos totais (2,0 g de polissacarídeo + 1,65 g de óleo, 100 mL de emulsão). As partículas úmidas de alginato e pectina, utilizando o óleo como material de recheio, apresentou teor lipídico de $41,45 \pm 0,80\%$ e $43,20 \pm 1,10\%$, respectivamente, obtendo-se alta eficiência de encapsulação de $91,70 \pm 1,77\%$ e $95,50 \pm 2,42\%$ em relação ao óleo encapsulado, mostrando que a gelificação iônica é uma técnica eficiente para encapsulação do material lipídico. Chan (2011) encontrou também alta eficiência de encapsulação com resultados superiores a 90%, utilizando 1,5% de concentração de alginato e 40% de óleo em volume, valores próximos aos encontrados no presente estudo.

Em trabalho recente (SOLIMAN *et al.*, 2013), foram encapsulados óleos essenciais em matrizes de alginato. Os autores utilizaram 2% (m/v) de alginato de sódio, 0,5% (p/v) de cloreto de cálcio e 20 minutos de reticulação iônica e altas eficiências de encapsulação foram observadas (óleo de tomilho: ~94%, óleo de cravo ~94%, óleo de canela ~90%).

2.3.6.4 Microestrutura e morfologia das partículas

A Figura 2.3.2 apresenta a morfologia e microestrutura das partículas de alginato e pectina úmidas e liofilizadas produzidas por gelificação iônica. As imagens da microscopia ótica mostram que o método de gelificação iônica é adequado para a produção das partículas de biopolímeros com formato esférico (Figura 2.3.2 A-C). As partículas de alginato e pectina, liofilizadas, apresentaram superfícies ásperas com formação de rugas e gotas de óleo visíveis e aparentemente recobertas na superfície (Figura 2.3.2 B-D).

Também é possível observar que as partículas foram resistentes ao processo de secagem, porém com alguma perda de seu formato esférico quando comparadas com as imagens da microscopia ótica. Adicionalmente, quando a pectina foi utilizada as partículas apresentaram superfícies deformadas com mais rugosidade e de forma alongada. Esse resultado evidencia a fragilidade das partículas de pectina. Jaya, Durance, Wang (2009) observaram microestrutura semelhante para partículas secas quando utilizaram alginato e pectina. Além disso, eles observaram que a estrutura interna das partículas apresentam poros interligados e a forma alongada das partículas de pectina foi atribuída à natureza de sua estrutura que apresenta cadeias laterais com presença de açúcares.

Lei, Kim, e Jeon (2008) observaram que microesferas de alginato apresentaram superfície lisa com formato esférico, indicando que a liofilização poderia reduzir a rugosidade e eliminar fissuras na superfície das partículas. No entanto, os autores observaram alta porosidade na seção transversal das microesferas.

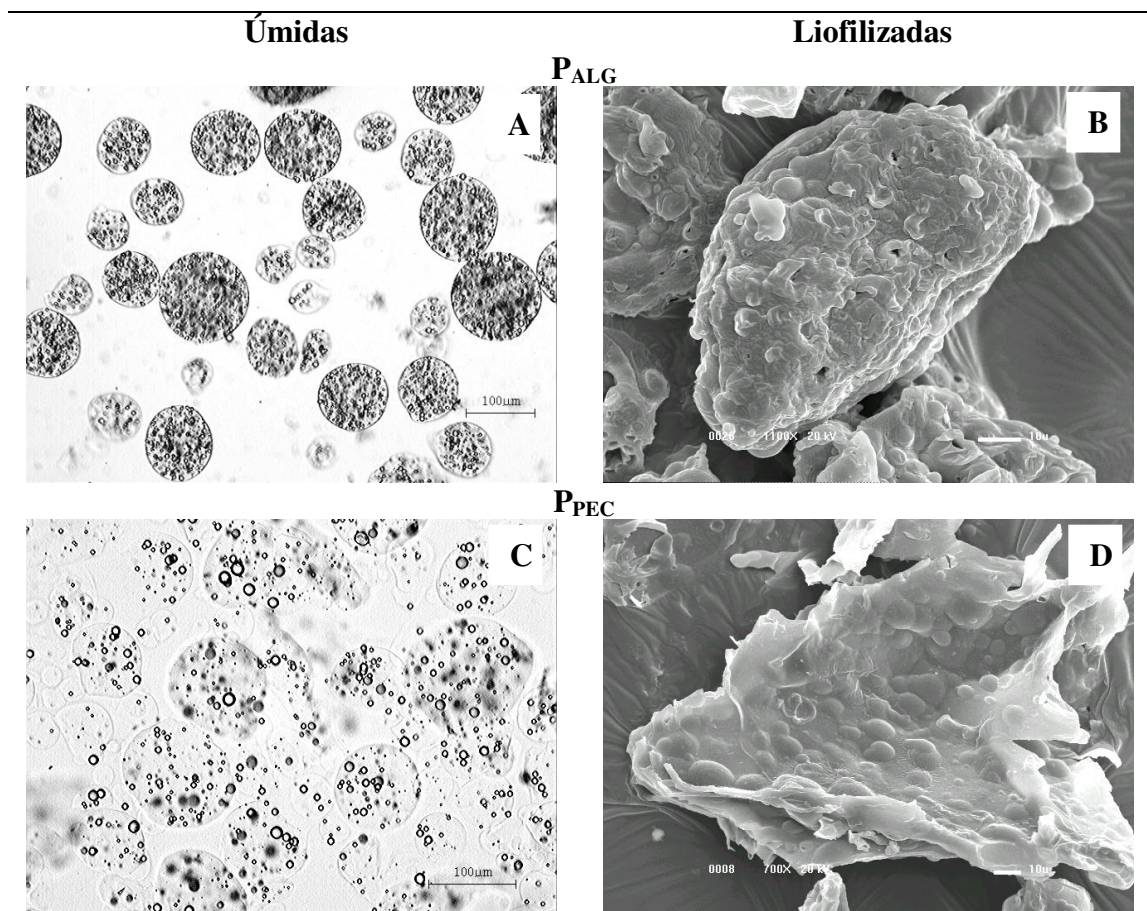


Figura 2.3.2 – Fotos obtidas por MO (coluna 1) e MEV (coluna 2) de partículas de alginato e pectina. A e C Barra MO = 100 μm . B e D Barra MEV = 10 μm .

Com relação à estrutura interna das partículas úmidas, obtida através de microscopia confocal de varredura laser (MCLV), a Figura 2.3.3 mostra a distribuição das gotas de óleo coradas com vermelho do Nilo, espalhadas no interior das partículas. É possível observar que as partículas apresentam formato esférico. No entanto, pode-se observar que as gotas de óleo apresentam ampla distribuição de tamanho (Figura 2.3.3 A-B-C). Estudo anterior realizado por Lamprecht, Schäfer e Lehr (2000) mostrou que, com a técnica de microscopia confocal, foi possível determinar a localização, assim como a quantidade de óleo encapsulado. O estudo da estrutura interna é importante uma vez que influencia as

características funcionais da partícula como a eficiência de encapsulação, permeabilidade, integridade e sua digestibilidade (JONES, McCLEMENTS, 2010).

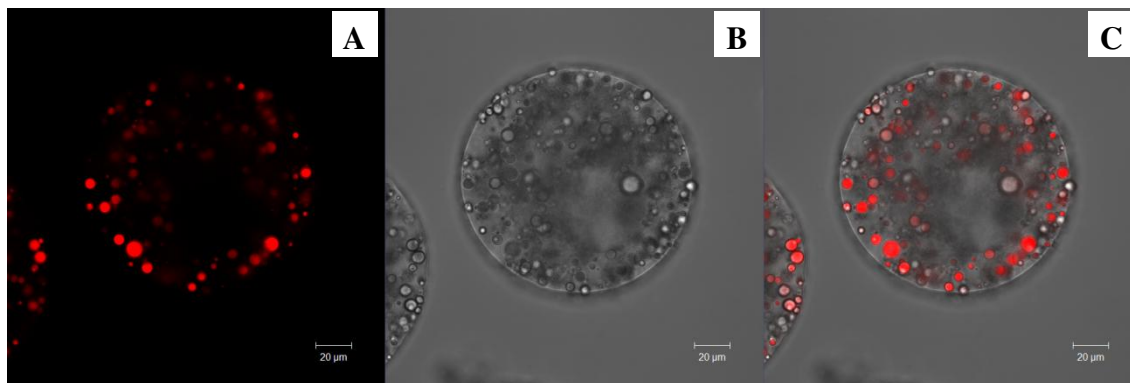


Figura 2.3.3 - Fotos obtidas por microscopia confocal de partículas de alginato: Alginato sem coloração e óleo de girassol – vermelho do nilo: A – Óleo-vermelho do nilo; B – Observação por transmitância; C – Sobreposição do óleo. Barras = 20 µm. Observação e capturação de imagem aproximadamente na metade da altura da partícula.

2.3.7 Adsorção de proteínas da clara de ovo e do soro do leite em partículas de alginato e pectina

Para o desenvolvimento desta parte do estudo foram utilizadas proteínas da clara de ovo e do soro do leite. Ambas apresentam estrutura globular, porém com tamanhos diferentes. O objetivo do presente estudo, ainda pouco abordado na literatura na área de alimentos, foi avaliar o comportamento de adsorção de proteínas em partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica. A hipótese é que a partícula com estrutura modificada com a camada proteica adsorvida possui propriedades de proteção mais favoráveis, especialmente quando comparadas com as partículas sem cobertura proteica. As características da superfície adsorvente mais relevante para a adsorção de proteínas são sua área específica, sua hidrofobicidade e seu estado elétrico. Superfícies de proteínas globulares são heterogêneas, flexíveis e altamente irregulares, com cargas que são função

do pH. A maioria de sua base peptídica apresenta pouca ou nenhuma liberdade rotacional (HAYNES, NORDE, 1994).

Preliminarmente uma ampla faixa de concentrações (0,5 a 14%) de proteína em solução foi investigada e 50g de partículas de pectina e 40g de partículas de alginato foram adicionadas ao mesmo volume de solução proteica (200 mL), para serem recobertas. Quatro efeitos principais, o arranjo estrutural da molécula de proteína, a desidratação da (ou de parte da) superfície adsorvente, a redistribuição de grupos carregados na camada interfacial e a polaridade da proteína adsorvida usualmente representam a contribuição primária para todo o processo de adsorção. A adsorção de proteínas é o resultado líquido de várias interações entre e com os componentes do sistema incluindo a superfície adsorvente, as moléculas de proteína, o solvente (água) e outros solutos presentes como íons com baixa massa molar. As origens desta interação incluem forças de Van der Waals (dispersão, orientação e forças de indução), forças de Lewis ácido-base (incluindo ligações de hidrogênio), forças eletrostáticas e efeitos entrópicos como efeito hidrofóbico e arranjos internos (restrições estéricas) (HAYNES, NORDE, 1994).

A Figura 2.3.4 A-C-E apresenta as quantidades de proteína adsorvida nos sistemas estudados. Aumento da concentração de proteína em solução resultou em aumento da quantidade de proteína adsorvida, independente do tipo de proteína ou do tipo de polissacarídeo utilizado (pectina ou alginato). As tendências das curvas de adsorção, são semelhantes para todas as proteínas estudadas OVA, WPC e OVA:WPC (1:1). A adsorção de proteínas foi significativamente superior para as partículas de pectina, independente do tipo e da concentração de proteína em solução avaliadas e independente do tipo de proteína utilizada quando comparadas as adsorções sobre as partículas de alginato.

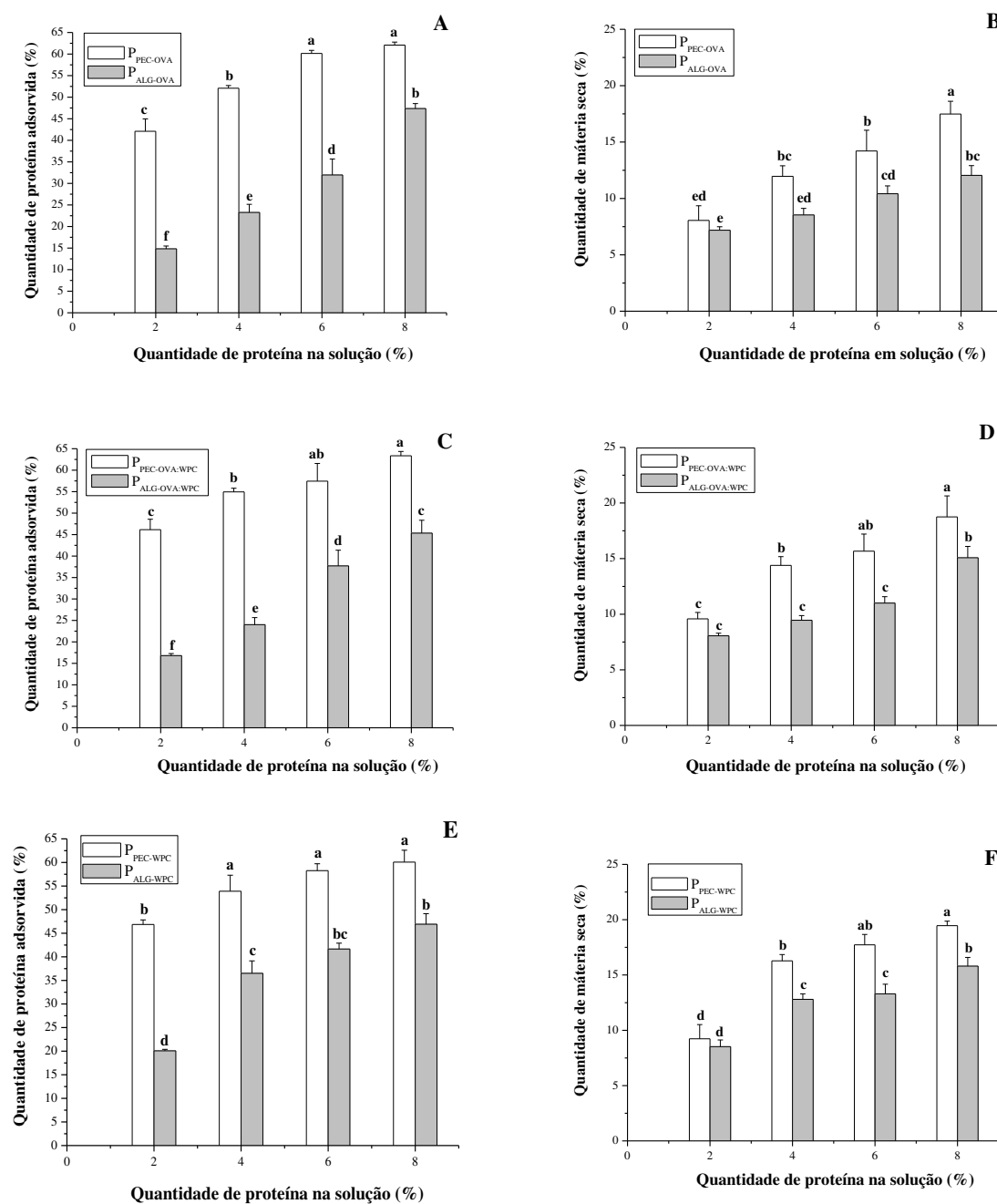


Figura 2.3.4 - Quantidade de proteína adsorvida e teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para cada tempo estudado, $p < 0,05$.

A literatura apresenta resultados indicando que maior a concentração de proteínas em solução resulta em maior quantidade de proteína adsorvida, incluindo os casos onde a adsorção é irreversível. A interpretação é que proteínas adsorvem irreversivelmente devido a múltiplas associações fracas, onde a probabilidade de quebrar todas as associações simultaneamente é infinitamente pequena (RAMSDEN, 1995). Como proteínas contêm muitos diferentes aminoácidos com hidrofobicidades diferentes, são mais ou menos anfifílicas e, desta forma, apresentam alta atividade de superfície. A adsorção de moléculas de proteína forma numerosos contatos com superfície do sorvente, usualmente produzindo alta adsorção. A quantidade de proteína é máxima em condições onde a carga da proteína e do sorvente compensam umas às outras (NORDE, 2003). Dependendo da concentração de moléculas de proteína em solução, reações de troca podem levar a um número crescente de moléculas adsorvidas. Uma consequência das reações de troca é que, embora a adsorção de proteínas seja em geral irreversível, um subsequente aumento na concentração de proteína pode aumentar o número de moléculas adsorvidas. Provavelmente a interação também é dependente das interações laterais entre as moléculas de proteínas (SALLOUM, SCHLENOFF, 2004). Estudo com partículas de alginato imersas em diferentes concentrações de quitosana também mostrou que o aumento na concentração de quitosana em solução causou aumento na quantidade de quitosana adsorvida na superfície da partícula (XIE *et al.*, 2009), como observado no presente estudo.

Se as proteínas podem se associar umas com as outras, adsorção em multicamadas pode ser formada. Considerando muitos diferentes grupos presentes na superfície da molécula de proteína, deveria ser surpreendente se a cooperatividade intermolecular não fosse à regra na adsorção proteica (RAMSDEN, 1995). Muitas proteínas globulares podem formar ligações químicas e físicas com outras moléculas de proteína. Quando a proteína adsorve, ela atinge alta concentração local em relação à concentração em solução e então a interação proteína-proteína pode ocorrer. Além disto, quando elas se desdobram, um grande número de grupos químicos na proteína é exposto a outras moléculas vizinhas e como consequência, a formação de ligações proteína-proteína é um evento comum em filmes de proteínas globulares (PUGNALONI *et al.*, 2004). A hipótese de formação de multicamadas proteicas é que a segunda camada se ligue no topo ou sob a camada original, mas é também

possível que a segunda proteína adsorva nos espaços vazios deixados pela primeira proteína na superfície ou mesmo que ela possa alterar a estrutura da primeira camada adsorvida permitindo adsorção adicional (DALGLEISH *et al.*, 1991).

Quando proteínas do soro do leite foram adsorvidas em partículas de pectina (Figura 2.3.4 E) nas concentrações de 4, 6 e 8%, os valores médios das quantidades adsorvidas não diferem entre si. Comportamento semelhante foi observado em um estudo quando foram utilizadas partículas de pectina recobertas com proteínas do soro do leite nas concentrações de 4-12% em solução (SOUZA *et al.*, 2012). Partículas de alginato recobertas com concentrações 6 e 8% de proteínas do soro do leite também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Na menor concentração de proteína em solução utilizada (Figura 2.3.4 A-E) 14,84 e 20,07% de proteína adsorvida foram quantificadas em partículas de alginato e, 42,10 e 46,85% para partículas de pectina, recobertas com OVA e WPC, respectivamente. β -lactoglobulina e ovalbumina são proteínas globulares (VERHEUL *et al.*, 1999) e estão na sua forma monomérica em pH 4. Como consequência a β -lactoglobulina é menor com raio de cerca de 2 nm (HAMBLING, Mc ALPINE, SAWYER, 1992). O tamanho molecular da proteína é um fator importante que regula a adsorção de uma camada interfacial. Uma molécula menor é retida mais facilmente em uma camada interfacial (SUTTIPRASIT, KRISDHASIMA, McGUIRE, 1992). Considerando o efeito de interações eletrostáticas, a adsorção de proteína deve ser minimizada sobre superfícies que apresentem a mesma carga que a proteína. Por outro lado, interações não eletrostáticas podem ser responsáveis pela adsorção (SALLOUM, SCHLENOFF, 2004). De acordo com os autores, a quantidade de proteína adsorvida é em grande extensão reversível através do controle da quantidade de sal ou da força iônica do sistema. Não somente a presença de sal limita a quantidade adsorvida, mas também contribui para remoção da proteína adsorvida. No entanto, no presente trabalho, a força iônica, não foi ajustada pela adição de sal (NaCl) aos sistemas estudados.

O aumento de proteína adsorvida nas partículas quando a concentração de proteína em solução foi incrementada, evidência que outros efeitos resultantes da estrutura das partículas podem desempenhar papel importante no mecanismo de adsorção além da

interação eletrostática. Embora o comportamento de adsorção de moléculas e macromoléculas nas superfícies planas não porosas tenha sido intensamente estudado, o mecanismo de interação/adsorção de moléculas carregadas sobre partículas porosas não é ainda completamente compreendido (MÖHWALD *et al.*, 2004; RABE, VERDES, SEEGER, 2011). A maioria dos estudos de adsorção experimental e propostas de modelos teóricos que consideram adsorção de polieletrólitos relacionam a interação das macromoléculas de várias formas e dimensões com superfícies planas e partículas não porosas. Um dos poucos estudos de adsorção de polieletrólitos sobre partículas porosas carregadas, ambos sintéticos, com características de carga, tamanho de poro na superfície, tamanho e estrutura molecular dos eletrólitos conhecidos, foi recentemente publicado (MALINOVA, WANDREY, 2007). Os autores observaram que o comprimento da cadeia, substituintes no grupo iônico, força iônica da solução e tamanho do poro das micropartículas influenciaram a quantidade adsorvida. Polieletrólitos menores adsorveram em maiores quantidades que as cadeias maiores e desde que a exclusão nos poros ocorreu para moléculas muito menores que os tamanhos dos poros, os autores concluíram que o efeito eletrostático dominou a adsorção sobre estes materiais.

A superfície das partículas obtidas por gelificação iônica complexadas com íons de cálcio apresentam alta porosidade (ALLAN-WOJTAS, TRUELSTRUP HANSEN, PAULSON, 2008). Adicionalmente, partículas obtidas por gelificação iônica utilizando alginato apresentaram estrutura com dobras da superfície, com redução na esfericidade (JAYA, DURANCE, WANG, 2010).

Na imobilização de enzimas, muitos estudos provaram que o tamanho de poro é, provavelmente, o parâmetro mais importante para a retenção da enzima evidenciando que o tamanho ideal do poro deve ser de três a cinco vezes superior ao tamanho da molécula de proteína (GAO *et al.*, 2010). Em outro estudo realizado por microscopia eletrônica com microesferas de alginato de cálcio mostrou-se que o diâmetro dos poros variou de 5 a 200 nm (ANDRESEN *et al.*, 1977; SMIDSRØD, 1974). A porosidade de partículas foi determinada em uma coluna através da avaliação dos volumes de exclusão utilizando padrões moleculares de tamanho conhecidos (KLEIN, STOCK, VORLOP, 1983). Valores

de 12 a 16 nm para o diâmetro dos poros das partículas de alginato foram determinados. No entanto os autores utilizaram padrões de maltodextrana, diferentes química e estruturalmente de proteínas. Stewart e Swaigood (1993), utilizaram cromatografia de exclusão molecular empacotada com partículas de alginato de cálcio e proteínas com raios de Stokes conhecidos. Os autores determinaram diâmetro de poro de 8 -10 nm. No pH de eluição (6-7) partículas de alginato apresentaram interações não covalentes com 6 das 13 proteínas empregadas e essas interações foram mais pronunciadas em baixas concentrações de Ca^{2+} . Os autores observaram que as proteínas do soro do leite, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, penetraram facilmente nos poros das partículas de alginato. No entanto, nenhuma proteína penetrou totalmente no volume interno total da matriz. Proteínas globulares são mais ou menos esféricas, com dimensões moleculares na faixa de poucos nanômetros. Grupos hidrofóbicos tendem ser alocados no interior da molécula onde são protegidos do contato com a água enquanto grupos carregados se encontram na periferia (HAYNES, NORDE, 1994). É possível que as altas adsorções observadas, tenham sido resultado da interação eletrostática ou pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas proteína-polissacarídeo e que adicionalmente as moléculas de proteína possam ter entrado nos poros das partículas obtidas por gelificação iônica. A adsorção de proteína sobre partículas porosas ocorre em várias etapas: transporte de proteína a partir da solução para a região interfacial, difusão da proteína dentro dos poros (difusão interna), fixação primária da proteína na superfície adsorvente (controlada por forças de atração física ou ligação química) e relaxamento da proteína no interior dos poros (HU, LI, LIU, 2005; KHARLAMOVA *et al.*, 2013; MALINOVA, WANDREY, 2007).

As adsorções proteicas nas partículas de alginato variaram de $14,84 \pm 0,64\%$ a $47,37 \pm 1,15\%$ recobertas com OVA (mínima e máxima concentração em solução), as recobertas com WPC variaram de $20,07 \pm 0,32\%$ a $46,92 \pm 2,22\%$ (mínima e máxima concentração em solução) e de $16,82 \pm 0,47\%$ a $45,34 \pm 3,0\%$ quando recobertas com mistura OVA:WPC (mínima e máxima concentração em solução). Quando foram utilizadas partículas de pectina, as quantidades adsorvidas variaram de $42,10 \pm 2,86\%$ a $62,08 \pm 0,69\%$; de $46,85 \pm 0,97\%$ a $60,08 \pm 2,51\%$; de $46,14 \pm 2,44\%$ a $63,35 \pm 1,01\%$ para as

recobertas com OVA, WPC e mistura OVA:WPC (mínima e máxima concentração), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, para partículas de pectina a adsorção foi significativamente superior ($p < 0,05$) quando comparadas às partículas de alginato, para todas as concentrações de proteína em solução estudadas. Resultados apresentados na Figura 2.3.1 mostram que o potencial Zeta da emulsão de pectina apresenta-se menos negativo ($-36,63 \pm 5,49$ mV em pH 4,0) comparado com a emulsão de alginato ($-55,14 \pm 9,26$ mV em pH 4,0) e, devido a esse resultado, é possível que a cadeia linear de alginato comprometa maior quantidade de grupos carboxilato na etapa de reticulação com os íons de cálcio para formação do gel, resultando em menor disponibilidade de grupos funcionais para interação com as moléculas de proteína em solução. Partículas de pectina obtidas por gelificação iônica apresentaram potencial Zeta um pouco mais negativo que as partículas de alginato o que poderia resultar em maior interação eletrostática com as proteínas carregadas positivamente, como observado no presente trabalho. No entanto, as diferenças de carga, não parecem ser suficientes para produzir grandes diferenças na adsorção para as partículas de pectina e de alginato.

Em estudo recente, as partículas foram inicialmente moídas de forma que o potencial Zeta das mesmas pudesse ser medido através do procedimento eletroforético onde a partícula necessita estar suspensa durante a aplicação do campo elétrico (DOHERTY *et al.*, 2012). Os autores avaliaram o potencial Zeta de partículas de proteínas do soro do leite (inicialmente desnaturada), recobertas em uma primeira camada, com vários polissacarídeos incluindo alginato e pectina e, posteriormente, recobrindo a camada polissacarídica com nova camada de proteínas do soro do leite. Os autores encontraram um potencial Zeta mais eletronegativo nas esferas recobertas com alginato comparado ao potencial Zeta das partículas recobertas com pectina. No entanto, o potencial Zeta da segunda camada proteica, quando pectina foi utilizada na primeira camada, foi mais eletropositivo em comparação à utilização do alginato nas mesmas condições, indicando maior deposição eletrostática das moléculas de proteína.

Partículas de alginato de cálcio apresentaram maior quantidade de cálcio ligado à partícula e, possivelmente estrutura mais compacta. Apesar da analogia estrutural entre cadeias de alginato e pectina, diferenças significativas ao nível das associações cadeia-cadeia foram encontradas (BRACCINI, PÉREZ, 2001). Partículas de pectina por outro lado, apresentaram menor quantidade de cálcio ligado, sendo visivelmente mais frágeis e possivelmente menos estruturadas, o que pode ter permitido o acesso das proteínas à parte interna das partículas consequentemente produzindo maior adsorção proteica. Devido a um menor teor de cálcio presente nas partículas de pectina é razoável supor que apresentam maior porosidade propiciando maior incrustação das moléculas de proteína no interior dos poros da partícula.

A Figura 2.3.4 C, apresenta a adsorção da mistura das proteínas da clara de ovo e do soro do leite na relação 1:1. Pode-se observar comportamento semelhante aos obtidos quando foram utilizadas as proteínas do soro do leite e da clara de ovo individualmente, quantidades crescentes de proteínas adsorvidas em função do aumento da quantidade de proteína em solução. No caso de misturas de proteínas, a literatura apresenta vários pressupostos. Proteínas pequenas difundem mais rápido que proteínas grandes e são as espécies dominantes nos estágios iniciais da adsorção no caso de misturas proteicas. Proteínas maiores, entretanto ligam-se mais fortemente à superfície por possuírem maior área de contato, podendo também repelir proteínas pré-adsorvidas durante o espalhamento sobre a superfície (efeito Vroman). Como consequência, a massa total de proteína adsorvida pode passar por um máximo de adsorção local durante o processo de adsorção (RABE, VERDES, SEEGER, 2011). Moléculas com baixa massa molar de soluções de proteínas altamente concentradas adsorvem primeiras à superfície, depois lenta e sequencialmente podem ser deslocadas por outras moléculas, que são capazes de formar interações fortes com a superfície (DICKINSON, 1995; LATOUR, 2008).

No presente estudo, entretanto, quando a mistura proteica foi utilizada, não foram quantificadas os tipos individuais de proteínas adsorvidas nas partículas. Porém, foi possível evidenciar a presença de ambas as proteínas adsorvidas nas partículas estudadas,

através dos resultados de eletroforese e de microscopia confocal (Figuras 2.3.5 e 2.3.6) discutidas na sequência.

2.3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS-PAGE é uma técnica amplamente utilizada para separar proteínas de acordo com sua mobilidade eletroforética, que é uma função do comprimento da cadeia do polipeptídeo e de sua massa molar (SHÄGGER, VON JAGOW, 1987). Isto resulta em um processo de fracionamento por tamanho. Neste trabalho, a eletroforese SDS-PAGE foi utilizada com finalidade de verificar se as proteínas estavam adsorvidas nas partículas de alginato e pectina, recobertas com OVA, WPC e OVA:WPC e no caso da mistura, verificar se havia alguma indicação se ambas as proteínas tinham sido adsorvidas. Os resultados são apresentados na Figura 2.3.5 A-B. Proteínas adsorvidas sobre partículas de alginato (Figura 2.3.5 A) e adsorvidas sobre partículas de pectina (Figura 2.3.5 B), recobertas com as proteínas da clara de ovo (coluna 1), mistura OVA:WPC coluna 2 (0,75:0,25), OVA:WPC coluna 3 (1:1), OVA:WPC coluna 4 (0,25:0,75) e WPC (coluna 5). Na Figura 2.3.5 A-B, as diferentes proporções de OVA e WPC foram identificadas por comparação com as mobilidades de padrões de proteínas purificadas (P).

Na coluna 1 correspondente as partículas de alginato e pectina recobertas somente com proteínas da clara de ovo (OVA), três diferentes bandas foram identificadas, o que confirma a presença de proteínas características da clara de ovo. As bandas foram identificadas por comparação com a mobilidade de padrões, ovalbumina (45,0 kDa) como a maior banda no gel, como esperado, e lisozima (14,4 kDa) (MINE, 1995). A outra banda detectada provavelmente corresponde à conalbumina (77,7 kDa). Isso se baseia mais em sua proporção relativa (12%) que em seu padrão de migração (MINE, 1995).

Para a partícula de alginato recoberta somente com as proteínas do soro do leite, três diferentes bandas foram detectadas, como pode ser observado na coluna 5. Novamente as bandas foram identificadas por comparação com a mobilidade de padrões, β -lactoglobulina (18,4 kDa) como a maior banda, α -lactoalbumina (14,2 kDa) como a segunda banda e a

terceira banda albumina de soro bovino (66,4 kDa). No entanto, na mesma coluna para a partícula de pectina recoberta somente com as proteínas do soro do leite, duas bandas foram identificadas, a primeira correspondente a β -lactoglobulina (18,40 kDa) e a segunda banda a albumina de soro bovino (66,4 kDa), a banda correspondendo a α -lactoalbumina (14,2 kDa) não foi visualizada. A ausência da banda correspondendo a α -lactoalbumina pode ser devido à perda da banda durante o processo da análise eletroforética.

Na coluna 3, referente as partículas de alginato e pectina recobertas com a mistura OVA:WPC (1:1), cinco bandas foram identificadas, indicativo da presença das principais proteínas constituintes da OVA e WPC. As bandas de proteína com baixa massa molar (14,40 kDa), que podem estar relacionadas com a mistura da lisozima (14,4 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa) e, a β -lactoglobulina (18,4 kDa), enquanto que bandas das proteínas de alta massa molar como a ovalbumina (45,0 kDa), albumina de soro bovino (66,4 kDa) e conalbumina (77,70 kDa), são observadas no topo dos géis. Esses resultados mostram a presença das duas proteínas adsorvidas sobre as partículas recobertas com a mistura OVA:WPC e adicionalmente, com bandas mais intensas nas partículas de pectina. Além disso, maior intensidade de banda é observada para a β -lactoglobulina (18,4 kDa) quando o concentrado proteico de soro do leite individual ou em mistura é utilizado, independente do tipo de partícula. Estudo anterior, com uma mistura (1:1) de clara de ovo e proteína de soro de leite, identificou por eletroforese SDS-PAGE a conalbumina (84,0 kDa), a ovalbumina (44,0 kDa), a β -lactoglobulina (18,0 kDa), a lisozima (16,0 kDa) e a α -lactoalbumina (14,0 kDa) (KUROPATWA, TOLKACH, KULOZIK, 2009).

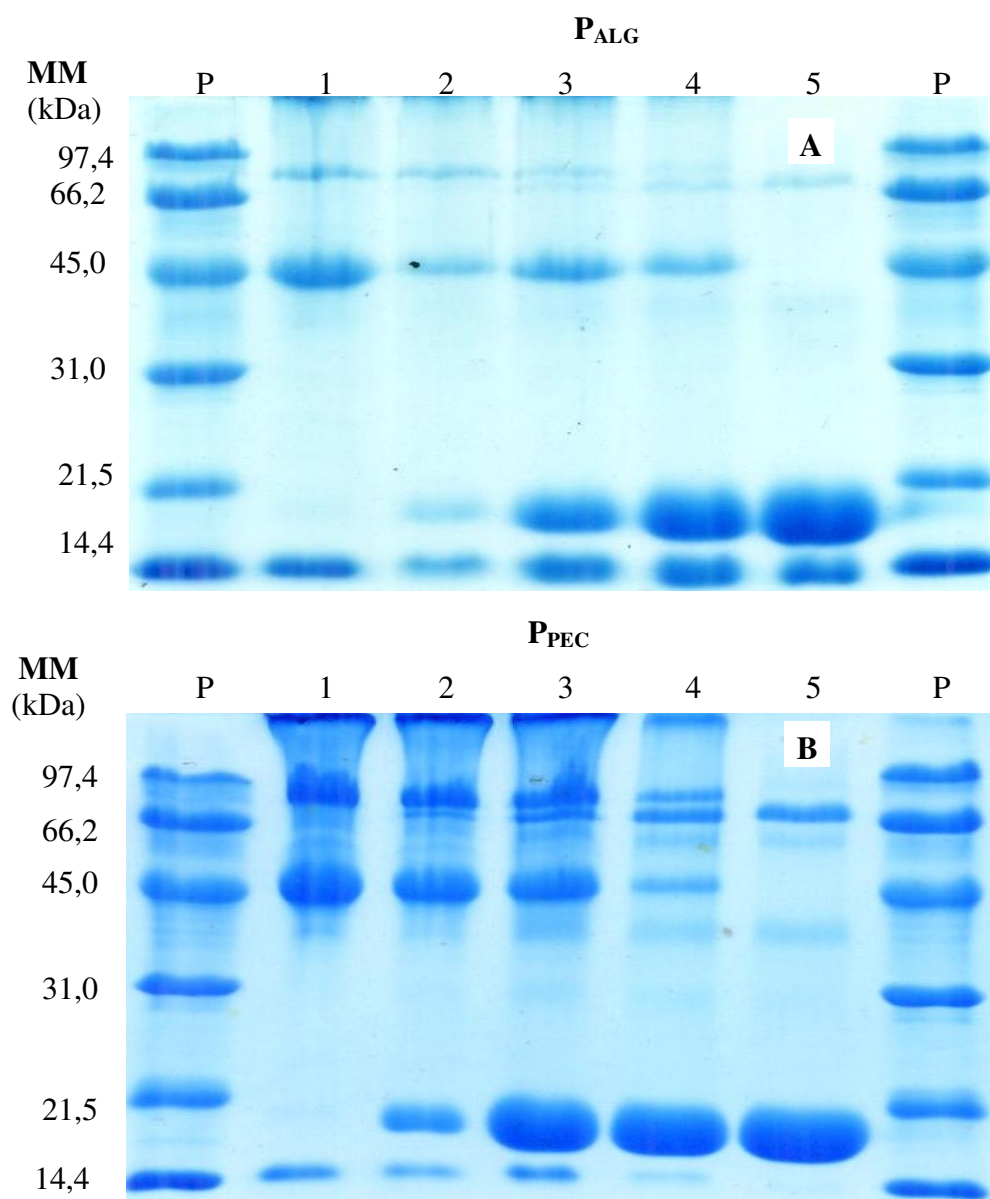


Figura 2.3.5 - Eletroforese em gel SDS-PAGE: A) P_{ALG} e B) P_{PEC}. P- padrões de massa molar, 97,4 kDa fosforilasa b, 66,2 kDa albumina sérica, 45,0 kDa ovalbumina, 31,0 kDa anidrasa carbônica, 21,5 kDa inibidor de tripsina e 14,4 kDa lisozima. Coluna 1 fração de OVA, colunas 2-4 fração da mistura OVA: WPC, coluna 5 fração de WPC.

2.3.9 Microscopia confocal de varredura a laser

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é uma técnica utilizada em muitos campos da ciência, especialmente em biologia e medicina (DÜRRENBARGER *et al.*, 2001; MAUKO *et al.*, 2009), sendo também utilizada para estudar a adsorção de proteínas em superfícies de partículas (HUBBUCH *et al.*, 2003; SUH *et al.*, 2004). A vantagem deste tipo de microscopia é o fato de ser uma técnica não destrutiva que permite a observação interna de estruturas sem que essas tenham que ser fragmentadas ou desidratadas (STRAND *et al.*, 2003). Além disso, é adequada para quantificar a espessura do revestimento individual em partículas (DEYPERE *et al.*, 2009). El-Sayed e Chase (2009) utilizaram MCVL para estudar a adsorção competitiva de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina e os resultados mostraram que α -lactoalbumina é capaz de deslocar a β -lactoglobulina apesar da sua menor afinidade para o adsorvente nas condições utilizadas. A técnica utiliza marcadores de fluorescência, para a identificação de uma molécula específica previamente corada (VAN DE VELDE *et al.*, 2003).

As partículas de alginato gelificadas com cálcio, contendo o óleo de girasol, foram recobertas com a mistura OVA:WPC (1:1) e produzidas com as proteínas marcadas com compostos fluorescentes conforme descrito no item 2.2.3. A deposição das proteínas nas partículas de alginato também foi confirmada por meio da microscopia confocal de varredura laser (Figura 2.3.6), através da associação dos corantes fluorescentes com as moléculas de proteína, coloração verde do corante FITC associado à solução WPC ou através da coloração vermelha do corante rodamina associada à solução OVA. Além disso, foi evidenciado, que nenhuma delas permaneceu predominantemente na superfície da partícula. Aparentemente as proteínas difundiram para o interior das partículas. A ligação com os compostos fluorescentes às proteínas parece não ter afetado suas propriedades de transporte e adsorção nas partículas estudadas.

Estudo apresentado na literatura mostrou através de microscopia confocal, que o ácido polilático adsorvido eletrostaticamente sobre partículas de alginato, também penetrou

na matriz do alginato, formando um complexo alginato: poliácido polilático -L-lisina com espessuras variáveis dependendo do tempo de exposição (STRAND *et al.*, 2003).

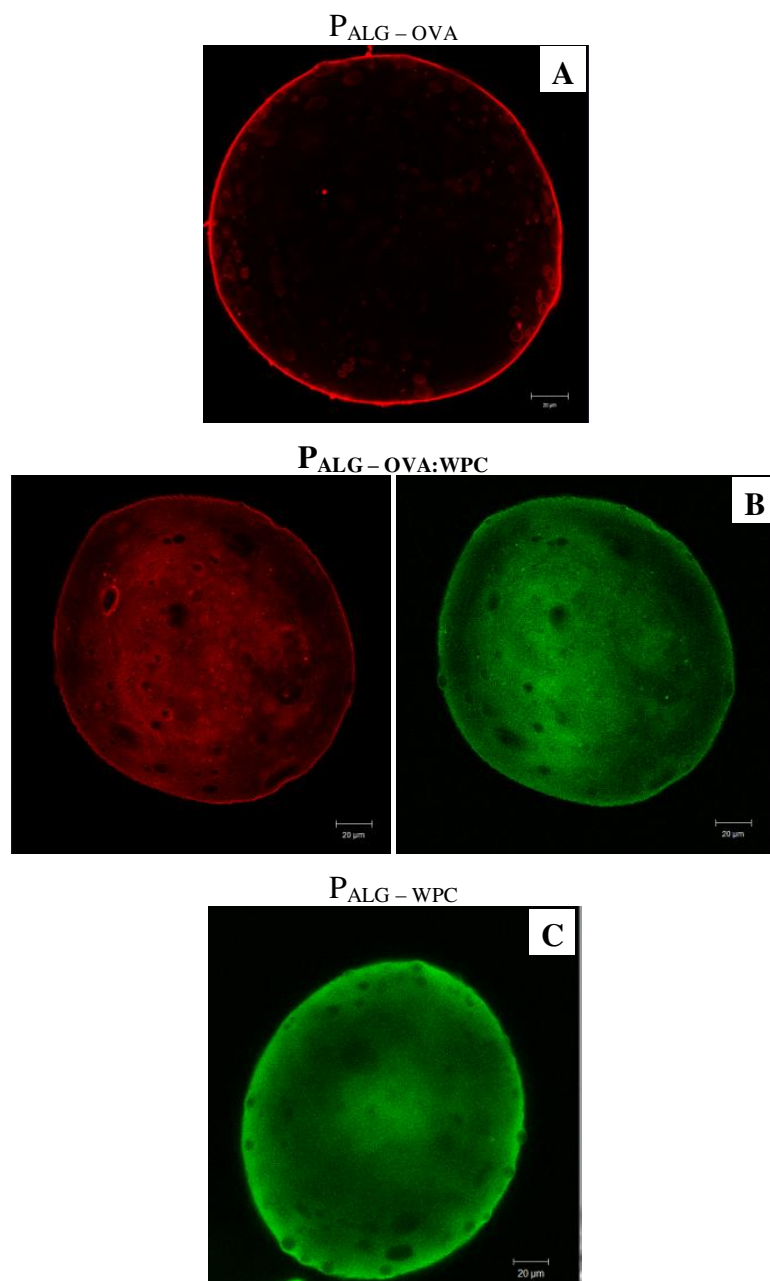


Figura 2.3.6 - Fotos obtidas por microscopia confocal de partículas de alginato: OVA-Rodamina + alginato sem coloração (fluorescência observada na cor vermelha) e óleo sem coloração + WPC-FITC (fluorescência observada na cor verde): A – OVA-Rodamina; B – Sobreposição de OVA-Rodamina + WPC-FITC; C - WPC-FITC. Barras = 20 μ m. Observação e captação de fotos em aproximadamente metade da altura da partícula.

2.3.10 Teor de matéria seca das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas

As Figuras 2.3.4 B-D-F apresentam os teores de matéria seca, para as partículas de alginato, que variaram entre $7,18 \pm 0,31\%$ a $12,05 \pm 0,86\%$, entre $8,52 \pm 0,61\%$ a $15,80 \pm 0,79\%$ e entre $8,06 \pm 0,23\%$ a $15,08 \pm 1,02\%$ quando as concentrações de proteína (OVA, WPC e OVA:WPC) em solução variaram de 2 a 8%, respectivamente. Quando foram utilizadas as partículas de pectina, constatou-se que os teores de matéria seca variaram entre $8,05 \pm 1,30\%$ a $17,49 \pm 1,13\%$, entre $9,23 \pm 1,29\%$ a $19,46 \pm 0,41\%$ e entre $9,58 \pm 0,58\%$ a $18,75 \pm 1,89\%$ com 2 e 8% de OVA, WPC e OVA:WPC, respectivamente.

Como esperado, as quantidades de matéria seca das partículas recobertas foram superiores quando comparadas com a matéria seca das partículas sem cobertura, independente do tipo de matriz. Quantidades maiores de proteína adsorvida determinaram maiores teores de matéria seca nas partículas recobertas. Partículas de alginato e pectina recobertas com OVA apresentaram os menores teores de matéria seca. É possível observar que a adsorção de proteína nas partículas levou a um aumento de 146% de matéria seca para as partículas de alginato e de 273% para as partículas de pectina em relação ao teor de matéria seca inicial, quando foi utilizada maior concentração de proteína em solução (8%). A maior quantidade de matéria seca observada nas partículas de pectina recobertas pode estar associada ao efeito de sua estrutura para promover maior desdobramento da proteína adsorvida sobre a superfície que possibilita liberação de moléculas de água (PATEL *et al.*, 2012).

2.3.11 Tamanho médio, morfologia e microestrutura das partículas de alginato e pectina recobertas com proteínas

2.3.11.1 Tamanho médio das partículas de alginato e pectina recobertas com proteínas

Os tamanhos médios das partículas de alginato e pectina recobertas com proteínas, foram determinados por espalhamento de luz utilizando o equipamento Masterziser e são apresentados na Figura 2.3.7. O tamanho das partículas recobertas é influenciado pelo

tamanho das partículas em função do polissacarídeo (pectina ou alginato) que têm por sua vez seus tamanhos influenciados pelas variáveis do processo como o diâmetro da agulha do bico da atomização, pressão de ar, concentração do agente de reticulação e polissacarídeo (BUREY *et al.*, 2008) e pela magnitude da força gerada na agitação mecânica durante a etapa da emulsão (ZHAI, CHEN, SCHREYER, 2013).

Em relação ao tamanho obtido as partículas produzidas com alginato recobertas com proteínas aumentaram de tamanho para $173,30 \pm 7,20 \mu\text{m}$, $174,90 \pm 5,40 \mu\text{m}$ e $166,10 \pm 5,80 \mu\text{m}$ para, $P_{\text{ALG-OVA}}$, $P_{\text{ALG-OVA:WPC}}$, $P_{\text{ALG-WPC}}$, respectivamente. Por outro lado, partículas produzidas com pectina e recobertas com proteína apresentaram diminuição de tamanho para $193,30 \pm 12,20 \mu\text{m}$, $188,60 \pm 9,20 \mu\text{m}$ e $181,00 \pm 8,30 \mu\text{m}$ para $P_{\text{PEC-OVA}}$, $P_{\text{PEC-OVA:WPC}}$, $P_{\text{PEC-WPC}}$, respectivamente, indicando que partículas produzidas com pectina aparentemente eram mais frágeis.

Os resultados mostraram que as partículas de pectina recobertas, independente do tipo de proteína, apresentaram tamanho menor quando comparadas com as partículas sem recobrimento, indicando que a proteína adsorvida exerceu pressão durante a adsorção, reduzindo seu tamanho e possivelmente expulsando parte da água presente na partícula. A adsorção de proteínas sobre géis carregados e a concomitante liberação de contra-íons leva à redução da pressão osmótica e assim ao encolhimento da rede de gel carregada (BECKER *et al.*, 2012). Partículas produzidas com alginato e recobertas com as proteínas estudadas apresentaram tamanhos médios maiores que os observados para as partículas sem cobertura. Comportamento semelhante foi observado anteriormente com partículas produzidas com alginato após revestimento com quitosana (ZHAI, CHEN, SCHREYER, 2013).

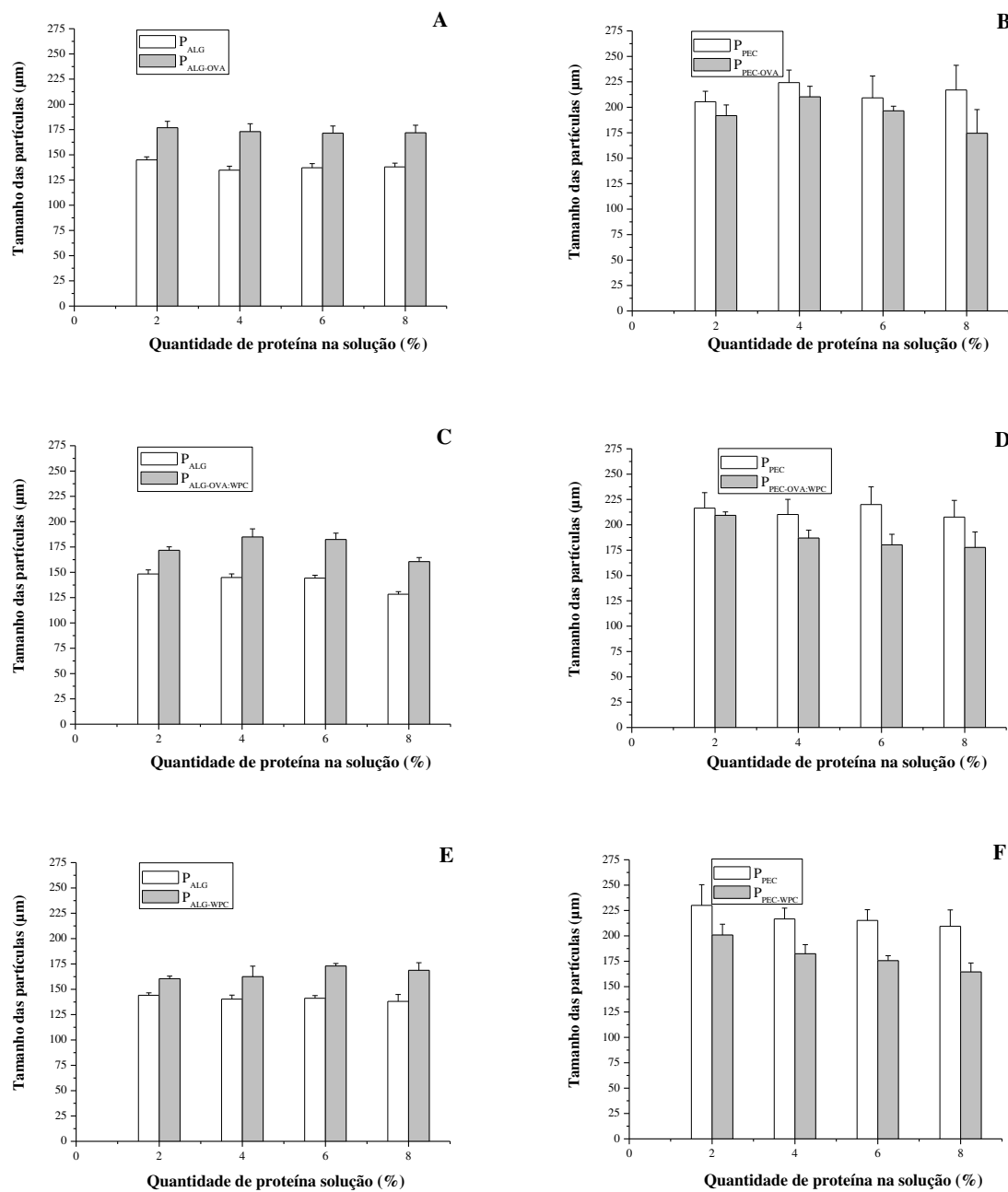


Figura 2.3.7 - Tamanho médio (μm) das partículas de alginato e pectina, com e sem recobrimento de OVA, OVA:WPC e WPC.

2.3.11.2 Morfologia e microestrutura das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas

As Figuras 2.3.8 ($P_{\text{ALG-OVA}}$, $P_{\text{ALG-OVA:WPC}}$, $P_{\text{ALG-WPC}}$) e 2.3.9 ($P_{\text{PEC-OVA}}$, $P_{\text{PEC-OVA:WPC}}$, $P_{\text{PEC-WPC}}$) apresentam as imagens obtidas por microscopia ótica das partículas úmidas e reidratadas e de microscopia eletrônica de varredura das partículas liofilizadas, contendo óleo de girassol e recobertas com proteína. A partir das observações feitas nas Figuras 2.3.8 e 2.3.9 (coluna 1) por microscopia ótica é possível perceber nas partículas de alginato que, de forma geral, as partículas úmidas recobertas apresentam formatos esféricos, com matriz definida, enquanto as de pectina apresentam formatos esféricos e formatos ovais. Em geral, partículas de biopolímeros possuem forma esférica, porém também podem apresentar na forma de fibras, esferóides ou aglomerados (JONES, McCLEMENTS, 2010).

As partículas de alginato e de pectina recobertas com proteínas e liofilizadas (Figuras 2.3.8 e 2.3.9) apresentam características diferentes quando comparadas com as partículas liofilizadas sem cobertura de proteína (Figura 2.3.2). Independente do tipo de matriz ou de tipo de proteína, a cobertura com proteína alterou significativamente sua aparência. A técnica de microscopia eletrônica de varredura requer amostras secas e a secagem pode levar à alteração da estrutura devido à retirada de água, porém a metodologia pode ser útil para revelar a estrutura da superfície externa e interna da partícula (BUREY *et al.*, 2008).

A observação da microscopia eletrônica de varredura mostrou que, independente do tipo de matriz, as partículas aparentemente suportaram o processo de secagem, sem perda de sua forma esférica original. No entanto, foi possível observar a presença de irregularidades e rugosidades nas superfícies das partículas secas, sem diferenças visuais entre as partículas recobertas com diferentes proteínas. A rugosidade nas superfícies pode estar associada à camada proteica aderida sobre a partícula. Resultados semelhantes foram observados em partículas de pectina quando foi utilizada proteína de soro do leite como material de cobertura (GEREZ *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012). No estudo de XIE *et al.* (2009), partículas de alginato recobertas com quitosana apresentaram diferentes graus de

rugosidade em função das concentrações de alginato utilizadas na produção de partículas, segundo os autores, como decorrência da carga de superfície das mesmas.

As fotos apresentadas na coluna 3 das figuras 2.3.8 e 2.3.9 mostram as partículas de alginato e pectina reidratadas após serem colocadas em água com pH ajustado para 4,0. Através da microscopia ótica pode-se perceber que as partículas não adquiriram formato esférico original das partículas úmidas recém-produzidas após 1 hora de imersão em água. Provavelmente a formação da camada proteica sobre as partículas tenha influenciado no comportamento de reidratação devido à diminuição da porosidade das partículas. Observou-se adicionalmente, que as partículas reidrataram-se em intervalos de tempo <10 segundos.

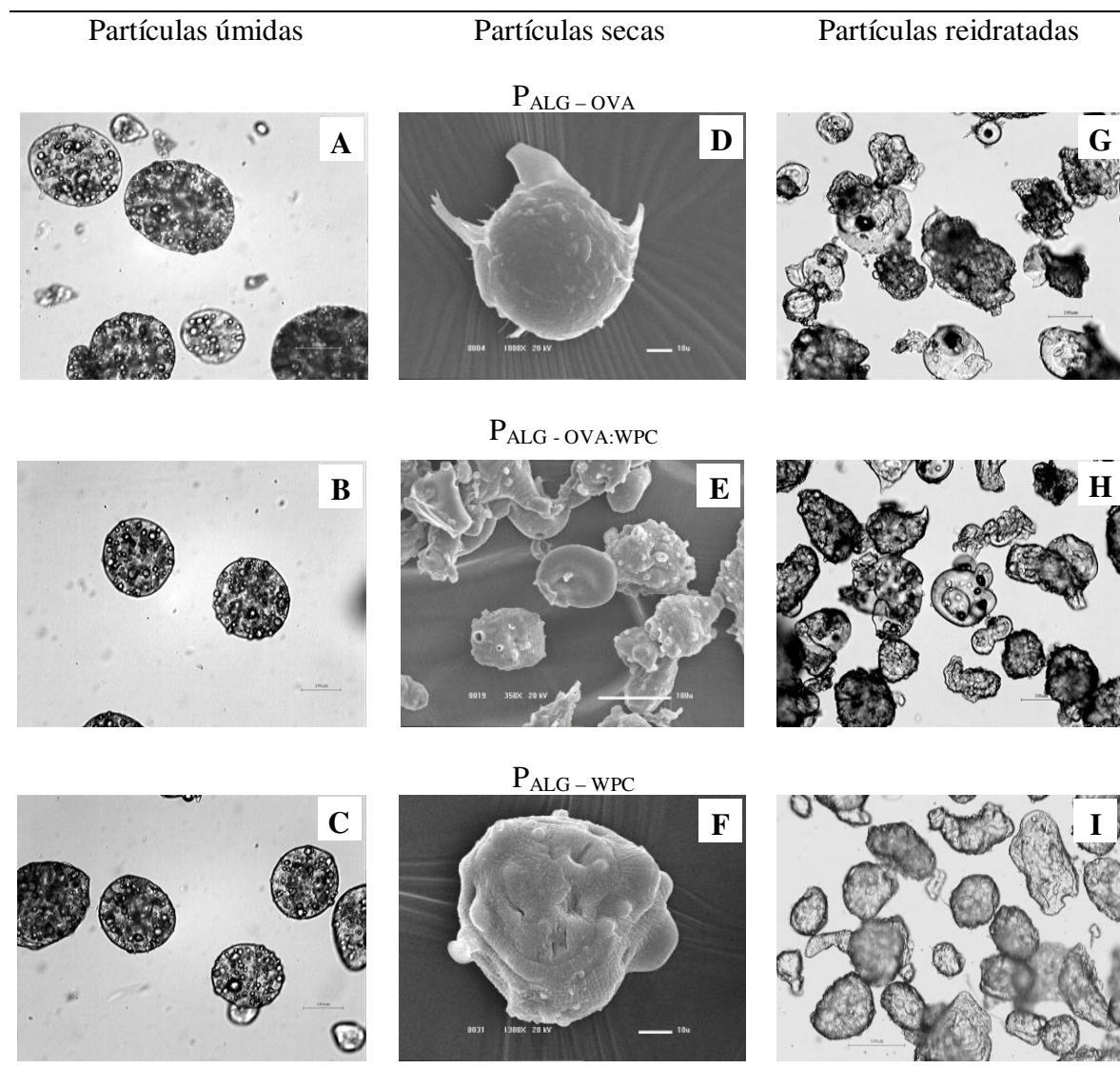


Figura 2.3.8 – Fotos obtidas por MO (colunas 1 e 3) e MEV (coluna 2) de partículas de alginato recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC, na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μ m e MEV = 10 μ m.

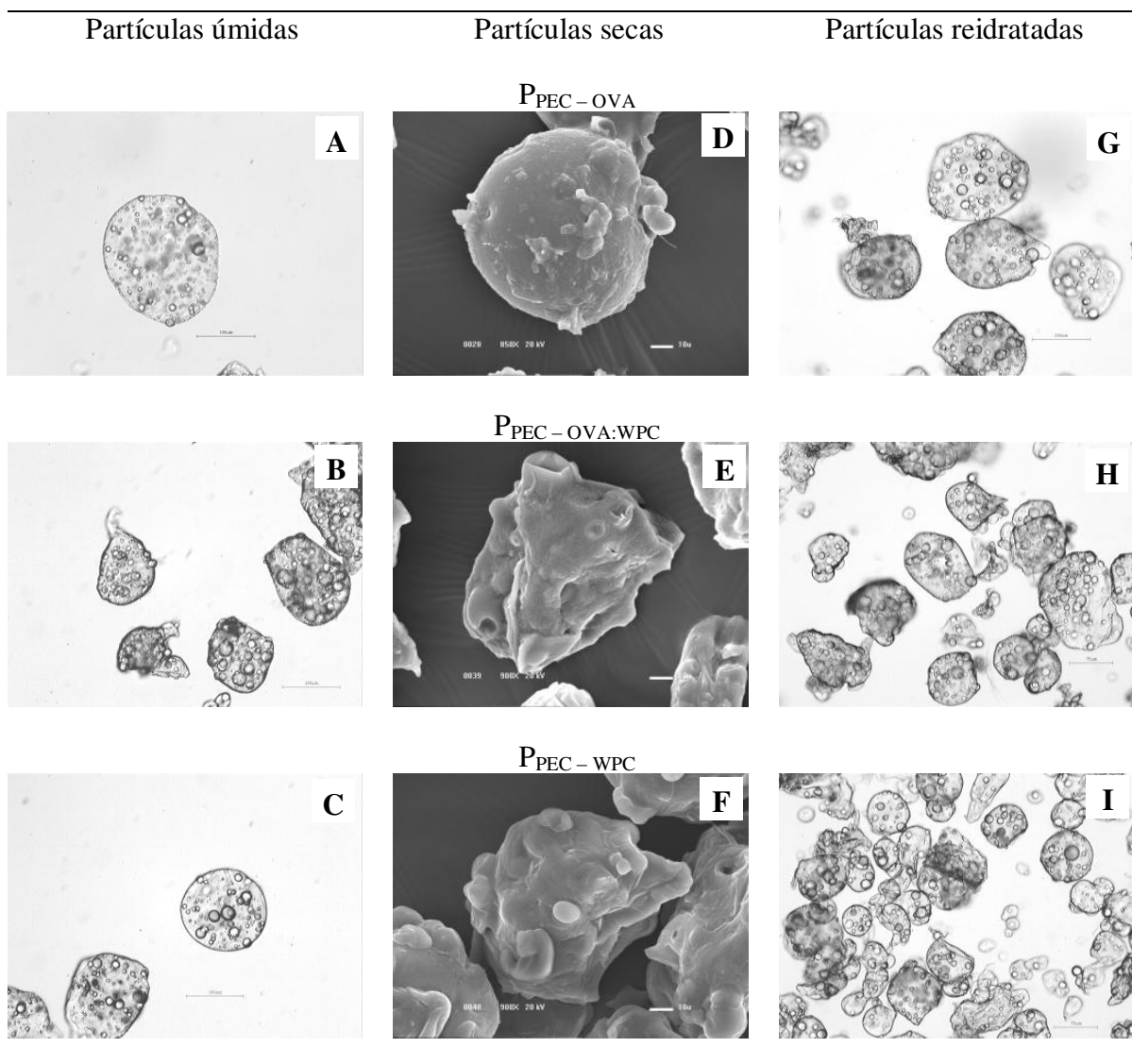


Figura 2.3.9 – Fotos obtidas por MO (colunas 1 e 3) e MEV (coluna 2) de partículas de pectina recobertas com OVA, OVA:WPC e WPC, na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μ m e MEV = 10 μ m.

2.3.12 Monitoramento da estabilidade oxidativa do óleo modelo

Partículas de alginato e pectina contendo o óleo modelo e recobertas com OVA, WPC e OVA:WPC (1:1) na concentração de 8% em solução foram utilizadas após liofilização e a estabilidade oxidativa do óleo encapsulado e do óleo livre foi avaliada pelo índice de peróxidos, durante 4 semanas, à 45 °C. Essa temperatura de armazenamento foi empregada para acelerar o processo de oxidação, já que o tempo de armazenamento avaliado foi relativamente curto.

Os índices de peróxidos do óleo livre e encapsulado nas partículas de alginato e pectina, sem cobertura e recobertas com proteínas da clara de ovo, do soro do leite e mistura OVA:WPC estão apresentadas na Figura 2.3.10.

Inicialmente, de acordo com a Figura 2.3.10, no tempo zero, o óleo puro apresentou o menor nível de oxidação, 1,02 meq de peróxido/kg de óleo. Os óleos encapsulados nas partículas apresentaram nível baixo de oxidação, variando de 4,20 a 7,50 meq de peróxido/kg de óleo, provavelmente devido ao manuseio durante a produção das partículas e a temperatura no caso das partículas produzidas com alginato.

Após 1 semana de armazenamento, à 45 °C, o óleo livre apresentou o maior nível de oxidação de $45,66 \pm 0,73$ meq de peróxido/kg de óleo. Todas as partículas apresentaram menor nível de oxidação que o óleo livre, sendo que as partículas de alginato sem cobertura apresentaram diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) quando comparadas com as partículas de pectina sem cobertura $29,83 \pm 2,94$ e $22,15 \pm 0,43$ meq de peróxido/kg de óleo, respectivamente. Partículas de pectina recobertas com OVA apresentaram o menor índice de oxidação ($9,39 \pm 0,26$ meq de peróxido/kg de óleo) dentre todas as partículas avaliadas.

Na segunda e terceira semanas de armazenamento, a tendência do nível de oxidação foi semelhante, sendo o maior índice de oxidação observado para o óleo livre, seguido das partículas sem cobertura, com valores maiores que as partículas recobertas com as proteínas, independente do tipo de polissacarídeo. As partículas de pectina recobertas com

OVA novamente apresentaram o menor índice de oxidação, após a terceira semana (41,55 $\pm$ 3,42 meq de peróxido/kg de óleo).

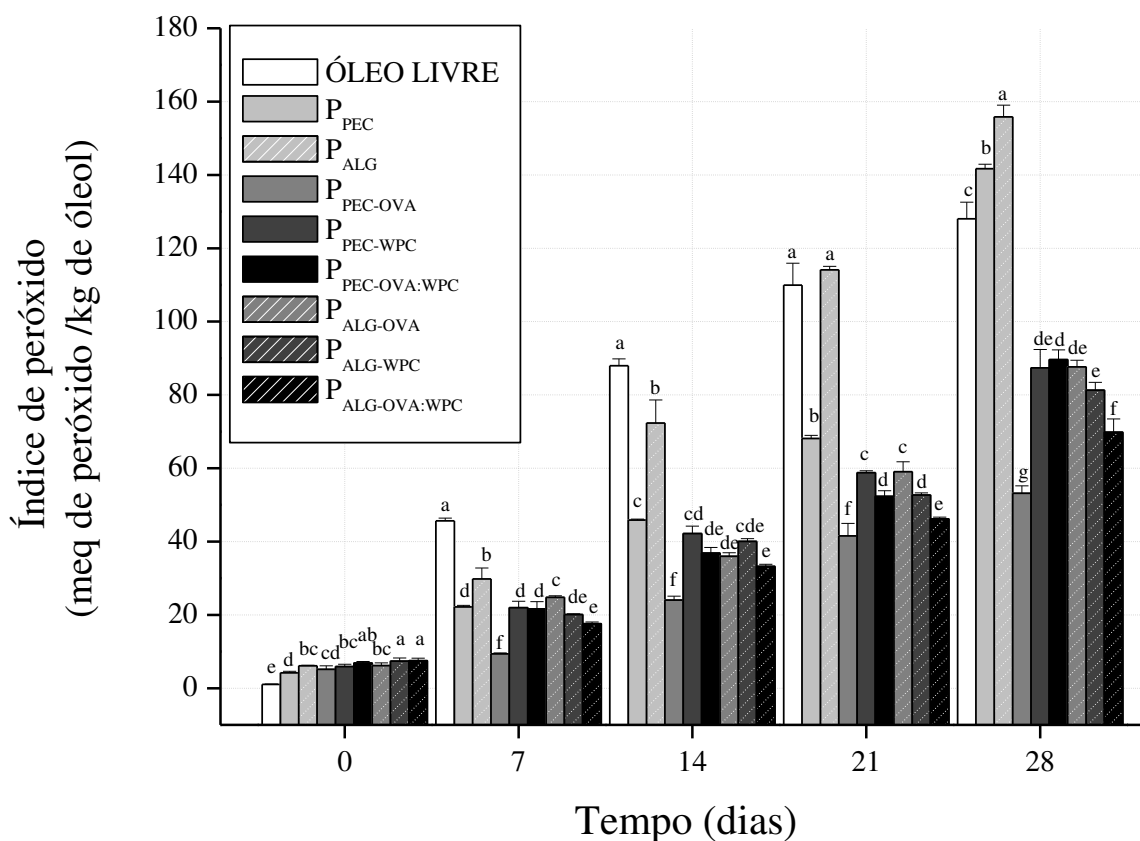


Figura 2.3.10 – Variações no índice de peróxido do óleo livre e encapsulado avaliado durante quatro semanas de armazenamento, à 45 °C. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras, para cada tempo estudado, $p < 0,05$.

Na quarta semana de armazenamento, as partículas de alginato sem cobertura apresentaram índice de oxidação ($155,82 \pm 3,21$ meq de peróxido/kg de óleo) superiores às partículas de pectina sem cobertura e ao óleo livre. Partículas de pectina recobertas com

WPC e OVA:WPC e partículas de alginato recobertas com OVA apresentaram valores de $87,40 \pm 5,01$, $89,61 \pm 2,68$ e $87,63 \pm 1,80$ meq de peróxido/kg de óleo, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$). Partículas de alginato recobertas com WPC e OVA:WPC apresentaram $81,27 \pm 2,13$ e $69,82 \pm 3,62$ meq de peróxido/kg de óleo, apresentando diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) com todas as partículas. Partículas de pectina recobertas com OVA apresentaram-se as mais efetivas na proteção do óleo, considerando o menor índice de peróxidos observado ao final do período de armazenamento ($53,15 \pm 2,03$ meq de peróxido/kg de óleo).

Com relação à estabilidade oxidativa do óleo modelo encapsulado em partículas sem recobrimento, resultados semelhantes foram observados anteriormente por Polavarapu *et al.* (2011), com uma estabilidade oxidativa maior no óleo de oliva e óleo de peixe livres quando comparados com os óleos encapsulados. Os autores atribuíram esses resultados a menor área superficial do óleo livre em relação ao óleo livre encapsulado.

No presente trabalho, partículas de alginato e pectina apresentaram alguns poros, como pode ser observado nas imagens de microestrutura, o que também pode ter influenciado no maior índice de oxidação das partículas sem cobertura, devido ao maior acesso do oxigênio ao óleo encapsulado. Outra característica das partículas que pode ser associada ao nível de oxidação é a maior barreira física ao oxigênio proporcionada às partículas recobertas com proteína, devido à maior espessura da matriz. Em outro estudo, resultados baseados na formação de peróxidos e de propanal indicaram que existe um fator adicional ao material de parede utilizado. Este fator é a microestrutura da partícula. De acordo com os autores, o uso da liofilização não envolve uso de calor e utiliza temperaturas muito baixas durante o processo, porém a morfologia das partículas é o fator limitante em relação à difusividade do oxigênio. A estrutura irregular e porosa produzida acelera a oxidação devido ao fácil acesso do oxigênio no interior das matrizes e, portanto, ao óleo encapsulado (ANWAR, KUNTZ, 2011).

O óleo livre oxidou mais do que o óleo encapsulado em partículas recobertas com proteínas, ao longo do período de armazenamento, a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ indicando a proteção do

material ativo por esse tipo de revestimento. O nível de oxidação desse óleo pode ser relacionado à sua composição, que possui elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados incluindo o ácido linoleico (50%) e o linolênico (10%).

A principal diferença do nível de oxidação das partículas de alginato e pectina recobertas com OVA, mistura OVA:WPC e WPC, em relação as partículas sem cobertura, pode ser relacionada à permeabilidade ao oxigênio dessas matrizes. A permeabilidade ao oxigênio de matrizes produzidas com ovalbumina é menor que aquela produzida com concentrado proteico do soro do leite como pode ser observado através de resultados de permeabilidade ao oxigênio de filmes apresentados na literatura. Hong e Krochta (2006) determinaram a permeabilidade ao oxigênio de filmes plásticos recobertos com solução de concentrado proteico de soro e glicerol e observaram valores de permeabilidade ao oxigênio de 16 a 30 mL μm^2 dia kPa, para a faixa de temperatura de 25 à 40 °C, respectivamente, sob 50% de umidade relativa. Taqi *et al.* (2011) obtiveram valores de permeabilidade ao oxigênio de filmes produzidos com ovalbumina (9%) e polietilenoglicol de 2 a 2,5 mL μm^2 dia kPa, à 23 °C e 50% de umidade relativa, respectivamente.

Existem alguns trabalhos na literatura que estudaram a estabilidade oxidativa de micropartículas produzidas por gelificação iônica, usando alginato ou pectina, sem cobertura de proteínas. Sun-Waterhouse *et al.* (2011) avaliaram a estabilidade oxidativa de óleo de oliva puro e adicionado de ácido cafeico, pela técnica de gelificação iônica usando uma solução aquosa de alginato na concentração de 1,5%. Os autores observaram que o óleo não encapsulado sofreu maior oxidação que as micropartículas produzidas sem ácido cafeico e as partículas produzidas com adição do ácido cafeico foram as que mais protegeram o óleo contra a oxidação, após 30 dias de estocagem à 37 °C, com valores de peróxido de 18, 14 e 12 meq de peróxido/kg de óleo, respectivamente. A proteção contra a oxidação foi atribuída à habilidade antioxidante do ácido cafeico em interagir com radicais livres. Sun-Waterhouse *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade oxidativa de microcápsulas de alginato (1 ou 1,2%) e uma combinação de alginato com hidroxipropilmetilcelulose (3:1) contendo óleo de abacate e adicionadas de BHT, à 37°C, por 90 dias, usando o óleo livre como controle. Os resultados mostraram que a combinação do processo de encapsulação,

com o uso dos antioxidantes (BHT) teve efeito sinérgico positivo, para melhorar a estabilidade oxidativa e suprimir a rancidez hidrolítica do óleo de abacate, à 37° C.

Jimenez *et al.* (2006) encapsularam ácido linoleico conjugado em matrizes poliméricas estudando a estabilidade oxidativa do óleo encapsulado observando que proteína do soro do leite foi mais efetiva contra a deterioração oxidativa comparada à goma arábica ou a uma mistura proteína do soro e maltodextrina. Provavelmente o fator determinante na vida útil do óleo encapsulado foi a porosidade da matriz seca que pode permitir a permeabilidade e difusão do oxigênio através da parede e o acesso aos ácidos graxos produzindo a oxidação dos mesmos. Os autores observaram que embora a mistura proteína de soro e maltodextrina tenha apresentado uma eficiência de encapsulação inferior (~60%) foi a mais protetiva contra a oxidação no teste de vida útil utilizado.

Os resultados do presente trabalho indicaram que a formação de peróxidos continua aumentando em todos os sistemas de partículas incluído o óleo livre ao longo do período de armazenamento. Porém, nenhuma das partículas recobertas favoreceu a oxidação em uma razão suficiente para que a fase de terminação fosse atingida. O índice de peróxidos utilizado no presente trabalho é um indicador útil da oxidação de lipídios, especialmente no início da oxidação lipídica (CHOE, MIN, 2005). Porém, para avaliação de produtos secundários o uso da quantificação do índice de peróxidos pode apresentar limitações. Cada método de avaliação fornece informações sobre o estado particular do processo oxidativo, que é função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos utilizados (FRANKEL *et al.*, 1994).

2.3.13 Conclusões

Partículas de alginato e pectina, utilizando a mesma metodologia de preparação e mesma concentração do agente de gelificação apresentaram diferentes teores de cálcio remanescente após a produção das partículas, sendo menor o teor de cálcio nas partículas de pectina. No entanto, altas eficiências de encapsulação foram observadas, com relação ao óleo encapsulado, para as partículas de alginato e de pectina.

A microscopia confocal mostrou gotas lipídicas encapsuladas com tamanho heterogêneo, porém espalhadas em toda a extensão da matriz. A secagem por liofilização produziu partículas recobertas, com perda de seu formato esférico original. Partículas secas apresentaram reidratação instantânea quando colocadas em meio aquoso.

A concentração da proteína em solução influenciou a adsorção da proteína sobre as partículas. O aumento da proteína em solução resultou em aumento de proteína adsorvida nas partículas estudadas. Maiores quantidades de proteína adsorvida foram observadas para partículas de pectina. Maior quantidade de proteína adsorvida produziu maior teor de matéria seca em todos os sistemas estudados. Após a adsorção proteica, partículas de pectina diminuíram de tamanho enquanto partículas de alginato aumentaram de tamanho médio.

No estudo de oxidação do óleo modelo encapsulado, partículas sem cobertura proteica, sofreram maior oxidação que o óleo livre devido à superfície de contato das gotas de óleo nas partículas com ar externo ser superior à apresentada pelo óleo livre. Partículas recobertas com proteínas foram mais efetivas na proteção do óleo que as sem cobertura. Proteínas da clara de ovo forneceram maior proteção oxidativa para o óleo modelo encapsulado.

2.3.14 Referências

ALLAN-WOJTAS, P., TRUELSTRUP HANSEN, L., PAULSON, A. T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41(1), p. 101-108, 2008.

ALONSO-MOUGAN, M., MEIJIDE, F., JOVER, A., RODRIGUEZ-NUNEZ, E., VAZQUEZ-TATO, J. Rheological behaviour of an amide pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 55(2), p. 123-129, 2002.

ANDRESEN, I. L., SKIPNES, O., SMIDSRØD, O., ØSTGAARD, K., HEMMER, P. C. Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. In: Cellulose Chemistry and Technology. ACS Symposium Series, Washington, 1977, v. 48, p. 361 – 381.

ANDERSEN, S. Omega-3 fatty acids in food fortification. **Leatherhead Food RA Food Industry Journal**, v. 1(1), p. 33-40, 1998.

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**, v. 41(2), p. 184-193, 2008.

ANWAR, S. H., KUNTZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules. Comparison of spray granulation, spray drying and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 105(2), p. 367-378, 2011.

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

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil. 5th Ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, USA, 2009.

BECKER, A. L., HENZLER, K., WELSH, N., BALLAUFF, M., BORISOV, O. Proteins and polyelectrolytes: A charged relationship. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17(2), p. 90-96, 2012.

BEINDORFF, C. M., ZUIDAM, N. J. Microencapsulation of fish oil. In: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. N. J. Zuidam and V. A. Nedovic (Ed.). Springer, New York, 2010, p. 161-185.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v. 37(8), p. 911-917, 1959.

BORUGEOIS, S., GERNET, M., PRADEAU, D., ANDREMONT, A., FATTAL, E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324(1), p. 2-9, 2006.

BRACCINI, I., GRASSO, R. P., PÉREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. **Carbohydrate Research**, v. 317(1-4), p. 119-130, 1999.

BRACCINI, I., PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2(4), p. 1089-1096, 2001.

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

CAPEL, F., NICOLAI, T., DURAND, D., BOULENGUER, P., LANGENDORFF, V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20(6), p. 901-907, 2006.

CARNEIRO, H. C. F., TONON, R. V., GROSSO, C. R. F., HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray

drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115 (4), p. 443-451, 2013.

CHAI, Y., MEI, L. H., WU, G. L., LIN, D. Q., YAO, S. J. Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. **Biotechnology Bioengineering**, v. 87(2), p. 228–233, 2004.

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

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84(2), p. 1267–1275, 2011.

CHANASATTRU, W., JONES, O. G., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J. Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23(8), p. 2450-2457, 2009.

CHEN, B., LI, H., DING, Y., SUO, H. Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed reticulação, **LWT - Food Science and Technology**, v. 47(1), p. 31-38, 2012.

CHOE, E., MIN, D. B. Chemistry and reactions of oxygen species in foods. **Journal of Food Science**, v. 70(9), p. 142-159, 2005.

DALGLEISH, D. G., EUSTON, S. E., HUNT, J. A., DICKINSON, E. Competitive adsorption of β -lactoglobulin in mixed protein emulsions, In: Food polymers, gels and colloids. E. Dickinson (Ed.). Dorset Press, Dorchester, 1991, p. 485 – 489.

DA SILVA, M. A., BIERHALZ, C. K, KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 77(4), p. 736–742, 2009.

DEPYPERE, F., VAN OOSTVELDT, P., PIETERS J. G., DEWETTINCK, K. Quantification of microparticle coating quality by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73(1), p. 179-186, 2009.

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

DICKINSON, E. Mixed biopolymers ant interfaces. In: Biopolymer Mixtures. S. E. Harding, S. E. Hill and J. R. Mitchell (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, 1995, p. 349-372.

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

DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G., CHRISTENSEN, B. E., GÅSERØD, O., SMIDSRØD, O. Swelling and partial solubilization of alginic acid gel beads in acidic buffer, **Carbohydrate Polymers**, v. 29 (3), p. 209-215, 1996.

DÜRRENBARGER, M. B., HANDSCHIN, S., CONDE-PETIT, B., ESCHER, F. Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **LWT - Food Science and Technology**, v. 34(1), p. 11-17, 2001.

EL-SAYED, M. M. H., CHASE, H. A. Confocal microscopy study of uptake kinetics of α -lactalbumin and β -lactoglobulin onto the cation-exchanger SP Sepharose FF. **Journal of Separation Science**, v. 32(18), p. 3246-3256, 2009.

FANG, Y., AL-ASSAF, S., PHILIPS, G. O., NISHINARI, K., FUNAMI, T., WILLIAMS, P. A., LI, L. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111(10), p. 2456-2462, 2007.

FANG, Y., AL-ASSAF, S., PHILIPS, G. O., NISHINARI, K., FUNAMI, T., WILLIAMS, P. Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 72(2), p. 334-341, 2008.

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

FRANKEL, E. N., HUANG, S. W., KANNER, J., GERMAN, B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42(5), p. 1054-1059, 1994.

GAO, S., WANG, Y., DIAO, X., LUO, G., DAI, Y. Effect of pore diameter and reticulation method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. **Bioresource Technology**, v. 101(11), p. 3830-3837, 2010.

GBASSI, G. K., VANDAMME, T., YOLOU, F. S., MARCHIONI, E. *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21(2), p. 97-102, 2011.

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

GEREZ, C. L., FONT DE VALDEZ, M. L., GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54(6), p. 552-556, 2012.

GIBBS, B. F., KERMASHA, S., ALLI, I., MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50(3), p. 213–224, 1999.

HAMBLING, S. G., MC ALPINE, A. S., SAWYER, L. β -lactoglobulin. In: Advanced dairy chemistry -1: Proteins. Elsevier Applied Science, London, 1992, p. 141-190.

HAMES, B. D., RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. B. D. Hames (Ed.). Oxford University Press, Oxford, 1990, 383 p.

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(6), p. 2052-2058, 2006.

HARTMAN, L., LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22(6), p. 475-476, 1973.

HAYNES, C. A., NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2(6), p. 517-566, 1994.

HONG, S. I., KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. **Journal of Food Engineering**, v. 77(3), p. 739–745, 2006.

HU, J., LI, S., LIU, B. Adsorption of BSA onto sulfonated microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23(3), p. 259-263, 2005.

HUBBUCH, J., LINDEN, T., KNEIPS, E., LJUNGLÖF, A., THÖMMES, J., KULA, M. – R. Mechanism and kinetics of protein transport in chromatographic media studied by confocal laser scanning microscopy: Part I. The interplay of sorbent structure and fluid phase conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1021(1-2), p. 93-104, 2003.

IDF. International Dairy Federation. International IDF Standards, Brussels, Belgium, section 74A, 1991.

JAYA, S., DURANCE, T. D., WANG, R. Effect of alginate-pectin composition on drug release characteristics of microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 26(2), 143-153, 2009.

JAYA, S., DURANCE, T. D., WANG, R. Physical characterization of drug loaded microcapsules and controlled *in vitro* release study. **The Open Biomaterials Journal**, v. 2, p. 9-17, 2010.

JIMENEZ, M., GARCÍA, H. S., BERINSTAIN C. I. Spray dried encapsulation of conjugated linoleic acid (CLA) with polymeric matrices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86(14), p. 2431-2437, 2006.

JONES, O. G., McCLEMENTS, D. J. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9(4), p. 374-397, 2010.

JYOTHI, S. S., SEETHADEVI, A., SURIA PRABHA, K., MUTHUPRASANNA, P., PAVITRA, P. Microencapsulation: review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3(1), p. 509-531, 2012.

KHARLAMOVA, M. V., MOCHALIN, V. N., LUKATSKAYA, M. R., NIU, J., PRESSER, V., MIKHALOVSKY, S., GOGOTSI, Y. Adsorption of proteins in channels of carbon nanotubes: effect of surface chemistry. **Materials Express**, v. 3(1), p. 1-10, 2013.

KIM, W. J., RAO, V. N. M., SMIT, C. J. B. Effect of chemical composition on compressive mechanical properties of low ester pectin gels. **Journal of Food Science**, v. 43(2), p. 572-575, 1978.

KLEIN, J., STOCK, J., VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 86-91, 1983.

KULMYRZAEV, A., CHANAMAI, R., McCLEMENTS, D. J. Influence of pH and CaCl_2 on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. **Food Research International**, v. 33(1), p. 15-20, 2000.

KUROPATWA, M., TOLKACH, A., KULOZIK, U. Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23(8), p. 2174-2181, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleave of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

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

LATOUR, R. A. Biomaterials: Protein-surface interactions. In: The encyclopedia of biomaterials and bioengineering. G. E. Wnek, G. L. Bowlin (Eds.) 2nd Ed. Informa Healthcare, London, 2008, v. 1, p. 270-284.

LEI, J., KIM, J. -H., JEON, Y. S. Preparation and properties of alginate/polyaspartate composite hydrogels. **Macromolecular Research**, v. 16(1), p. 45-50, 2008.

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

LÖFGREN, C., GUILLOTIN, S., HERMANSSON, A. M. Microstructure and kinetic rheological of amidated and nonamidated LM pectin gels. **Biomacromolecules**, v. 7(1), p. 114-121, 2006.

LOPES DA SILVA, J. A., RAO, M. A. Pectins: structure, functionality and uses. In: Food polysaccharides and their applications. A. M. Stephen, G. O. Phillips and P. A. Williams (Eds.). 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, 2006, p. 353-411.

LY, M. H., AGUEDO, M., GOUDOT, S., LE, M. L., CAYOT, P., TEIXEIRA, J. A., LE, T. M., BELIN, J. M., WACHÉ, Y. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. **Food Hydrocolloids**, v. 22(5), p. 742–751, 2008.

MADENE, A., JACQUOT, M., SCHER, J., DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41(1), p. 1-21, 2006.

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

MALINOVA, V., WANDREY, C. Loading polyelectrolytes onto porous microspheres: Impact of molecular and electrochemical parameters. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111(29), p. 8494-8501, 2007.

MARTINSEN, A., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33(1), p. 79-89, 1989.

MARTINSEN, A., STORRØ, I., SKJÅRK-BRÆK, G. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39(1), p. 186-194, 1992.

MAUKO, A., MUCK, T., MIRTÍČ, B., MLADENVIČ, A., KREFT, M. Use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) for the characterization of porosity in marble. **Materials Characterization**, v. 60(7), p. 603-609, 2009.

McCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65(8), p. 1270–1282, 2000.

MESTDAGH, M. M., AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer Science: food and non food applications**, v. 91(1), p. 303 - 314, 1998.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6(7), p. 225-232, 1995.

MOE, S. T., DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G., SMIDRØD, O. Alginates, In: Food polysaccharides and their applications. M. A. Stephen (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1995, p. 245-286.

MÖHWALD, H., MENZEL, H., HELM, C. A., STAMM, M. Lipid and polyampholyte monolayers to study polyelectrolyte interactions and structure at interfaces. **Advances in Polymer Science**, v. 165, p. 151–175, 2004.

MØRCH, Y. A., DONATI, I., STRAND, B. L., SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7(5), p. 1471-1480, 2006.

NORDE, W. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. In: Biopolymers at Interfaces. M. Malmsten (Ed.). Marcel Dekker, New York, 2003, p. 21-43.

O'BRIEN, R. D. Fats and oils: formulating and processing for applications. CRC Press, Boca Raton, 2009, 680 p.

OPANASOPIT, P., APIRAKARAMWONG, A., NGAWHIRUNPAT, T., ROJANARATA, T., RUKTANONCHAI, U. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. **AAPS – American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9(1), p. 67-74, 2008.

PATEL, A. J., VARILLY, P., JAMADAGNI, S. N., HAGAN, M. F., CHANDLER, D., GARDE, S. Sitting at the edge: how biomolecules use hydrophobicity to tune their interactions and function. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116(8), p. 2498-2503, 2012.

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

PEPPAS, N. A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50(1), p. 27-46, 2000.

PETERSON, C. L., WAGNER, G. L., AULD, D. L. Vegetable oil substitutes for diesel fuel. **Transactions of the ASAE**, v. 26(2), p. 322-327, 1983.

POLAVARAPU, S., OLIVER, C. M., AJLOUNI, S., AUGUSTIN, M. A. Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil-extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. **Food Chemistry**, v. 127(4), p. 694–705, 2011.

PUGNALONI, L. A., DICKINSON, E., ETTELAIE, R., MACKIE A. R., WILDE, P. J. Competitive adsorption of proteins and low molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107(1), p. 27- 49, 2004.

RABE, M., VERDES, D., SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162(1-2), p. 87-106, 2011.

RACAPÉ, E., THIBAUT, J. F., REITSMA, J. C. E., PILNIK, W. Properties of amidated pectins. II. Polyelectrolyte behavior and calcium binding of amidated pectin anamidated pectin acids. **Biopolymers**, v. 28(8), p. 1435-1448, 1989.

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

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

RAMSDEN, J. J. Puzzles and paradoxes in protein adsorption, **Chemical Society Reviews**, v. 24(1), p. 73-78, 1995.

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.

SANDOVAL-CASTILLA, O., LOBATO-CALLEROS, C., GARCÍA-GALINDO, H. S., ALVAREZ-RAMÍREZ, J., VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, **Food Research International**, v. 43(1), p. 111–117, 2010.

SAKIYAMA-ELBERT, S. E., HUBBELL, J. A. Functional biomaterials: design of novel biomaterials. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, p. 183–201, 2001.

SALLOUM, D. S., SCHLENOFF, J. B. Protein adsorption modalities on polyelectrolytes multilayers. **Biomacromolecules**, v. 5(3), p. 1089 – 1096, 2004.

SANTIPANICHWOHG, 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(6), p. N23-N30, 2008.

SHÄGGER, H., VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166(2), p. 368-379, 1987.

SHANTHA, N. C., DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, v. 77(2), p. 421-424, 1994.

SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginate in gel state. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, v. 57, p. 263-274, 1974.

SMRDEL, P., BOGATAJ, M., PODLOGAR, F., PLANINŠEK, O., ZAJC, N., MAZAJ, M., KAUČIČ, V., MRHAR, A. Characterization of calcium alginate beads containing structurally similar drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 32(5), p. 623-633, 2006.

SMRDEL, P., BOGATAJ, M., MRHAR, A. The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 77-89, 2008.

SOLIMAN, E. A. EL-MOGHAZY, A. Y. MOHY EL-DIN, M. S., MASSOUD, M. A. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 3, p. 48-55, 2013.

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(1), p. 560-566, 2012.

SRIAMORNSAK, P., KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358(1-2), p. 205-213, 2008.

STEWART, W. W., SWAIGOOD, H. E. Characterization of calcium alginate pore diameter by size exclusion chromatography using protein standards. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 922-927, 1993.

STRAND, B. L., MØRCH, B. L., ESPEVIK, T., SKJÅK-BRÆK, G. Visualization of alginate–poly-L-lysine–alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82(4), p. 386-394, 2003.

SUH, C. W., KIM, M. Y., CHOO, J. B., KIM, J. K., KIM, H. K., LEE, E. K. Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. **Journal of Biotechnology**, v. 112(3), p. 267-277, 2004.

SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J., MISKELLY, G. M., WIBISONO, R., WADHWA, S. S. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v.126(3), p. 1049-1056, 2011.

SUN-WATERHOUSE, D., PENIN-PEYTA, L., WADHWA, S. S., WATERHOUSE, G. I. N. Storage stability of phenolic-fortified avocado oil encapsulated using different polymer formulations and co-extrusion technology. **Food Bioprocess Technology**, v. 5(8), p. 3090-3102, 2012.

SUTTIPRASIT, P., KRISDHASIMA, V., MCGUIRE, J. The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin: I. Surface tension measurements with single-component and mixed solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 154(2), p. 316-326, 1992.

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

TAQI, A., ASKAR, K. A., NAGY, K., MUTIHAC, L., STAMATIN, I. Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films. **African Journal of Biotechnology**, v.10(60), p. 12963-12972, 2011.

UBBINK, J., KRÜGER, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17(5), p. 244-254, 2006.

VAN DE VELDE, F., WEINBRECK, F., EDELMAN, M. W., VAN DER LINDEN, E., TROMP, R. H. Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31(1-4), p. 159-168, 2003.

VAN TASSEL, P. R. Statistical mechanical modeling of protein adsorption. **Materialwissenschaft und Werkstofftech**, v. 34(12), p. 1129-1132, 2003.

VAN TOMME, S. R., VAN NOSTRUM, C. F., DIJKSTRA, M., DE SMEDT, S. C., HENNINK, W. E. Effect of particle size and charge on the network properties of microsphere-based hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70(2), p. 522–530, 2008.

VERHEUL, M., PEDERSEN, J. S., ROEFS, S. P. F. M., DE KRUIF, K. G. Association behavior of native β -lactoglobulin. **Biopolymers**, v. 49(1), p. 11-20, 1999.

VROMAN, L., ADAMS, A. L. Adsorption of proteins out of plasma and solutions in narrow spaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 111(2), p. 391-402, 1986.

WALKENSTRÖM, P., HERMANSSON, A. M. High pressure treated mixed gels of gelatin and whey protein. **Food Hydrocolloids**, v. 11(2), p. 195-208, 1997.

WEISS, J., TAKHISTOV, P., McCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, 71(9), p. R107-R116, 2006.

XIE, H. G., ZHENG, J. N., LI, X. X., LIU, X. D., ZHU, J., WANG, F., XIE, W. Y., MA, X. J. Effect of surface morphology and charge on the amount and conformation of fibrinogen adsorbed onto alginate/chitosan microcapsules. **Langmuir**, v. 26(8), p. 5587-5594, 2009.

YOO, S. H., SONG, Y. B., CHANG, P. S., LEE, H. G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38(1), p. 25-30, 2006.

YOU, J. O., PARK, S. B., PARK, H. Y., HAMM, S., CHUNG, C. H., KIM, W. S. Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. **Journal of Microencapsulation**, v. 18(4), p. 521-532, 2001.

YU, C. Y., YIN, B. C., ZHANG, W., CHENG, S. X., ZHANG, X. Z., ZHUO, R. X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68(2), p. 245-249, 2009.

YU, C. Y., JIA, L. H., CHENG, S. X., ZHANG, X. Z., ZHUO, R. X. Fabrication of microparticle protein delivery systems based on calcium alginate. **Journal of Microencapsulation**, v. 27(2), p. 171-177, 2010.

ZHAI, P., CHEN, X. B., SCHREYER, D. J. Preparation and characterization of alginate microspheres for protein delivery within tissue scaffolds. **Biofabrication**, v. 5(1), .p 1-11, 2013.

CAPÍTULO 3

**PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM
GELATINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E RESISTÊNCIA GASTROINTESTINAL *IN*
*VITRO***

CAPÍTULO 3

PARTÍCULAS DE ALGINATO E PECTINA, RECOBERTAS COM GELATINA E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E RESISTÊNCIA GASTROINTESTINAL *IN VITRO***RESUMO**

Polissacarídeos aniônicos e seus géis podem formar complexos com proteínas dependendo das condições de ajuste do pH, de suas concentrações, da relação estequiométrica proteína: polissacarídeo, densidade de carga e da força iônica do meio. Inicialmente a formação de coacervados entre solução de gelatina (GEL), proteína de soro de leite (WPC) e mistura GEL:WPC, 1:1 e emulsões de óleo de girassol e pectina ou alginato foi estudada em função do pH e de diferentes relações estequiométricas proteína: emulsão. A complexação foi avaliada quanto ao potencial Zeta e aparência visual dos sistemas produzidos. Posteriormente, a complexação entre soluções das mesmas proteínas e partículas obtidas por gelificação iônica de alginato ou de pectina com íons cálcio em meio aquoso, sem ajuste da força iônica, foi avaliada por observação visual dos sistemas resultantes. Por meio desta análise, foi possível definir as condições em que há interação entre as proteínas e as partículas. Partículas de pectina foram recobertas com proteínas nas concentrações 0,75, 1,25 e 2,0% para soluções de GEL, GEL:WPC e WPC, respectivamente, e partículas de alginato foram recobertas nas concentrações de 0,63, 0,63 e 0,75% para soluções de GEL; GEL:WPC e WPC, respectivamente, em pH 4,0. Partículas de alginato e pectina sem cobertura foram avaliadas com relação à resistência física e as partículas com recobrimento proteico na maior concentração (8,0%), avaliadas em relação à solubilidade da proteína adsorvida em condições gastrointestinais *in vitro*. As partículas obtidas foram caracterizadas com relação ao conteúdo total de proteína adsorvida, teor de matéria seca, tamanho e morfologia. As maiores adsorções de proteína foram observadas nas partículas produzidas com pectina. Partículas de alginato sem cobertura permaneceram estáveis em condições gástricas e incharam levemente em condições intestinais. As partículas de alginato recobertas se mostraram parcialmente resistentes às condições gástricas, com

solubilização de $32,4 \pm 2,1\%$; $12,1 \pm 1,6\%$ e $11,5 \pm 1,1\%$ para GEL, GEL:WPC e WPC, respectivamente. As partículas de pectina apresentaram maior sensibilidade à atividade proteolítica em ambiente gástrico. As proteínas adsorvidas em todas as partículas do presente estudo apresentaram alta sensibilidade às condições intestinais com solubilização superior a 97% para as partículas produzidas com pectina revestidas com proteínas e com solubilidades entre 83 a 99% no caso das partículas produzidas com alginato e revestidas com proteínas. As partículas de pectina revestidas mostraram-se mais adequadas para liberação de ativos no intestino delgado enquanto as de alginato revestidas foram mais adequadas para liberação do princípio ativo no cólon.

ABSTRACT

Anionic polysaccharides and their gels can form complexes with proteins depending on the conditions of pH adjustment, concentration of the polymers, and stoichiometric ratio of polysaccharide: protein, charge density and ionic strength of the medium. Initially, the formation of coacervates of gelatin solution (GEL) whey protein (WPC) and GEL:WPC, 1:1 and emulsions of sunflower oil and pectin or alginate was studied as a function of pH and different protein: emulsion stoichiometric ratios. The complexation was evaluated using Zeta potential and the visual appearance of the resulting systems. Subsequently, the complexation of the same protein solutions and ion particles obtained by gelation of alginate or pectin with calcium ions in an aqueous medium, without adjusting the ionic strength was evaluated by visual observation of the resulting systems. Through this analysis it was possible to define the conditions under which there is interaction between the proteins and particles. Pectin particles were coated with protein concentrations of 0.75%, 1.25% and 2.0% for solutions GEL, GEL:WPC and WPC, respectively, and alginate particles were coated in concentrations of 0.63%, 0.63% and 0.75% solutions to GEL, GEL:WPC and WPC, respectively, at pH 4.0. Particles of alginate and pectin without coverage were evaluated for physical resistance and particles coated with protein at the highest protein concentration in solution (8.0%) were evaluated in relation to the solubility of the protein adsorbed on gastrointestinal *in vitro* conditions. The obtained particles were characterized with respect to the total content of adsorbed protein content, dry matter, size and morphology. The higher protein adsorption was observed for particles made with pectin. Alginate particles without coverage remained stable in gastric conditions and swelled slightly in intestinal conditions. The alginate-coated particles were shown partially resistant to gastric conditions, with a solubility of $32.4 \pm 2.1\%$, $12.1 \pm 1.6\%$ and $11.5 \pm 1.1\%$ for GEL, GEL:WPC and WPC, respectively. The particles of pectin showed greater sensitivity to proteolysis activity in the gastric environment. The proteins adsorbed on each particle of the present study showed high sensitivity to intestinal conditions with greater solubility (higher than 97%) for particles made with pectin covered with protein and solubility between 83 and 99% in the case of the particles produced with alginate and

coated with proteins. Particles produced with pectin and covered with proteins were more suitable for release of active core material in the small intestine, while the alginate coated particles were more suitable to release the active ingredient in the colon.

3.1 Introdução

Complexos entre proteínas e polissacarídeos têm sido muito estudados e formam-se espontaneamente em solução aquosa, sendo geralmente estáveis em uma ampla faixa de soluções com diferentes valores de pH, devido à interação eletrostática entre os grupos de carga oposta dos biopolímeros (COOPER *et al.*, 2005; DE KRUIF, WEINBRECK, DE VRIES, 2004; TOLSTOGUZOV, 2003).

A formação e a estabilidade destes complexos são influenciadas por parâmetros como pH, força iônica, estequiometria, densidade de carga dos biopolímeros, além das condições de processamento como temperatura e tempo (YE, 2008). A formação do complexo entre proteínas e polissacarídeos ocorre geralmente na faixa de pH entre o valor de pKa dos grupos aniônicos do polissacarídeo e do ponto isoelétrico (pI) da proteína (DE KRUIF, WEINBRECK, DE VRIES, 2004; TOLSTOGUZOV, 1997).

Muitos trabalhos envolvendo o estudo dos parâmetros básicos que regulam a formação de complexos entre pectina e proteínas do soro do leite na produção de nanopartículas, vem sendo desenvolvidos na busca da determinação das melhores condições de nanocomplexação (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008). Medidas de potencial Zeta para identificar melhores estequiometrias, efeito do pH, concentração dos hidrocolóides utilizados e efeito da força iônica são empregados extensamente.

Diferentes estratégias para produção de microcápsulas com proteínas do soro do leite incluem *spray drying* (PICOT, LACROIX, 2004), gelificação induzida por frio (BARBUT, FOEGEDING, 1993), coacervação complexa (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e métodos combinados (LAMBERT *et al.*, 2008). No entanto, os resultados obtidos são controversos. Outros estudos têm avaliado a proteção conferida a ativos sensíveis pela encapsulação, os quais, no geral, indicam que na forma encapsulada os ativos são protegidos de condições adversas, mantendo maior estabilidade durante a estocagem e a passagem pelo trato gastrointestinal (TANG *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2009). Dentre os métodos utilizados destacam-se partículas produzidas por gelificação iônica utilizando biopolímeros aniônicos como o alginato e pectina (CHAN, 2011). Alginatos são os

materiais em geral, mais utilizados para aplicações alimentícias e não alimentícias por causa de sua biocompatibilidade, segurança/inocuidade e baixo custo (MARTINSEN, SKJÅK-BRAEK, SMIDSRØD, 1989).

Entre as técnicas de encapsulação, a gelificação iônica é uma tecnica branda, não requer a utilização de altas temperaturas durante sua produção e não utiliza solventes orgânicos; porém, as partículas apresentam limitada resistência à passagem pelo trato gastrointestinal devido a sua porosidade. As funcionalidades destas partículas podem ser melhoradas com formação de uma camada proteica sobre sua superfície (PATIL *et al.*, 2010; RAJAM *et al.*, 2012). Embora os mecanismos de deposição de moléculas de proteínas em partículas porosas não sejam totalmente compreendidos, estudos mostram que o recobrimento das partículas com uma camada proteica melhora as propriedades funcionais das partículas (KHEIREDDIN, ZHANG, AKBULUT, 2013).

Polissacarídeos aniônicos incluindo alginato e pectina apresentam várias propriedades que os habilitam a serem usados como matriz para encapsulação e/ou liberação controlada de uma variedade de substâncias, incluindo proteínas, células e compostos bioativos. Estas propriedades incluem: a) meio aquoso relativamente inerte no interior da matriz; b) temperatura branda para a produção, sem uso de solvente orgânico, c) gel com alta porosidade que permite altas taxas de difusão de macromoléculas, d) habilidade de controlar a porosidade com um simples processo de recobrimento e e) dissolução e biodegradação do sistema sob condições fisiológicas normais (GOMBOTZ, WEE, 2012). No entanto, partículas de alginato apresentam algumas desvantagens como formação de poros e quebra na superfície das partículas resultando em uma rápida difusão de água e outros fluidos para o ativo encapsulado (GOUIN, 2004). A degradação de partículas de alginato recobertas com proteínas do soro do leite foi investigada recentemente em condições simuladas gastroentéricas por Hébrard *et al.* (2013).

A hipótese deste estudo foi que o recobrimento das partículas com uma camada de proteína pode melhorar sua estabilidade e, assim, a viabilidade do ativo à passagem pelo trato gastrointestinal. Inicialmente, a carga superficial das soluções de GEL, WPC e

GWL:WPC foram estudadas em diferentes valores de pH e diferentes relações estequiométricas proteína:polissacarídeo para identificar as condições de complexação eletrostática. As partículas de alginato e pectina com e sem recobrimento proteico foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho, quantidade de proteína adsorvida e matéria seca. Partículas com as maiores quantidades de proteína adsorvida foram avaliadas posteriormente com relação à sua estabilidade física e com relação à solubilidade proteica durante a passagem por condições simuladas do trato gastro intestinal.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Material

Os materiais utilizados foram: pectina cítrica (PEC) GENU® de baixo teor de metoxilação amidada (conteúdo de ácido galacturônico $81,3 \pm 1,2\%$, grau de esterificação $30,4 \pm 1,6\%$ e grau de amidação $10,1 \pm 1,0\%$, determinado de acordo com FAO, (2009), CP Kelco, Limeira, SP, Brasil), alginato de sódio (ALG) (alta massa molar, alto conteúdo de ácido gulurônico, lote G3512301 MANUGEL DMB, FCM Biopolymer, Campinas, SP, Brasil), concentrado proteico do soro do leite (WPC) (Lacprodan - lote: Lac804U17601, 76, Arla Foods Ingredientes, Porteña, Provincia de Córdoba, Argentina), gelatina (GEL) (origem suína, bloom 244, 240P/6 do tipo A, ponto isoelétrico característico 7,86, Gelita South America, SP, Brasil), cloreto de cálcio anidro (M.M: 110,99, Dinâmica, Diadema - SP, Brasil), óleo de girassol comercial, ácido clorídrico (M.M.: 36,46, Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (M.M.: 40, Nuclear, Diadema - SP, Brasil); ácido sulfúrico (Synth, Diadema, SP, Brasil), pepsina suína da mucosa gástrica (P7012-5G, lote 010M7005V, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil), pancreatina de pâncreas suíno (P1625-100G, lote 128K1933, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil), mucina extraída do estômago suíno (lote 111M7000V, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., SP, Brasil). Água deionizada e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Caracterização dos biopolímeros

A gelatina e as proteínas do soro do leite foram caracterizadas com relação ao teor de proteína e umidade segundo metodologia da *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC, 2006) e quanto ao conteúdo de lipídios (BLIGH, DYER, 1959). Utilizou-se a metodologia de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total, adotando 5,5 e 6,38 para GEL e WPC, respectivamente, como fator de conversão de nitrogênio em proteína.

3.2.2.2 Determinação do Potencial Zeta

Para avaliar a formação de complexos eletrostáticos entre as proteínas e os polissacarídeos foram utilizadas medidas da mobilidade eletroforética das misturas de proteínas em solução (SOL_{GEL}, SOL_{GEL:WPC} e SOL_{WPC}) e das emulsões dos polissacarídeos (EMUL_{ALG} e EMUL_{PEC}). Foram determinadas as cargas superficiais das soluções de proteína e das emulsões de polissacarídeos. O mesmo teste foi conduzido para as misturas com diferentes quantidades de solução de proteína para uma quantidade fixa de emulsão de polissacarídeo produzindo, assim, diferentes relações estequiométricas proteína: polissacarídeo. Todas as determinações do potencial Zeta foram realizadas no equipamento Zetasizer modelo Nano-Z (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.).

3.2.2.2.1 Potencial Zeta das soluções

Soluções de proteínas do concentrado proteico do soro do leite foram preparadas a concentração de 0,2% (m/m) mantidas sob agitação *overnight* e avaliadas com relação ao potencial Zeta, variando o pH de 3,0 a 7,0 a temperatura ambiente. Para a solução de gelatina e mistura GEL:WPC o pH variou de 3,0 a 9,0 e de 3,0 a 8,0 respectivamente, sendo os sistemas mantidos a 45 °C.

Quando foi utilizada a mistura GEL:WPC, soluções de gelatina e proteínas do soro do leite foram misturados na concentração de 0,2%, em agitação constante, a 45 °C. Antes

das leituras, o pH das soluções foi ajustado manualmente utilizando ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N e 0,5 N, e as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.2.2 Potencial Zeta das emulsões

Foram preparadas soluções de SOL_{ALG} e SOL_{PEC} na concentração de 2% (m/m). As soluções foram emulsificadas com 1,65% (m/m) de óleo de girassol em agitador Ultra Turrax, a 14000 rpm por 3 minutos (IKA Works do Brasil, RJ). As emulsões (EMUL_{ALG} e EMUL_{PEC}) foram diluídas para a concentração de 0,2% (volume de emulsão/volume de água) e o potencial Zeta foi medido, em pHs 3,0 a 7,0, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata como no item anterior.

3.2.2.3 Potencial Zeta das relações entre solução de GEL, GEL:WPC, WPC, e emulsões de alginato e pectina

A solução de proteínas do concentrado proteico do soro do leite foi preparada na concentração 2%. A solução permaneceu 4 horas sob agitação constante a 500 rpm, em temperatura ambiente; após foi diluída para a concentração final de 0,2% (m/m) e mantida em agitação, por 60 minutos. A solução de gelatina foi preparada na concentração de 0,2% em agitação constante a 45 °C, por 1 hora. Para a solução da mistura GEL:WPC (1:1), soluções de gelatina e proteínas do soro do leite foram misturadas na concentração de 0,2%, em agitação constante, ambas a 45 °C. As soluções tiveram o pH ajustado antes das misturas. Os coacervados foram preparados utilizando misturas volumétricas em tubos de vidro de 30 mL, em diferentes relações (proteína:polissacarídeo) com pH ajustado para 3,0, 3,5 e 4,0. Para o pH 3,0 e 3,5 foram avaliadas relações proteína:polissacarídeo variando de 1:1 a 10:1, enquanto a pH 4,0 as relações variaram de 1:1 a 20:1.

Após a preparação, as misturas permaneceram em repouso por 12 horas em temperatura ambiente para posterior determinação do potencial Zeta. As amostras foram agitadas manualmente imediatamente antes da determinação. As relações foram preparadas em triplicata, em temperatura ambiente. Os valores dos potenciais Zeta representam uma média de nove determinações.

3.2.2.4 Complexação eletrostática entre as soluções de GEL, GEL:WPC, WPC e partículas de alginato e pectina

Para esse experimento foram produzidas partículas de alginato e pectina, obtidas por gelificação iônica, conforme descrito no item 2.2.2.4. As partículas sem recobrimento foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, eficiência de encapsulação e matéria seca conforme descrito no Capítulo 2. As partículas foram suspensas em meio aquoso com pH ajustado para 3,0, 3,5 e 4,0 equivalente a uma concentração de 0,2% (m/m) do polissacarídeo, foram preparadas misturas volumétricas entre SOL_{GEL}:P_{PEC}, SOL_{GEL:WPC}:P_{PEC}, SOL_{WPC}:P_{PEC} utilizando as seguintes relações 0,5:1; 0,75:1; 1:1; 1,25:1; 1,5:1; 1,75:1; 2:1; 2,5:1; 3:1, 4:1, 4,5:1, 5:1; 5,5:1, 6:1 e entre SOL_{GEL}:P_{ALG}, SOL_{GEL:WPC}:P_{ALG}, SOL_{WPC}:P_{ALG} variando de 0,125:1; 0,25:1; 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 2:1; 3:1 (0,2% m/m). Quando foram utilizadas as soluções de GEL ou a mistura GEL:WPC, a temperatura foi fixada em 45 °C. Os sistemas foram mantidos em agitação durante 1 hora, em homogenizador rotativo, a 25 rpm (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) e, em seguida, permaneceram mais 12 horas em repouso à temperatura ambiente para avaliação do aspecto visual. Cada solução foi preparada em triplicata.

3.2.2.5 Recobrimento de partículas de alginato e pectina com GEL, GEL:WPC e WPC

Para a cobertura com proteínas, foram produzidas partículas como no item 2.2.2.4. Cinquenta gramas de partículas de alginato ou pectina foram transferidas para 200 mL de solução de proteína. Para os recobrimentos de partículas de alginato, foram utilizadas soluções de GEL, GEL:WPC e WPC nas concentrações de 0,63%, 0,63% e 0,75%, respectivamente, e para o recobrimento de partículas de pectina foram utilizadas soluções de GEL, GEL:WPC e WPC nas concentrações de 0,75%, 1,25% e 2%, respectivamente. Adicionalmente todos os sistemas estudados foram recobertos com concentrações de 8 % de proteína em solução. As partículas foram mantidas nas soluções contendo proteína durante 30 minutos, em agitação constante (500 rpm), à 45 °C para a solução de GEL e GEL:WPC e à temperatura ambiente para a solução de WPC. As partículas foram lavadas em peneiras de malha de aço (ϕ 53 μ m), com água deionizada (pH 4,0) para remover a

proteína que não foi adsorvida nas partículas. Foram feitas três produções independentes de partículas para cada concentração avaliada. Para cada produção, as partículas foram analisadas em triplicata em relação ao tamanho, teor de proteína e umidade. Uma fração das partículas úmidas foi congelada e liofilizada (Mod. 501, Edwards Pirani, Crawley, West Sussex, UK) à -40 °C, pressão de 0,1 mmHg, tempo total do ciclo de 48 h. As partículas secas foram acondicionadas em frascos com tampa e mantidos sob refrigeração.

3.2.2.6 Características físico-químicas das partículas

3.2.2.6.1 Composição centesimal das partículas de alginato e pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC

As partículas foram caracterizadas com relação ao teor de umidade e proteína, de acordo com metodologia descrita no item 2.2.2.6.1 do Capítulo 2.

3.2.2.6.2 Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas de alginato e pectina com ou sem recobrimento proteico

O tamanho médio (d 0,5) das partículas úmidas foi determinado de acordo com metodologia descrita no item 2.2.2.6.3 do Capítulo 2

3.2.2.6.3 Morfologia das partículas com ou sem recobrimento proteico

A morfologia das partículas úmidas sem e com cobertura foi observada conforme metodologia descrita no item 2.2.2.6.4 do Capítulo 2.

3.2.2.7 Avaliação da solubilidade proteica das partículas de alginato e pectina, recobertas com proteínas submetidas às condições gastrointestinais

Partículas de alginato e pectina recobertas com a maior concentração de proteínas em solução (8% GEL, GEL:WPC e WPC) foram submetidas às condições gastrointestinais simuladas de acordo com a metodologia descrita por Mozzi *et al.* (2009) e Sultana *et al.* (2000). Em tubos de vidro de 30 mL, contendo 20 mL de suco gástrico artificial (SGA) com o pH ajustado para 2,0, foram adicionadas duas gramas de partículas úmidas e

incubadas a 37 °C, em banho maria com agitação, por 2 horas. O suco gástrico artificial (SGA) utilizado foi elaborado com 1,12 g/L KCl; 2 g/L NaCl; 0,11CaCl₂; 0,4 g/L KH₂PO₄ g/L; 3,5 g/L de mucina e 0,26 g/L de pepsina e HCl para ajuste de pH.

Posteriormente para a simulação do suco intestinal artificial (SIA), alterou-se o pH para 7,0 com solução de NaHCO₃ na concentração de 20% (m/v) e adicionou-se pancreatina na concentração de 1,95 g/L, e novamente se incubou as amostras por mais 5 horas. Após intervalos de tempo de duas, e sete horas amostras foram retiradas para avaliação da morfologia.

Após 2 e 7 horas de simulação das condições gastrointestinais, alíquotas de 10 mL foram separadas e colocadas em banho de gelo, onde permaneceram imersas por 15 minutos para inativação das enzimas. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas por 20 minutos a 34540 g (centrífuga modelo RC-5C Sorvall Instruments, Wilmington, USA). O teor de proteína que se despreendeu das partículas e ficou solúvel no sobrenadante foi quantificado pelo método de Kjeldahl. Foi preparado um branco, contendo apenas SGA e pancreatina para o ajuste do nitrogênio proveniente das enzimas.

Foi também quantificado o total de proteína adsorvida nas partículas antes de serem submetidas às condições gastrointestinais. A produção das partículas de alginato e pectina por gelificação iônica e o recobrimento proteico com posterior quantificação da proteína solubilizada durante a simulação gastrointestinal foi realizada em três ensaios independentes e para cada produção foram feitas determinações em triplicata.

3.2.2.8 Análise estatística

Foram avaliadas diferenças significativas entre as médias, para os valores obtidos, utilizando ANOVA e teste de Tukey com auxílio do programa SAS, em nível de 5% de significância.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Caracterização dos biopolímeros

Alginato e pectina apresentaram teores de umidade de $12,25 \pm 0,13\%$ e $13,72 \pm 0,17\%$, respectivamente. Como esperado, a gelatina e as proteínas do soro do leite exibiram alto teor proteico (Tabela 3.3.1).

Tabela 3.3.1 – Composição centesimal dos biopolímeros (base seca)

Produtos	Composição centesimal (%)			
	Proteína	Lipídios	Carboidratos*	Cinzas
GEL	$89,79 \pm 0,26$	ND	ND	ND
WPC	$80,53 \pm 0,35$	$7,58 \pm 0,31$	7,96	$3,93 \pm 0,04$

(*) por diferença

ND – Não determinado

3.3.2 Potencial Zeta dos biopolímeros

As proteínas apresentaram cargas positivas abaixo de seus pontos isoeletricos (Figura 3.3.1), tendo o potencial Zeta aumentado com a diminuição do pH, variando de 21,40 mV a -5,19 mV em valores de pH de 3,0 a 9,0 respectivamente, para gelatina; de 21,08 mV a -10,24 mV em valores de pH 3,0 a 8,0 para mistura GEL:WPC e valores de 20,61 mV a -19,70 mV em valores de pH de 3,0 a 7,0, para proteínas do soro do leite. Todas as proteínas apresentaram aumento do potencial Zeta com decréscimo do pH.

O valor dos pontos isoeletricos das proteínas foram encontrados nos pHs 7,8, 5,2 e 4,35 para GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente. O ponto isoeletrico (pI) do WPC medido neste estudo, foi semelhante ao relatado em publicações anteriores (pH ~4,45) (CHEN *et al.*, 2012; KOUPANTISIS, KIOSSEOGLOU, 2009), enquanto que Xu *et al.* (2012), avaliando o potencial Zeta de soluções de gelatina, encontrou o equilíbrio de cargas positivas e negativas em pH 8,0. Em relação ao valor de potencial Zeta e o ponto isoeletrico da mistura GEL:WPC não foi encontrada informação na literatura.

Valores de potencial Zeta para a GEL, encontrado neste trabalho, são semelhantes aos relatados na literatura. Nakagawa e Nagao (2012) avaliando o potencial Zeta de solução de gelatina a 0,2% encontraram valores que variaram de 24,5 a -8 mV quando o pH variou de 1,8 a 7,0. Devido ao aumento do pH a magnitude da carga positiva dos polieletrólitos catiônicos diminui, em parte, porque os grupos carboxilas são carregados negativamente ($-\text{COO}^-$) e alguns dos grupos amina ($-\text{NH}_3^+$) sofrem desprotonação ($-\text{NH}_2$) (KULMYRZAEV, CHANAMAI, McCLEMENTS, 2000).

Ao analisar o potencial Zeta das emulsões de alginato e pectina (Figura 3.3.1) observou-se que ambos apresentaram carga negativa nos valores de pH estudados, tendo suas cargas aumentadas com elevação do pH, variando de $-34,68 \pm 6,31$ mV a $-71,58 \pm 7,8$ mV para a emulsão de alginato e de $-18,84 \pm 3,85$ mV a $-50,90 \pm 5,33$ mV para emulsão de pectina em pHs de 3,0 e 7,0, respectivamente. Além disso, pode-se observar que a emulsão de pectina apresentou-se menos negativa quando comparada com a de alginato. O potencial Zeta negativo do alginato e pectina podem ser atribuídos à presença dos grupos carboxilato. A carga líquida negativa dos polissacarídeos é proveniente dos grupamentos carboxilato ($-\text{COO}^-$) dos ácidos gulurônico e galacturônico distribuídos nas cadeias do alginato e pectina, respectivamente. Esses resultados estão próximos aos relatados na literatura. Um estudo realizado por Peinado *et al.* (2010) avaliando o potencial Zeta de soluções de alginato a 0,2% (m/m) encontrou valores variando de ~ -10 mV e ~ -70 mV para valores de pH 2 e 11, respectivamente. Os autores indicaram que a carga negativa do alginato manteve-se relativamente constante quando o pH foi reduzido de 11 a 4, mas diminuiu significativamente quando o pH foi reduzido para valores menores de 4, o que pode ser atribuído ao fato de que os grupos aniônicos do alginato estarem abaixo do valor de seu pKa, que é em torno de 3,5. Segundo Jones *et al.* (2010) polissacarídeos aniônicos perdem progressivamente sua carga à medida que o pH é reduzido em relação a seu pKa.

Os grupos funcionais carregados negativamente dos polissacarídeos podem interagir com os grupos catiônicos das moléculas de proteínas através da complexação eletrostática e, assim, coacervados podem ser formados quando soluções de proteína e de polissacarídeo aniônico são misturadas. A formação e a estabilidade destes complexos são influenciadas

pelo pH, força iônica, relação estequiométrica proteína: polissacarídeo, densidade de carga, força iônica e condições de produção como temperatura, velocidade, forma e tempo de agitação (GIRARD *et al.*, 2004; SCHMITT *et al.*, 1998; TOLSTOGUZOV, 1997; YE, 2008). Uma atração eletrostática é esperada a valores de pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína e acima do pKa do polissacarídeo (MESTDAGH, AXELOS, 1998). O estudo clássico de coacervação complexa foi desenvolvido anteriormente por Bungenberg de Jong *et al.* (1949).

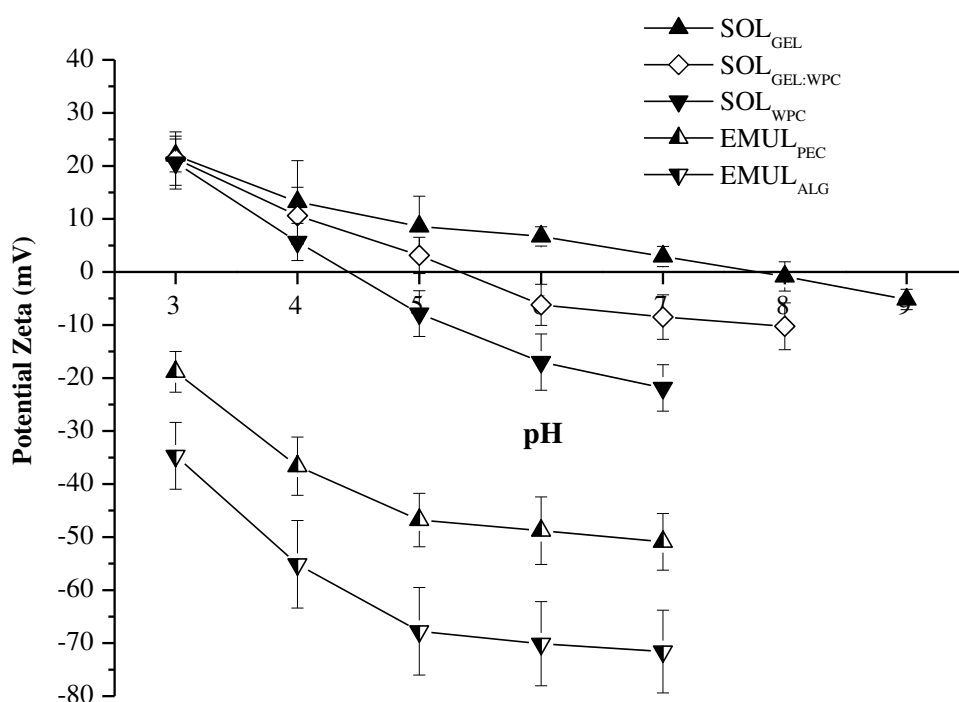


Figura 3.3.1 Potencial Zeta das soluções das proteínas (GEL, GEL:WPC e WPC) e emulsões de alginato e pectina, na concentração de 0,2% (m/m).

Através da avaliação dos potenciais Zeta da gelatina e das proteínas do soro do leite pode-se determinar valores de pH onde a neutralização de cargas pode ser obtida e neste caso, valores de pH próximos e inferiores a 4,35 podem ser adequados à neutralização e à formação de complexos. No presente estudo foram investigados os valores de pH 3,0, 3,5 e

4,0 para os testes subsequentes envolvendo diferentes relações estequiométricas entre os hidrocolóides, para que condições ideais de formação de complexos eletrostáticos entre as soluções de gelatina, mistura GEL:WPC, proteínas do soro do leite e emulsões de alginato e pectina pudessem ser formados.

3.3.3 Complexação eletrostática entre as soluções de GEL, GEL:WPC, WPC e emulsões de alginato e pectina

A formação dos complexos foi verificada pela medida do potencial Zeta das misturas em função da variação da quantidade de proteína mantendo-se fixa a quantidade de polissacarídeo, e também através da observação visual da fase sobrenadante (Figuras 3.3.2 a 3.3.7).

As fotografias produzidas para as soluções de GEL, mistura GEL:WPC e WPC com a emulsão de pectina são apresentadas nas Figuras 3.3.2, 3.3.3 e 3.3.4. Nestas figuras, na parte superior são apresentados os valores de potencial Zeta dos complexos, expressos em milivolts (mV) e na inferior as relações volumétricas (proteína: polissacarídeo).

É possível observar que, independentemente do tipo de polissacarídeo utilizado para complexar com as moléculas de proteína, ocorre produção de soluções turvas com intensidades diferentes quando um dos componentes está em excesso. Pode-se também observar uma relação ótima da mistura proteína: polissacarídeo para cada valor de pH utilizado (3,0, 3,5 e 4,0) com potencial Zeta (mV) próximo de zero e com separação de fases.

Como esperado, observou-se que o potencial Zeta tornou-se menos negativo com aumento da quantidade de proteína na mistura com o polissacarídeo, indicando produção de complexos moleculares. Em um estudo onde a solução de goma acácia foi adicionada à de β -lactoglobulina, a separação de fases apareceu quase imediatamente após a mistura das soluções, em pHs 3,6, 4,2 e 5, e a amplitude das fases dependeu fortemente do valor do pH (SCHMITT *et al.*, 1999).

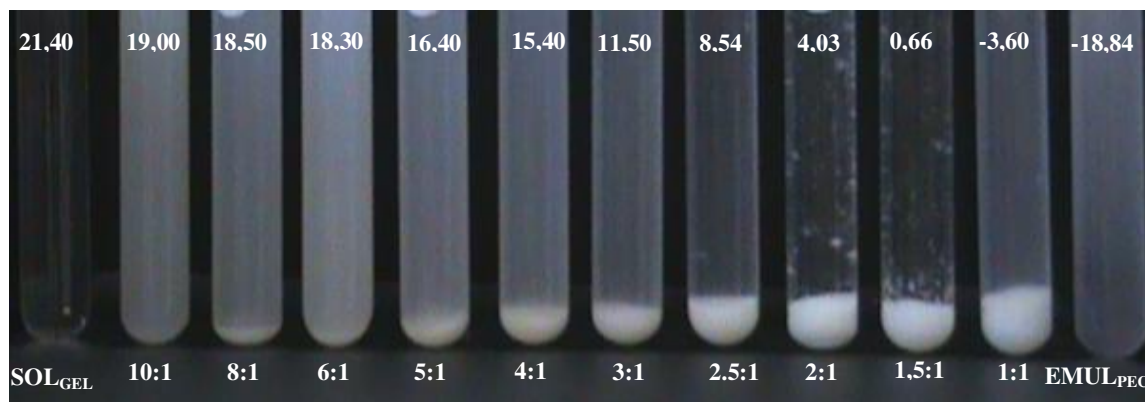
A Tabela 3.3.2 apresenta as relações ótimas proteína:EMUL_{PEC} obtidas na observação visual das Figuras 3.3.2, 3.3.3 e 3.3.4.

Tabela 3.3.2 Relações ótimas entre soluções de proteínas e emulsão da pectina

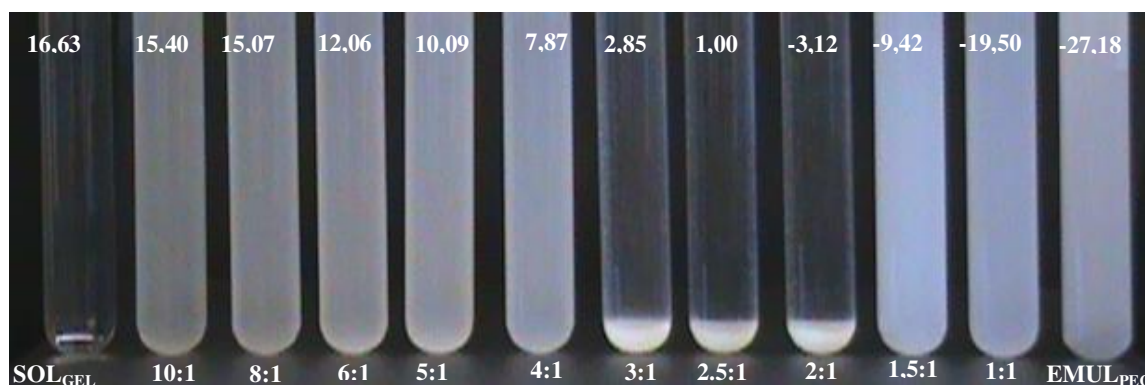
	pH	Relação	Potencial Zeta
SOL _{GEL} :EMUL _{PEC}	3,0	1,5:1	0,66
	3,5	2,5:1	1,00
	4,0	4,5:1	2,81
SOL _{GEL:WPC} :EMUL _{PEC}	3,0	1,5:1	1,33
	3,5	3:1	0,48
	4,0	6:1	0,26
SOL _{WPC} :EMUL _{PEC}	3,0	2:1	3,84
	3,5	4:1	-0,87
	4,0	8:1	0,41

A partir desses resultados, pode-se observar que uma quantidade maior de proteína foi necessária para saturar os grupos carboxilato da pectina, quando o pH foi aumentado de 3,0, 3,5 para 4,0. Esse efeito pode ser atribuído ao fato de que a proteína tem mais cargas positivas em soluções ácidas (WEINBRECK *et al.*, 2004) e, portanto, mais moléculas da pectina poderem se ligar aos grupos catiônicos. Para cada valor de pH existe uma relação específica entre os biopolímeros, em que eletroneutralidade do complexo é encontrada sendo, portanto, possível entre o pKa do polissacarídeo e o pI da proteína, desde que diferentes relações estequiométricas sejam utilizadas em cada valor de pH (BURGESS, CARLESS, 1984; DE KRUIF *et al.*, 2004). Girard, Turgeon, Gauthier (2002) avaliaram o potencial Zeta de misturas entre β -lactoglobulina e pectina na proporção 10:1 observando variações de carga em função do pH, determinando valores de potencial Zeta de 2 mV em pH 3,5 e -8,4 mV para o pH 7,5 para a mesma relação estequiométrica. A mistura proteína: polissacarídeo em diferentes estequiometrias altera o equilíbrio da carga (negativo/positivo) e, conseqüentemente, a extensão da associação entre estes dois poli-íons (FARRIS *et al.*, 2009), o que é consistente com os resultados obtidos no presente trabalho.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

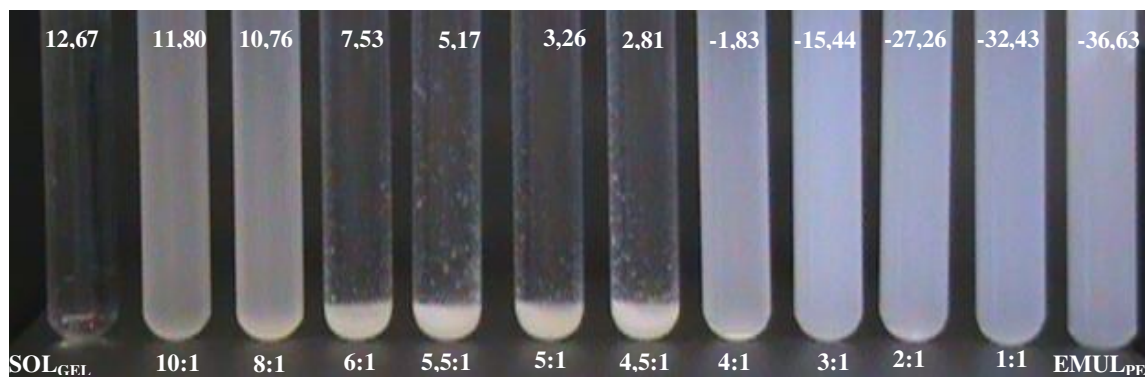
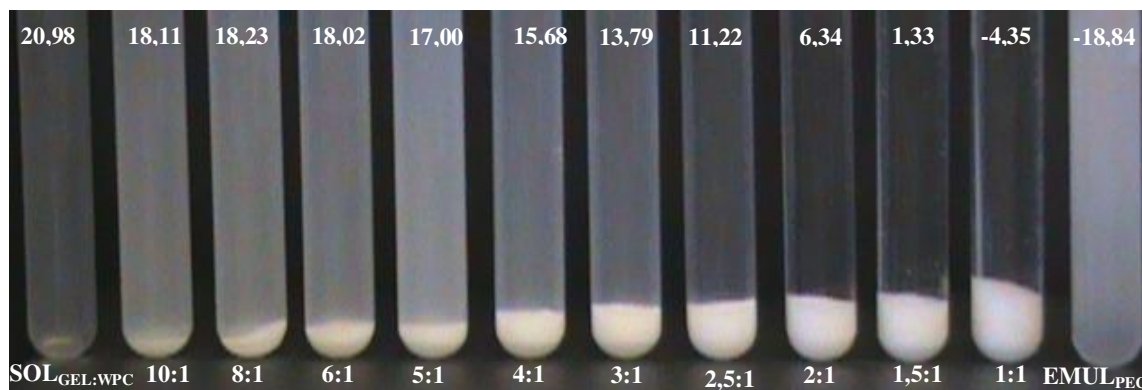
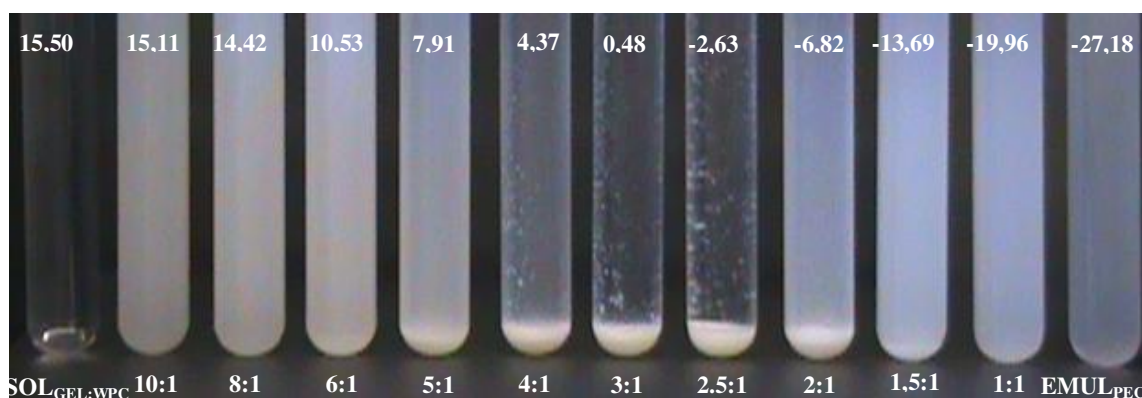


Figura 3.3.2 - Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:EMUL_{PEC} no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

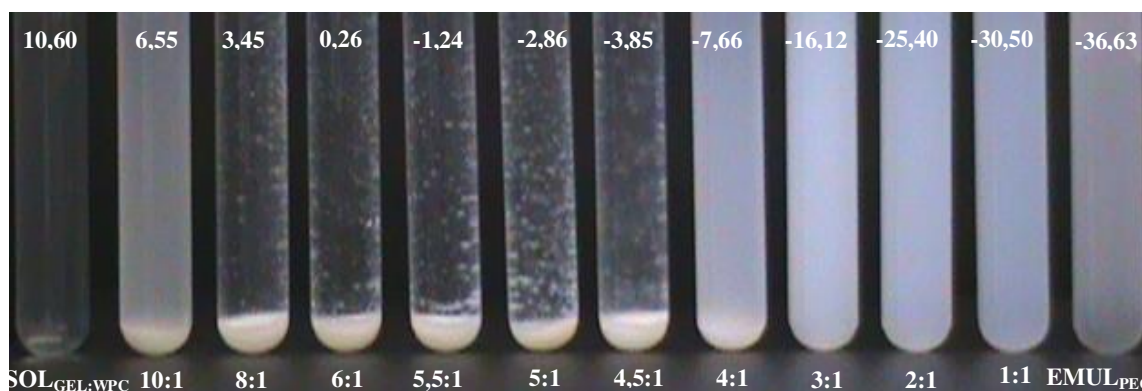
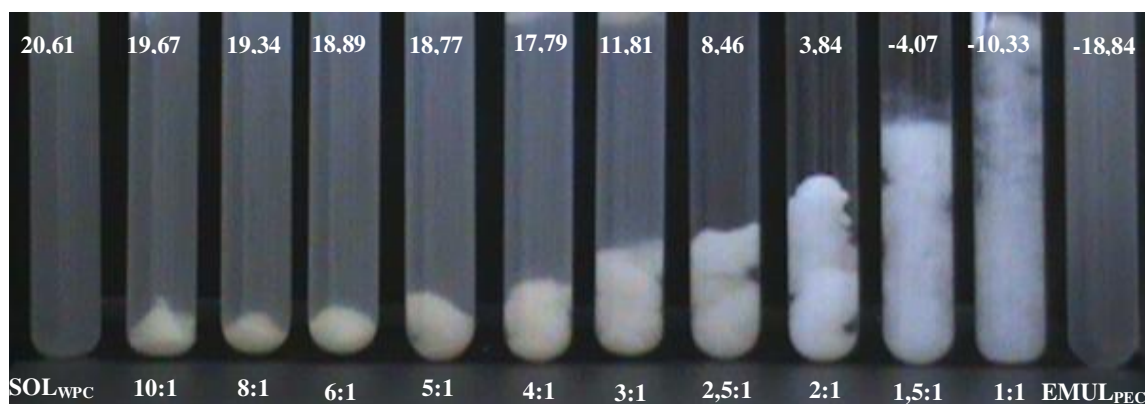
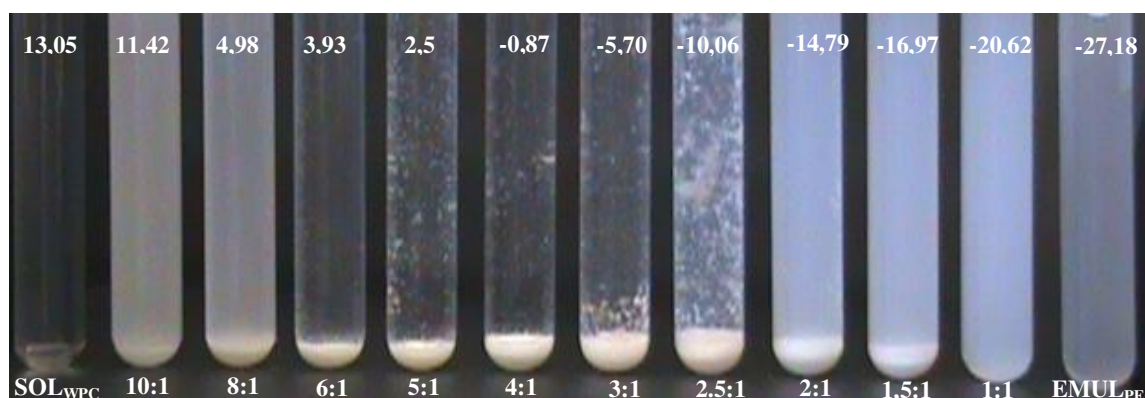


Figura 3.3.3 - Influência da acidez e da proporção SOL_{GEL:WPC}:EMUL_{PEC} no aspecto visual e valores de potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3



B) pH 3,5



C) pH 4,0

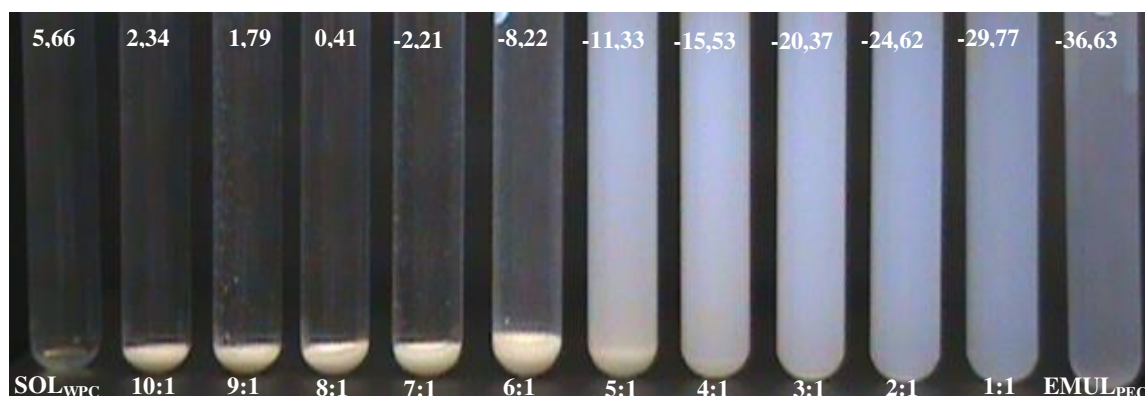
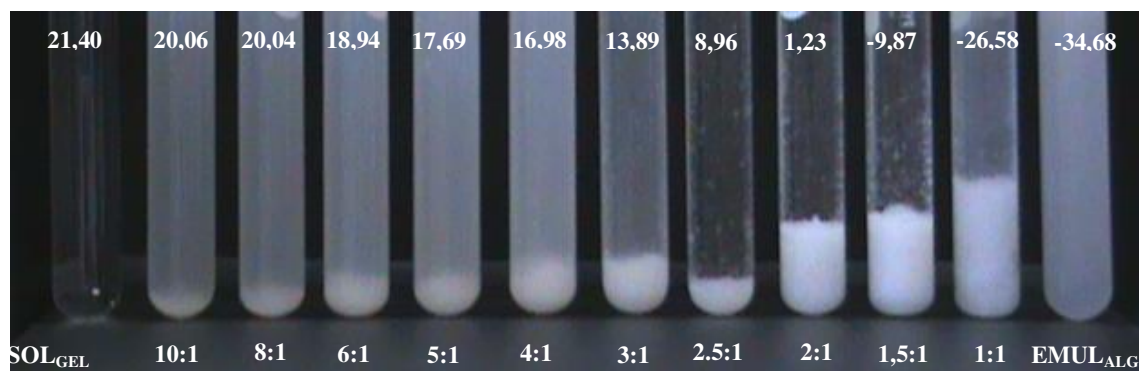


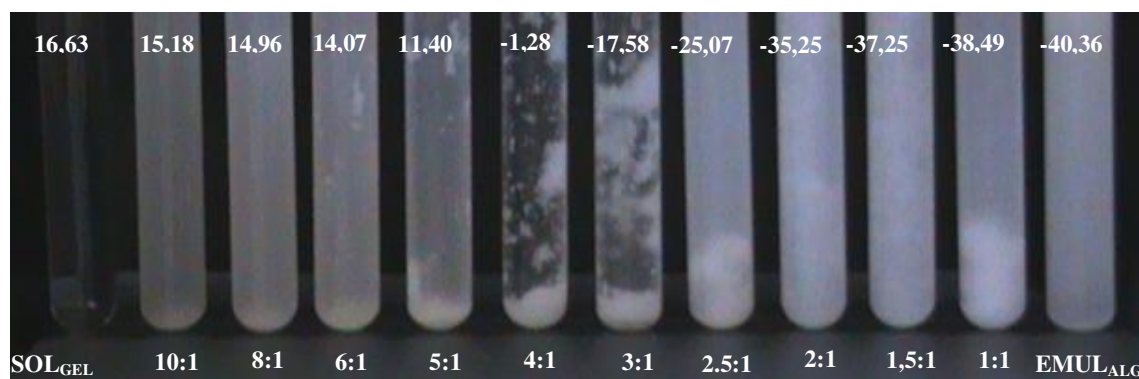
Figura 3.3.4 - Influência da acidez e da relação SOL_{WPC}:EMUL_{PEC} no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

Misturas utilizando emulsões de alginato tiveram comportamento semelhante aos observados quando pectina foi utilizada. Todas as relações proteína:polissacarídeo estudadas apresentaram mudanças elétricas acompanhadas das alterações físicas observadas visualmente à medida que a quantidade de proteína aumentou em relação à de alginato. As fotos dos produzidos entre às soluções de gelatina, mistura GEL:WPC, proteínas do soro do leite e as emulsões de alginato estão apresentadas nas Figuras 3.3.5, 3.3.6 e 3.3.7.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

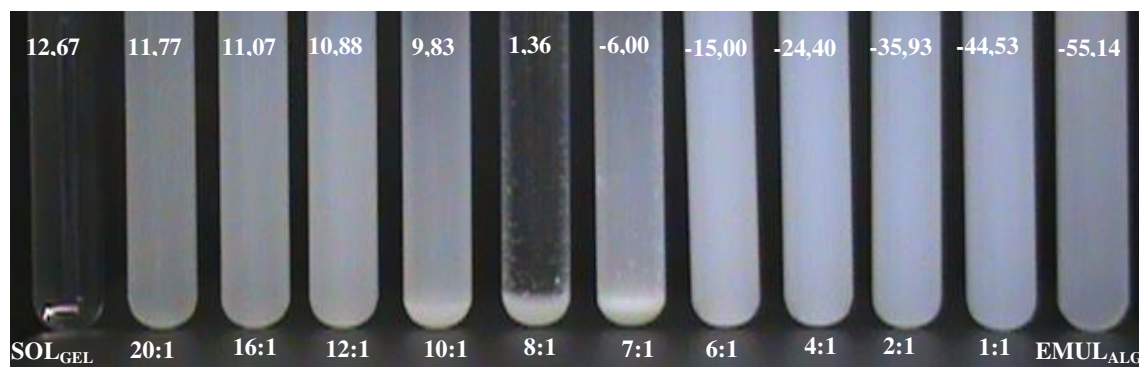
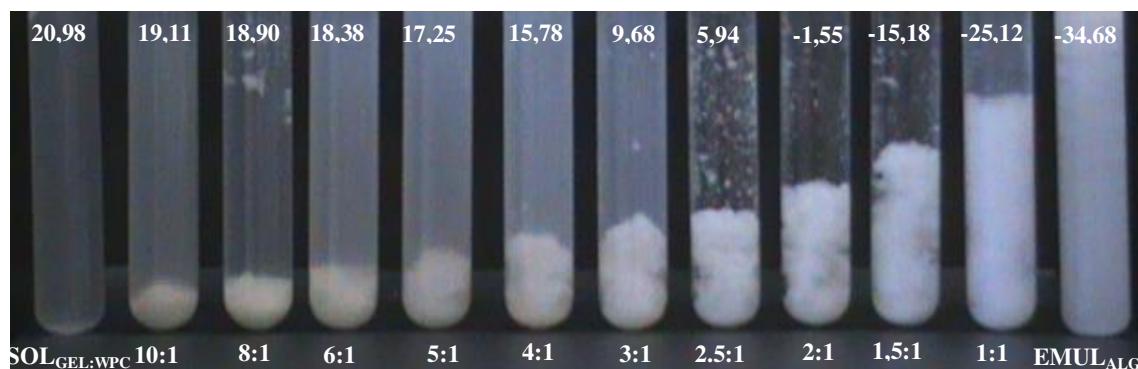
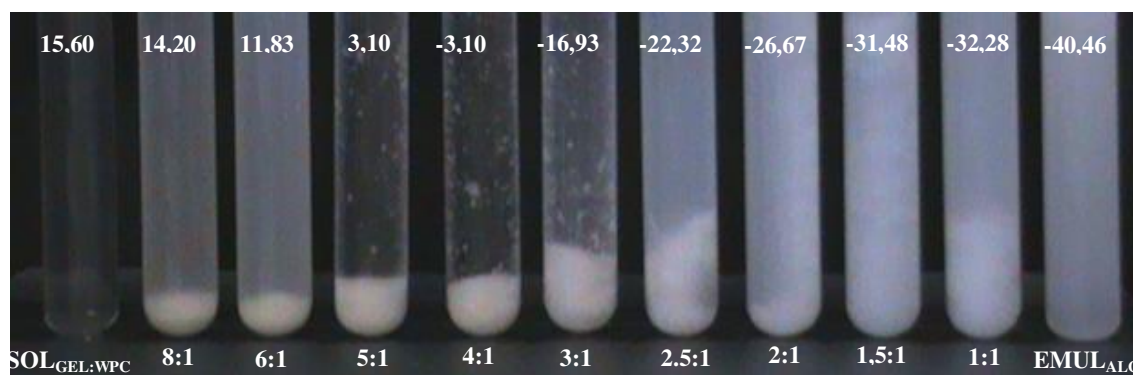


Figura 3.3.5 - Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:EMUL_{ALG} no aspecto visual e valores de potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3



B) pH 3,5



C) pH 4,0

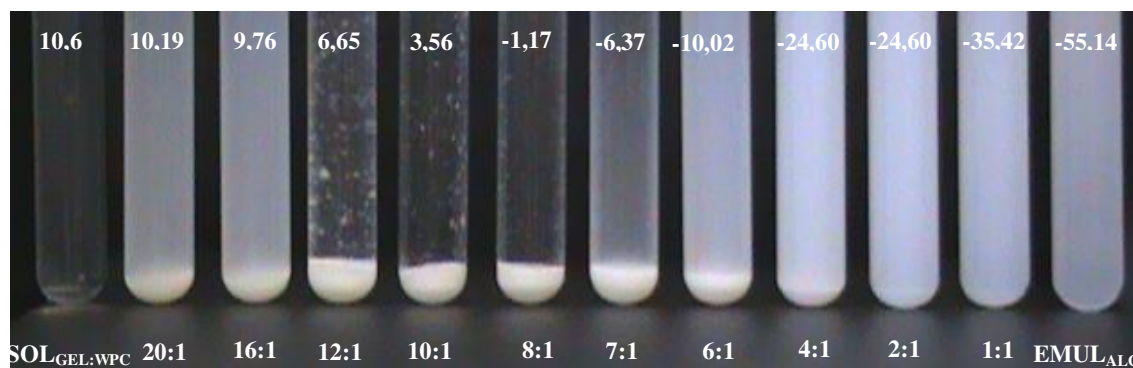
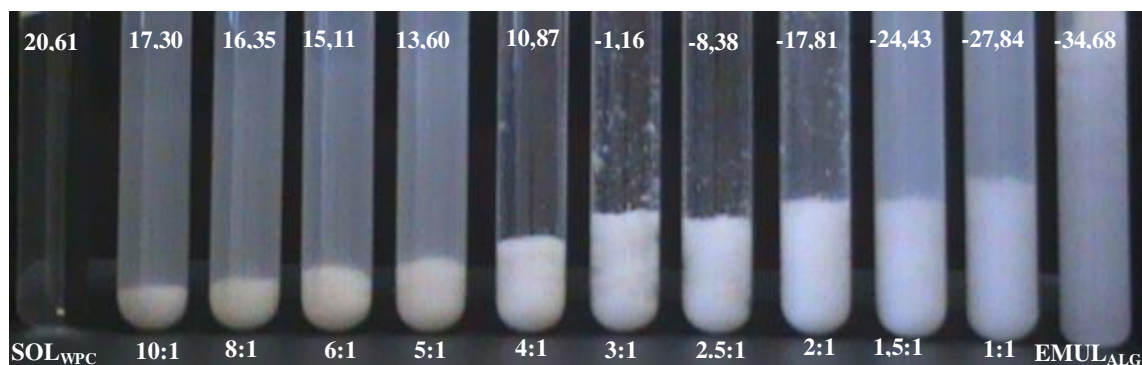
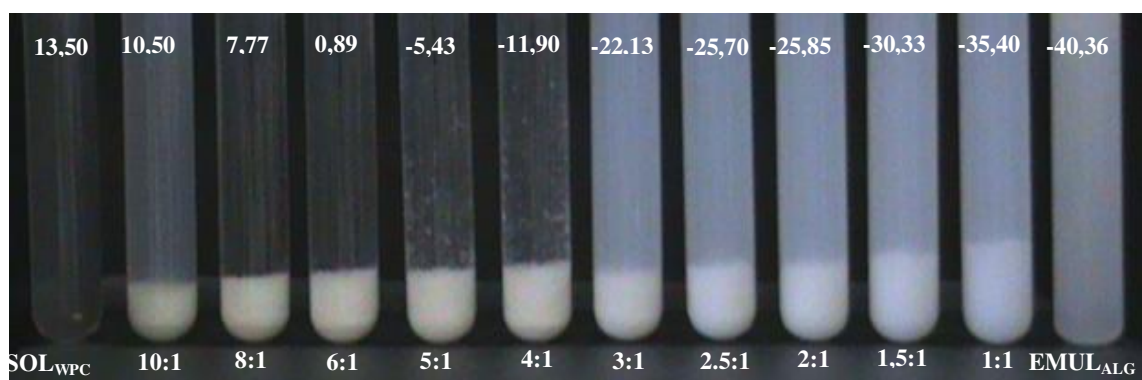


Figura 3.3.6 - Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:WPC:EMUL_{ALG} no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

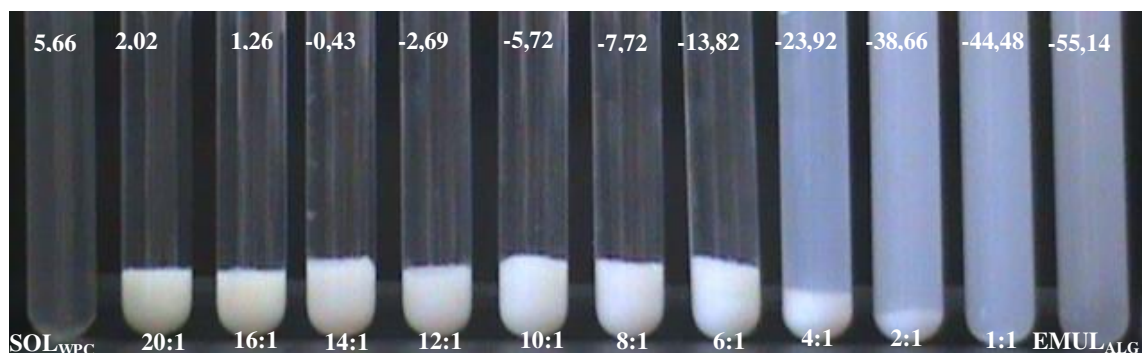


Figura 3.3.7 - Influência da acidez e da relação SOL_{WPC}:EMUL_{ALG} no aspecto visual e potencial Zeta das misturas (valores expressos em mV indicados na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5 e C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

É possível observar que, independentemente do tipo de polissacarídeo utilizado para complexar com as moléculas de proteína, houve formação de soluções turvas com intensidades diferentes quando um deles esteve em excesso. No entanto, pode-se verificar uma relação ótima da mistura proteína:EMUL_{ALG} para cada valor de pH utilizado (3, 3,5 e 4) com potencial Zeta (mV) próximo de zero, com separação de fases conforme apresentado na Tabela 3.3.3.

Tabela 3.3.3 Relações ótimas entre soluções de proteínas e emulsão de alginato

	Ph	Relação	Potencial Zeta
SOL _{GEL} :EMUL _{ALG}	3,0	2:1	1,23
	3,5	4:1	-1,28
	4,0	8:1	1,36
SOL _{GEL} :WPC:EMUL _{ALG}	3,0	2:1	1,55
	3,5	4:1e 5:1	-3,30 e 3,10
	4,0	8:1	-1,17
SOL _{WPC} :EMUL _{ALG}	3,0	3:1	-1,16
	3,5	6:1	0,89
	4,0	14:1	0,43

Em estudo recente foi observada formação máxima de coacervados entre misturas de isolado proteico de ervilha e alginato, à concentração de 0,1% (m/v) em pH 2,5, na proporção de mistura 4:1 (KLEMMER, 2012). Adicionalmente, em outro estudo recente onde soluções de gelatina e de alginato a 0,5% foram misturadas, máxima complexação foi encontrada na relação gelatina:alginato de 3,5:1 a pH 3,75 (DEVI, KAKATI, 2013). Complexos insolúveis entre pectina de beterraba, de alto teor de metoxilação não amidada, e proteínas do soro do leite em pH 4,0 foram obtidas para a relação pectina:WPC 1:3,84 (NEIRYNCK *et al.*, 2007) enquanto que Girard, Turgeon e Gauthier (2002) observaram alta adsorção de β -lactoglobulina (96%) na formação de complexos com pectina de baixo teor de esterificação em pH 4,5 na relação 1:4 de pectina:proteína.

Os resultados das medidas de potencial Zeta das soluções de proteínas e das emulsões dos polissacarídeos realizadas mostra que é possível ocorrer complexação eletrostática entre os biopolímeros estudados nos pHs 3,0, 3,5 e 4,0. Em função dos

resultados apresentados para o estudo envolvendo complexação de soluções de proteínas e polissacarídeos, os mesmos valores de pH (3,0, 3,5 e 4,0) foram utilizados para o estudo da complexação de partículas de polissacarídeos com as mesmas proteínas estudadas.

3.3.4 Complexação eletrostática entre soluções de GEL, GEL:WPC, WPC e partículas de alginato e pectina

Partículas de pectinas e alginato sem recobrimento nos pHs 3,0, 3,5 e 4,0 foram caracterizadas e os resultados apresentados na Tabela 3.3.4. Partículas de pectina apresentaram tamanhos de $285,77 \pm 16,60 \mu\text{m}$, $277,83 \pm 26,50 \mu\text{m}$ e $212,10 \pm 26,50 \mu\text{m}$ em pH 3,0, 3,5 e 4,0. Quando pectina foi utilizada para produção das partículas em pH 3,0 observou-se menor teor de matéria seca, com diferença significativa quando comparado com as partículas produzidas nos pHs 3,5 e 4,0. Partículas de alginato apresentaram tamanhos médios de $137,67 \pm 7,79 \mu\text{m}$, $140,48 \pm 4,71 \mu\text{m}$ e $135,18 \pm 3,76 \mu\text{m}$ em pH 3,0, 3,5 e 4,0, respectivamente, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Pode-se também observar quantidades de matéria seca próximas entre partículas de alginato produzidas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nos diferentes pHs estudados.

O efeito da variação do pH observado para as partículas de pectina, em pH 3,0 com diminuição do teor de matéria seca e aumento de tamanho médio quando o pH foi abaixado para 3,0 e 3,5, podem ser atribuídas a menor densidade de carga da pectina em pHs próximo de seu pKa (pH 2,9) e, conseqüentemente, a sua afinidade pelos íons de cálcio também decresce. Esse efeito pode ser compensado parcialmente pela formação de ligação de hidrogênio entre grupos carboxílicos protonados (CAPEL *et al.*, 2006).

Foi observada alta eficiência de encapsulação (>90%) em todos os sistemas estudados, independentemente do pH utilizado para a obtenção das partículas. Os resultados indicam que gelificação iônica é uma técnica eficiente, especialmente para encapsulação de substâncias hidrofóbicas.

Tabela 3.3.4 Características das partículas de alginato e pectina em diferentes pHs.

	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0
	P _{ALG}		
Matéria seca (%)	5,39 ± 0,69 ^a	5,25 ± 0,45 ^a	5,83±0,09 ^a
Teor de óleo (%)	42,68 ± 0,97 ^a	41,81 ± 0,48 ^a	41,45±0,80 ^a
E. E. (%)	94,42 ± 2,15 ^a	92,50 ± 1,07 ^a	91,70±1,80 ^a
Tamanho (µm)	137,76 ± 7,79 ^a	140,48 ± 4,71 ^a	135,18±3,76 ^a
	P _{PEC}		
Matéria seca (%)	4,25±0,21 ^b	4,76±0,15 ^a	4,98±0,78 ^a
Teor de óleo (%)	42,03±0,73 ^a	42,52±0,84 ^a	43,16±1,10 ^a
E. E. (%)	92,98±1,62 ^a	94,42±2,15 ^a	95,50±2,42 ^a
Tamanho (µm)	285,77±16,6 ^a	277,83±26,5 ^a	212,10±7,1 ^b

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre as amostras ($p < 0,05$), obtida através do teste de Tukey.

No estudo com partículas, a quantidade de carga não pôde ser quantificada pelo dispositivo eletroforético devido à rápida sedimentação das partículas. Em função dessa dificuldade, a observação visual das relações estudadas foi utilizada para avaliar as diferentes relações proteína:partículas para os pHs 3,0, 3,5 e 4,0. Além disso, sistemas contendo gelatina não apresentaram diferenças visuais em relação às soluções e partículas de pectina complexadas com gelatina, produzindo alta aderência nas paredes dos tubos prejudicando a avaliação. As medidas do tamanho das partículas com a proteína adsorvida e a quantidade de material coacervado precipitado foram utilizadas quando necessário, para a avaliação dos sistemas.

Após a gelificação iônica, devido à complexação dos grupos carboxilato do polissacarídeo-íons cálcio, a carga líquida negativa da partícula é muito menor que a do polissacarídeo em solução. Como não foi possível medir o potencial Zeta dos sistemas onde

as partículas foram utilizadas, o pressuposto é que a neutralização de cargas vai requerer uma quantidade de proteína menor para saturar as cargas negativas das partículas que as utilizadas quando misturas de soluções foram estudadas. Desta forma, foram necessárias relações estequiométricas proteína:polissacarídeo menores que as utilizadas para as misturas de soluções (SMERDEL *et al.*, 2008).

Para proteína:P_{PEC} as relações utilizadas foram: 0,5:1, 0,75:1, 1,25:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1 e 6:1, enquanto para proteína:P_{ALG} foram utilizadas as relações: 0,125:1, 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1 e 3:1 todas expressas como relações volumétricas. Estas relações foram posteriormente convertidas para relações mássicas.

Em pH 3,0, quando SOL_{GEL}:P_{PEC} foi avaliada a melhor relação volumétrica observada proteína:partícula foi 0,75:1 (Figura 3.3.8-A), para mistura SOL_{GEL}:WPC:P_{PEC} foi 1,25:1 (Figura 3.3.9-A) e também 1,25:1 no caso do SOL_{WPC}:P_{PEC} (Figura 3.3.10-A). Quando partículas de alginato foram utilizadas as melhores relações volumétricas obtidas foram 0,25:1 (Figura 3.3.11-A) para SOL_{GEL}:P_{ALG}; 0,50:1 (Figura 3.3.12-A) para a mistura SOL_{GEL}:WPC:P_{ALG} e 0,25:1 (Figura 3.3.13-A) para SOL_{WPC}:P_{ALG}.

Quando o pH investigado foi 3,5 no caso de partículas de pectina as relações volumétricas foram 1:1 (Figura 3.3.8-B), 1,5:1 (Figura 3.3.9-B) e 2:1 (Figura 3.3.10-B) para SOL_{GEL}:P_{PEC}, SOL_{GEL}:WPC:P_{PEC} e SOL_{WPC}:P_{PEC}, respectivamente, enquanto para partículas de alginato estas relações foram 0,75:1 (Figura 3.3.11-B), 0,75:1 (Figura 3.3.12-B) e 1:1 (Figura 3.3.13-B) para SOL_{GEL}:P_{ALG}, SOL_{GEL}:WPC:P_{ALG} e SOL_{WPC}:P_{ALG}, respectivamente.

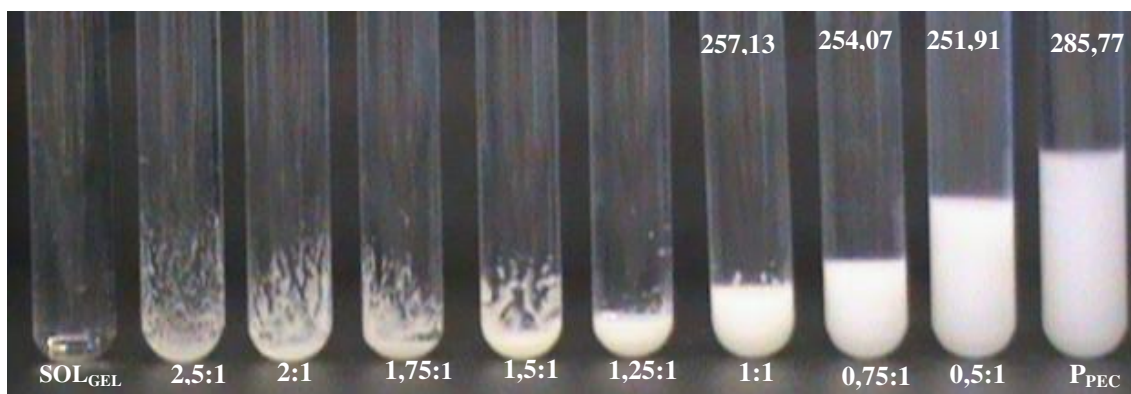
No caso dos sistemas a pH 4,0, para partículas de pectina foram obtidas as relações volumétricas: 1,5:1 (Figura 3.3.8-C), 2,5:1 (Figura 3.3.9-C) e 4:1 (Figura 3.3.10-C), enquanto para partículas de alginato relações de 1,25:1 (Figura 3.3.11-C), 1,25:1 (Figura 3.3.12-C) e 1,5:1 (Figura 3.3.13-C) para GEL, mistura GEL:WPC e WPC respectivamente. Souza *et al.* (2012) observaram precipitação de complexos a partir da relação 1:2,3 para solução de partículas de pectina e de proteínas do soro do leite.

Como esperado, foram necessárias menores quantidades de proteína para complexação quando foram utilizadas partículas em comparação com a complexação com as emulsões.

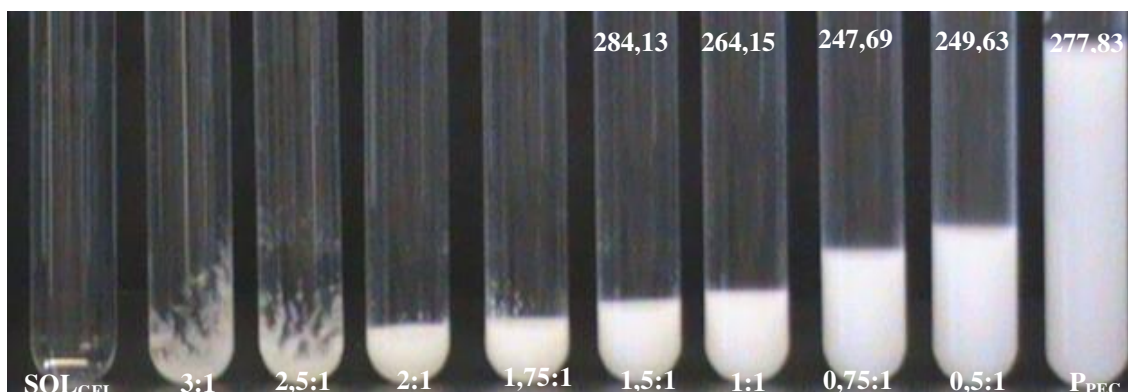
Quando partículas de pectina foram complexadas com gelatina utilizando relações superiores a 1:1, 2:1 e 3:1 para pH 3,0, 3,5 e 4,0, respectivamente, observou-se alto grau de agregação das partículas tornando impossível a determinação do tamanho. A agregação/aderência às paredes dos tubos pode ser devida à elevada densidade de carga linear da gelatina. Outra hipótese é que alta concentração de moléculas tenha gelificado devido ao abaixamento da temperatura de 45 °C para 25 °C (temperatura ambiente). Após a mistura a complexação entre partículas de pectina de gelatina seria favorecida apenas em baixas concentrações e em temperatura superior à de gelificação (>30 °C). Partículas de alginato complexadas com gelatina foram relativamente mais estáveis, não apresentando agregação/aderência, sendo possível a medida dos tamanhos médios. O alginato foi superior à pectina para complexar com gelatina, em termos de menor agregação, com tamanho de partícula menor e de fácil dispersão. Comportamento semelhante foi também observado por Saravanan e Panduranga Rao (2010).

Partículas de pectina complexadas com gelatina sofreram maior aumento de tamanho. Resultado oposto foi observado quando comparado às partículas complexadas com proteínas do soro do leite, enquanto que as partículas complexadas com a mistura GEL:WPC mantiveram tamanho próximo de seu tamanho original da pectina. Partículas de alginato após adsorção aumentaram de tamanho independente do tipo de proteína ou do pH (3,0, 3,5 e 4,0) utilizado para complexação.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

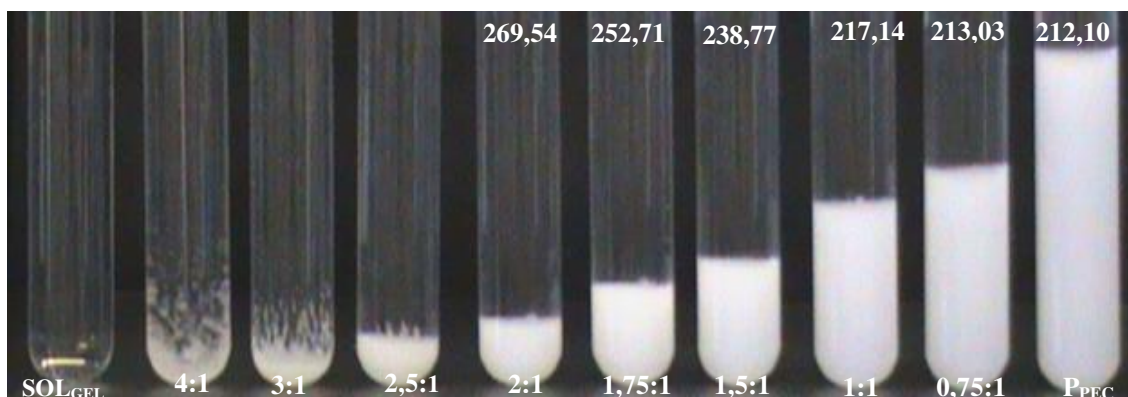
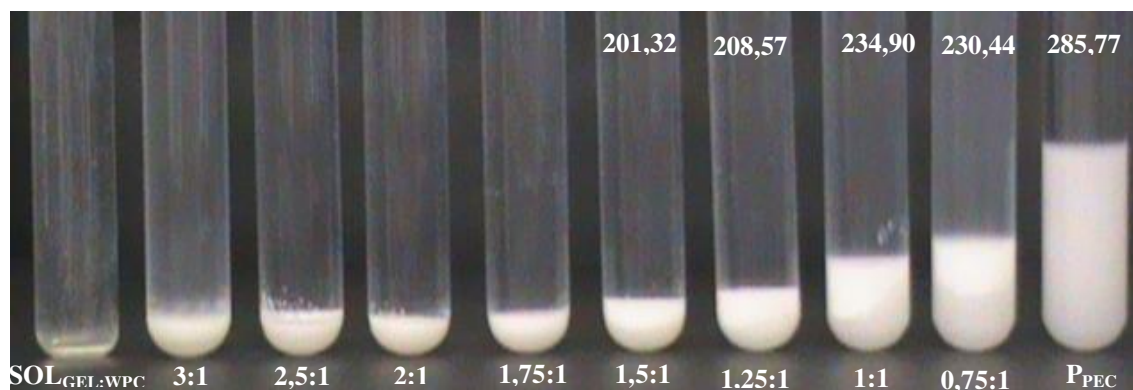
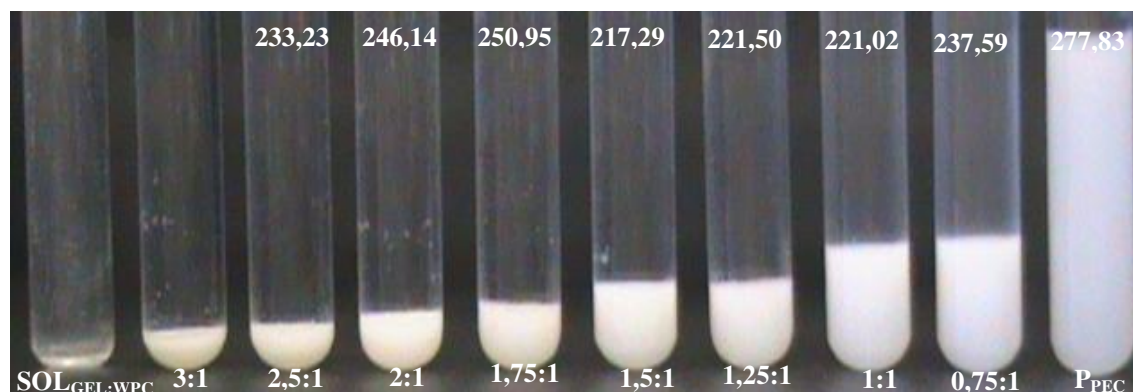


Figura 3.3.8 Influência da acidez da relação SOL_{GEL}:P_{PEC}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm , indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

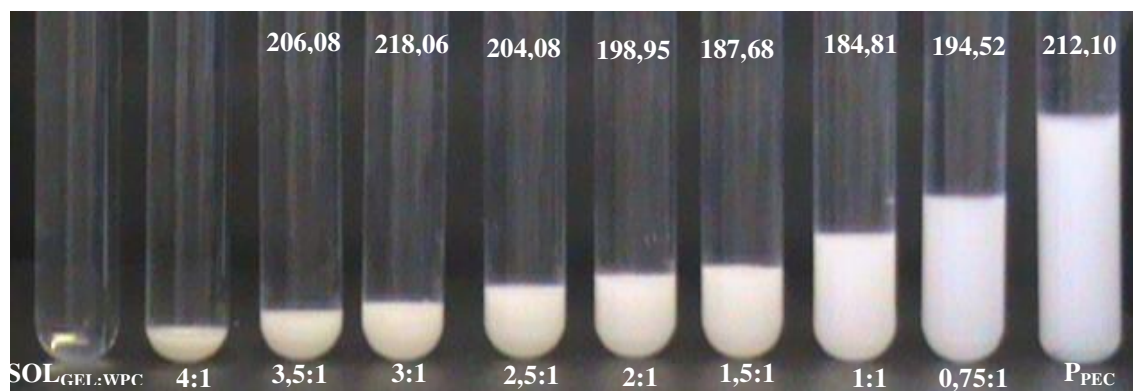
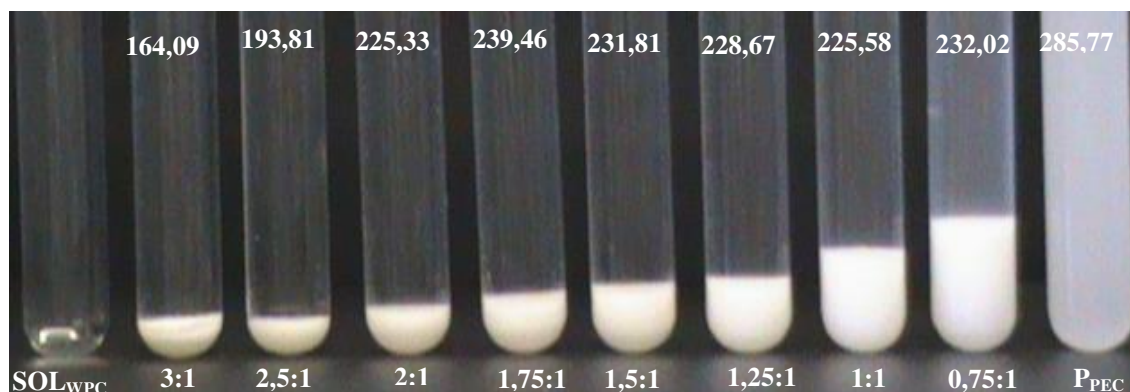
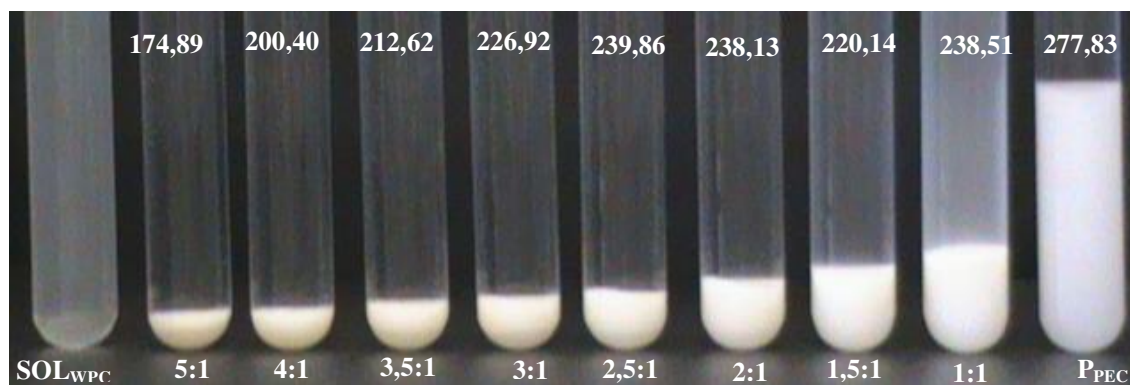


Figura 3.3.9 Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:WPC:P_{PEC}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm , indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

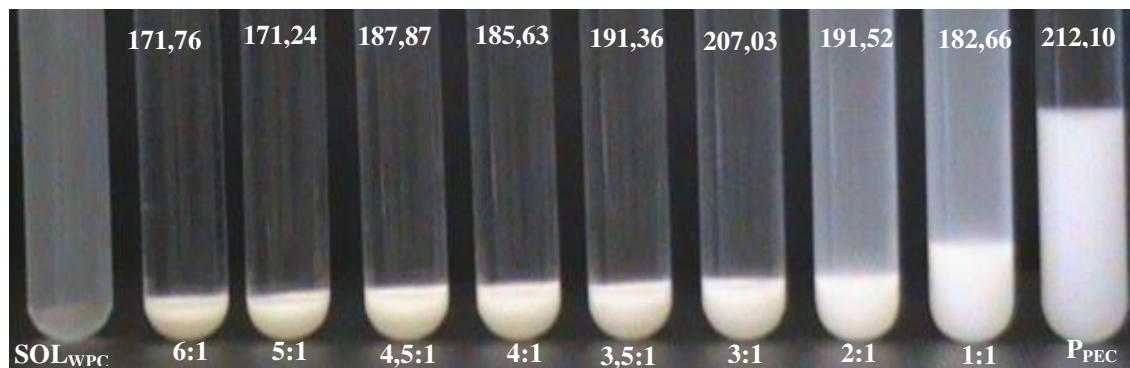
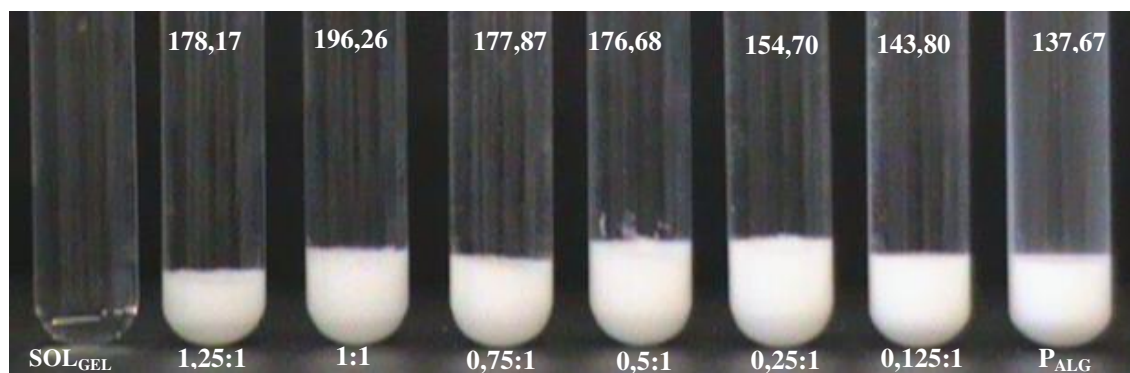
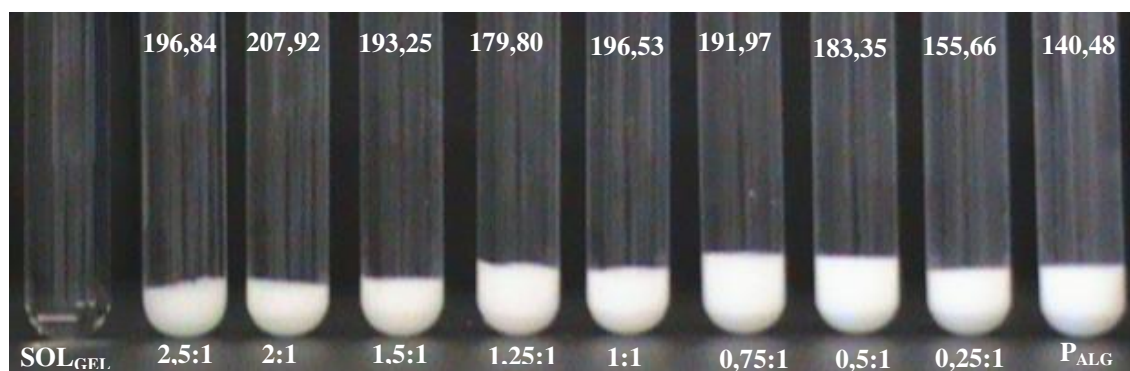


Figura 3.3.10 Influência da acidez e da relação SOL_{WPC}:P_{PEC}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm, indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

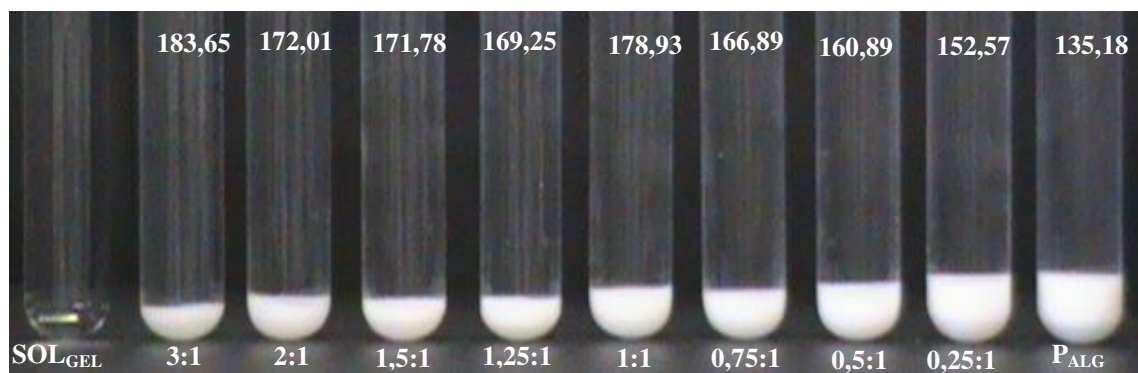
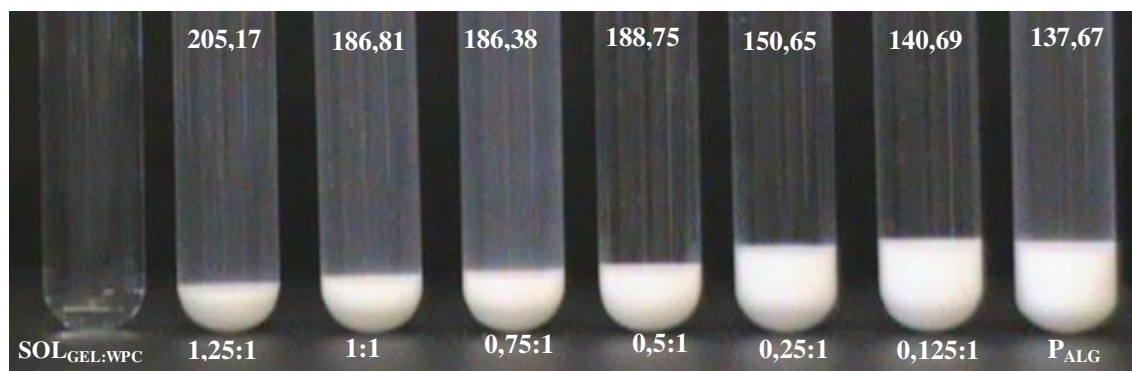
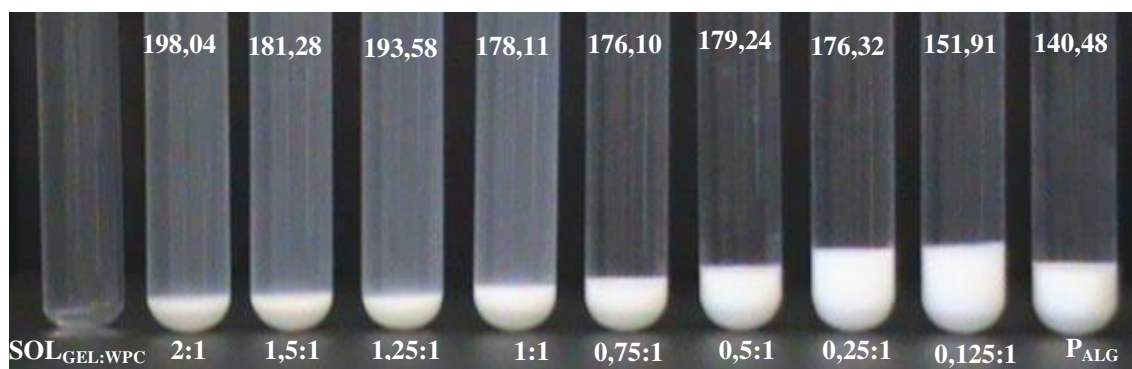


Figura 3.3.11 Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:P_{ALG}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm, indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

A) pH 3,0



B) pH 3,5



C) pH 4,0

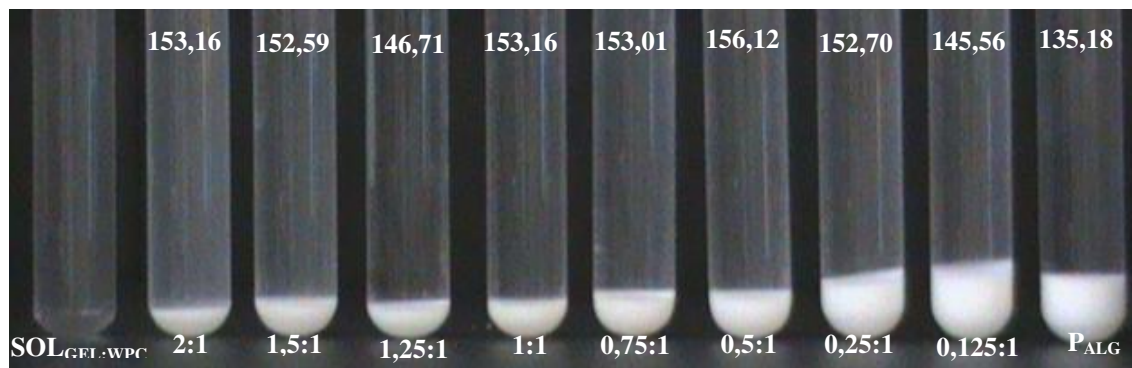
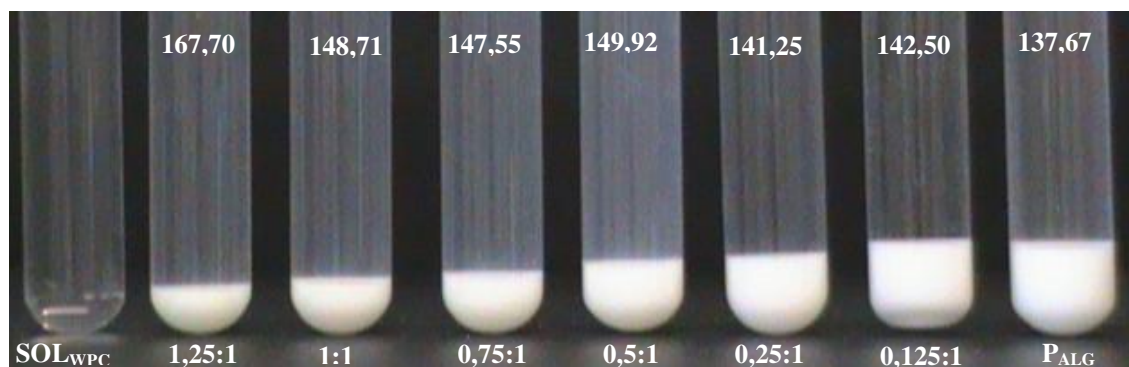
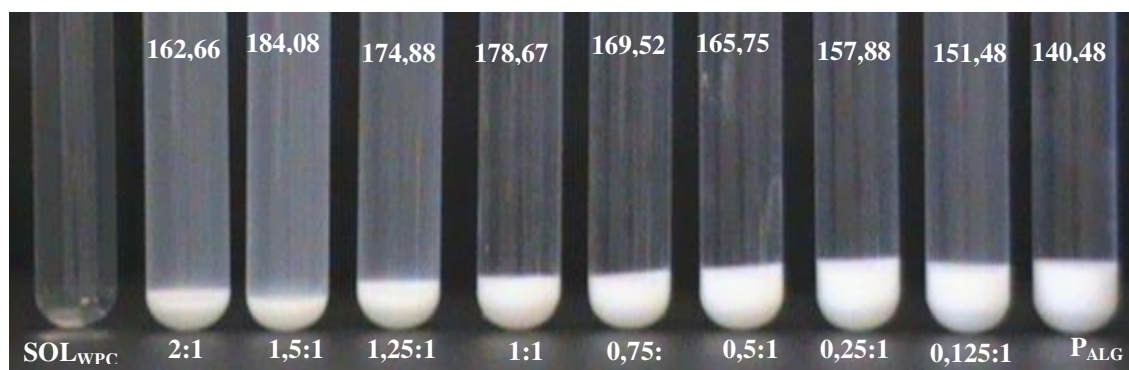


Figura 3.3.12 Influência da acidez e da relação SOL_{GEL}:WPC:P_{ALG}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm, indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

pH 3,0



A) pH 3,5



B) pH 4,0

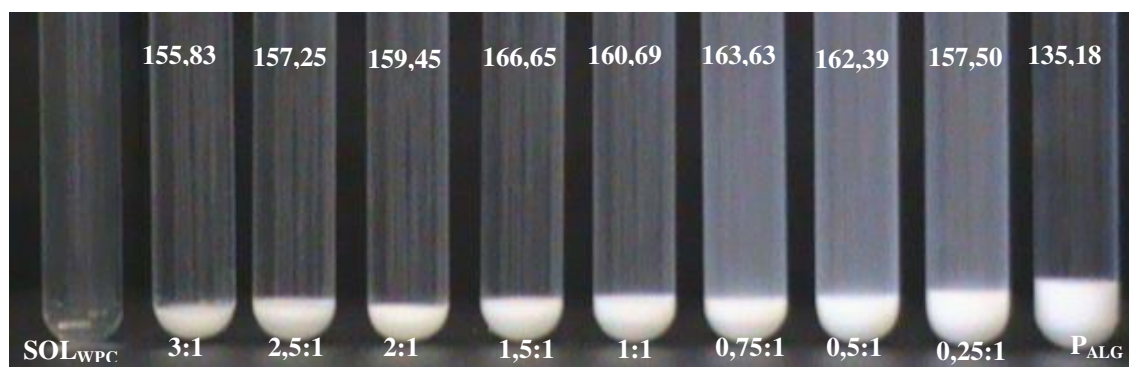


Figura 3.3.13 Influência da acidez e da relação SOL_{WPC}:P_{ALG}, no aspecto visual das misturas e no tamanho das partículas (tamanho em μm, indicado na parte superior dos tubos). A) pH 3,0, B) pH 3,5, C) pH 4,0. Fotos após 12 horas de repouso.

Independentemente do tipo de proteína utilizada, esses resultados indicaram que quantidades menores de proteínas foram necessárias para saturar as partículas de alginato quando comparado com partículas de pectina. Esse resultado é coerente com as informações apresentadas no Capítulo 2 do presente trabalho. No processo de gelificação iônica as partículas de alginato apresentaram maior quantidade de íons cálcio indicando maior intensidade de reticulação com íons carboxilato e, portanto menor densidade de carga negativa para se associar com as proteínas em relação às de pectina.

3.3.5 Adsorção de gelatina e proteínas do soro do leite em partículas de alginato e pectina

Para a continuidade do trabalho envolvendo o estudo da adsorção de proteínas em sistemas mais concentrados, o pH escolhido foi 4,0 considerando que entre os pH nos sistemas diluídos (3,0, 3,5 e 4,0) o pH 4,0 está mais distante do valor dos pKas dos polissacarídeos e portanto, apresenta maior quantidade de cargas (KUROPATWA, TOLKACH, KULOZIK, 2009). Este valor foi também utilizado anteriormente para avaliar as interações entre a pectina de beterraba e β -lactoglobulina (SANTIPANICHWONG *et al.*, 2008).

De acordo com as relações volumétricas escolhidas, suas correspondentes relações mássicas para as partículas de pectina foram proteína: polissacarídeo: 1,06:1, 1,77:1 e 2,82:1, enquanto para partículas de alginato as de proteína:polissacarídeo foram: 0,73:1, 0,73:1 e 0,88:1 para GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente. Para trabalhar nessas relações mássicas selecionadas para as partículas de pectina as concentrações de proteínas em solução foram de 0,75, 1,25, e 2,0% para gelatina, mistura GEL:WPC e proteínas do soro do leite, respectivamente, enquanto para partículas de alginato as concentrações das soluções de proteína correspondentes às relações investigadas foram 0,63, 0,63, e 0,75% para gelatina, mistura GEL:WPC e proteínas do soro do leite. Adicionalmente a fim de obter mais informações sobre a adsorção proteica, foi escolhida uma relação com alto teor de proteína em solução (8%) para todos os sistemas estudados e neste caso a relação proteína: partículas de pectina foi de 11,30:1 (m:m) enquanto para proteína:partículas de alginato foi de 9,36:1 (m:m), respectivamente.

Ao se analisar o teor de proteína adsorvida (Tabela 3.3.5), quando foram utilizadas partículas de pectina, os teores de proteínas foram $36,45 \pm 0,80\%$ (RM 1,06:1), $44,33 \pm 1,93\%$ (RM 1,77:1) e $46,85 \pm 0,97\%$ (RM 2,82:1) recobertas com GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente, enquanto para as partículas de alginato as adsorções foram de $26,28 \pm 1,93\%$ (RM 0,73:1), $23,28 \pm 0,83\%$ (RM 0,73:1) e $17,38 \pm 1,07\%$ (RM 0,88:1) recobertas com GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente.

O aumento da concentração de proteína em solução (8%) resultou no aumento de proteína adsorvida em ambas as partículas, porém superiores quando partículas de pectina foram utilizadas quando comparadas com o teor de proteína adsorvida nas partículas de alginato. Resultados semelhantes foram observados no Capítulo anterior quando partículas de pectina e alginato foram recobertas com OVA e WPC ou sua mistura. Além disso, quando a gelatina foi utilizada observou as maiores quantidades adsorvidas quando comparadas com as adsorções da mistura GEL:WPC e proteínas do soro do leite. Uma possível explicação para a maior adsorção é a natureza aberta da estrutura da gelatina em relação à estrutura globular das outras proteínas estudadas, o que pode facilitar maior interação entre as moléculas disponíveis dos polissacarídeos e a proteína e também a interação proteína-proteína. A ordem de adsorção observada, independente do polissacarídeo, foi GEL>WPC>GEL:WPC indicando que a mistura proteína aberta + globular não foi tão eficientemente adsorvida comparada às proteínas individuais.

Tem sido mostrado na literatura que proteínas flexíveis ligam polissacarídeos mais fortemente que proteínas globulares (GRINDROD, NICKERSON, 1968). A explanação proposta é que moléculas flexíveis são capazes de formar um máximo número de contatos com moléculas de carga oposta, e a concentração local dos grupos que interagem é favorecida.

Tabela 3.3.5 - Teor de GEL, GEL:WPC, WPC adsorvidas em partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica em função da concentração da proteína em solução (%), pH 4,0.

Proteína em solução (%)	Relação (m:m)	Proteína adsorvida (%)		
		P _{ALG-GEL}	P _{ALG-GEL:WPC}	P _{ALG-WPC}
0,63	0,73 : 1	26,28 ± 1,93	23,28 ± 0,83	-----
0,75	0,88 : 1	-----	-----	17,08 ± 1,07
8,00	9,36 : 1	53,68 ± 1,60	46,97 ± 1,23	47,28 ± 0,30
		P _{PEC-GEL}	P _{PEC-GEL:WPC}	P _{PEC-WPC}
0,75	1,06 : 1	36,45 ± 0,80	-----	-----
1,25	1,77 : 1	-----	44,30 ± 1,93	-----
2,00	2,82 : 1	-----	-----	46,85 ± 0,97(*)
8,00	11:30 : 1	62,36 ± 1,66	56,74 ± 1,13	60,08 ± 2,51(*)

(*) Valores mencionados no Capítulo 2

3.3.6 Teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC

Como esperado, o aumento da quantidade proteína adsorvida resultou em aumento no teor de matéria seca nas partículas de alginato e pectina. No caso das partículas de pectina recobertas, os teores de matéria seca variaram entre $11,19 \pm 0,99\%$, $11,59 \pm 1,36\%$ e $9,23 \pm 1,29\%$ quando as concentrações de proteína foram 0,75% para GEL, 1,25% para a mistura GEL:WPC e 2,00% para WPC, respectivamente. Teores de matéria seca $19,02 \pm 1,26\%$, $17,64 \pm 0,61\%$ e $19,46 \pm 0,41\%$ foram quantificados quando foram utilizadas 8% de proteína em solução para GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente.

Os teores de matéria seca, para as partículas de alginato foram de $10,55 \pm 0,55\%$, $9,36 \pm 0,44\%$, e $8,16 \pm 0,45\%$ quando as concentrações de proteína foram 0,63% para GEL, 0,63% para a mistura GEL:WPC e 0,75% para WPC, respectivamente (Tabela 3.3.6). Foram determinados teores de matéria seca de $17,14 \pm 1,23\%$, $15,32 \pm 0,55\%$ e $14,63 \pm 0,23\%$ quando foi utilizada 8% de concentração de GEL, mistura GEL:WPC e WPC.

Tabela 3.3.6 Teor de matéria seca em partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica, recobertas com GEL, GEL:WPC, WPC em função da proteína em solução (%), pH 4,0.

Proteína em solução (%)	Relação (m:m)	Matéria seca (%)		
		P _{ALG-GEL}	P _{ALG-GEL:WPC}	P _{ALG-WPC}
0,63	0,73 : 1	10,55 ± 0,55	9,36 ± 0,44	-----
0,75	0,88 : 1	-----	-----	8,16 ± 0,45
8,00	9,36 : 1	17,41 ± 1,23	15,32 ± 0,55	14,63 ± 0,23
		P _{PEC-GEL}	P _{PEC-GEL:WPC}	P _{PEC-WPC}
0,75	1,06 : 1	11,19 ± 0,99	-----	-----
1,25	1,77 : 1	-----	11,59 ± 1,36	-----
2,00	2,82 : 1	-----		9,23 ± 1,29 (*)
8,00	11:30 : 1	19,02 ± 1,26	17,64 ± 0,61	19,46 ± 0,41 (*)

(*) Valores mencionados no Capítulo 2

3.3.7 Tamanho médio e morfologia das partículas de alginato e pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC

Os tamanhos médios das partículas de alginato e pectina úmidas recobertas com solução de proteínas estão apresentados na Tabela 3.3.7. Pode-se verificar que partículas de pectina recobertas com GEL apresentaram aumento de tamanho para $252,8 \pm 6,7 \mu\text{m}$ e $282,5 \pm 22,3 \mu\text{m}$ nas concentrações de 0,75 e 8,0%, respectivamente. Comportamento diferente foi observado quando as partículas foram recobertas com WPC, apresentando diminuição de tamanho para $200,9 \mu\text{m} \pm 10,7$ e $164,5 \pm 8,8 \mu\text{m}$ nas concentrações de 2,0 e 8,0% respectivamente. No entanto, quando foram recobertas com a mistura GEL:WPC mantiveram tamanhos próximos ao tamanho médio original obtido para partículas de gelificação iônica.

As partículas de alginato, independente da concentração da proteína em solução e do tipo de proteína, aumentaram de tamanho. Quando 8% de proteína foram utilizadas os tamanhos foram de $159,9 \pm 6,1 \mu\text{m}$; $152,7 \pm 3,9 \mu\text{m}$ e $163,4 \pm 2,9 \mu\text{m}$ para as partículas recobertas com GEL, mistura GEL:WPC e WPC, respectivamente.

Tabela 3.3.7 - Tamanho médio (μm) das partículas de alginato e pectina, produzidas por gelificação iônica, recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC

Proteína em solução (%)	P _{ALG}	P _{ALG-GEL}	P _{ALG}	P _{ALG-GEL:WPC}	P _{ALG}	P _{ALG-WPC}
0,63	140,4 $\pm$ 3,7	186,1 $\pm$ 2,7	137,3 $\pm$ 2,9	147,2 $\pm$ 3,4	-----	-----
0,75	-----	-----	-----	-----	136,7 $\pm$ 3,4	165,3 $\pm$ 4,9
8,0	140,4 $\pm$ 3,7	159,9 $\pm$ 6,1	137,3 $\pm$ 2,9	152,7 $\pm$ 3,9	136,7 $\pm$ 3,4	163,4 $\pm$ 2,9
	P _{PEC}	P _{PEC-GEL}	P _{PEC}	P _{PEC-GEL:WPC}	P _{PEC}	P _{PEC-WPC}
0,75	217,6 $\pm$ 16,4	252,8 $\pm$ 6,7	-----	-----	-----	-----
1,25	-----	-----	221,4 $\pm$ 12,1	232,6 $\pm$ 11,2	-----	-----
2,00	-----	-----	-----	-----	230,1 $\pm$ 22,4	200,9 $\pm$ 10,7(*)
8,00	217,6 $\pm$ 16,4	282,5 $\pm$ 22,3	221,4 $\pm$ 12,1	223,4 $\pm$ 15,3	209,4 $\pm$ 16,2	164,5 $\pm$ 8,8(*)

(*) Valores mencionados no Capítulo 2

As partículas de alginato recobertas com as proteínas apresentam superfície definida e continua, aproximadamente esféricas com as gotas de óleo distribuídas por toda a extensão do gel (Figuras 3.3.14 e 3.3.15 – A, C e E). Pode-se verificar também que o recobrimento das partículas com a camada(s) proteica(s) não alterou a morfologia e nem afetou a distribuição do material de recheio na partícula. Porém, a superfície das partículas tornou-se rugosa, evidência que a rugosidade na superfície está associada à cobertura protéica.

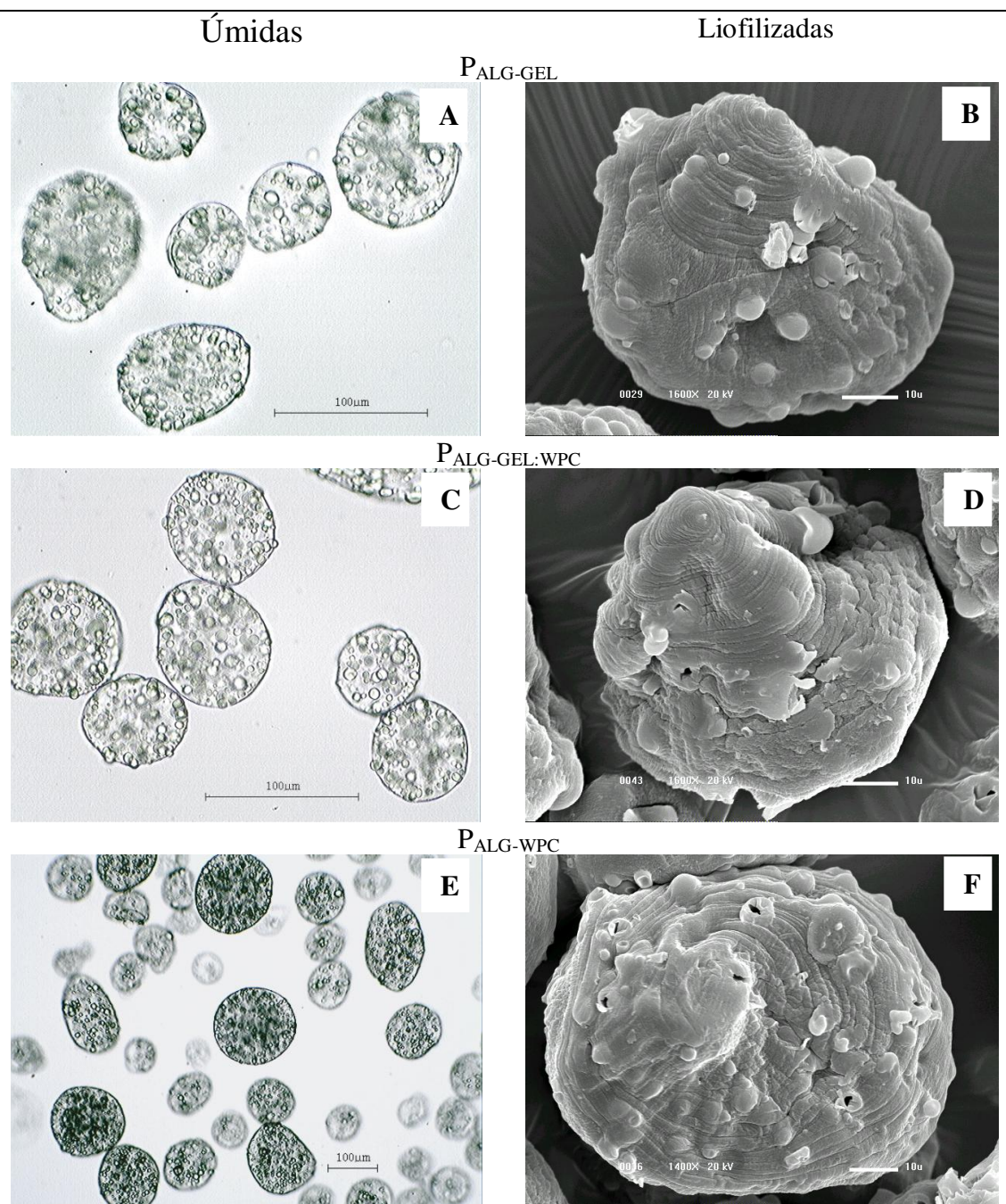


Figura 3.3.14 – Fotos obtidas por MO (A, C e E) e MEV (B, D e F) de partículas de alginato recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μ m e MEV = 10 μ m.

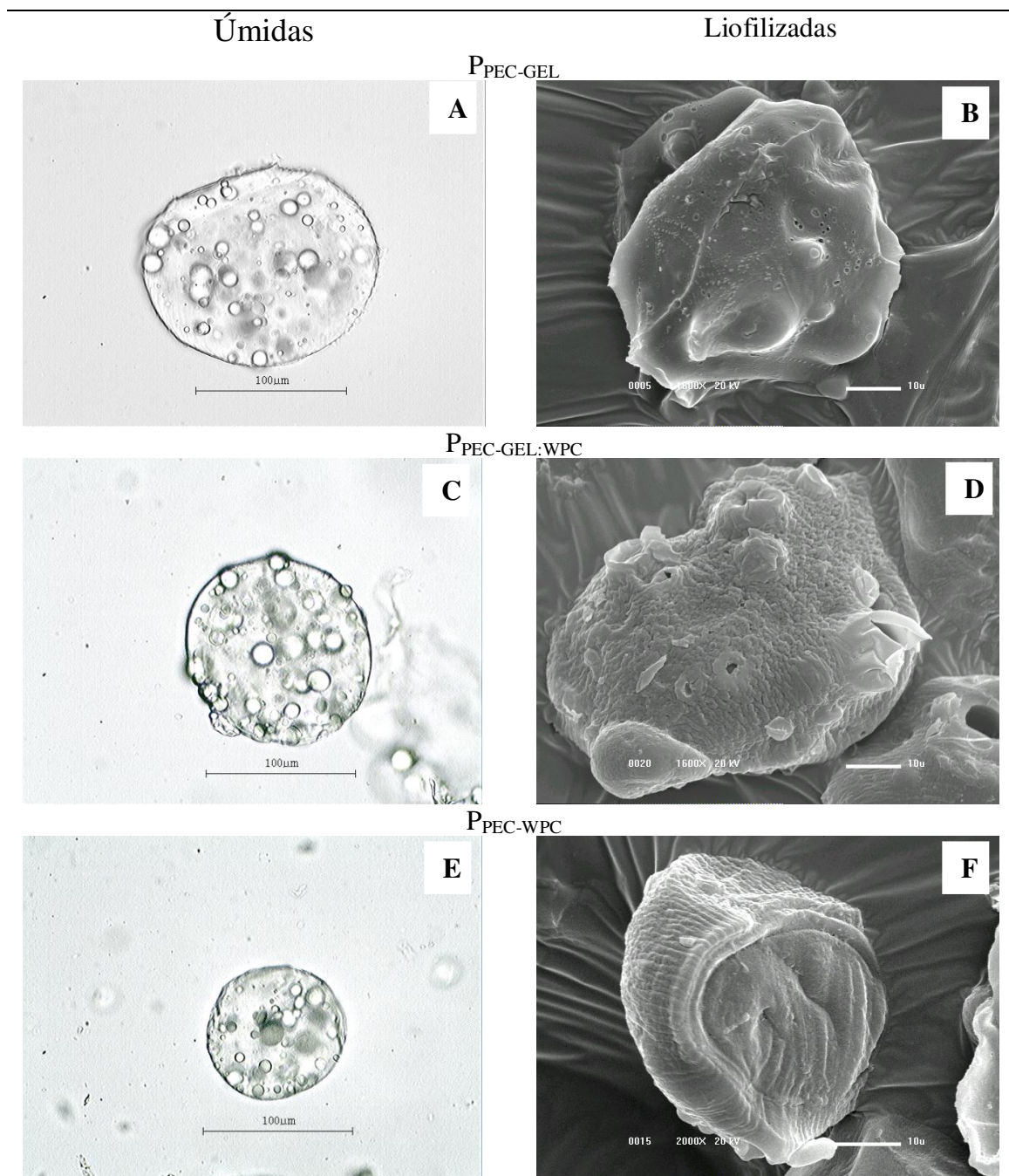


Figura 3.3.15 - Fotos obtidas por MO (A, C e E) e MEV (B, D e F) de partículas de pectina recobertas com GEL, GEL:WPC e WPC na concentração de 8% de proteína em solução, pH 4,0. Barras MO = 100 μ m e MEV = 10 μ m.

3.3.8 Partículas de alginato e pectina com ou sem revestimento proteico, submetidas às condições gastrointestinais

Partículas úmidas de alginato e pectina com e sem recobrimento proteico foram avaliadas quanto à sua resistência física e quando submetidas sequencialmente a condições gastrointestinais simuladas. A resistência das partículas úmidas foi avaliada qualitativamente utilizando microscopia ótica para captar fotos das partículas após os tratamentos. A Figura 3.3.16 apresenta as micrografias óticas das partículas sem cobertura submetidas à ação enzimática, temperatura e pH característico do estômago (2h) e posterior troca para condições intestinais (5h). Partículas de pectina foram bastante danificadas após duas horas de incubação. Além disso, em condições intestinais foram destruídas, tornando-se difícil identificar o seu limite de resistência física, resultando na possível liberação total do óleo encapsulado. Por outro lado, partículas de alginato sem cobertura mantiveram-se sem sinais de desintegração aparente durante as primeiras duas horas sob condições gástricas e também com aparente integridade após serem submetidas às condições intestinais.

Com relação às partículas de pectina, resultados diferentes foram apresentados na literatura, em recente estudo, partículas de pectina foram produzidas por gelificação iônica utilizando pectina de baixa metoxilação e pectina de alto teor de metoxilação modificada, onde as partículas foram avaliadas em função da liberação de indometacina em condições gástricas e intestinais simuladas (JUNG, ARNOLD, WICKER, 2013). Os autores observaram liberação de menos de 20% de indometacina após serem inseridas sequencialmente em ambiente gástrico e intestinal. Em outro estudo, micropartículas de pectina utilizando cloreto de cálcio como agente de reticulação, foram incubadas sequencialmente em condições gástricas seguido do fluido simulado do cólon contendo pectinase (CHAURASIA *et al.*, 2008). Os autores observaram baixa liberação do fármaco (8%) em ambiente gástrico mostrando que a matriz é um transportador eficaz para atingir liberação no cólon. Esses resultados diferentes dos encontrados neste estudo podem ser

devidos às diferentes condições de estudo, diferentes valores de pH, a presença ou ausência de diferentes enzimas e de diferentes fontes da pectina.

A manutenção da integridade das partículas de alginato pode estar relacionada ao maior teor de íons Ca^{2+} observado anteriormente (Capítulo 2) que produziu maior número de ligações cruzadas dentro da matriz polimérica aumentando a resistência frente às condições gastrointestinais (BRACCIANI, PÉREZ, 2001).

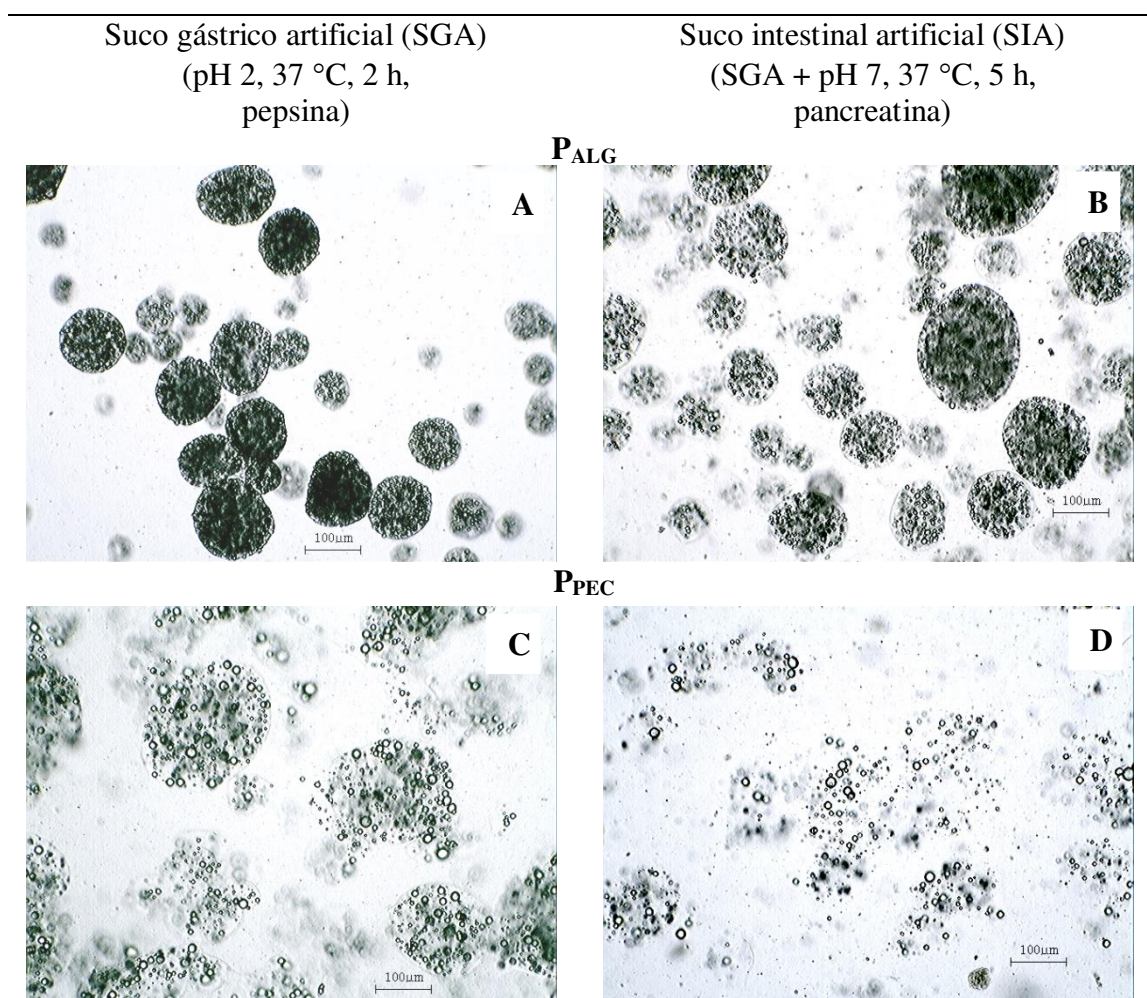


Figura 3.3.16 Fotos obtidas por MO das partículas de alginato e pectina submetidas a simulação sequencial ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A e C: Imediatamente após a exposição ao SGA; B e D: Imediatamente após a exposição ao SIA. Barras MO = 100 μm .

Estes resultados sugerem que as partículas de alginato, estudado nas diferentes condições simuladas irão atingir o intestino grosso, para a digestão pela microflora do cólon que pode então desestabilizar a partícula e possibilitar a liberação total do ativo encapsulado.

3.3.9 Solubilidade das proteínas adsorvidas em partículas de alginato e pectina, submetidas às condições gastrointestinais

Partículas úmidas de alginato e pectina contendo óleo de girassol foram recobertas com GEL, mistura GEL:WPC (1:1) e WPC, na concentração de 8%. Após a produção, as partículas recobertas foram avaliadas quanto à solubilidade da proteína adsorvida, submetidas sequencialmente a condições gastrointestinais. As quantidades de proteína solubilizada das partículas nas condições gastrointestinais são apresentadas na Tabela 3.3.6.

Para partículas de pectina recobertas com proteínas as solubilidades no ambiente gástrico observadas após 2 horas foram aproximadamente 56, 38 e 37% em relação à quantidade protéica inicialmente presente para GEL, mistura GEL:WPC e WPC respectivamente. Para partículas de alginato revestidas com proteínas, as solubilidades nas mesmas condições gástricas foram ~32, 12 e 11% para GEL, mistura GEL:WPC e WPC, mostrando que as solubilizações protéicas foram significativamente menores quando partículas de alginato foram utilizadas. Ensaios *in vitro* de ativos encapsulados usando pectinato de cálcio, liberaram o ativo marcador mais rapidamente que o mesmo ativo encapsulado em alginato de cálcio ou uma mistura de pectina e alginato de cálcio (VANDAMME *et al.*, 2002).

A baixa solubilidade quando as proteínas do soro do leite foram utilizadas em simulação gástrica pode ser devido à resistência à hidrólise proteolítica da β -lactoglobulina, que representa a maior fração proteica do soro do leite. As partículas recobertas com gelatina, independente do tipo de polissacarídeo, apresentaram alta solubilidade gástrica, quando comparadas às partículas recobertas com a mistura GEL:WPC e WPC nas duas primeiras horas do ensaio. Esse comportamento indica que a gelatina é mais susceptível à hidrólise enzimática e dependente da matriz utilizada como adsorvente. Proteínas altamente

desordenadas, como caseínas ou gelatina, são rapidamente hidrolisadas por pepsina, mas proteínas com conformação globular como β -lactoglobulina apresentam relativa resistência à digestão gástrica (SCHMIDT, VAN MARKWIJK, 1993; REDDY, KELLA, KINSELLA, 1988). Em um estudo recente (ANNAN, BORZA, HANSEN, 2008), partículas de gelatina foram submetidas a condições gastrointestinais e mostraram-se estruturalmente instáveis em ambiente gástrico devido à degradação pela pepsina, sendo completamente desintegradas em 45 minutos. Entretanto, quando as partículas de gelatina foram recobertas com alginato houve melhora na resistência dos probióticos encapsulados, durante a exposição às condições gastroentéricas (ANNAN, BORZA, HANSEN, 2008).

Partículas de proteínas do soro do leite (DOHERTY *et al.*, 2011) foram submetidas a 3 horas de incubação em condições gástricas simuladas (*in vitro*, pH 1,8, 37 °C). As partículas mostraram estabilidade em condições ácidas e resistência à pepsina. Entretanto nas condições intestinais simuladas ocorreu rápida desintegração das partículas e liberação dos microorganismos encapsulados (DOHERTY *et al.*, 2011). Recentemente Gbassi *et al.* (2009) mostraram que o recobrimento com proteínas do soro sobre partículas de alginato foi eficiente para proteger o probiótico encapsulado mesmo quando proteínas do soro estavam na forma nativa. Assim, no pH intestinal, a sensibilidade da matriz de alginato prevaleceu sobre a estabilidade da rede das proteínas do soro sugerindo que o material encapsulado pode ser liberado rapidamente no intestino, independente de seu tamanho. Na presença de pancreatina, todas as partículas investigadas pelos autores citados foram rapidamente degradadas.

Após a passagem pelas condições intestinais simuladas, as solubilidades protéicas foram muito altas independentes do tipo de polissacarídeo utilizado. As partículas produzidas com pectina liberaram praticamente todo o conteúdo proteico adsorvido (>96%) independente do tipo de proteína, enquanto partículas de alginato revestidas com proteína liberaram quantidades superiores a 82% (~99% para GEL, ~82% para a mistura GEL:WPC e ~86 para WPC).

As morfológicas das partículas recobertas são apresentadas na Figura 3.3.17 para as partículas de alginato e na Figura 3.3.18 para as partículas de pectina, reforçando evidências de maior fragilidade das partículas produzidas com pectina. Esses resultados indicam que praticamente toda a proteína adsorvida nas partículas foram solubilizadas na simulação do ambiente intestinal, independente do tipo de matriz polimérica (Tabela 3.3.8).

Tabela 3.3.8 Solubilidade de GEL, GEL:WPC, WPC adsorvidas em partículas de alginato e pectina após serem submetidas as condições gastrointestinais

Tratamentos	SGA	SIA
	(pH 2, pepsina, 2h, 37 °C)	(SGA+ pH 7, pancreatina, 5h, 37 °C)
P _{PEC-GEL}	56,31±2,82 ^a	98,51±1,48 ^a
P _{PEC-GEL:WPC}	38,05±2,30 ^b	96,99±2,53 ^a
P _{PEC-WPC}	37,40±2,14 ^b	99,85±1,59 ^a
P _{ALG-GEL}	32,41±2,09 ^b	99,48±0,23 ^a
P _{ALG-GEL:WPC}	12,08±1,58 ^c	82,59±5,31 ^b
P _{ALG-WPC}	11,55±1,13 ^c	86,02±4,37 ^b

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre as amostras ($p < 0,05$), obtida através do teste de Tukey.

Na Figura 3.3.17 pode-se observar que a perda de proteína aparentemente não refletiu na morfologia das partículas de alginato recobertas com as proteínas estudadas. Além disso, nenhuma alteração significativa na morfologia das partículas foi observada após 2 horas de simulação das condições gástricas, as quais ainda se mostravam íntegras, esféricas e densas. No entanto, quando foram utilizadas partículas de pectina recobertas (Figura 3.3.18) pode-se observar que a perda de proteína afetou a morfologia após a passagem gástrica. As partículas apresentaram alto grau de inchamento, foram menos esféricas, independente do tipo de proteína utilizada como cobertura. As partículas perderam integridade independente do tipo de proteína aderida. Comportamento semelhante foi observado por Gebara *et al.* (2013).

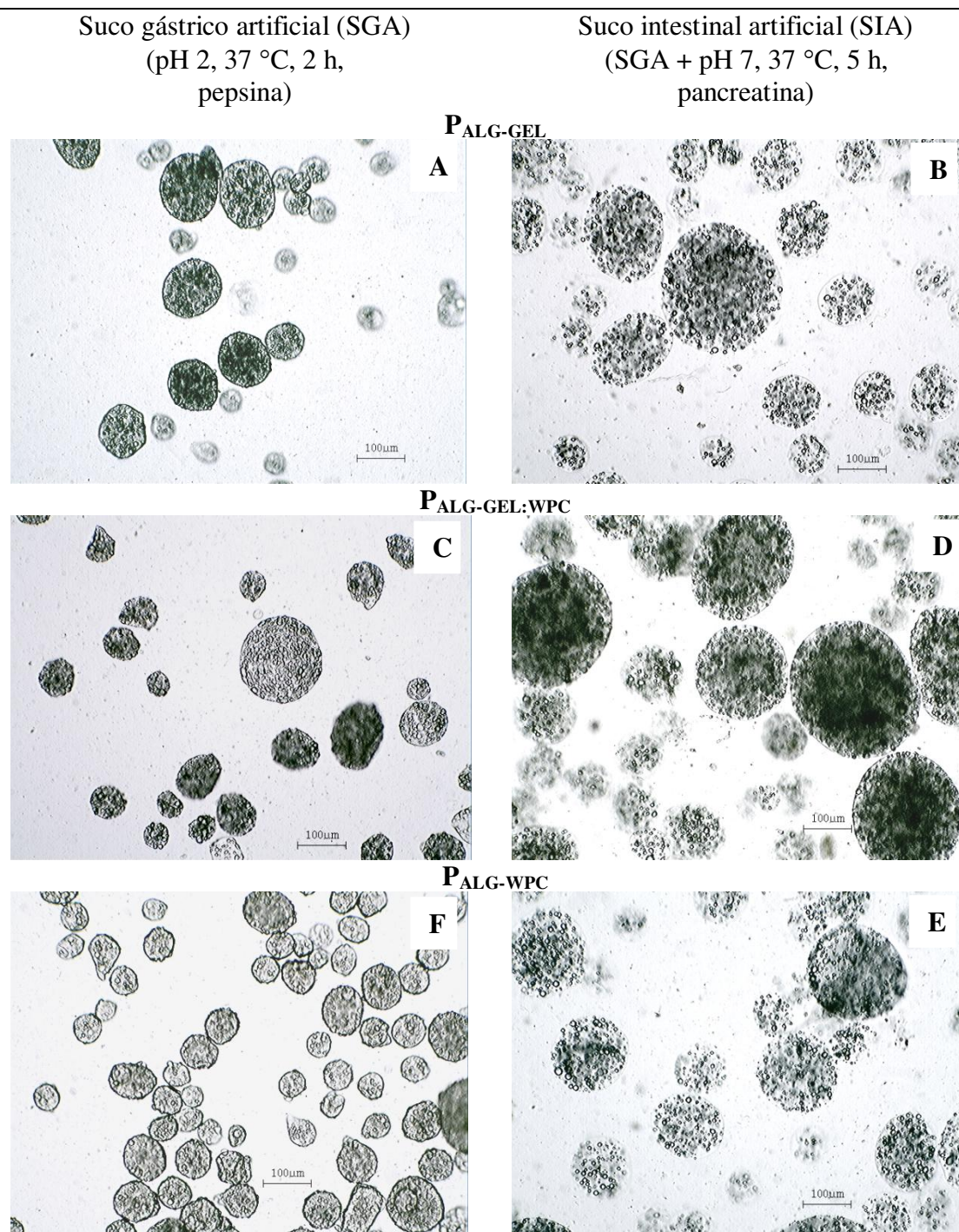


Figura 3.3.17 – Fotos obtidas por MO das partículas de alginato, recobertas com GEL, GEL:WPC, WPC submetidas à simulação sequencial ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A, C e F: Imediatamente após a exposição ao SGA; B, D e E: Imediatamente após a exposição ao SIA. Barra MO = 100 µm.

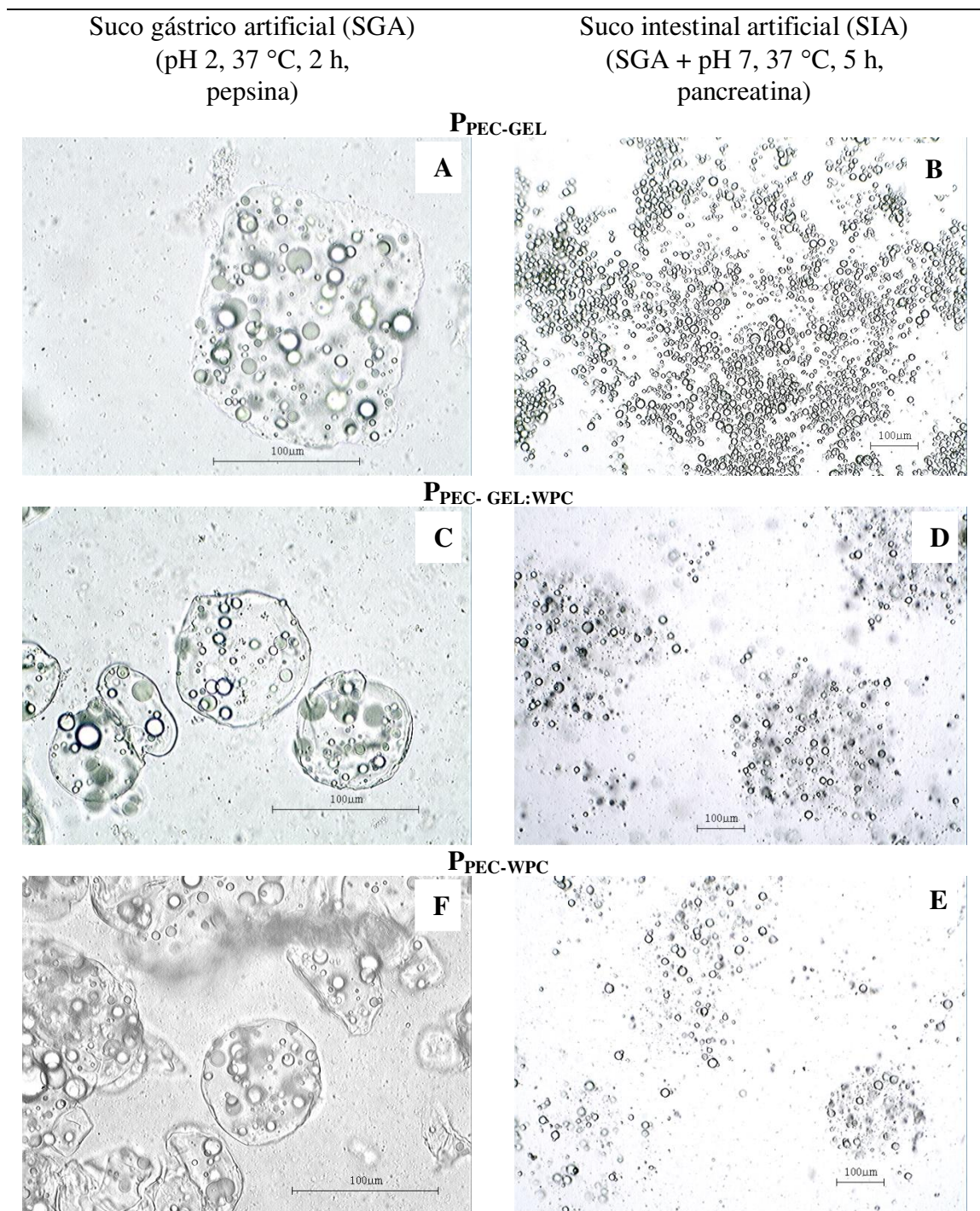


Figura 3.3.18 – Fotos obtidas por MO das partículas de pectina, recobertas com GEL, GEL:WPC, WPC submetidas à simulação sequencial ao suco gástrico artificial (SGA) e suco intestinal artificial (SIA). A, C e F: Imediatamente após a exposição ao SGA; B, D e E: Imediatamente após a exposição ao SIA. Barra MO = 100 µm.

3.3.10 Conclusões

Com base nos resultados da segunda parte do estudo, pôde-se observar complexação eletrostática entre as proteínas e os polissacarídeos em emulsão, em pHs 3,0, 3,5 e 4,0 onde possuem cargas opostas. No entanto, houve necessidade de menor quantidade de proteína para complexar com as partículas quando comparado com as relações observadas quando soluções foram avaliadas. Embora a interação entre os grupos carboxilato dos polissacarídeos e os íons Ca^{2+} possa ter reduzido à carga disponível das partículas, alta adsorção de proteína foi observada em todos os sistemas estudados.

As partículas de alginato sem recobrimento mostraram resistência às condições gástricas. Partículas de pectina recobertas foram sensíveis às condições gástricas, promovendo alta solubilidade da proteína adsorvida: $56,31 \pm 2,82\%$, $38,05 \pm 2,30\%$ e $37,40 \pm 2,14\%$ recobertas com gelatina, mistura GEL:WPC e proteínas do soro do leite, respectivamente. A adsorção de proteínas nas partículas de pectina não melhorou a resistência às condições gastrointestinais simuladas. Além disso, durante a exposição às condições gástrica partículas de pectina recobertas com gelatina apresentam alta solubilidade quando comparadas com as recobertas com a mistura GEL:WPC e o WPC.

Todas as partículas, independente da matriz ou do tipo de proteína, promoveram alta solubilidade de proteína adsorvida, quando submetidas às condições intestinais simuladas.

Partículas de alginato com ou sem cobertura apresentam resistência à passagem gastrointestinal, portanto adequadas ao uso em alimentos ou fármacos, onde o ativo deve ser liberado no cólon, enquanto partículas de pectina de baixo teor de esterificação amidada parecem ser mais adequadas na liberação de ativos no ambiente intestinal.

3.3.11 Referências

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**, v. 41(2), p. 184–193, 2008.

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

BARBUT, S., FOEGEDING, E. A. Ca^{2+} - Induced gelation of pre-heated whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 58(4), p. 867–871, 1993.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemical and Physiology**, v. 37(8), p. 911-917, 1959.

BUNGENBERG DE JONG, H. G. Crystallisation–coacervation–flocculation. In: Colloid science II. H. R. Kruyt (Ed.). Elsevier, Amsterdam, 1949, p. 232-258.

BURGESS, D. J., CARLES, J. E. Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 98(1), p. 1-8, 1984.

CAPEL, F., NICOLAI, T., DURAND, D., BOULENGUER, P., LANGENDORFF, V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxy pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20(6), p. 901-907, 2006.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84(4), p. 1267–1275, 2011.

CHAURASIA, M., CHOURASIA, M. K., JAIN, N. K., JAIN, A., SONI, V., GUPTA, Y., JAIN, S. K. Methotrexate bearing calcium pectinate microspheres: a platform to achieve colon-specific drug release. **Current Drug Delivery**, v. 5(3), p. 215–219, 2008.

CHEN, B., LI, H., DING, Y., SUO, H. Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed reticulação. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47(1), p. 31-38, 2012.

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

DE KRUIF, C. G., WEINBRECK, F., DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9(5), p. 340-349, 2004.

DEVI, N., KAKATI, D. K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**, v. 117(2), p. 193-204, 2013.

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

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

FARRIS, S., SCHAICH, K. M., LIU, L., PIERGIOVANNI, L., YAM, K. L. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20(8), p. 316 - 332, 2009.

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

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

GIRARD, M., SANCHEZ, C., LANEUVILLE, S. I., TURGEON, S. I., GAUTHEIR, S. E. Associative phase separation of β -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35(1), p. 15-22, 2004.

GIRARD, M., TURGEON, S. L., GAUTHEIR, S. F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16(6), p. 585-591, 2002.

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

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15(7-8), 330-347, 2004.

GRINDROD, J., NICKERSON, T. A. Effect of various gums on skimmilk and purified milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 51(6), p. 834-841, 1968.

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

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

JUNG, J., ARNOLD, R. D., WICKER, L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116-121, 2013.

KHEIREDDIN, B., ZHANG, M., AKBULUT, M. Adhesion friction and lubrication of polymeric nanoparticles and their application. In: Polymer adhesion friction and lubrication. H. Zeng (Ed.). John Wiley & Sons Inc., 2013, p. 617-658.

KLEMMER, K. J., WALDNER, L., STONE, A., LOW, N. H., NICKERSON, M. T. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 130, p. 710–715, 2012.

KULMYRZAEV, A., CHANAMAI, R., McCLEMENTS, D. J. Influence of pH and CaCl_2 on the stability of dilute whey protein stabilized emulsions. **Food Research International**, v. 33(1), p. 15-20, 2000.

KOUPANTSIS, T., KIOSSEOGLOU, V. Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. **Food Hydrocolloids**, v. 23(4), p. 1156–1163, 2009.

KUROPATWA, M., TOLKACH, A., KULOZIK, U. Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23(8), p. 2174-2181, 2009.

LAMBERT, J.M., WINBRECK, F., KLEEREBEZEM, M. In vitro analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein-gum Arabic microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56(18), p. 8360–836, 2008.

MARTINSEN, A., SKJÅK-BRAEK, G., SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33(1), p. 79-89, 1989.

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

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(1), p. 56-64, 2009.

NAKAGAWA, K., NAGAO, H. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 411, p. 129-139, 2012.

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

OLIVEIRA, A. C., MORETTI, T. S., BOSCHINI, C., BALIERO, J. C. C., FREITAS, O., FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, p. 685–693, 2007.

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

PEINADO, I., LESMES, U., ANDRÉS, A., McCLEMENTS, J. D. Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides. **Langmuir**, v. 26(12), p. 9827-9834, 2010.

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

RAJAM, R., KARTHIK, P., PARTHASARATHI, S., JOSEPH, G. S., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4(4), p. 891 - 898, 2012.

REDDY, I. M., KELLA, N. K. D., KINSELLA, J. E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 36(4), p. 737-741, 1988.

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(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(3), p. 808 -816, 2010.

SCHMIDT, D. G., VAN-MARKWIJK, B. W. Enzymatic hydrolysis of whey protein. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. **Netherland Milk and Dairy Journal**, v. 47(1), p. 15-22, 1993.

SCHMITT, C., SANCHEZ, C., THOMAS, F., HARDY, J. Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13(6), p. 483–496, 1999.

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

SMRDEL, P., BOGATAJ, M., ZEGA, A., PLANINSEK, O., MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by inotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 5(2), p. 90-105, 2008.

SULTANA, K., GOLWARD, G., REYNOLDS, N., ARUMUGASWAMY, R., PIERIS, P., KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62(1), p. 47–55, 2000.

TANG, Z., HUANG, X., BAXI, S., CHAMBERS, J. R., SABOUR, P. M., WANG, Q. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. **Food Research International**, v. 52(2), p. 460–466, 2013.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17(1), p. 1-23, 2003.

TOLSTOGUZOV, V. B. Protein-polysaccharide interactions. In: Food Proteins and Their Applications. S. Damodaran and A. Paraf (Ed.). Marcel Dekker, New York, 1997, p. 171-199.

VANDAMME, T. F., LENOURRY, A., CHARRUEAU, C., CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48(31), p. 219-231, 2002.

WEINBRECK, F., NIEUWENHUIJSE, H., ROBIJN, G. W., DE KRUIF, C. G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(11), p. 3550-3555, 2004.

XU, J., LI, T. D., TANG, X. L., QIAO, C. D., JIANG, Q. W. Effect of aggregation behavior of gelatin in aqueous solution on the grafting density of gelatin modified with glycidol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 201-207, 2012.

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

YU, C. Y., YIN, B. C., ZHANG, W., CHENG, S. X., ZHANG, X. Z., ZHUO, R. X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68 (2), p. 245-249, 2009.

ZHENG, H., ZHOU, Z., CHEN, Y., HUANG, J., XIONG, F. pH-sensitive alginate/soy protein microspheres as drug transporter. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106 (2), p. 1034–1041, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo mostrou que a associação entre a gelificação iônica e a complexação eletrostática permitiu desenvolver partículas utilizando biopolímeros, com propriedades melhoradas resistentes a processos de oxidação lipídica induzida por temperatura e resistentes a parte superior do trato gastrointestinal *in vitro*.

A utilização da técnica de gelificação iônica para encapsular óleo foi altamente eficiente, encapsulando em torno de 91,7% para partícula de alginato e 95,50% para partículas de pectina.

Foi possível observar que a carga de superfície das partículas de polissacarídeos é inferior à carga de solução e emulsão dos mesmos polissacarídeos medida através do potencial Zeta. Partículas de pectina apresentaram maior eletronegatividade para complexar com moléculas de proteína.

O tamanho médio das partículas de alginato foi menor quando comparadas com o tamanho das partículas de pectina antes do recobrimento com as proteínas. Após o recobrimento proteico as partículas produzidas com alginato aumentaram de tamanho, enquanto partículas produzidas com pectina diminuíram de tamanho quando proteínas globulares foram adsorvidas.

A concentração da proteína em solução influenciou a adsorção da proteína. O aumento da quantidade de proteína em solução resultou em um aumento da quantidade de proteína adsorvida nas partículas de alginato e pectina. Maiores quantidades de proteína adsorvida foram observadas para as partículas de pectina.

No estudo de oxidação lipídica partículas recobertas com proteínas foram mais protetivas ao óleo encapsulado que as partículas sem recobrimento. Entre as proteínas, as proteínas da clara de ovo foram as que ofereceram maior proteção ao óleo contra oxidação comparada com a mistura OVA:WPC ou WPC.

CONCLUSÕES GERAIS

No estudo de misturas entre soluções de proteínas e emulsões de polissacarídeos a complexação eletrostática ótima ocorreu quando a carga elétrica da relação estequiométrica proteína: polissacarídeo foi próxima da neutralidade para cada valor de pH utilizado. Adicionalmente, houve necessidade de uma menor quantidade de proteína para complexar com as partículas quando comparada com as relações observadas quando emulsões foram avaliadas.

A microscopia confocal mostrou a deposição das proteínas da clara de ovo e do soro do leite simultaneamente nas partículas (como exemplo, nas de alginato). Além disto, foi evidenciado, que nenhuma delas permaneceu predominantemente na superfície das partículas.

Partículas de alginato sem recobrimento proteico mostraram resistência às condições gástricas e parcialmente resistentes as condições intestinais, enquanto as partículas de pectina com recobrimento proteico foram sensíveis às condições gástricas e desfizeram-se em ambiente intestinal.