



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**MICROENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃ EM MATRIZ DE
PROTEINA ISOLADA DE SORO DE LEITE**

BIANCA CARDOSO GASPARINI

Florianópolis
2016

Bianca Cardoso Gasparini

**MICROENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D₃ EM MATRIZ DE
PROTEINA ISOLADA DE SORO DE LEITE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manique Barreto

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Gasparini, Bianca Cardoso Gasparini

Microencapsulação de vitamina D3 em matriz de proteína isolada de soro de leite / Bianca Cardoso Gasparini Gasparini; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2016.

169 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1.Ciência dos Alimentos.2.microencapsulação. 3.vitamina D3. 4. proteína isolada de soro de leite.I. Manique Barreto, Pedro Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Bianca Cardoso Gasparini

**MICROENCAPSULAÇÃO DE VITAMINAD₃ EM MATRIZ DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de Fevereiro de 2016.

Prof.^a Roseane Fett, Dr.^a

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Banca Examinadora:

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Bruno Szpoganicz, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Jane Mara Block, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta Dissertação...

Aos meus pais Luiz Donizetti Gasparini e

Ana Luíza Cardoso Gasparini e ao meu irmão

Otávio Cardoso Gasparini pelo amor, carinho, e dedicação.

Por sempre me apoiaram, em todos os momentos de minha vida.

Por serem minha força, minha alegria e por me ensinarem que sem luta

não há vitória

Agradecimentos

A *Deus*, pela certeza de Sua presença e sua força em meus momentos de medo e desânimo, e por caminhar a minha frente abrindo todos os caminhos de minha vida.

Aos meus avós *Sylvia Bianchi Gasparini, Fernando Gasparini, Maria de Paula Martins Cardoso e José Cardoso* por mesmos distantes serem meu porto seguro em momentos difíceis, e por toda força que me deram através das lembranças de momentos de alegria.

Ao *Gabriel de Morais Gandolpho*, por sempre acreditar em mim e nunca me deixar desistir de meus sonhos, por todo amor, carinho e dedicação nas mais variadas situações, e por tornar meus dias muito mais felizes.

A *Universidade Federal de Santa Catarina* – UFSC - Por todas as experiências adquiridas, e conhecimentos que levarei para vida toda.

Ao *Programa de pós-graduação de Ciência e Tecnologia de Alimentos* da UFSC pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao *Professor Pedro Luiz Manique Barreto*, pela oportunidade, incentivo, orientação, amizade e por todo auxílio em meu crescimento profissional e conhecimento transmitido.

As *Professoras, Hérica Aparecida Magosso, Santiago Francisco Yunes, Dilma Maria de Oliveira, Tereza Cristina Rêzzone de Souza e Luiz Fernando Dias Probst* pelos seus ensinamentos, carinho, amizade, apoio na realização de análises, e valiosa colaboração para minha formação profissional desde o início de minha graduação até a conclusão deste mestrado.

Aos *Professores, Edna Regina Amante, Bruno Szpoganicz, Juliano De Dea Lindner, Jane Mara Block e Ernani Sebastião Sant Anna* pela disponibilidade, e dedicação, no que se refere ao desenvolvimento deste projeto.

As minhas amigas, *Maria das Graças Patel, Amanda Cristina J. Cunha, e Bruna P. Szeganiez*, pela amizade, cumplicidade, horas de estudo, e por fazerem desta minha caminhada algo muito mais alegre.

Aos amigos *Eunice Cassanego Itha, Sergio de Souza e Gebo Francisco Panho* por me acolherem e me darem todo apoio durante meu período de especialização, e acima de tudo por me presentear com sua amizade.

À *Matheus V. O. Brisola Maciel* pela amizade, torcida, ajuda e todos os ensinamentos concedidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos parceiros de grupo *Aliene, Amanda, Ana Paula Pereira, Ana Paula, Bruna, Carolina, Cleonice, Daniele, Giovana, Maria Luiza, Michele, Rayssa* e também a todos os colegas do laboratório de Reologia e Polímeros Naturais, pelos bons momentos de convivência.

Aos *Professores, Técnicos e Funcionários* do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo auxílio e colaboração.

Aos *Laboratórios de Controle de Qualidade, Farmacotécnica e Central de Microscopia Eletrônica*, da Universidade Federal de Santa Catarina pela infraestrutura disponibilizada, em especial aos colegas Caroline, Rafael e Luis pela atenção e ajuda na realização de análises.

A *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina* – FAPESC – Pelo financiamento deste projeto de mestrado.

A *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – CAPES – Pelo apoio financeiro concedido para o meu aperfeiçoamento profissional.

“Na vida não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

A vitamina D, possui um papel muito importante no desenvolvimento do tecido ósseo, e sua deficiência pode ocasionar doenças como a osteomalácia e o raquitismo, sendo necessária sua ingestão adequada. No entanto, suas fontes de obtenção, tanto via alimentação quanto síntese cutânea, possuem restrições, e seu uso na indústria alimentícia é limitado devido sua instabilidade na presença de luz e oxigênio atmosférico. A técnica de encapsulação possibilita sua aplicação em formulações industriais. A partir deste contexto, foram desenvolvidas e caracterizadas micropartículas de vitamina D₃, em matriz de isolado proteico de soro de leite a partir do processo de secagem por atomização. Foram desenvolvidas quatro formulações de matriz, sendo duas diferenciando-se pela adição ou não de surfactante, e duas pela reticulação enzimática ou não, todas com concentrações de recheio variando de 20, 25 e 30 % em relação à massa da matriz polimérica. As micrografias das amostras reticuladas revelaram um formato esférico com a presença de concavidades, e para as demais amostras um formato esférico e liso. A encapsulação da vitamina D₃ foi confirmada através dos dados das análises térmicas e espectroscopia de infravermelho, e a reticulação da matriz através da avaliação reológica das soluções. Os testes de liberação revelaram um aumento da liberação conforme a concentração de vitamina D₃. Os resultados de eficiência de encapsulação mostraram que o procedimento de encapsulação foi bem sucedido para as amostras com concentrações baixas do composto bioativo, apresentando valores de 12 % de eficiência pra formulações de matrizes reticuladas e de 21, 54 e 56 % de eficiência para formulações de matrizes não reticuladas. Indicando que, a matriz utilizada apresentou boas propriedades como agente encapsulante quando não reticulada, e formulada com baixas concentrações desta vitamina, através do método de secagem por atomização. Sendo assim, as micropartículas de vitamina D₃ em matrizes a base de proteína isolada de soro de leite representam um ingrediente promissor na formulação de novos produtos alimentícios.

Palavras-chave: microencapsulação, vitamina D₃, proteína isolada de soro de leite.

ABSTRACT

Vitamin D has an important function in the development of bone tissue, and its deficiency can cause diseases such as osteomalacia and rickets, requiring adequate consumption. However, their sources of obtaining through cutaneous synthesis have restrictions, and its use in the food industry is limited because of its instability in the presence of light and atmospheric oxygen. The encapsulation technique is a technology that can allow its application in industrial formulations. On this context, it has been developed and characterized vitamin D₃ microparticles, whey protein isolated matrix from the spray drying process. Four matrix compositions were developed, two with addition of a surfactant and with out it, and two by enzymatic crosslinking / or not all stuffed with concentrations from 20, 25 and 30 % relative to the mass of the matrix. The micrographs of the crosslinked samples revealed a spherical shape with the presence of dimples, and the other samples form a spherical and smooth. Encapsulation of vitamin was confirmed from the data of thermal analysis and infrared espectroscopy, and crosslinking the matrix using solutions of rheological evaluation. The encapsulation efficiency results showed that the encapsulation procedure was successful for the samples with low concentrations of bioactive compound, with values of 12 % efficiency for crosslinked matrix formulations and 21, 54 and 56 % efficiency for formulations that is not reticulated. Indicating that the die used had good properties as the encapsulating agent when not cross-linked and formulated with low levels of this vitamin, through the method of drying by atomization. Thus, the vitamin D₃ microparticles whey protein isolated base matrix, represent a promising ingredient in the formulation of industrial food products.

Keywords: microencapsulation, vitamin D₃, whey protein.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1- Representação das estruturas: a) Colecalciferol ou vitamina D ₃ b) Ergocalciferol ou vitamina D ₂	40
Figura 2- Diagrama Simplificado do Metabolismo da vitamina D...	41
Figura 3- Modelo ilustrativo de uma microesfera e micropartícula..	46
Figura 4- Representação gráfica do atomizador Hosokawa Bepex..	48
Figura 5- Estrutura das proteínas: (a) Estrutura terciária da β -lactoglobulina (b) Estrutura tri-dimencional nativa da α -Lactoalbumina mostrando os terminais N e C, o átomo de cálcio ligado (esfera) e as quatro pontes de dissulfeto.....	52
Figura 6: Modo de ação geral da enzima transglutaminase.....	55

CAPÍTULO 2

Figura 1-Micrografias eletrônica de varredura das micropartículas com surfactantes, BS, A1s, A2s e A3s, e sem surfactante B, A1, A2 e A3.....	89
Figura 2- Micrografia eletrônica de varredura da amostra A1. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D de 1500 e 3000 vezes respectivamente.....	90
Figura 3- Micrografia eletrônica de varredura da amostra A1s. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D de 1500 e 3000 vezes respectivamente.....	91
Figura 4- Distribuição de tamanho das partículas sem surfactante, B, A1, A2 e A3.....	93
Figura 5-Distribuição de tamanho das partículas com surfactante BS, A1s, A2s e A3s.....	94
Figura 6- Análise termogravimétrica – micropartículas A1.....	96
Figura 7- Análise termogravimétrica – micropartículas A1s.....	96
Figura 8- Termograma das micropartículas B, BS, A1 e A1s.....	99
Figura 9- Termograma dos compostos puros PI, PI + Surfactante, vitamina D ₃ , PI+ vitamina D ₃ , PI+surfactante + vitamina D ₃	100
Figura 10- Espectroscopia de IV – PI.....	102
Figura 11- Espectroscopia de IV- Vitamina D ₃	103
Figura 12- Espectroscopia de IV- micropartículas sem surfactante B, A1, A2 e A3.....	104
Figura 13- Espectroscopia de IV- fármaco e vitamina D ₃	105
Figura 14- Espectroscopia de IV- micropartículas com surfactante BS, A1s, A2s e A3s.....	105

Figura 15- Estrutura molecular do surfactante.....	106
Figura 16- Liberação do composto bioativo, vitamina D ₃ , das micropartículas A1, A2 e A3	107
Figura 17- Liberação do composto bioativo, vitamina D ₃ , das micropartículas A1s, A2s e A3s.....	107
Figura 18 – Liberação de vitamina D ₃ pela razão m _v /m _∞ em função do tempo para as amostras A1, A2 e A3.....	109
Figura 19 – Liberação de vitamina D ₃ pela razão m _v /m _∞ em função do tempo para as amostras A1s, A2s e A3s.....	110
Figura 20- Representação da molhabilidade das micropartículas sem surfactante das amostras B, A1, A2 e A3 como os solventes: água deionizada, formamida e diodometano.....	115
Figura 21- Representação da molhabilidade das micropartículas com surfactante das amostras B, A1, A2 e A3 como os solventes: água deionizada, formamida e diodometano.....	116
CAPÍTULO 3	
Figura 1- Produção de micropartículas de vitamina D3 reticuladas, A1TG, A2TG e A3TG, e não reticuladas; A1i, A2i e A3i, com a enzima transglutaminase.....	136
Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura das amostras reticuladas; BTG, A1TG, A2TG e A3TG, e não reticuladas Bi, A1i, A2i e A3i.....	142
Figura 3- Micrografia eletrônica de varredura da amostra A1TG....	143
Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra A1i.....	143
Figura 5- Distribuição de tamanho das micropartículas reticuladas, BTG, A1TG, A2TG e A3TG.....	145
Figura 6 - Distribuição de tamanho das partículas não reticuladas BI, A1i, A2i e A3i.....	146
Figura 7- Análise termogravimétrica da amostra reticulada com a enzima transglutaminase A1TG.....	148
Figura 8- Análise termogravimétrica da amostra não reticulada com a enzima transglutaminase Ai.....	148
Figura 9- Termograma da enzima trasglutaminase pura e das micropartículas BTG e A1TG.....	151
Figura 10 - Termograma das micropartículas Bi e A1i.....	151
Figura 11- Espectroscopia de IV- micropartículas reticuladas BTG A1TG, A2TG e A3TG.....	153
Figura 12- Comportamento de fluxo das emulsões A1TG e A1i....	156
Figura 13- Comportamento de fluxo das emulsões reticuladas.....	156
Figura 14- Comportamento de fluxo das emulsões não reticuladas BI e A1i.....	157

Figura 15- Perfil de liberação das amostras A1TG, A2TG e A3TG.	159
Figura 16- Perfil de liberação das amostras A1i, A2i e A3i.....	159
Figura 17 – Liberação de vitamina D ₃ pela razão m_t/m_∞ em função do tempo para as amostras A1TG, A2TG e A3TG.....	161
Figura 18 – Liberação de vitamina D ₃ pela razão m_t/m_∞ em função do tempo para as amostras A1i, A2i e A3i.....	161

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Distribuição das principais proteínas do soro de leite bovino e humano.....	51
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Denominação das formulações das micropartículas.....	84
Tabela 2- Rendimento percentual das micropartículas B, A1, A2, A3, BS, A1s, A2s e A3s.....	85
Tabela 3- Dados de concentração superficial, total e eficiência de encapsulação.....	87
Tabela 4- Parâmetros Termogravimétricos amostras B, A1, A2 e A3.....	97
Tabela 5- Parâmetros Termogravimétricos amostras BS, A1s, A2s e A3s.....	97
Tabela 6- Principais correlações espectroscópicas de IV – PI.....	102
Tabela 7- Principais correlações espectroscópicas de IV – Vitamina D ₃	103
Tabela 8- Parâmetros obtidos pela equação $M_t/M_\infty = K_a t^n$ para as amostras.....	110
Tabela 9- Ângulo de contato das micropartículas B, A1, A2, A3 BS, A1s, A2s e A3s como os solventes: água deionizada, formaldeído e diiodometano.....	112
Tabela 10- Valores de energia livre superficial das amostras sem surfactante.....	113
Tabela 11- Valores de energia livre superficial das amostras com surfactante.....	113
Tabela 12- Valores de densidade e índice de Carr's e de Hauser.....	118

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Denominação das formulações das micropartículas.....	137
Tabela 2 - Rendimento percentual das micropartículas BTG, A1TG, A2TG, A3TG, Bi, A1i, A2i e A3i.....	137
Tabela 3- Dados de concentração superficial, total e eficiência de encapsulação.....	139
Tabela 4- Parâmetros Termogravimétricos das amostras BTG, A1TG, A2TG e A3TG e enzima Transglutaminase	149
Tabela 5- Parâmetros Termogravimétricos - amostras BI, A1i, A2i e A3i.....	149
Tabela 6- Comparação dos valores de transmitância entre as amostras reticuladas e não reticuladas.....	154

Tabela 7- Comparação dos valores de transmitância entre as amostras reticuladas e não reticuladas.....	155
Tabela 8- Modelo de lei da Potência do comportamento de fluxo das amostras.....	158
Tabela 9- Parâmetros obtidos pela equação $M_t/M_\infty = K_a t^n$ para as amostras.....	162
Tabela 10- Densidade e Índice de Carr's e de Hauser das micropartículas.....	163
Tabela 11- Relação de Índice de Carr's e de Hauser.....	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Albumina Sérica Bovina (ASB).
Análise de variância (ANOVA).
Análise termogravimétrica (TGA).
Calorimetria exploratória diferencial (DSC).
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).
Densidade Aparente (d_{ap}).
Densidade compactada (d_{cp}).
Eficiência de encapsulação (EE).
Entalpia de Fusão (Δ_{mH}).
Espectroscopia de infravermelho (IV).
Imunoglobulinas (IG).
Índice de Carr's ($I_{carr's}$).
Índice de Hauser (I_{Hauser}).
Isolado proteico de leite comercial (IP).
Lactoferrina (LF).
Limite de escoamento (σ_0).
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).
Taxa de deformação (γ).
Temperatura de transição vítrea (Tg).
Tensão de cisalhamento (σ).
Transglutaminase (TG).
Transglutaminase microbiana (TGM).
Viscosidade plástica (η_{pl}).
 β -lactoglobulina (β -LG).
 α -lactalbumina (α -LA)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	31
OBJETIVOS.....	35
Objetivo geral.....	35
Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
1.1. Colecalciferol (Vitamina D)	39
1.1.1. A deficiência de colecalciferol (Vitamina D)	41
1.2. Encapsulação.....	44
1.2.1. Métodos de encapsulação.....	47
1.2.1.1. Secagem por atomização	47
1.3. Proteína isolada de soro de leite	50
1.4. Reticulação	53
1.4.1. Reticulação química	54
1.4.2. Reticulação enzimática	54
1.4.2.1. Enzima transglutaminase	54
1.4.2.2. Reticulação da proteína isolada de soro de leite	56
1.5. Comportamento reológico do soro de leite	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de vitamina D₃, em matriz de proteína isolada de soro de leite	73
RESUMO	75
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E METODOS	79
2.1. Material	79
2.2. Metodologia	79
2.2.1 Preparação das micropartículas	79
2.3. Eficiência de encapsulação e rendimento das micropartículas.....	80
2.3.1. Determinação da massa total de vitamina D ₃	80
2.3.2. Determinação da massa superficial de vitamina D ₃	80
2.4. Caracterização físico-química das micropartículas	81
2.4.1. Análise morfológica	81
2.4.1.1. Morfologia e distribuição de tamanho de partícula	81
2.4.2. Distribuição de tamanho de partícula	81
2.4.3. Análise térmica	81
2.4.3.1. Análise termogravimétrica (TGA)	81
2.4.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	82
2.4.4. Espectroscopia no infravermelho (IV)	82

2.4.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas ...	82
2.4.6. Ângulo de contato e energia livre superficial	83
2.4.7. Densidade	83
2.4.7.1. Densidade aparente	83
2.4.7.2. Densidade compactada	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1. Rendimento das micropartículas	84
3.2. Eficiência de encapsulação	86
3.3. Caracterização físico-química das micropartículas	89
3.3.1. Análise morfológica	89
3.3.1.1. Morfologia	89
3.3.1.2. Distribuição de tamanho de partícula	92
3.3.2. Análise térmica	95
3.3.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)	95
3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	98
3.3.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	101
3.3.4. Determinação do perfil de liberação das micropartículas ...	106
3.3.5. Ângulo de contato e energia livre superficial	111
3.3.6. Densidade aparente e compactada	117
Conclusão	119
Referencias	120
CAPÍTULO 3 – Estudo da reticulação de proteína isolada de soro de leite aplicada como matriz de micropartículas de vitamina D₃	125
RESUMO	127
1. INTRODUÇÃO	129
2. MATERIAL E METODOS	131
2.1. Material	131
2.2. Metodologia	131
2.2.1. Preparação das micropartículas	131
2.3. Eficiência de encapsulação e rendimento das micropartículas	132
2.3.1. Determinação da massa total de vitamina D ₃	132
2.3.2. Determinação da massa superficial de vitamina D ₃	133
2.4. Caracterização físico-química das micropartículas	133
2.4.1. Análise morfológica	133
2.4.1.1. Morfologia e distribuição de tamanho de partícula	133
2.4.2. Análise térmica	133
2.4.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)	133
2.4.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	134
2.4.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	134

2.4.4. Comportamento reológico	134
2.4.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas ...	134
2.4.6. Densidade	135
2.4.6.1. Densidade aparente e compactada	135
2.4.7. Índice de Carr's e índice de Hauser	135
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
3.1. Rendimento das micropartículas	137
3.2. Eficiência de encapsulação	138
3.3. Caracterização físico-química das micropartículas	142
3.3.1. Análise morfológica	142
3.3.1.1. Morfologia	142
3.3.1.2. Distribuição de tamanho de partícula	144
3.3.2. Análise térmica	148
3.3.2.1. Análise Termogravimétrica (TGA)	148
3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	150
3.3.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	153
3.3.4. Comportamento reológico	155
3.3.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas ...	158
3.3.6. Densidade e índice de Carr's e Hauser	162
Conclusão	165
Referências	166
Conclusão geral	169

INTRODUÇÃO

A possibilidade de encapsular compostos bioativos, sensíveis a reações com o ambiente em que estão expostos, através de partículas comestíveis tem sido alvo de pesquisas nas últimas décadas. Esse tipo de empacotamento tem como objetivo a obtenção de partículas que apresentem tanto características de interesse da matriz, como por exemplo, propriedades mecânicas, controle de liberação do composto bioativo, e boa retenção de voláteis, quanto às características de interesse do recheio como as propriedades nutricionais (AZEREDO, 2005).

Existem muitos materiais que podem servir como matrizes de compostos encapsulados, por exemplo, quitosana, carragena, celulose, lipídeos, zeína, goma arábica, proteína de soro de leite entre outros. A proteína de soro de leite é um coproduto da indústria de queijos, e possui alto valor nutritivo. Quando processado, como isolado ou concentrado proteico, torna-se um ótimo ingrediente para formulação de diversos alimentos (AZEREDO, 2005; YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

As principais características que tornam as proteínas de soro de leite interessantes para aplicação como material de parede na elaboração de micropartículas são as propriedades funcionais como: a solubilidade, capacidade emulsificante, estabilidade das emulsões, e capacidade de formação de micropartículas. Além das propriedades encapsulantes, as proteínas do soro são uma excelente fonte de aminoácidos essenciais, favorecendo assim a sua aplicabilidade (MODLER, 2000; ANTUNES, 2009).

Outro fator que torna as proteínas do soro de leite, modificadas ou não, muito atrativas para a utilização como material encapsulante é a possibilidade de se utilizar um coproduto da produção de queijos. Pois apesar deste coproduto ser rico em nutrientes, requer a aplicação de tecnologias, para seu beneficiamento, que demandam investimentos financeiros elevados, sendo inviáveis para pequenas e médias empresas, que acabam descartando este coproduto (ALVES et al., 2014). Porém quando não tratado corretamente, ou descartado indevidamente, em ambientes aquáticos e no solo, o soro de leite gera riscos ao meio ambiente (SILVA; BOLINI, 2006).

Apesar de apresentar diversas características que a tornam um ótimo agente encapsulante, a proteína isolada de soro de leite interage facilmente com moléculas de água, o que restringe sua aplicação a compostos ativos com alta sensibilidade à umidade. Com a finalidade de

contornar essa restrição, este trabalho visou à utilização da metodologia de reticulação enzimática, que teve como alvo favorecer a incorporação de ligações intermoleculares e intramoleculares por ligações cruzadas covalentes em proteínas, através da ação de uma enzima (FRASCARELI et al., 2012b; RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012).

Dentre as enzimas mais utilizadas na metodologia de reticulação enzimática, a transglutaminase (TGase) se destaca devido à sua capacidade de catalisar reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas entre proteínas, peptídeos e aminas primárias, especialmente entre resíduos de lisina e glutamina, formando ligações covalentes, e melhorando características de textura de alimentos sendo amplamente utilizada pela indústria (MACEDO; SATO, 2005).

A proteína isolada do soro de leite em solução apresenta facilidade de modificação química ou enzimática, favorecendo a incorporação de ligações inter e intramoleculares por ligações cruzadas. Quando reticulada com a enzima transglutaminase apresenta uma rede molecular mais rígida, e com menor solubilidade em água, o que possibilita, dentre outras coisas, sua aplicação como material encapsulante (FRASCARELI et al., 2012b; RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012).

Os métodos de encapsulação aplicados na formação de partículas comestíveis têm como objetivo combinar as características desejáveis do material de parede com a funcionalidade química dos compostos bioativos. Uma variedade de operações unitárias é utilizada para a execução deste método como: a liofilização, extrusão, inclusão molecular, secagem em tambor, leiteo fluidizado, secagem por atomização, entre outras (AZEREDO, 2005).

Dentre os processos utilizados para encapsulação, a secagem por atomização destaca-se, pelo seu baixo custo, produção de partículas de boa qualidade, flexibilidade no uso de matrizes variadas, disponibilidade de equipamentos no mercado entre outras vantagens. Devido à demanda de fatores que facilitam o emprego da secagem por atomização, esta técnica é atualmente a mais utilizada industrialmente no processo de microencapsulação (BRASILEIRO, 2011; FAVARO-TRINDADE, 2011).

As características físico-químicas de muitos compostos bioativos, como compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, enzimas e vitaminas, dificultam seu processamento na produção de alimentos industrializados. As vitaminas são essenciais para saúde humana, porém sua aplicação em alimentos representa um desafio para indústria, pois

em sua maioria são altamente oxidáveis, e conseqüentemente eliminadas durante os processos envolvidos na produção alimentícia (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

A vitamina D é essencial no desenvolvimento do tecido ósseo. Pode ser encontrada naturalmente na dieta de origem animal, como, por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, e de origem vegetal como legumes e cogumelos. Apesar de sua presença em alimentos, as quantidades existentes são baixas, e a síntese cutânea é a principal fonte da vitamina na maioria dos indivíduos (HEANEY, 2008).

Devido à baixa concentração em alimentos, a pouca exposição ao sol, a pouca atividade física, a obesidade e uma combinação de diversos outros fatores, estudos apontam que a deficiência de vitamina D está presente em indivíduos de todo mundo, das mais variadas faixas etárias. A deficiência desta vitamina pode causar alterações ósseas e renais, como o raquitismo, e a osteomalacia (*osteo* - osso, *malacia* - amolecimento). Além das doenças já conhecidas, pesquisas vêm relacionando os baixos níveis de vitamina D no organismo com hipertensão, câncer, doenças autoimunes como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, diabetes melito insulino-dependente, mal de Alzheimer e mal de Parkinson entre outras (SARAIVA et al., 2005; SARAIVA et al., 2007; MAEDA; KUNII; HAYASHI; LAZARETTI-CASTRO, 2007).

Devido à necessidade de incluir a vitamina D na dieta da população, as indústrias de alimentos buscam inserir a vitamina em seus produtos, gerando assim suplementos alimentares. Porém as características físico-químicas desta vitamina, como a alta sensibilidade à luz ultravioleta, e a hidrofobicidade dificultam seu processamento em diversos produtos alimentícios, tanto sólidos quanto líquidos (ABBASI, 2014).

Diante da dificuldade da incorporação da vitamina D em produtos de suplementação, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que ofereçam possibilidades de preservação desse componente sensível, durante o processamento e armazenamento dos alimentos. A microencapsulação é uma alternativa tecnológica, atualmente aplicada na área alimentícia, que fornece proteção, a ingredientes sensíveis, como a vitamina D, podendo preservar suas propriedades nutricionais e manter a estabilidade (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

Tendo em vista o valor nutricional, e as características atrativas da utilização da proteína isolada de soro de leite, um coproduto da produção de queijos, como agente encapsulante, e a necessidade de

introduzir a vitamina D na dieta da população, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar micropartículas através da secagem por atomização, contendo como material de parede a proteína isolada de soro de leite e como recheio a vitamina D. Além disso, avaliou-se a influência do processo de reticulação da proteína com a enzima transglutaminase sobre as características das partículas. Sendo estas partículas, um ingrediente promissor no desenvolvimento de formulações de suplementos alimentares, para utilização na indústria de alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção e caracterização de micropartículas de vitamina D₃ a partir de matrizes de proteína isolada de soro de leite, através do processo de secagem por atomização com potencial para aplicação em processos alimentícios.

Objetivos específicos

- Desenvolver diferentes formulações de matrizes, com variações de concentração de recheio, para produção de micropartículas de proteína isolada de soro de leite/reticuladas ou não com a enzima transglutaminase, contendo vitamina D₃ pelo processo de secagem por atomização.
- Determinar os valores de eficiência de encapsulação das micropartículas.
- Caracterizar as micropartículas, quanto a suas propriedades físico-químicas através de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho, análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial, ângulo de contato, compressibilidade/compatibilidade do pó e energia livre superficial.
- Investigar o comportamento reológico das soluções preparadas para obtenção das micropartículas reticuladas com a enzima transglutaminase;
 - Estudar o perfil de liberação das micropartículas.
 - Avaliar, em relação aos parâmetros estudados, a formulação da matriz, e concentração de recheio, que proporcionam micropartículas de vitamina D₃ com proteína isolada de soro de leite com maior potencial de eficiência de encapsulação.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

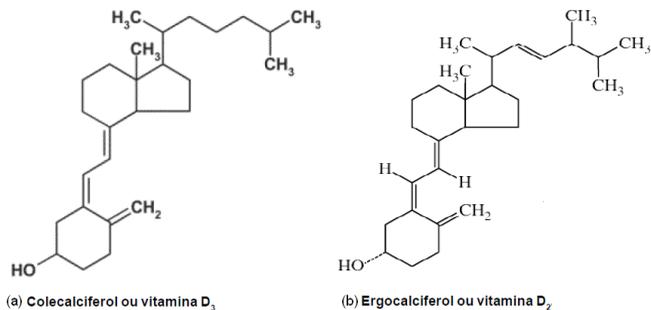
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Colecalciferol (Vitamina D)

Conhecida pela sua função na manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo, e no desenvolvimento do tecido ósseo, a vitamina D exerce um papel fundamental na saúde humana. (PETERLICK; CROSS, 2005; BOUILLON et al., 2008; HEANEY et al., 2008; KIMBALL; FULEIHAN; VIETH, 2008; JAMES, 2008). Além destas funções, pesquisas realizadas demonstram sua interação com o sistema imunológico, diferenciação e proliferação celular, secreção hormonal, e seu envolvimento em doenças crônicas não transmissíveis, devido à expressão do receptor desta vitamina em diversos tecidos corporais como pele, intestino, rins, coração, entre outros (JONES; TWOMEY, 2008).

A vitamina D pode ser encontrada naturalmente na dieta, em alimentos de origem animal, na forma de coledalciferol, também chamada de vitamina D₃, presente no óleo de fígado de bacalhau e outros peixes (arenque, cavala e salmão), bem como em legumes e cogumelos, na forma de ergocalciferol (Vitamina D₂) (LICHTENSTEIN et al., 2013). As estruturas moleculares do coledalciferol, e do ergocalciferol diferem-se, apenas pela presença de uma ligação dupla adicional e um grupo metil incorporados à cadeia alquílica lateral (CAMPBELL, 2000) (Figura 1).

Figura 1: Representação das estruturas: a) Colecalciferol ou vitamina D₃ b) Ergocalciferol ou vitamina D₂.

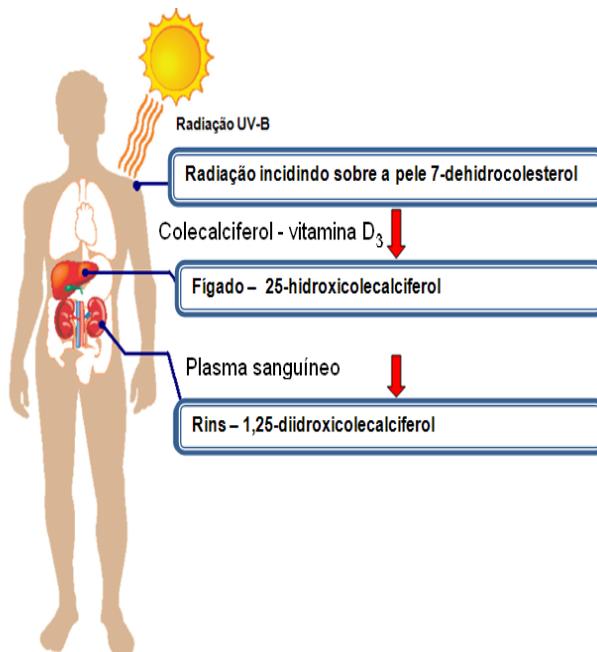


Fonte: Barral, Barros e Araújo (2007).

Na maioria dos indivíduos, a síntese cutânea é a principal fonte de vitamina D, sendo o restante obtido pela alimentação e pelo uso de suplementos (HEANEY, 2008). As células da epiderme da pele contêm o 7-deidrocolesterol, um precursor cutâneo da vitamina D. Quando este precursor é exposto a raios ultravioletas B (UV-B), cujo comprimento de onda se situa entre 290 e 315 nm, este sofre uma reação fotolítica e é transformado em pré-vitamina D₃, uma forma não metabolicamente ativa.

Esta pré-vitamina é transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde é convertida em 25-hidroxivitamina-D₃, ou 25(OH)D₃ (calcidiol) através de uma reação de hidroxilação com as enzimas P450 (LICHTENSTEIN et al., 2013). A maior parte da produção da 25(OH)D₃ é depositada no tecido gorduroso, a principal reserva corporal de vitamina D. Para se tornar ativa, a vitamina sofre uma última hidroxilação, sob a ação da enzima 1- α -hidroxilase, transformando-se em 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(2OH)D₃] ou calcitriol, essa reação ocorre nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais ao rim (BIANCO; LAZARETTI, 1999). A Figura 2 ilustra um diagrama simplificado do metabolismo da vitamina D.

Figura 2: Diagrama simplificado do metabolismo da vitamina D.



Fonte: Lichtenstein et al., (2013) (adaptado).

A ingestão necessária de vitamina D para indivíduos com idades entre um e setenta anos é de 600 UI/dia, já para os indivíduos com idade superior a setenta anos, a dosagem é de 800 UI/dia, o que resulta em níveis séricos maiores de que 20 ng/mL, desde que haja um nível mínimo de exposição ao sol. Muitos fatores podem afetar os níveis séricos de vitamina D no organismo, como a exposição ao sol, a atividade física, a pigmentação da pele, a alimentação e a obesidade. A combinação destes fatores pode submeter o ser humano a um risco de deficiência de vitamina D (LICHTENSTEIN et al., 2013).

1.1.1. A deficiência de colecalciferol (Vitamina D)

A deficiência da vitamina D pode provocar alterações ósseas e renais, como o raquitismo, e a osteomalacia. O raquitismo atinge crianças pequenas, entre seis e vinte quatro meses de idade, e é

caracterizado por falhas na mineralização dos ossos em crescimento. Essa diminuição na capacidade de desenvolvimento dos ossos se deve à falta de calcitriol, que impede o aporte de cálcio no intestino e, conseqüentemente, a mobilização do cálcio através dos ossos (RUIZ-IRASTORZA et al., 2008). A osteomalacia pode ser chamada de raquitismo do adulto, e corresponde a uma falha na mineralização dos ossos já formados, conduzindo a dores ósseas e fraturas (GUILLAND; LEQUEU, 1995).

Atualmente diversos estudos têm relacionado à carência da vitamina D, com outras doenças como: a obesidade, hipertensão, câncer, doenças autoimunes como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, Lúpus eritematoso sistêmico, diabetes melito insulino-dependente (MARQUES, 2010) doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca e cardiomiopatia, doenças respiratórias como bronquite, pneumonia entre outras (MCNALLY, 2014).

Visto que a síntese de colecalciferol poderia não ser suficiente para a população que habitava regiões do mundo onde não existia luz solar em abundância, especialmente em regiões frias, como por exemplo, o norte Europeu, e que os habitantes dessas zonas poderiam desenvolver raquitismo ou osteomalácia, se a oferta alimentar de vitamina D não cobrir suas necessidades, alguns países como Estados Unidos e Grã-Bretanha investiram na suplementação alimentar da população. Para suprir esta carência, os teores de vitamina D foram aumentados em certos alimentos como margarinas, leites e cereais matinais (COULTATE, 2004).

Apesar de a síntese cutânea de vitamina D através do efeito dos raios ultravioleta da luz solar ser a maior fonte desta vitamina, estudos atuais apontam que populações que vivem em países quentes também apresentam carências nos níveis da vitamina devido a fatores que podem diminuir sua síntese e que vão além da pouca exposição à luz solar, como a poluição industrial, o uso de roupas inadequadas, a obesidade, a alimentação, a falta de atividade física entre outros (LICHTENSTEIN et al., 2013).

Um estudo realizado em São Paulo aponta que a população idosa apresentou níveis séricos de 25(OH)D abaixo do necessário, após o inverno (SARAIVA et al 2005; SARAIVA et al., 2007; MAEDA; KUNII; HAYASHI; LAZARETTI-CASTRO, 2007). Peteres (2009) encontrou concentrações inadequadas de vitamina D em 60 % de adolescentes saudáveis e 50 % de jovens adultos em São Paulo (DE SOUZA et al., 2009; BRASIL, 2014).

Devido à deficiência em níveis séricos de vitamina D, em populações localizadas em diferentes regiões do mundo há a necessidade de uma suplementação alimentar desta vitamina. Esta suplementação vem sendo realizada através da incorporação a diversos alimentos, denominados enriquecidos. São denominados enriquecidos, todos os alimentos aos quais forem adicionadas substâncias nutrientes com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo, que pode ser feito através da reposição quantitativamente dos nutrientes destruídos durante o processamento do alimento, ou suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2014).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos na área alimentícia, a incorporação da vitamina D em alimentos ainda representa um desafio para a indústria. Esse desafio se deve às características físico-químicas desta vitamina, como a hidrofobicidade, sensibilidade à luz ultravioleta, e sua rápida decomposição na presença de oxigênio atmosférico, que dificultam seu processamento em diversos produtos alimentícios, tanto sólidos quanto líquidos (ABBASI, 2014).

A vitamina D é insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e óleos vegetais. Sua degradação ocorre pela ação da luz, devido à presença de peróxidos provenientes da oxidação de ácidos graxos insaturados, essa degradação pode ser ainda maior na presença de metais (ferro, cobre entre outros). Uma alternativa para prevenir a oxidação da vitamina D, provocada pela ação da luz é a utilização de antioxidantes como, por exemplo, o tocoferol (ISLABÃO, 1978). Porém, a adição de antioxidantes pode não ser suficiente para garantir a estabilidade da vitamina D em certos processos alimentícios, que envolvam, por exemplo, o uso de temperaturas elevadas, provocando, assim, sua degradação. Diante da dificuldade de manipulação da vitamina D, devido à sua alta sensibilidade, e da necessidade de incorporação da mesma em produtos de suplementação alimentar, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que ofereçam possibilidades de preservar esses componentes durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Uma alternativa tecnológica, atualmente aplicada na área alimentícia, é o processo de microencapsulação que fornece proteção, em compostos sensíveis, como a vitamina D, podendo preservar suas propriedades físico-químicas e manter a estabilidade.

1.2. Encapsulação

Com o objetivo de proteger as propriedades de alimentos com alta sensibilidade, a indústria alimentícia vem aplicando na fabricação de seus produtos, o processo de encapsulação (AZEREDO, 2005). A encapsulação é uma tecnologia atualmente bem desenvolvida em diversos campos de aplicações, incluindo farmacêuticos, químicos, cosméticos, perfumaria, produtos têxteis, agricultura, entre outros, sendo que as indústrias de alimentos, apenas recentemente reconheceram a utilização dessa tecnologia (POTHAKUMARY, 1995; PSZCZOLA, 1998; GIBBS; KERMASHA; ALLI; MULLIGAN, 1999).

A encapsulação aplicada à ciência de alimentos é uma técnica que consiste em empacotar um ou mais compostos alimentícios sensíveis, em partículas comestíveis (AZEREDO, 2005). Essa técnica tem como finalidade reduzir as interações de compostos instáveis com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em modificações das características físico-químicas como variação de cor, aroma, sabor, e diminuição de valores nutricionais.

Além destas funções, a encapsulação tem como objetivo evitar reações prematuras de um substrato, reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo, mascarar compostos que apresentem um sabor indesejável, e separar componentes incompatíveis ou reativos (DEPYPERE et al., 2003; PSZCZOLA, 1998).

Outro objetivo de grande importância que envolve a técnica de encapsulação é a *liberação controlada*, que permite a liberação do material encapsulado lentamente, ou a partir da ocorrência de certo evento, evitando assim a perda de compostos durante o processamento de um produto alimentício (RISCH; REINECCIUS, 1995). A liberação de aditivos no local e no momento adequado aumenta sua efetividade, reduzindo assim o volume utilizado, e ampliando as aplicações do mesmo (GOUIN, 2004).

A liberação do agente ativo pode ocorrer de diversas formas, por meio da biodegradação, difusão, ruptura mecânica, solubilidade no meio, e mediante a ação de solvente, temperatura, pressão e pH (AZEREDO, 2005). Além de todos os objetivos propostos, a técnica de encapsulação está sendo aplicada no desenvolvimento de embalagens para materiais de estados físicos gasosos, sólidos ou líquidos em pequenas partículas que liberam o seu conteúdo em condições específicas (NEDOVIC et al., 2011).

No processo de empacotamento de compostos ativos em partículas comestíveis, o material revestido é denominado de recheio,

núcleo, caroço, ou material ativo, e o material que forma a partícula, parede, matriz, cobertura, casca, encapsulante ou transportador (KAREL; LANGER, 1988 ZHU; XIAO; ZHOU; Yi, 2012). Os materiais aplicados como núcleo, incluem compostos de fácil degradação como pigmentos, aromas, compostos de sabor, enzimas, acidulantes, nutrientes, conservantes e vitaminas (ZHU; XIAO; ZHOU; Yi, 2012).

A natureza da matriz é um dos principais fatores que influenciam a estabilidade e a taxa de liberação do núcleo (KAREL et al., 1988). Baseado neste conceito, a escolha do material deve levar em consideração uma série de requisitos como capacidade de formação do filme, facilidade de reconstituição, sabor, odor, baixa viscosidade, propriedades mecânicas, transições vítreas entre outras propriedades físico-químicas. O material de parede deve ainda, ser insolúvel e não reativo com o recheio; portanto, sua compatibilidade deve ser avaliada através das características como porosidade, solubilidade etc. (JACKSON; LEE, 1991; BRAZEL, 1999).

Outros critérios como a eficiência de encapsulação, a estabilidade durante a estocagem, características microscópicas da superfície, e grau de proteção do núcleo devem ser atendidos pelo material de parede (PÉREZ et al., 2003). Muitas vezes a matriz não atende a todos os requisitos necessários para manter o núcleo protegido e uma alternativa é a utilização de misturas ou blendas poliméricas, onde materiais que tornam a matriz mais eficaz são adicionados (SHAHIDI; HAN, 1993).

Existe uma variedade de materiais com potencial para uso como encapsulante como: os polissacarídeos e proteínas. Destaca-se a zeína (prolamina do milho), proteína isolada de soro de leite, gomas (goma arábica, alginato, goma guar etc), lipídeos, celulose (microcelulose cristalina), amido, maltodextrinas, ciclodextrinas entre outros (AZEREDO, 2005) alguns polissacarídeos de origem marinha como a quitosana e a carragenana (KARE; LANGER, 1988) entre outros materiais.

As proteínas isoladas (acima de 90 % p/p) e as proteínas concentradas (acima de 80 % p/p) de soro de leite vêm se destacando entre as matrizes existentes. Separadamente como material encapsulante, ou combinada com outros materiais como, por exemplo, a transglutaminase, e a maltodextrina. A proteína isolada de soro de leite apresenta um bom potencial emulsificante, sendo um material promissor no desenvolvimento de formulações de emulsões para encapsulação de

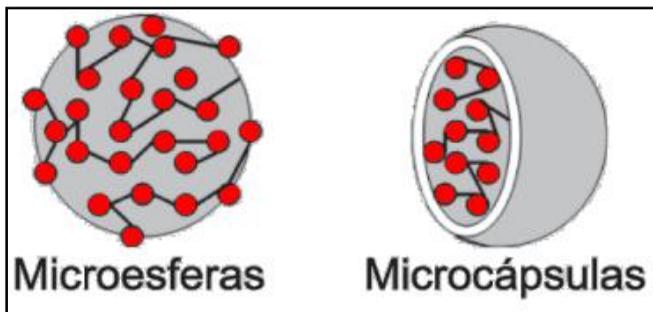
compostos ativos, para a indústria de alimentos (FRASCARELI et al., 2012b; RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012).

Em termos de classificação por tamanho, as partículas podem ser classificadas como macropartículas ($> 5000 \mu\text{m}$), micropartículas ($0,2-500 \mu\text{m}$) e nanopartículas ($< 0,2 \mu\text{m}$) (BAKER, 1986; AZEREDO, 2005). Além de apresentarem diversos tamanhos, os materiais de uma encapsulação podem resultar em diversos formatos, classificando-se em duas categorias.

A primeira categoria é chamada de sistema do tipo reservatório, e abrange as cápsulas nas quais o recheio é circundado por um filme contínuo e definido, e nitidamente concentrado na região central (KING, 1995; McNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998; MARTIN DEL VALLE 2004). Essa mesma categoria, pode ainda ter mais de um núcleo, ou ter várias paredes protegendo um mesmo núcleo, caracterizando-se pelas “verdadeiras microcápsulas” (CONSTANT; STRINGHETA, 2002).

Na segunda categoria há o sistema matricial, em que as partículas possuem o recheio disperso uniformemente em uma matriz, caracterizando-se por “microesferas”. Apesar das microesferas expor em sua superfície uma pequena fração do material encapsulado, diferenciando-se assim das microcápsulas, o termo encapsulação engloba as duas categorias (DEPYPERE et al., 2003; PIMENTEL; JACOME JUNIOR, 2007). Na Figura 3 pode ser observado um esquema ilustrativo diferenciando uma microcápsula de uma microesfera, sendo ambas consideradas micropartículas.

Figura 3: Modelo ilustrativo de uma microesfera e uma microcápsula.



Fonte: Pimentel, Jácome Júnior, Mosqueira e Magalhães (2007).

1.2.1. Métodos de encapsulação

Diversas operações unitárias podem ser utilizadas para a encapsulação como, por exemplo, a atomização, liofilização, extrusão, inclusão molecular, coacervação, secagem em tambor, leite fluidizado entre outras (AZEREDO, 2005). Na seleção do método mais adequado para a encapsulação de certo composto em uma determinada matriz, deve-se levar em consideração fatores como: a aplicação do produto final, as propriedades físico-químicas do núcleo e da matriz, a escala de produção, o tamanho da partícula, o mecanismo de liberação desejado e o custo (RÉ, 1998).

Dentre as mais variadas técnicas existentes a tecnologia de atomização ou também chamada do inglês *spray drying*, que se destaca pela produção de partículas de boa qualidade, pela sua flexibilidade, onde a matriz pode ser trocada (RÉ, 1998; DESAI; PARK, 2005), pelo seu baixo custo e pela disponibilidade dos equipamentos no mercado (GOUIN, 2004). Devida à demanda de fatores que facilitam o emprego da secagem por atomização, esta é a técnica mais utilizada atualmente pela indústria, no processo de microencapsulação de alimentos (BRASILEIRO, 2011; FAVARO-TRINDADE, 2011), tornando-se promissora no desenvolvimento de novos materiais microencapsulados.

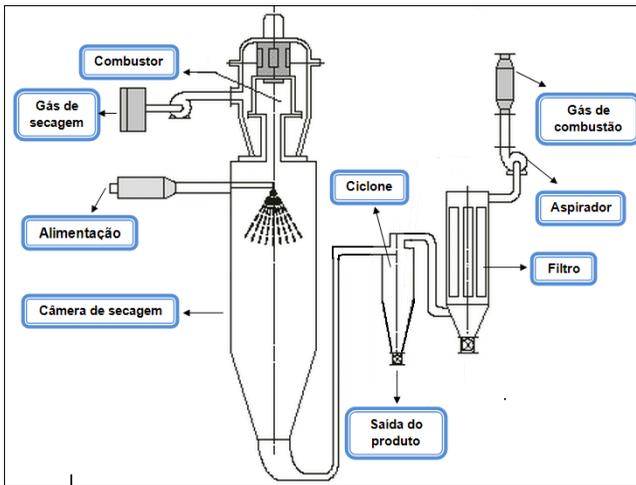
1.2.1.1. Secagem por atomização

Utilizada desde a década de 1930 para preparar as primeiras partículas de sabor, o método de atomização é a técnica mais antiga empregada na tecnologia de encapsulação (DZIEZAK, 1988). Essa metodologia, baseia-se em envolver compostos bioativos em materiais de parede que possam lhe fornecer proteção contra efeitos do meio ambiente como a luz, o oxigênio atmosférico entre outros fatores que possam provocar sua degradação, garantindo assim sua estabilidade química e física (FUCHS et al.2006; KHA et al., 2010).

A secagem por atomização é uma operação unitária, amplamente utilizada na indústria, para a desidratação de alimentos pastosos e líquidos como, por exemplo, o leite (MOREIRA, 2007), para secagem de micropartículas já preparadas com outra metodologia, e na produção de micropartículas (BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992). Além da indústria de alimentos, essa tecnologia é aplicada pelas indústrias químicas, farmacêuticas e cosméticas (FUCHS et al., 2006; KHA et al., 2010).

O atomizador é constituído basicamente de uma câmara, onde o fluido a ser desidratado sofre aspersão ou atomização, através de bicos ou discos atomizadores, e recebe uma corrente de ar aquecido, sendo despejado em uma câmara de secagem com pressão reduzida, suficiente para evaporação da água presente no mesmo, promovendo a formação de partículas (MOREIRA, 2007). A Figura 4 ilustra um diagrama de um secador por atomização.

Figura 4: Representação gráfica do atomizador Hosokawa Bepex



Fonte: Zbicinski, Smucerowicz, Strumillo e Crowe (2000).

O método de encapsulação através do secador por atomização é um processo contínuo, que pode ser exemplificado assim: a primeira etapa é a preparação de uma emulsão ou dispersão, onde o material de recheio, geralmente hidrofóbico, é emulsionado em uma solução aquosa ou a matriz é dispersa. Em seguida, a emulsão, óleo em água, resultante sofre a segunda etapa onde é homogeneizada, e depois bombeada através de um atomizador para uma câmara de alta temperatura com pressão reduzida (MUTKA; NELSON, 1988). No interior da câmara acontece a terceira etapa, a atomização das partículas, que ocorre à medida que estas são lançadas no meio gasoso, tomando uma forma esférica com a fase aquosa empacotada pela fase oleosa. Por fim, as partículas formadas pela atomização são desidratadas através do fluxo de ar quente que promove a evaporação da água presente, em alta

velocidade e com baixa pressão (DZIEZAK, 1988; LAOHASONGKRAM; MAHAMAKTUDSANEE; CHAIWANICH SIRI, 2011).

A rápida evaporação da água na etapa de desidratação devido à alta relação da área de superfície com o volume das partículas, bem como a baixa pressão não deixa com que o núcleo ultrapasse a temperatura de 100 °C, reduzindo assim alterações das propriedades de compostos termossensíveis (MUTKA; NELSON, 1988). Segundo Li et al. (2010) o rendimento da secagem em nível laboratorial atinge cerca de 50 a 70 % e em geral as partículas obtidas possuem o núcleo distribuído na forma de micropartículas no material encapsulante, mas fatores como a taxa de alimentação, fluxo de gás, e concentração de gás podem influenciar na morfologia da mesma. A liberação do material bioativo nestas partículas, do tipo matricial, é geralmente associada à ação de solventes ou através da difusão (RÉ, 1998).

Apesar do desenvolvimento de metodologias para encapsular compostos bioativos, a microencapsulação por atomização/pulverização continua sendo a técnica mais utilizada pela indústria de alimentos (BRASILEIRO, 2011; FAVARO-TRINDADE, 2011). Essa preferência pelas indústrias deve-se a grande gama de vantagens oferecidas por esta técnica como: a possibilidade de trabalhar com materiais termolábeis, a formação de partículas pequenas e de boa qualidade (DZIEZAK, 1988), a flexibilidade no uso de matrizes variadas e o baixo custo (RÉ, 1998; DESAI, 2005).

Abbasi, Emam-Djomeh, Mousavi e Davoodi (2014) apontam que a redução, ou remoção de gordura de alimentos processados é desejável em uma dieta saudável, porém este processo resulta na eliminação de vários micronutrientes tais como vitaminas lipossolúveis. Além da redução das gorduras muitos processos industriais eliminam vitaminas da composição de seus produtos, pois estas apresentam sensibilidade a diversos fatores do meio ambiente (ABBASI et al., 2014) sendo a aplicação da vitamina D em produtos líquidos muito difícil, devido a sua natureza termosensível e hidrofobicidade.

A presença destes micronutrientes é essencial para saúde humana, estudos realizados por Pettifor e Prentice em 2011, declaram que a presença de vitamina D em níveis adequados pode prevenir doenças como diabetes, esclerose múltipla e câncer. A microencapsulação através do *spray drying* é uma alternativa para manter a estabilidade das vitaminas em processos realizados na indústria alimentícia, e mascarar possíveis sabores ou odores estranhos da mesma (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010).

Segundo Brazel (1999) o material de parede de uma cápsula de vitamina deve liberar seu núcleo no intestino ou no estômago, ou seja, após a ingestão, mantendo assim todas as propriedades do composto bioativo. Ainda segundo Gonnet et al. (2010) para proporcionar a liberação da vitamina no momento ideal, as matrizes são geralmente materiais hidrofóbicos como, por exemplo, as ceras, mas muitos derivados de proteínas com ligações cruzadas e celulose também vêm sendo utilizados com a finalidade de promover liberação entérica.

Para a realização do processo de microencapsulação de óleos, assim como algumas vitaminas, é necessário que seja produzido um sistema emulsionado do tipo óleo/água, onde são formadas as gotas, que darão origem às micropartículas. Portanto, a estabilidade da emulsão e o tamanho das gotas tem um papel importante na eficiência da encapsulação de óleos (RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012).

De acordo com Gouin (2004), materiais como goma arábica, maltodextrina, amidos modificados, e proteínas de soro de leite e de soja são aplicados na microencapsulação de óleos. As proteínas de soro de leite, além de ser um coproduto da fabricação de alimentos lácteos, apresentam boa atividade emulsificantes, revelando-se promissoras para a indústria de alimentos na formulação de emulsões e no desenvolvimento de micropartículas para proteger e aplicar compostos bioativos (FRASCARELI et al., 2012b; RODEA-GONZÁLEZ et al., 2012;).

1.3. Proteína isolada de soro de leite

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias, é um fluido viscoso, que se apresenta como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis, e a descontínua é formada, principalmente de micelas de caseína e de glóbulos de gordura. Esta emulsão é considerada o único alimento que satisfaz as necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie mamífera (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2005).

Do ponto de vista comercial, o leite bovino é o mais importante, podendo ser comercializado em sua forma desidratada, leite em pó, ou na forma líquida integral ou desengordurada e pasteurizada ou esterilizada (SGARBIERI, 2004). Sua composição engloba água e sólidos totais distribuídos em minerais, vitaminas, gorduras, açúcares e proteínas (SGARBIERI, 2005). As proteínas são os compostos mais valorizados do leite, devido à suas propriedades nutritivas derivadas de sua composição em aminoácidos (CHEFTEL et al., 1989), e das

propriedades físico-químicas, que são de grande interesse tecnológico, como absorção e retenção de água e de gordura, capacidade espumante e estabilidade de espuma, solubilidade, geleificação, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis e formação de micropartículas (MODLER, 2000).

As proteínas presentes no leite diferem por suas propriedades físico-químicas, podendo ser classificadas em: proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento, caseínas e proteínas do soro (LOURENÇO, 2000). As principais proteínas presentes no soro de leite bovino são β -lactoglobulina (β -LG), α -lactalbumina (α -LA), Imunoglobulinas (IG), Lactoferrina (LF), Albumina sérica bovina (ASB), e Lisozima (SGARBIERI, 2005). As quantidades relativas destas proteínas presentes no leite bovino e humano são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das principais proteínas do soro de leite bovino e humano.

Proteínas de soro (g/L)	Leite bovino	Leite humano
Proteínas totais	5,6	5,0
β -lactalbumina	3,2	Traços
α -lactalbumina	1,2	2,8
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Traços	0,4

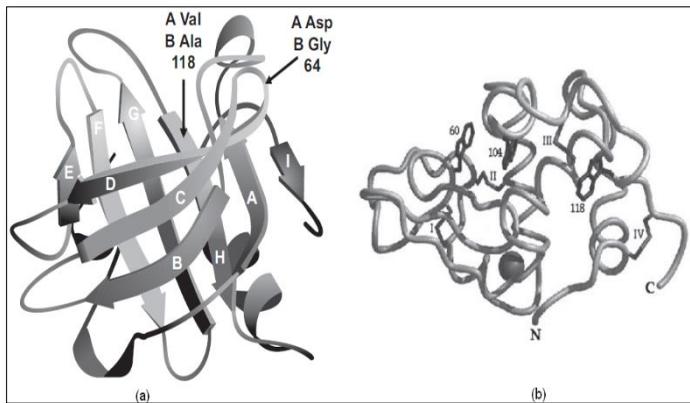
Fonte: Sgarbieri (2005) (adaptado).

A β -lactoglobulina é o principal componente protéico do soro de leite bovino, seu papel fisiológico ainda é pouco conhecido. Sabe-se que ela apresenta um efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa, devido ao efeito antioxidante do grupo tiol presente em sua estrutura (DAI-DONG et al., 1990). Segundo Nagoka et al., (2001) peptídeos derivados da β -LG bovina podem influenciar fortemente no nível de colesterol sérico. Vários estudos têm sido feitos com o propósito de definir os sítios de ligação existentes na β -LG, para o retinol, pois em 1972, Futterman e Heller, demonstraram que a β -LG bovina, forma complexos com o retinol, solúveis em água, mas um consenso ainda não foi alcançado (JANG; SWAISGOOD, 1990).

Tratando-se de uma proteína termossensível, a β -lactoglobulina possui uma conformação estrutural bem elucidada por: BROWNLOW et al. (1997) apresentando uma estrutura característica da família de proteínas denominadas lipocalinas onde nove segmentos em folhas β antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de barril achatado, ou cálice de caráter hidrofóbico. Esse cálice confere a esta proteína a capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor, que compreendem propriedades funcionais de grande aplicação na indústria de alimentos (MORR; FOEGEDING, 1990).

A α -lactoglobulina é uma metaloproteína com caráter hidrofóbico, que se liga em íons metálicos como o cálcio e o zinco. Possui uma estrutura globular com quatro ligações dissulfeto e resíduos de aminoácidos, sendo a mais estável dentre as proteínas do soro, devido a sua capacidade de se ligar ao Ca^{2+} (BREW, 2003). A Figura 5 ilustra a estrutura terciária da α -lactoglobulina e da β -lactoglobulina.

Figura 5: Estrutura das proteínas: (a) Estrutura Terciária da β -Lactoglobulina (b) Estrutura tri-dimensional nativa da α -Lactoalbumina mostrando os terminais N e C, o átomo de cálcio ligado (esfera) e as quatro pontes dissulfeto.



Fonte: Sgarbieri (2004).

A função biológica da α -LA baseia-se na “modificação” da especificidade de uma enzima responsável pela síntese da lactose nas glândulas mamárias, a enzima D-glicose 4- β -galactosil transferase (POPPI FA et al., 2010). Trabalhos de autores suecos apontam a capacidade da α -LA de destruir células cancerígenas em condições

específicas de pH e na presença de ácido oleico (EUGENE; BERLINER, 2000).

A albumina sérica bovina representa de 15 a 20 % das proteínas presentes no soro bovino. Sua estrutura é caracterizada pela presença de ligações dissulfeto e de um grupo sulfidrilo (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006). As demais proteínas presentes no soro de leite bovino também exercem funções importantes como a ação imunológica das imunoglobinas (HURLEY, 2003), e a antiviral antifúngica e antiparasitária da Lactoferrina (LOONERDAL, 2003).

Além das proteínas, o soro de leite bovino apresenta lipídeos, lactose, ácido láctico, ácido cítrico, compostos nitrogenados não proteicos como o ácido úrico, vitaminas do complexo B e sais minerais como o cálcio, principalmente o fosfato de cálcio, cloreto de cálcio e de sódio e outros (GONZÁLEZ SISO, 1996; PANESAR et al., 2007).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou na indústria, através da precipitação ácida do leite, no pH isoeletrico, resultando em caseinatos e no soro ácido, pelo processo enzimático gerando o soro doce, ou através da microfiltração das micelas de caseína, obtendo-se micelas concentradas e proteínas na forma de concentrado ou isolado proteico (CAUSSIN; FAMELART; FAUQUANT; MAUBOIS, 2001; ZINSLY et al., 2001; ORDÓÑEZ et al., 2005).

O soro doce e o soro ácido diferem principalmente pelo conteúdo mineral e pela acidez (KOSSEVA et al., 2009). O soro doce, por ser resultado da ação de enzimas sobre a caseína contém maior quantidade de aminoácidos livres, lactose e peptídeos (TULLIO, 2007), sendo muito empregado na área alimentícia (MIZUBUTI, 1994). Já o soro ácido é pouco empregado pela indústria, pois seu forte sabor ácido não é muito aceito pelo público consumidor (VIEIRA, 2006). Sua aplicação baseia-se na suplementação de sucos de frutas ácidas e na coagulação na produção de “*queso blanco*”.

1.4. Reticulação

A natureza hidrofóbica dos agentes encapsulantes proteicos limita a sua aplicação como matriz no processo de encapsulação de compostos bioativos que requerem barreira à umidade. Visando melhorar as propriedades funcionais das proteínas para aumentar sua aplicabilidade, são realizadas modificações químicas e enzimáticas, que favorecem a incorporação de ligações inter e intramoleculares por

ligações cruzadas covalentes em proteínas (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

1.4.1. Reticulação química

As modificações das propriedades funcionais de diversas proteínas são realizadas comumente através de reagentes químicos, porém a maioria destes tem potencial toxicológico limitando suas aplicações em produtos alimentícios. Dentre os reticulantes químicos mais utilizados destacam-se o formaldeído, glioxal (SELLING; WOODS; BISWAS, 2010), o glutaraldeído já aplicado em proteína de soro de leite (LEE; ROSENBERG, 1999) entre outros. Devido à origem natural das enzimas, a reticulação enzimática é mais aceitável de que a química, tanto para autoridades regulatórias quanto pelo consumidor (NONAKA et al., 1989).

1.4.2. Reticulação enzimática

Devido ao potencial toxicológico da utilização de reagentes químicos para obter ligações cruzadas e melhorar as propriedades funcionais das proteínas, muitos estudos vêm aplicando as enzimas para promover reações de reticulação com proteínas. Responsáveis por ampliar o número de coesões da matriz polimérica e conseqüentemente, o grau de ligações intramoleculares e intermoleculares, as reações enzimáticas provocam alterações nas propriedades funcionais da matriz como, por exemplo, a diminuição da solubilidade e da permeabilidade ao vapor de água (CARVALHO; GROSSO, 2006).

Dentre as enzimas mais utilizadas nesta reação, destaca-se a enzima transglutaminase (TGase) (EC 2.3.2.13), aplicada em estudos de reticulação com várias proteínas como gelatina (BAE et al., 2009), proteína de ervilha (SUN; ARNTFIELD, 2012), proteína de soja, (ZHU; RINZEMA; TRAMPER; BOL, 1995; YOKOYAMA; KIKUCHI, 2004) e, proteína de soro de leite (GAUCHE et al., 2008) entre outras aplicações.

1.4.2.1. Enzima transglutaminase

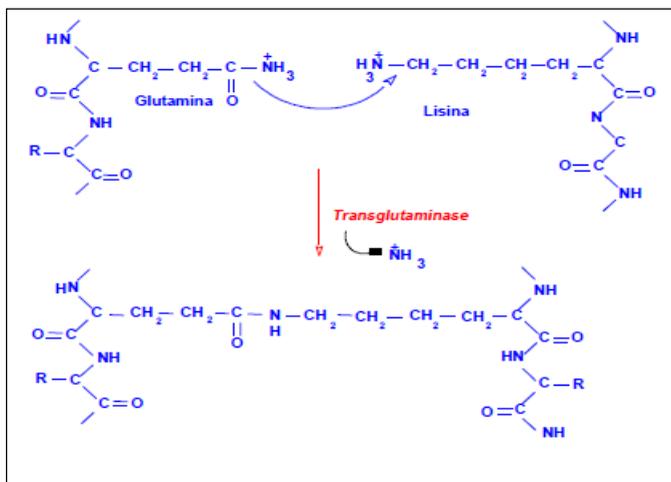
Conhecida pelo nome sistemático de proteína-glutamina gama-glutamil-transferase, e presente naturalmente na maioria dos fluídos corporais, e nos tecidos animais (LORAND, 2002), a enzima transglutaminase pode modificar as propriedades funcionais de proteínas

vegetais e animais, conferindo-lhes melhores aspectos reológicos e sensoriais (NIELSEN, 1995). Essa modificação pode ocorrer por meio de ligações cruzadas, incorporação de aminas e desaminação (MOTOKI; SEGURO, 1998).

A enzima TGase é um agente reticulante, pois é catalisadora da reação de acil – transferência, entre os acil-doadores, grupos γ -carboxiamídico, resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica, e os acil-receptores, aminas primárias, incluindo os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina em certas proteínas, atuam como acil-receptores, como apresentado na figura 6 (NIELSEN,1995; ZHU et al.,1995).

Quando ocorre a ligação chamada de ϵ - (γ -glutamil) lisina, resultado da ação aceptor de uma amina terminal de um resíduo de lisina, ocorre à formação de ligações cruzadas entre cadeias proteicas, ou seja, uma reação de polimerização, provocando alterações nas propriedades físicas das proteínas (ZHU et al.,1995).

Figura 6: Modo de ação geral da enzima transglutaminase



Fonte: Macedo e Sato (2005).

Quando os resíduos de lisina ou outras aminas primárias estão ausentes, a água comporta-se como nucleófilo da reação, resultando na desaminação, e na mudança de carga da proteína, devido à ampliação no número de resíduos carboxílicos. No entanto, quando a lisina está livre

durante a reação, aminas são incorporadas nas cadeias proteicas, alterando a hidrofobicidade da superfície (ZHU et al., 1995).

No processamento de alimentos, a enzima transglutaminase é um ingrediente conhecido e bastante aplicado, pois confere características únicas aos alimentos, de forma segura. Dentre as mais variadas aplicações destacam-se, por exemplo, a adição da enzima na formulação de pães, que aumenta o volume e a consistência do mesmo (COLLAR; BOLLAÍN; ANGIOLONI, 2005).

Para fins industriais e pesquisas tecnológicas, a enzima transglutaminase pode ser obtida através de três fontes. A primeira fonte baseia-se na extração e purificação de fluidos e tecidos corporais de animais que fazem parte da alimentação humana, como por exemplo, pescados, bovinos e suínos. A segunda forma de obtenção da enzima a manipulação genética utilizando micro-organismos hospedeiros, leveduras ou *Aspergillus* (MACEDO; SATO, 2005).

A terceira maneira de obter a enzima transglutaminase é a realização de um “screening” através de um micro-organismo produtor de TGase gerando assim uma enzima transglutaminase microbiana (MTGase). Recentemente as MTGase estão sendo muito utilizadas pela indústria alimentícia, devido a capacidade de formação de ligações cruzadas com grande parte das proteínas dos alimentos como por exemplo proteínas de ovos, caseínas, glutens, miosinas entre outras, o que possibilita inúmeras aplicações em alimentos (MACEDO; SATO, 2005).

1.4.2.2. Reticulação da proteína isolada de soro de leite com a enzima transglutaminase

A Transglutaminase é aplicada como agente de reticulação em proteínas de soro de leite, com a finalidade de realizar ligações cruzadas com as proteínas presentes em maior proporção como a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina. Porém estudos apontam que após o período de incubação da TGase com o soro de leite, são observadas ligações cruzadas fortes com a proteína α -lactoalbumina e fracas com a β -lactoglobulina (FAERGEMAND; OTTE; QVIST, 1997).

Essa diferença de interação entre a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina com a enzima transglutaminase pode ser explicada pela maior disponibilidade de resíduos de lisina e glutamina da α -lactoalbumina, que favorecem a formação de ligações cruzadas com maior intensidade (FAERGEMAND; OTTE; QVIST, 1997).

1.5. Comportamento reológico do soro de leite

O comportamento reológico de soluções de proteínas isoladas de soro de leite é característico de um fluido Newtoniano, preparadas a 2 a 8 % (m/m), quando a concentração é aumentada para 10 a 24,5 % (m/m) o comportamento pseudoplástico e a tensão de cisalhamento requerida aumenta. Em soluções com concentrações de 32 % além do comportamento pseudoplástico, apresentam comportamento tixotrópico (LIZARRAGA, 2006).

Quando submetidas a reações de polimerização com a transglutaminase algumas alterações no comportamento reológico já foram analisadas, como por exemplo, a temperatura de gelificação das proteínas, que ao sofrerem reação de reticulação com a transglutaminase, apresentam uma temperatura de geleificação levemente menor de que as proteínas não reticuladas com a enzima (TRUONG et al., 2004).

Para determinar o comportamento de fluxo das proteínas de soro de leite reticuladas com a transglutaminase Wilcox e Swaisgood (2002) analisaram a viscosidade intrínseca e de cisalhamento antes da formação de gel. Os dados obtidos apontaram um aumento da viscosidade intrínseca indicando a formação de biopolímeros maiores e menos esféricos. A partir da aplicação do modelo da Lei da Potência na curva de tensão de cisalhamento versus taxa de deformação foram obtidos o índice de consistência (K) e de comportamento de fluxo (n), que se aproximou do valor zero, indicando o comportamento de fluido não Newtoniano (WILCOX; SWAISGOOD, 2002).

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, M. A. E.; DAVOODI, D. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v.143, p.379-383, 2014.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O. ; RODRIGUES, P. H. J.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; De CARVALLHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de Coprodutos. **Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ANDRADE, C. T.; NASSER, R. O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 315-321, 2005.
- ANTUNES, A.J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: Manole, p. 135, 2003.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BAE, H. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R.M.;PARK, H.J.; WHITESIDE, W.S. Effects of transglutaminase- induce cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film. **Food Chemistry**, v.114, p.180-1899, 2009.
- BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. New York: John Wiley & Sons, p.206-214, 1986.
- BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. C. - Vitamina D: Uma Abordagem Molecular. **Pesquisa Brasileira de Odontopediá Clínica Integrada**, n.7, p.309-315, 2007.
- BETZ, M.; STEINER, B.; SCHANTZ, M.;OIDTMANN, J.;MÄDER, K. RICHLING, E. ; KULOZIK, U. Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. **Food Research International**, v.47, p. 51–57, 2012.

BIANCO, A.C.; LAZARETTI, C.M. Fisiologia do metabolismo osteomineral. In: Aires MM, editor. **Fisiologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 870, 1999.

BOUILLON R, CARMELIET G, VERLINDEN L, VAN ETTEN E, VERSTUYF A, LUDERER HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrinol Review**, n. 29, v.6, p.726-76, 2008.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263-272, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 31, de 13 de janeiro de 1998. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1-E, p.4. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em 27 de agosto de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 agosto, sec.1, p.7, 2005.

BRASILEIRO, J. S. L. Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BRAZEL, C. S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

BREW, K. A–Lactalbumina. In: Fox PF, Mcsweeney PLH. Advanced dairy chemistry: proteins. New York: **Kluwer Academic**; 2003.

BROADHEAD, J.; ROUAN, E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.18, p. 1169 – 1206, 1992.

BROWNLOW, S.; MORAES, C. J.H.; COUPER, R.; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; *et al.* Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin. **Food Structure**, v.5481-95, 1997.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C.R.F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, n.26, v.3, p.495-501, 2006.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. Proteínas alimentícias. Zaragoza: Editora Acribia, p. 346, 1989.

COLLAR, C.; BOLLAÍN, C.; ANGIOLONI, A. Significance of microbial transglutaminase on the sensorial, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 479-488, 2005.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência Tecnologia Alimentos**, v.36, n.1, p.12-18, 2002.

COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**. Vitaminas. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 239 – 242.

DAI-DONG, J.X.; NOVAK, G.; HARDY, J. Stabilization of vitamin C by β -lactoglobulin during heat treatment. **Science des Aliments**, v.10 p. 393, 1990.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science Policy**, v.1, n.2, p.75-94, 2003.

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

DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for α -carotene encapsulation and preservation, **Journal Food Science**, v.62, n.6, p.1158-1162, 1997.

de SOUZA, G. P.; de PAIVA, P. G. A.; de MEDEIROS, P. M.; SZEJNFELD, V.L.; ARAÚJO, M. L. Relationship between nutrient intake and vitamin D status in osteoporotic women. **International Journal Vitamin Nutrition Research**. n.77, v.6, p.376-81, 2007.

DIARRASSOUBA, F.; REMONDETTO, G.; LIANG, L.; GARRAIT, G.; BEYSSAC, E.; SUBIRADE, M. Effects of gastrointestinal pH conditions on the stability of the b-lactoglobulin/vitamin D3 complex and on the solubility of vitamin D3. **Food Research International**, v.52, p. 515 – 521, 2013.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, p. 929–935, 2009

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-151, 1988.

EISSA, A. S.; KHAN, S.A.; Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 543-547, 2006.

EUGENE, A.; BERLINER, L. J. α -lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, n.473, v.3, p.269-74, 2000.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca^{2+} -independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 1997.

FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, p. 239-254, 2011.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática. 2ed. Porto Alegre: Artmed, p.602, 2006.

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G.H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 402-409, 2005.

FIORUCCI, A. R. BENEDETTI FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em sistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, Novembro, p. 10-16, 2005.

FRASCARELI, E. C. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 413-424, jul. 2012b.

FUCHS, M.;TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M.E.; ORDONNAUD, C.;PEYRAT-MAILLARD, M.N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 27 – 35, 2006.

GAUCHE, C. VIEIRA, J.T.C., OGLIARI, P.J., BORDIGNON-LUIZ, M.T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v.43, p. 788-794, 2008.

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

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

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

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v.146 p. 276–290, 2010.

GONZÁLEZ,D.A.R.;OLIVARES,J.C.;GUERRERO,A.R.;HUEZO,M.R .R.;CARTER,E.J.V.; ALONSO,C.P. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 102–109, 2012.

GONZÁLEZ SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

GULLAND, J. C.; LEQUEU, B. As **Vitaminas: Do nutriente ao medicamento**. 1ª Edição. São Paulo: Santos, 1995, 357p.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-88, 2006.

HEANEY R. P.; ARMAS, L.A.G; SHARY, J.R.; BELL, N.H.; BINKLEY, N.; HOLLIS, B.W. 25-hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. **American Journal Clinical Nutrition**, v.87, n.6, p. 1738-42, 2008.

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

HURLEY, W.L. Immunoglobulins in mammary secretions In: Fox PF, McSweeney PLH. *Advanced dairy chemistry: proteins* New York: Kluwer Academic; 2003.

ISLABÃO, N. **Vitaminas: Seu Metabolismo no homem e nos animais domésticos**. São Paulo, Nobel, p.201, 1978.

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

JAMES, W.P. 22nd Marabou Symposium: the changing faces of vitamin D. **Nutrition Review**, v.66, n.5, p.286-90, 2008.

JANG, H.; SWAISGOOD, H. Analysis of ligand binding and β -lactoglobulin denaturation by chromatography on immobilized trans-retinal. **Journal Dairy Science**, v.73, p.2067-2074, 1990.

JONES, B. J.; Twomey, P.J. Issues with vitamin D in routine clinical practice. **Rheumatology**, v. 47, p.1267-68, 2008.

KAREL, M.; LANGER, R. Controlled release of food additives. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. *Flavor encapsulation*. Washington, DC: ACS, p.29-36, 1988.

KHA, T. C.; GUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 385 – 392, 2010.

KIMBALL, S.; FULEIHAN, G. H. VIETH, R. Vitamin D: a growing perspective. **Critical Reviews Clinical Laboratory Science**, v.45 n.4, p.339-414, 2008.

KING, A.H. Encapsulation of food ingredients. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, (ACS Symposium. Series, 590), p.26-39, 1995.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P.S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.437-447, 2009.

KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.

LAOHASONGKRAM, K.; MAHAMAKTUDSANEE, T.; CHAIWANIC HSIRI, S. Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. **Procedia – Food Science**, v. 1, p. 1660 – 1665, 2011.

LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked wheyprotein-based microcapsules containing theophylline. **Journal of Controlled Release** v. 61, p. 123–136, 1999.

LE MAUX, S.; GIBLIN, L.; CROGUENNEC, T.; BOUHALLAB, S.; BRODKORB, A. Beta-lactoglobulin as a molecular carrier of linoleate: characterization and effects on intestinal epithelial cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p. 9476-9483, 2012.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative

new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304 – 310, 2010.

LIANG, L.; TREMBLAY-HEBERT, V.; SUBIRADE, M. Characterisation of the b-lactoglobulin/a-tocopherol complex and its impact on atocopherol stability. **Food Chemistry**, v.126, p. 821- 826, 2011.

LICHTENSTEIN A.; FERREIRA, J.M; SALES, M. M.; AGUIAR, F. B.; FONSECA, L. A. M.; SUMITA, N. M.; DUARTE, A. J. S. Review article: Vitamin D: non-skeletal actions and rational use **Revista da Associação médica brasileira**, v. **59**, p.495-506, 2013.

LIZARRAGA, M. S.; PIANTE VICIN, D.De; GONZÁLEZ, R.; RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L.G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 740-748, 2006.

LOONERDAL, B. LACTOFERRIN. In: Fox PF, McSweeney PLH *Advanced dairy chemistry: proteins*. New York: Kluwer Academic; 2003.

LORAND, L. Transglutaminase: Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 7-12, 2002.

LOURENÇO, E. J. Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, 2000.capítulo 5, p.179-231.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 413-419, 2005.

MAEDA, S.S.; KUNII, I. S.; HAYASHI, L.; LAZARETTI-CASTRO, M.. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v.40, n.12, p. 1653-1659, 2007.

MARQUES, C. D. L. DANTAS, A. T.; FRAGOSO, T. S.; DUARTE, A. L. B. P. Art. Importâncias nos níveis de vitamina D nas doenças

aotoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.1, p.67-80, 2010.

MARTIN DEL VALLE, E.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v.39, n.9, p.1033- 1046, 2004.

MAUBOIS, J. L.; FAUQUANT, J.; FAMELART, M. H.; CAUSSIN, F. Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives. *In: Proceedings of the 3rd International Whey Conference*; 2001; Munich. Chicago: American Dairy Products Institute; p.59-72, 2001.

MCNALLY, D. J. Vitamin D as a modifiable risk factor in critical illness: questions and answers provided by observational studies. **Journal Pediatric**, v.90, n.2, p.99-101, 2014.

McNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.46, p.4551-4555, 1998.

MENEZES, A.C.S. Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (*Spondias Mombin L.*) com potencial atividade probiótica. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). Food proteins: processing applications. Wiley-VCH, Inc. p.1-21, 2000.

MOREIRA, G. E. G. Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola. 2007. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio do Norte, Natal, 2007.

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, p.100-12, 1990.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

MUTKA, J.R.; NELSON, D.B. Preparation of encapsulated flavors with high flavor level. **Food Technology**, v.42, n.4, p.154-157, 1988.

NAGOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. **Biophysical Biochemical Research Communications**, v. 281, p.11-17, 2001.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806 – 1815, 2011.

NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnol**, v.9, p.119-156, 1995.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} - independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619- 2623, 1989.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnología de alimentos - Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p 279, 2005.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: ArtMed, v.1, 2005. 294p.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p.1-14, 2007.

PÉREZ-ALONSOA, C.; BÁEZ-GONZÁLEZA, J. G.; BERISTAINB, C. I.; VERNON-CARTERA, E. J.; VIZCARRA-MENDOZA, M. G. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v.53, n.2, p.197-203, 2003.

PETERLICK, M.; CROSS, H. S. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. **European Journal Clinical Investigation**, v.35, n.5, p.290-304, 2005.

PETERS, B. S. E.; DOS SANTOS, L. C.; FISBERG, M.; WOOD, R. J.; MARTINI L. A. Prevalence of vitamin D insufficiency in Brazilian adolescents. **Annals Nutrition Metabolism**, v.54, n.1, p.15-21, 2009.

PETTIFOR, J. M.; PRENTICE, A. The role of vitamin D in paediatric bone health. Best. **Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.25, p. 573–584, 2011.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; MAGALHÃES, N. S. S.; Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 43, n. 4, 2007.

PIMENTEL, L. F.; JUNIOR J. ; TAVARES, A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira Ciência Farmacêutica**, v.43, n.4, p. 503-514, 2007.

POPPI FA, COSTA MR, DE RENSIS CMVB, Sivieri K / UNOPAR Artigo de revisão Soro de Leite e Suas Proteínas: Composição e Atividade Funcional Whey and its Proteins: Composition and Functional Activity **Científica Ciências Biológicas Saúde**, v.12 n.2, p.31-7, 2010.

POTHAKUMARY,U.R.;BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Trends in Food Science Technology**, v.6, p. 397–406, 1995.

PSZCZOLA, D. Encapsulated ingredients: Providing the right fit. **Food Technology**, v. 52, n.12, p. 70–76, 1998.

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

RISCH, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, (ACS Symposium. Series, 590) p.2-7, 1995.

RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 102-109, 2012.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; MALCATA, F.X.; LOBO, J.M.S.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; FREITAS, A.C. On the viability of five probiotic strains when immobilised on various polymers. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 137-144, 2011a.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011b.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.1288-1294, 1990.

ROSENBERG, M.; SHEU, T.Y. Microencapsulation of volatiles by spray - drying in whey protein-based wall systems. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 273-284, 1996.

RUIZ-IRASTORZA, G.; EGURBIDE, M.V.; OLIVARES, N.; MARTINEZ-BERRIOTXOA, A.; AGUIRRE, C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. **Rheumatology**, v. 47, p.920-3, 2008.

SARAIVA G. L.; CENDOROGLO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAUJO, L. M.; VIEIRA, J. G.; KUNIII, et al. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23 degrees 34'S), **Brazilian Osteoporosis International**, v.16, p.1649-1654, 2005.

SARAIVA, G. L.; CENDOROGLIO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAÚJO, L. M. Q.; VIEIRA, J. G. H.; MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; KUNII, I.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatiroidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, vol.51, n.3, p. 437-442, 2007.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite **Review Nutrition**, v.17, n.4, p397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações. São Paulo: Varela; p.517, 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.

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

SHARMA, R.; LORENZEN, P.C.; QVIST, K.B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 785-793, 2001.

SHIRAI, M.A.; OLIVATO, J.B.; GARCIA, P.S.; MÜLLER, C.M.O.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Thermoplastic starch/polyester films: Effects of extrusion process and poly (lactic acid) addition. **Materials Science and Engineering**, v.33, p.4112-4117, 2013.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.116-122, 2006.

SOARES, F.C.; YAMASHITA, F.; MÜLLER, C.M.O.; PIRES, A.T.N. Effect of cooling and coating on thermoplastic starch/poly (lactic acid) blend sheets. **Polymer Testing**, v.33, p.34-39, 2014.

SUN, X.D., ARNTTFIELD, S. D. Gelation properties of myofibrillar/pea protein mixtures induced by transglutaminase crosslinking. **Food Hydrocolloids**, v.27, p. 394-400, 2012.

TULLIO, L. T. Isolamento e Caracterização do Glicomacropéptido do Soro de Leite. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Programa de pós-graduação em Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Paraná, PR.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.133–143, 2007.

TRUONG, V.D.; CLARE, D.A.; CATIGNANI, G.L.; SWAISGOOD, H.E. Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1170-1176, 2004.

VIEIRA, A. A. M. T. **Estudo da Hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Lactozym e prozyn**. 2006. 77f. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

VIOTTO, H. W.; ROIG, S. M. Efeito de pré-tratamento no fluxo de permeado durante ultrafiltração de soro de queijo. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, n.28, v.1, p.47-55, 1994.

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v.426, p. 211– 218, 2012.

ZBICINSKI, I.; SMUCEROWICZ, I.; STRUMILLO, C.; CROWE, C. Application of pulse combustion technology in spray drying process. **Brazilian Journal Chemistry Engineering**, v.17, p.4-7, 2000.

ZINSLY, P. F.; SGARBIERI, V.C.; PEREIRA DIAS, N.F.G.; Jacobucci HB, Pacheco MTB, Baldini VLS. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal Food Technology**, v.4, p.1-8, 2001.

ZORILLA, R.; LIANG, L.; REMONDETTO, G.; SUBIRADE, M. Interaction of epigallocatechin-3-gallate with b-lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 629 - 644, 2011.

ZHU, G. Y.; XIAO, Z. B.; ZHOU, R.J. F.; YI, P. Adv. Mater. Res. 2012, 440, 535. VASBINDER, A. J.; ALTING, A. C.; VISSCHERS, R. W.; DE KRUIF, C. G. Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. **International Dairy Journal**, v.13, p. 29–38, 2003.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 277-282, 1995.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 364–367, 2010.

WELTI-CHANGES, J. Principles and Applications of Freeze-Concentration and Freeze-Drying. In: HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**, Boca Raton: Taylor e Francis Group, v. 1, p. 3618, 2006.

WILCOX, C. P.; SWAISGOOD, H. E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p. 420-430, abril-junho.2009.

YOKOYAMA, N. N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.447–454, 2004.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VITAMINA D₃, EM MATRIZ DE PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE.

RESUMO

O desenvolvimento de micropartículas de proteína isolada de soro de leite, contendo como recheio a vitamina D₃, é uma tecnologia promissora, visto que este composto bioativo possui um papel importante para o desenvolvimento ósseo do ser humano e suas características físico-químicas dificultam seu consumo, síntese cutânea e seu processamento na indústria alimentícia. Com base nessas informações foram formuladas e caracterizadas duas matrizes de isolado proteico de soro de leite para obtenção de micropartículas, com diferentes concentrações de vitamina D₃ (20, 25 e 30 % em relação à massa da matriz polimérica), a partir do processo de secagem por atomização. Em uma primeira formulação o surfactante pluronic F68 não foi utilizado para o preparo da matriz, e em uma segunda formulação o mesmo esteve presente. Os resultados mostraram que, o procedimento de encapsulação foi bem-sucedido, apresentando valores elevados de eficiência de encapsulação para as amostras contendo baixas concentrações do composto bioativo, sendo de 54% de eficiência para as partículas sem surfactante e de 21 % para as partículas contendo surfactante em sua formulação. A análise de distribuição de tamanho confirmou a obtenção de partículas em escala micrométrica variando de 10 a 100 µm, e as micrografias revelaram uma estrutura esférica, de superfície lisa, sem rachaduras, conferindo maior proteção à vitamina D₃. A partir dos espectros de infravermelho foi possível constatar a presença/ausência do surfactante utilizado na formulação da matriz. As análises térmicas apresentaram os estágios de degradação da matriz e do recheio e forneceram dados de estabilidade térmica das micropartículas. De acordo com os resultados obtidos na caracterização das amostras as duas formulações da matriz a base de isolado proteico de leite apresentaram boas propriedades como agente encapsulante no preparo/obtenção de micropartículas de vitamina D₃, através da secagem por atomização. Gerando assim micropartículas com potencial nutricional, além de propriedades que possibilitam a introdução da vitamina D₃ em formulações alimentícias.

Palavras-chave: microencapsulação, vitamina D₃, isolada proteico de soro de leite.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina D pode causar alterações ósseas e renais, como o raquitismo e a osteomalácia, pois é essencial para o desenvolvimento do tecido ósseo. No entanto nos últimos anos, pesquisas vêm relacionando a deficiência desta vitamina com outras enfermidades como o mal de Alzheimer e mal de Parkinson, hipertensão, câncer, esclerose múltipla, artrite reumatoide, entre outras (AVASARALA; ZACHARIAH, 2015; NING et al., 20015).

Esta vitamina pode ser encontrada em alguns alimentos, em concentrações muito baixas, como por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, que não satisfazem as necessidades diárias do ser humano. Sendo a principal fonte desta vitamina a síntese cutânea, todavia esta síntese pode ser prejudicada por diversos fatores como a pouca exposição ao sol, a obesidade, o estresse e diversos outros fatores, causando assim a insuficiência deste composto bioativo à população (SARAIVA et al. 2007; HEANEY, 2008).

Estes fatos apontam a necessidade de incluir a vitamina D na dieta populacional, porém suas características físico-químicas, como sua volatilidade e degradação na presença de luz ultravioleta, dificultam seu processamento na indústria de alimentos (ABBASI, 2014). Uma alternativa para vencer esta dificuldade é a utilização do método de microencapsulação, uma técnica que possibilita a utilização de compostos bioativos sensíveis em processos industriais sem alterar suas propriedades nutricionais, sensoriais entre outras (YOSHIDA; ANTUNES, 2009; ABBASI, 2014).

A microencapsulação consiste em empacotar um ou mais compostos bioativos em micropartículas comestíveis. Onde o material revestido pode ser denominado de diversos nomes, como por exemplo, núcleo e recheio, já o material que forma a partícula como matriz, casca, parede, entre outros (ZHU et al. 2003).

Uma variedade de compostos, como proteínas e polissacarídeos pode ser utilizada como agente encapsulante (AZEREDO, 2005). A proteína isolada de soro de leite vem se destacando entre as matrizes existentes, por apresentar um bom potencial emulsificante, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis entre outras propriedades (ANTUNES, 2009; FRASCARELI et al., 2012b).

Além das propriedades citadas, outro fator que torna a proteína isolada de soro de leite interessante para aplicação como material encapsulante, é a sua origem como um coproduto da indústria de

queijos, que apesar de apresentar boas características nutricionais, ainda é pouco aproveitado, pois seu beneficiamento exige tecnologias de custo elevado incompatível com a realidade de diversas indústrias (ALVES et al., 2014).

Devido à necessidade de inserir vitamina D na dieta da população e os fatores que tornam a utilização do isolado proteico de soro de leite como material de parede interessantes na produção de micropartículas, este trabalho teve como objetivo a produção de micropartículas de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite através da secagem por atomização.

2.MATERIAL E METODOS

2.1. Material

As micropartículas foram preparadas a partir dos seguintes materiais: isolado proteico de soro de leite comercial (PI), com 92 % (p/p, em base seca) de proteína, obtido da empresa Glanbia®, água destilada, medicamento comercial de lote: 14040030 contendo 5,0 µg de vitamina D₃ (colecalférol) a cada 0,036 mL, o tensoativo Pluronic® F-68 (Polioxiétileno), e a vitamina D₃ padrão, adquiridos da SIGMA-ALDRICH®.

2.2. Metodologia

2.2.1. Preparação das micropartículas

As micropartículas de isolado proteico de soro de leite foram produzidas, em triplicata, a partir da modificação da metodologia de Baranauskiene et al. (2006), onde em uma primeira etapa, preparou-se três soluções de PI 10,0 % (m/m) em água destilada, e estas foram mantidas sob agitação mecânica por um período de doze horas até a total dissolução dos sólidos. Após a solubilização da matriz, foram adicionados 20,0 % (m/m em relação à massa de PI) do surfactante Pluronic® F-68 às soluções, as quais foram novamente mantidas sob agitação até a formação de uma solução homogênea.

Na segunda etapa da preparação, o fármaco foi adicionado às soluções homogêneas, nas seguintes proporções 20, 25 e 30 % (m/m em relação à massa de PI). As emulsões foram então preparadas, com um homogeneizador Ultra-Turrax® para devida estabilização, por um período de 5 minutos a 5000 rpm e em seguida, foram secas pelo método de atomização em um Mini Spray Dryer da marca BÜCHI modelo B-290, no Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais da UFSC.

O mesmo procedimento de preparação das micropartículas foi refeito, nas mesmas proporções, porém sem a adição do surfactante Pluronic® F-68 na primeira etapa da metodologia.

2.3. Eficiência de encapsulação e do rendimento das micropartículas

O rendimento das micropartículas foi obtido através da relação entre a quantidade de reagentes utilizados para a produção das partículas desejadas, e o valor total em massa do produto final obtido.

A eficiência de encapsulação das micropartículas foi avaliada segundo o método de Teng et al. (2013) com algumas modificações, onde tanto a vitamina D₃ superficial, quanto a total foram extraídas e quantificadas através da análise de espectroscopia de UV – Vis. Marca HITACHI U-1800 spectrophotometer.

A massa total de vitamina D₃ presente nas partículas, bem como na superfície, foi determinada através de espectrofotometria de absorção na região do UV, empregando um equipamento da marca HITACHI (modelo U-1800), com detecção em 265 nm. Uma curva de calibração ($R^2= 0,996$) foi obtida, empregando vitamina D₃ medicamento. Os cálculos de eficiência de encapsulação foram realizados segundo a equação 1 apresentada abaixo:

$$EE(\%) = \frac{(m_{\text{óleo total}}) - (m_{\text{óleo superficial}})}{m_{\text{óleo total teórica}}} \times 100 \quad (1)$$

2.3.1. Determinação da massa total de vitamina D₃

A massa total de vitamina D₃ foi obtida em uma primeira etapa, através da solubilização de 0,05g de micropartículas em um tubo de ensaio contendo 10,0 mL de água destilada. Esta solução foi mantida sob agitação em um agitador magnético Dist DI -03 por 10 minutos. Em seguida 1,0mL da solução obtida foi dissolvida em 10,0mL de álcool etílico. Em uma segunda etapa a solução diluída foi centrifugada em uma centrífuga Hermle modelo Z 200A a 6000 rpm por um período de 15 minutos. Após a completa separação de fases, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e a vitamina extraída, foi quantificada através de espectroscopia de UV – Vis conforme descrito no item 2.3.

2.3.2. Determinação da massa superficial de vitamina D₃

A massa superficial de vitamina D₃ foi obtida através da adição 10,0 mL de álcool etílico em um tubo de ensaio contendo 0,05g de

amostra. Esta solução heterogênea foi centrifugada em uma centrífuga Hermle modelo Z 200^a, por um período de 15 minutos a 6000 rpm, até a completa separação de fases. Em seguida o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, e transferido para uma cubeta de quartzo de 3,0 mL, e a vitamina foi quantificada através de espectroscopia de UV – Vis conforme descrito no item 2.3.

2.4. Caracterização físico-química das micropartículas

Após a obtenção das micropartículas de proteína isolada de soro de leite, com o fármaco, as mesmas foram caracterizadas.

2.4.1. Análise morfológica

2.4.1.1. Morfologia

A morfologia das micropartículas foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com um microscópio modelo JEOL modelo JSM-6390LV, situado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.4.2. Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas foi observada através da análise de imagens concedidas também pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e através de micrografias por difração de feixe de laser, obtidas em um equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK).

Para a obtenção das micrografias, uma pequena quantidade de cada amostra foi dispersa em álcool etílico em um tubo de ensaio, e em seguida submetidas à leitura no equipamento, essa análise foi realizada em triplicata para todas as amostras. Os dados foram então concedidos e tratados com o *software Quantikov Image Analyzer*.

2.4.3. Análise térmica

2.4.3.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Para avaliar a estabilidade e a degradação térmica das micropartículas foi realizada uma análise termogravimétrica (TGA) com o aparelho da marca Shimadzu Corporation (Quioto, Japão) situado no

Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. A análise foi realizada a temperatura ambiente até 600 °C, em uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (fluxo = 50 mL min⁻¹).

2.4.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada com um equipamento da marca *TA Instruments*, modelo *Multicell MC-DSC*, situado no Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais da UFSC, para avaliar as alterações estruturais. As amostras foram inicialmente resfriadas até -20 °C, e em seguida foi realizada a varredura na velocidade de 1 °C min⁻¹ até 140 °C.

2.4.4. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Com o intuito de observar, analisar e comparar as interações estruturais das micropartículas foi realizada análise de espectroscopia na região do infravermelho com um equipamento PerkinElmer FT-IR/NIR (Frontier Spectrometer) com transformada de Fourier, resolução de 4 cm⁻¹ na faixa situada entre 4000 a 400 cm⁻¹ no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.4.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas

Uma avaliação do perfil de liberação da vitamina D₃, das micropartículas produzidas, foi desempenhada utilizando a metodologia de Xu, Khan e Burgess (2012), em que 10 mg de amostra foi acondicionado juntamente com 10 mL de solução tampão pH 7,4 em membranas de diálise (Cut-off de peso molecular de 12.000 – 16.000 e porosidade de 25 Angstroms).

As membranas de diálise foram então mergulhadas em um frasco âmbar fechado contendo a mesma solução tampão de pH 7,4 e mantidos sobre leve agitação mecânica. As alíquotas da fase externa ao saco de diálise foram retiradas em intervalos de tempo apropriados para avaliar a quantidade de vitamina D₃ liberada para o meio. A quantificação da vitamina foi realizada através de espectroscopia de UV – Vis. com um equipamento modelo HITACHI (U-1800 spectrophotometer). A análise foi realizada em triplicata para todas as amostras.

2.4.6. Ângulo de contato e Energia livre superficial

Através de um goniômetro modelo OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), acoplado a um sistema processador de imagem de alta resolução Data Physics Instruments determinou-se o ângulo de contato das micropartículas formadas. Para realizar as medições de ângulo de contato, foram produzidas pastilhas, de superfície plana, das amostras analisadas. As pastilhas foram obtidas através da prensagem de 1 tonelada por 1 minuto, de uma massa de aproximadamente 200 mg de amostra na prensa de modelo Perkin Elmer (Hydraulische Presse).

A partir das pastilhas produzidas de cada amostra foram realizados ensaios, à temperatura ambiente, onde solventes de polaridades diferentes, sendo estes, água deionizada (5 μL), formamida (4 μL) e diiodometano (0,8 μL) foram depositados sobre a superfície dos comprimidos. Ao final dos ensaios, os dados fornecidos pela análise de ângulo de contato foram tratados, determinando-se assim valores de energia livre superficial de cada amostra.

2.4.7. Densidade

2.4.7.1. Densidade aparente

Para determinar a densidade aparente (d_{ap}) das micropartículas, utilizou-se o método de Chinta et al. 2009 com algumas modificações, em que uma massa de 0,5 g de cada amostra foi adicionada à uma proveta graduada, através de um funil. Em seguida o volume apresentado na proveta foi registrado e tratado para obter-se o valor da densidade.

2.4.7.2. Densidade compactada

A densidade compactada (d_{cp}) foi determinada conforme a metodologia utilizada na determinação da densidade aparente, no entanto, após a adição da amostra à proveta graduada, a mesma foi compactada por 1200 vezes através do compactador automático, Copley® Scientific modelo JV 1000.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas seis formulações de micropartículas de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite, onde três formulações utilizaram o surfactante Pluronic® F-68, e diferentes concentrações de vitamina D₃, 20, 25 e 30 % (m/m em relação à massa de PI). As demais formulações foram realizadas com os mesmos reagentes, nas mesmas proporções, com as três diferentes concentrações de vitamina, porém a estas não foi adicionado o tensoativo Pluronic® F-68.

Além das seis amostras citadas, foram preparados dois brancos, uma contendo somente a matriz, que foi denominada de Branco (B) e outra contendo a matriz e o surfactante, denominado de Branco Surfactante (BS). Todas as formulações foram então nomeadas como APresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Denominação das formulações de micropartículas.

Amostras	Concentração de vitamina D ₃ (%)	Formulações sem surfactante	Formulações contendo surfactante
Branco	0	B	BS
1	20%	A1	A1s
2	25%	A2	A2s
3	30%	A3	A3s

3.1. Rendimento das micropartículas

O rendimento percentual, de cada formulação, foi obtido através da relação entre o rendimento real e teórico conforme a Equação 2 (ATKINS; JONES, 2006), e apresenta-se na Tabela 2.

$$\text{Rendimento percentual} = \frac{\text{rendimento real}}{\text{rendimento teórico}} \times 100 \quad (2)$$

Tabela 2: Rendimento percentual das micropartículas B, A1, A2, A3, BS, A1s, A2s e A3s.

Amostras	Rendimento Real*	Rendimento Teórico*	Rendimento Percentual (%)
B	15,06±0,43	20,00±0,07	76,16±1,06
A1	11,29±0,27	24,00±0,01	47,06±1,14
A2	13,69±0,49	25,02±0,03	54,78±1,98
A3	14,27±0,24	26,00±0,05	54,91±0,95
BS	17,05±0,10	22,24±0,09	76,68±0,47
A1s	13,30±0,29	26,24±0,08	50,69±1,11
A2s	18,22±0,24	27,24±0,09	66,89±0,90
A3s	18,20±0,43	28,24±0,05	64,46±1,54

*Média com base em triplicata ± desvio padrão dos resultados.

Estruturas micro e nanométricas são termodinamicamente instáveis devido a maior área interfacial (σ) do sistema, o que leva a uma maior energia de Gibbs, como mostra a Equação 3, sendo que de acordo com a 2ª Lei da Termodinâmica o equilíbrio sempre tenderá para um estado de menor energia, buscando, neste caso, uma área interfacial mínima (ATKINS; de PAULA, 2007).

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \sigma}\right)_{p,T,n} \quad (3)$$

Como estruturas micro e manométricas possuem grande área interfacial em relação ao volume do sistema, para que as mesmas sejam estabilizadas, é necessário reduzir a tensão interfacial do sistema, pois assim reduz-se a energia interfacial do sistema, o que auxilia na estabilização destas estruturas. O papel do surfactante é justamente diminuir a tensão interfacial do sistema e auxiliar esta estabilização. Com sua natureza anfífilica o surfactante tende a ser adsorvido na interface do sistema, reduzindo sua tensão interfacial.

Neste contexto, presença do surfactante ajuda no processo de formação das partículas, pois estabiliza a emulsão óleo/água, e conseqüentemente aumenta o seu rendimento. Essa relação pode ser confirmada através da análise de variância (ANOVA), dos valores de rendimento das formulações (Tabela 2) com e sem surfactante, como a mesma concentração de vitamina.

Por meio dos resultados da análise de variância afirmou-se uma diferença significativa entre os valores de rendimento percentual ($F > F_{\text{crítico}}$), para as amostras contendo recheio, sendo $F = 10,37$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A1 e A1s, $F = 61,71$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A2 e A2s e de $F = 55,32$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A3 e A3s indicando que a presença/ausência de surfactante interferiu no rendimento das partículas. As amostras B (76,17%) e Bs (76,26%), resultaram em um valor de $F (0,39)$ menor que de $F_{\text{crítico}} (7,70)$, declarando que a presença/ausência do surfactante não interferiu no rendimento das partículas neste caso.

3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE %) corresponde à porção do composto bioativo presente no núcleo das micropartículas secas, em relação à quantidade total adicionada no início da emulsão (QUISPE-CONDORI, SLDAÑA; TEMELLI, 2011). Essa relação pode ser calculada conforme a Equação 4.

$$EE(\%) = \frac{m_{\text{vit.D3 total}} - m_{\text{vit.D3 superficial}}}{m_{\text{vit.D3 total teórica}}} \times 100 \quad (4)$$

Os resultados da eficiência de encapsulação das micropartículas com e sem surfactantes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados de concentração superficial, total e eficiência de encapsulação das micropartículas.

Amostra	A1s		A2s		A3s	
	A1	A1s	A2	A2s	A3	A3s
Vit. D₃ Superficial (µg vit./0,05g amostra)*	0,046±0,014	0,575±0,044	0,425±0,031	0,548±0,082	0,587±0,033	0,617±0,068
Vit. D₃ Total (µg vit./0,05g amostra)*	0,827±0,090	0,863±0,012	0,714±0,093	0,842±0,071	0,796±0,026	0,848±0,096
Vit. D₃ Total Teórica (µg)	1,49	1,36	1,79	1,64	2,07	1,90
(EE%)	54,043±1,055	21,195±0,112	14,480±1,210	18,219±1,732	10,816±1,279	13,494±1,72

*Média com base em triplicata ± desvio padrão dos resultados.

Observando os dados da Tabela 3 pode ser constatado que, quanto maior a concentração de vitamina utilizada no preparo das partículas, menor sua eficiência de encapsulação, para as micropartículas formuladas com e sem surfactante. No entanto, as micropartículas preparadas com concentrações menores do composto ativo de interesse, 20 % de vitamina m/m em relação à massa de PI, apresentam valores de EE % mais elevados, de 54,043 % para as partículas sem surfactante e 21,195 % para partículas contendo surfactante.

Assim, pode ser observado que quanto maior a concentração de recheio utilizada no preparo das micropartículas estudadas, maior a concentração destas na superfície das partículas, e segundo a Equação 1 apresentada por Quispe-Condori et al. (2011), quanto maior a concentração de recheio na superfície das partículas menor a eficiência de encapsulação.

O mesmo foi observado em relação à estabilidade de compostos ativos em diferentes concentrações por Abbasi et al. (2014) em nanopartículas de vitamina D₃ com isolado proteico de soro de leite, onde foram estudadas amostras de partículas com concentrações de 280 µg. ml⁻¹ e 560 µg. ml⁻¹ de vitamina D₃. Estas amostras foram avaliadas antes e após sete dias de armazenamento, e os resultados apontam uma redução da estabilidade do composto ativo de 17-12 % do valor inicial das partículas contendo 280 µg. ml⁻¹ de vitamina e de 34-20 % do valor inicial das partículas contendo 560 µg. ml⁻¹ de vitamina

Comparando os resultados de eficiência de encapsulação (Tabela 3) entre as micropartículas formuladas com e sem surfactante, com a mesma concentração de vitamina D₃, através de análise de variância (ANOVA), observou-se que para A1 e A1s houve diferença significativa entre os valores de F e F_{crítico}. Sendo F= 169,00 e F_{crítico}= 10,12 (F > F_{crítico}), indicando que a presença do surfactante interferiu na eficiência de encapsulação.

Para o conjunto de amostras A2 e A2s e de A3 e A3s os valores obtidos pela análise de variância indicaram que, a presença/ausência do surfactante não interferiu na eficiência de encapsulação das partículas resultando em valores de F menores que F_{crítico} sendo estes F= 4,21 e F_{crítico}=10,12 para A2 e A2s e de F= 2,11 e F_{crítico}= 10,12 para A3 e A3s.

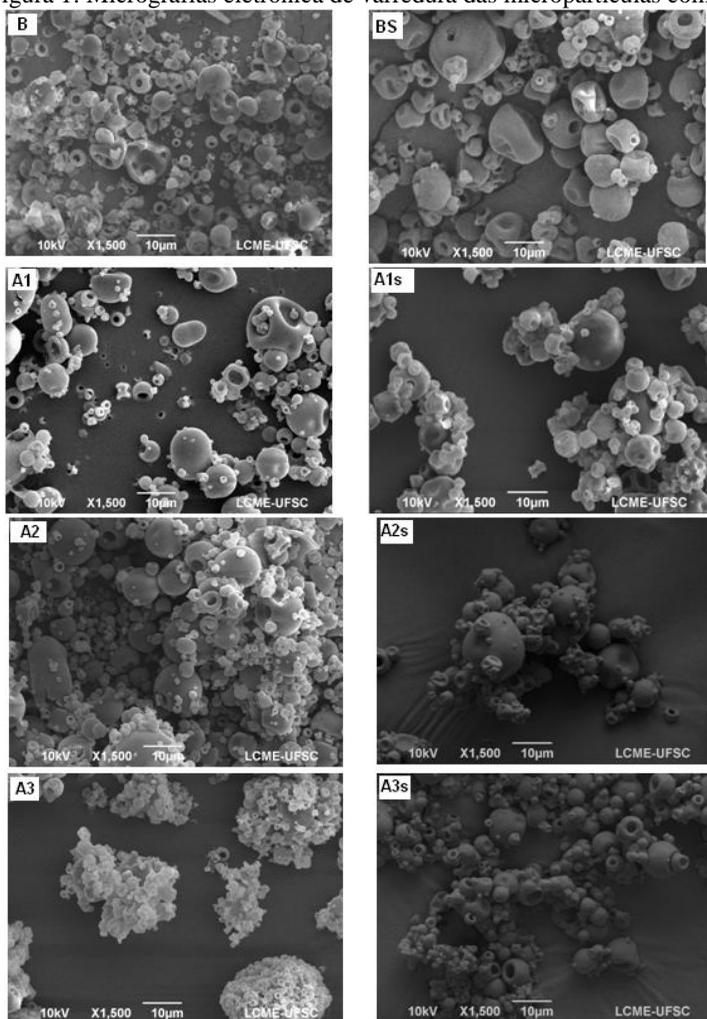
3.3. Caracterização físico-química das micropartículas

3.3.1. Análise morfológica

3.3.1.1. Morfologia

A Figura 1 ilustra as micrografias das partículas obtidas, em uma magnificação de 1500 vezes.

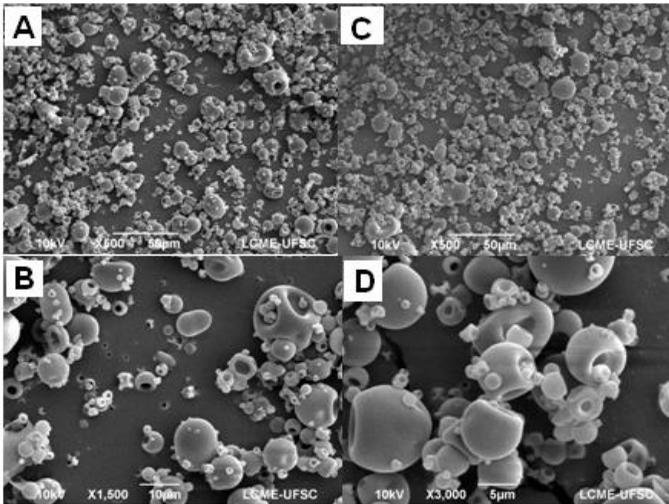
Figura 1: Micrografias eletrônica de varredura das micropartículas com



surfactantes, BS, A1s, A2s e A3s, e sem surfactante B, A1, A2 e A3.

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, podem ser obtidas imagens ampliadas das micropartículas e assim, informações sobre sua morfologia além de elucidar propriedades estruturais, de porosidade e superfície. Através da Figura 1 é possível perceber que as partículas B, BS, A1 e A1s apresentam-se mais espaçadas, enquanto as demais amostras, com maiores concentrações de vitamina, A2, A2s, A3 e A3s encontram-se mais aglomeradas. As Figuras 2 e 3 apresentam as micrografias em magnificação de 500,1500 e 3000 vezes das amostras que apresentaram melhores resultados de eficiência de encapsulação A1 e A1s respectivamente.

Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura da amostra A1. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D de 1500 e 3000 vezes,



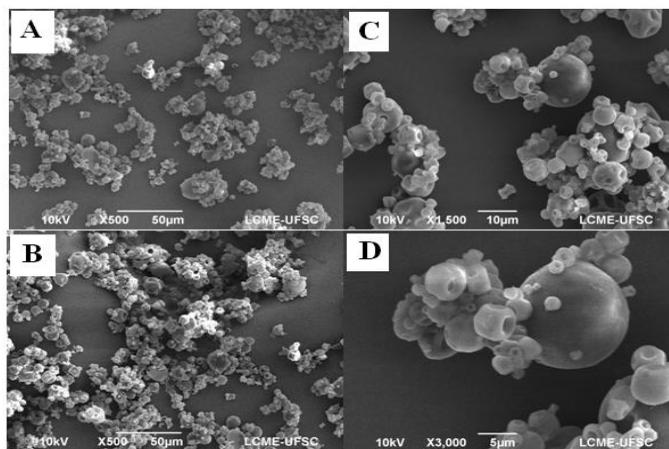
respectivamente.

As microcápsulas da amostra A1 foram avaliadas em maior detalhe, pois foram as amostras que apresentaram maior rendimento percentual e maior eficiência de encapsulação. Essas amostras obtidas pelo método de *spray drying* com proteína isolada de soro de leite (Figura 2) apresentaram um formato esférico, e uma superfície lisa, homogênea, compacta e sem fissuras aparentes. Através das

micrografias, também é possível observar a ausência de poros e materiais livres na formação das micropartículas, empregando um aumento de até 3000 vezes.

Apesar de serem obtidas com uma formulação diferente, as micropartículas contendo surfactante (Figura 3), exibiram aparência similar às amostras sem surfactante: formato esférico e superfície lisa, sem fissuras ou rachaduras, assim como ilustrado na Figura 1. Podendo acarretar em uma menor permeabilidade de gases e conseqüentemente maior retenção e proteção do composto bioativo.

Figura 3: Micrografias eletrônicas de varredura da amostra A1S. Onde A e C estão em uma magnificação de 500 vezes e B e D de 1500 e 3000 vezes, respectivamente.



Também pode ser notada a presença de pequenos achatamentos na superfície de algumas partículas em ambas as amostras. De acordo com Fávaro-Trindade et al. (2010) estes achatamentos ou concavidades, são típicos de produtos, de variadas matrizes, obtidos pelo processo de secagem por atomização, no entanto, segundo Rodríguez-Huezo et al. (2007) a formação destes achatamentos está relacionada com a temperatura de secagem, e que à uma temperatura de secagem moderada (temperatura de entrada de 140 °C) ocasiona estas concavidades na superfície da partícula.

3.3.1.2. Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição do tamanho das micropartículas determinada por difração de feixe de laser pode ser observada no gráfico apresentado pela Figura 4, para amostras contendo surfactante B, A1, A2 e A3, e pela Figura 5 para formulações sem surfactante BS, A1s, A2s e A3s.

Figura 4: Distribuição de tamanho das micropartículas sem surfactante, B, A1, A2 e A3.

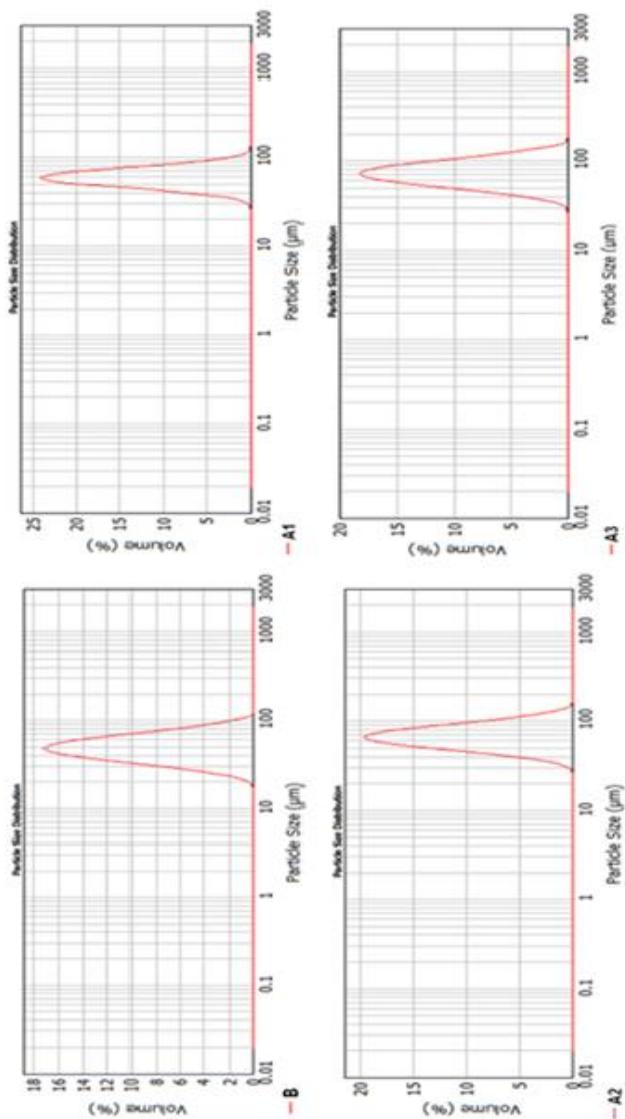
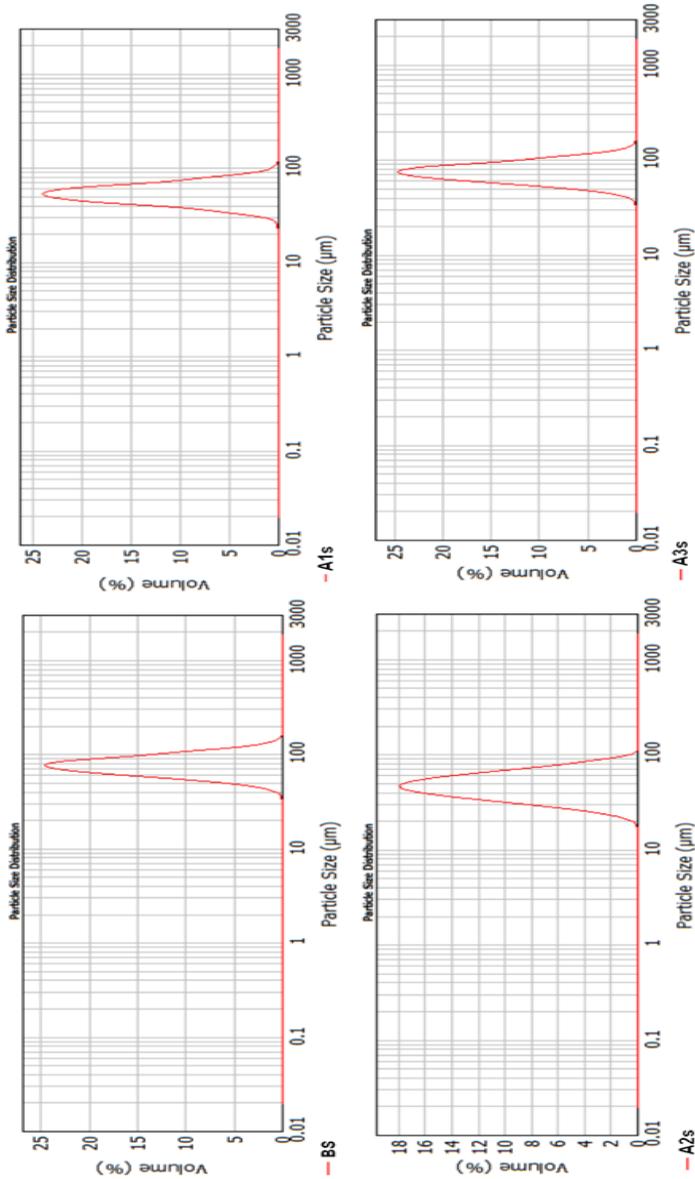


Figura 5: Distribuição de tamanho das micropartículas com surfactante BS, A1s, A2s e A3s.



Segundo as informações apresentadas nas Figuras 4 e 5, ambas as amostras apresentaram uma distribuição de tamanho unimodal. Indicando que a metodologia empregada é eficiente na produção de micropartículas e com uma distribuição de tamanho homogênea. Os tamanhos das partículas obtidas estão em escala micrométrica, com diâmetros entre 20 e 110 μm .

As micropartículas sem surfactante apresentaram tamanhos entre 45,4-61,6 μm (B) 44,2-60,1 μm (A1), 58,4-79,3 μm (A2), 66,2-89,9 μm e volumes de 16,75 % 17,44 %, 17,63 % e de 19,4 % respectivamente. As micropartículas formuladas com surfactante obtiveram volumes máximos de 23,95 % e tamanhos de 59,8-81,3 μm (BS), 48,9-66,4 μm (A1s), 48,9-66,4 μm (A2s) e de 69,6-94,6 μm (A3s). Essa pequena diferença de tamanho entre as partículas com e sem surfactante, se refere à presença de um composto a mais, neste caso o surfactante que foi adicionado na formulação da matriz.

3.3.2. Análise térmica

3.3.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Quando um polímero é submetido a um tratamento térmico, podem ocorrer mudanças em sua estrutura, caracterizadas pela ruptura de ligações e formação de novos compostos voláteis, provocando uma diminuição ou aumento de sua massa molecular, bem como uma perda de massa com o aumento da temperatura, provocada pela degradação molecular e formação de compostos voláteis. A estabilidade e as propriedades térmicas de um polímero podem ser avaliadas através de uma análise termogravimétrica, onde a perda ou o ganho de massa de uma amostra é medida em função do tempo (a temperatura constante), ou da variação de temperatura (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Para a obtenção dos dados de estabilidade e das propriedades térmicas das amostras, as micropartículas produzidas e os produtos puros utilizados como matriz, proteína isolada de soro de leite, como recheio, vitamina D₃, e o surfactante foram submetidos à análise termogravimétrica. As curvas de degradação térmica (TG e DTG) das amostras que apresentaram maior eficiência de encapsulação, A1 e A1s são apresentadas nas Figuras 6 e 7 respectivamente, e os valores dos parâmetros termogravimétricos como temperatura e porcentagem de perda de massa, de todas as micropartículas e dos compostos puros vitamina D₃, PI, e surfactante estão resumidos nas Tabelas 6 e 7.

Figura 6: Análise termogravimétrica - micropartículas sem surfactante (A1).

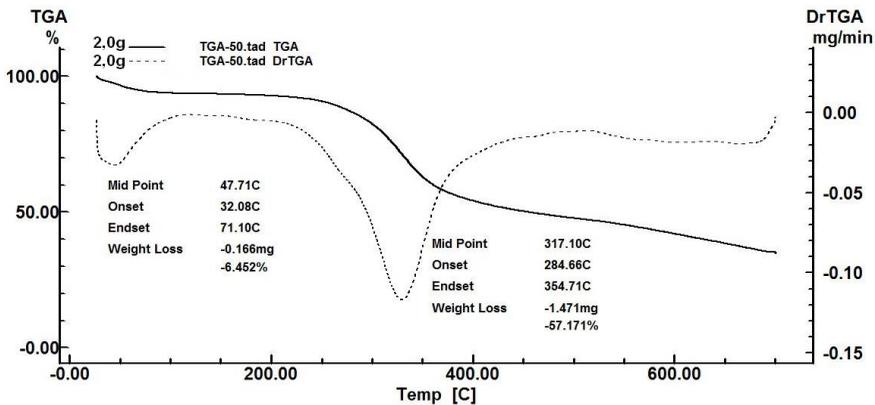


Figura 7: Análise termogravimétrica – micropartículas contendo surfactante (A1s).

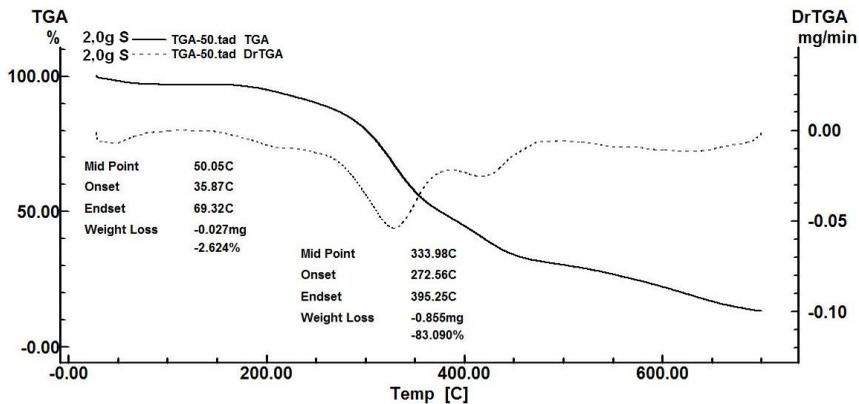


Tabela 4: Parâmetros termogravimétricos – amostras B, A1, A2 e A3.

		PI	Vit. D ₃	B	A1	A2	A3
1°	T _{máx} ^a	86,14	359,76	76,94	71,10	75,09	72,08
Estágio	M ^b	0,924	92,537	5,765	6,452	7,429	3,763
2°	T _{máx} ^a	373,89	-	360,70	354,71	393,47	421,62
Estágio	M ^b	81,781	-	64,697	57,171	80,444	63,041
% resíduos a 600°C		17,295	7,463	29,538	36,377	12,127	33,196

^a Temperatura de máxima degradação (°C). ^b Percentagem de perda de massa em cada estágio de degradação.

Tabela 5: Parâmetros termogravimétricos – amostras BS, A1s, A2s e A3s.

		PI	Vit. D ₃	Surfactante	BS	A1s	A2s	A3s
1°	T _{máx} ^a	86,14	359,76	430,71	82,15	69,32	73,10	93,79
Estágio	M ^b	0,924	92,537	89,290	5,559	2,624	5,059	3,626
2°	T _{máx} ^a	373,89	-	-	388,13	396,25	368,46	408,92
Estágio	M ^b	81,781	-	-	69,183	83,090	76,980	86,484
% resíduos a 600°C		17,295	7,463	10,71	25,2597	14,286	17,961	9,89

^a Temperatura de máxima degradação (°C). ^b Percentagem de perda de massa em cada estágio de degradação

As curvas de degradação térmicas (TG e DTG) realizadas sob atmosfera de nitrogênio, e os dados das Tabelas 4 e 5, para as micropartículas mostraram que ambas tiveram um primeiro decréscimo de massa, até cerca de 82 °C, que pode ser atribuído à evaporação de água adsorvida, o mesmo comportamento pode ser observado na amostra de matriz (PI) pura.

Um segundo estágio de degradação observado nas micropartículas encontra-se na faixa de 360,70 a 408,92 °C o qual é associada à degradação da proteína e/ou da matriz proteína/surfactante, como podemos observar com a perda de 81,78 % de massa do isolado proteico de soro de leite à temperatura máxima de degradação ($T_{máx}$) de 373,89 °C. Tanto a vitamina, quanto o surfactante apresentaram apenas um estágio de degradação com uma perda massa de 92,537 % e 89,290 % a uma $T_{máx}$ de 359,76 °C e 430,71 °C respectivamente.

O que pode ser observado é que nas partículas com presença de surfactante não há uma separação das temperaturas de degradação máxima dos dois componentes. Uma única etapa de degradação térmica acontece intermediária às etapas isoladas da proteína e do surfactante. Entretanto, nas partículas com surfactante, tanto a Bs como A1s foram as que apresentaram uma maior estabilidade térmica, com o pico de degradação máxima de 388,13 °C e 396,25 °C, respectivamente.

3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Por meio da análise de calorimetria exploratória diferencial podem ser determinadas possíveis interações em sistemas poliméricos, além de obter dados importantes de propriedades térmicas como a transição vítrea (T_g), utilizada para determinar a estabilidade das amostras durante sua estocagem e aplicação, temperaturas de fusão (T_m), de cristalização (T_c) e parâmetros como entalpia de fusão (Δ_{mH}), de cristalização (Δ_{cH}) e da capacidade calorífica (C_p) (ATKINS; de PAULA, 2007). As Figuras de 8 e 9 revelam os resultados da análise para as amostras puras PI, vitamina D₃, surfactante, proteína isolada de soro de leite com surfactante (PI+Surf), das micropartículas branco B e BS, e que apresentaram maior eficiência de encapsulação, A1 e A1s respectivamente.

Figura 8: Termograma das amostras B, BS, A1 e AS.

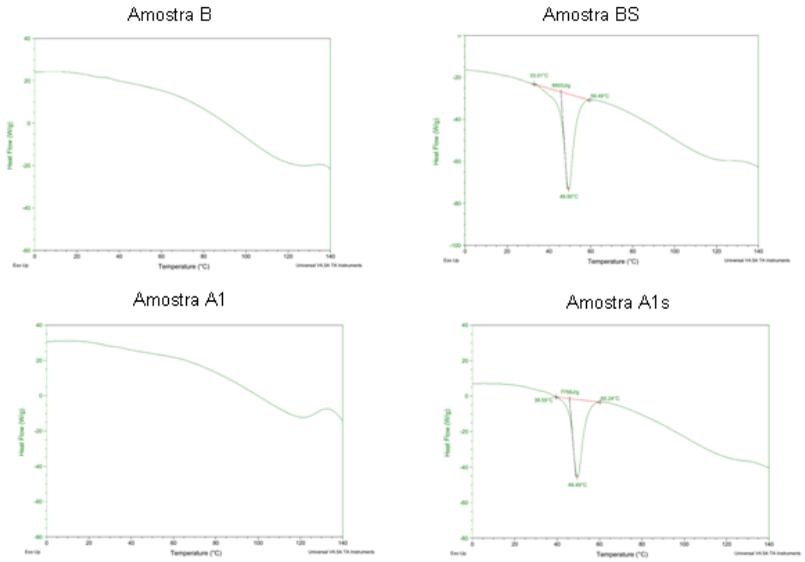
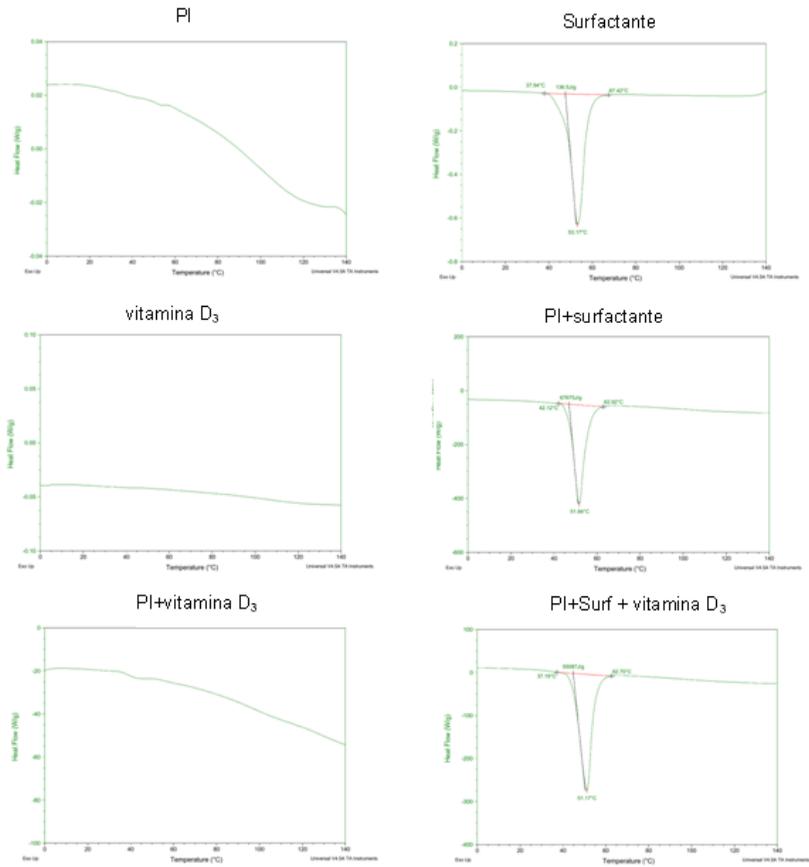


Figura 9: Termograma dos compostos puros PI, Surfactante, vitamina D₃, PI + surfactante, PI+ vitamina D₃, PI+surfactante + vitamina D₃.



Ao analisar os termogramas dos materiais puros (Figuras: 9), observa-se que somente o surfactante apresenta o pico referente à entalpia de fusão (Δ_{mH}). Já as amostras que não contém o surfactante, matriz e/ou recheio somente, não apresentam nenhuma alteração durante a varredura térmica. O que já era esperado uma vez que as micropartículas foram analisadas em seu estado seco (sólido) e por se tratar de proteínas de estruturas rígidas, não iriam sofrer alteração estrutural na faixa de temperatura analisada.

Por outro lado, a vitamina que é comercializada na forma líquida, semelhante a um óleo, possui seu princípio ativo, vitamina D₃, solubilizado nos demais excipientes. Sendo assim, com suas estruturas cristalinas dissolvidas, não há como detectarmos transições vítreas (T_g), temperatura de cristalização (T_c) ou temperatura de desnaturação e/ou fusão (T_m).

Comparando os termogramas da Figura 9, PI+ surfactante, e PI + Surfactante + vitamina D₃, podemos observar que a entalpia necessária para que ocorra a degradação térmica do surfactante diminuiu de 67,67 kJ.g⁻¹ para 55,08 kJ.g⁻¹ na amostra que contém o fármaco. O mesmo fato pode ser observado nas amostras das micropartículas Figura 8, B e A1 diminuindo de 8,50 kJ.g⁻¹ para 7,759 kJ.g⁻¹.

Estas reduções de entalpia de fusão estão relacionadas com o efeito do próprio fármaco (vitamina D₃ e excipientes), uma vez que o óleo acaba atuando como lubrificante nas cadeias poliméricas reduzindo a rigidez e a resistência térmica da estrutura proteica, matriz, diminuindo a interação com o surfactante, e tornando-o mais disponível para troca de calor com o meio, necessitando de uma quantidade inferior de energia para que ocorra a transição térmica estrutura (FAYAD, 2010).

3.3.3. Espectroscopia no infravermelho

Ao fornecer radiação eletromagnética para uma molécula e a frequência desta radiação corresponder à frequência de vibração da molécula, a energia é absorvida resultando em um aumento de amplitude de uma vibração. Cada movimento molecular possui uma vibração em uma frequência específica, podendo assim ser identificado pela medida de seu espectro na região do infravermelho (McMURRY, 2009).

As análises de espectroscopia de infravermelho das amostras produzidas foram realizadas para identificar os grupos funcionais presentes em sua composição e suas respectivas interações. As principais bandas do espectro de infravermelho da proteína isolada de

soro de leite (Figura 10), e da vitamina D₃ (Figura 11), apresentam-se nas Tabelas 6 e 7.

Figura 10: Espectro IV - proteína isolada de soro de leite.

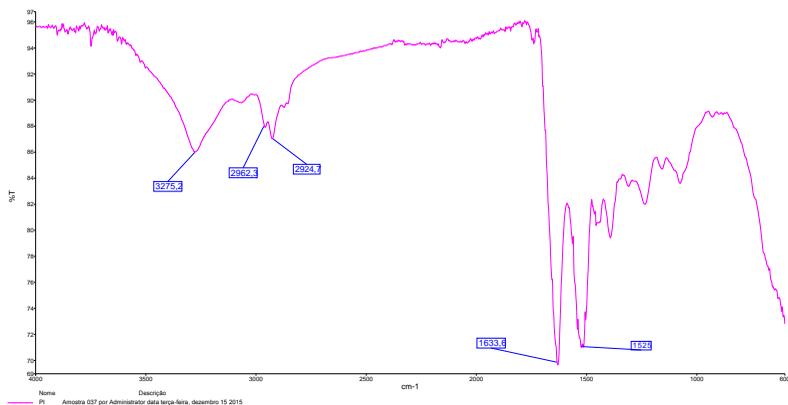
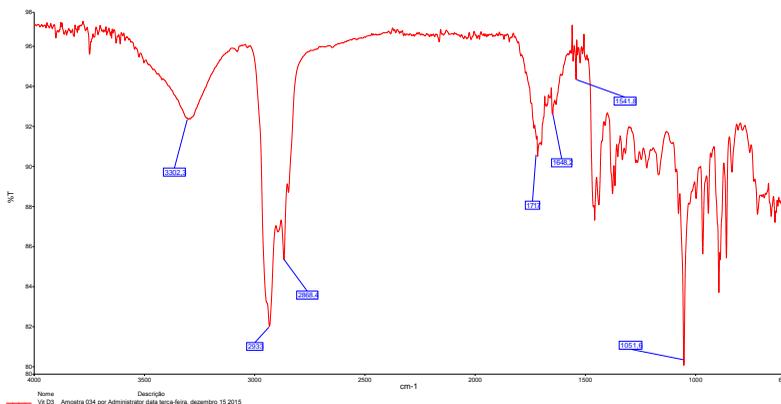


Tabela 6: Principais correlações espectroscópicas de IV - proteína isolada de soro de leite.

Comprimento de onda (λ) (cm^{-1})	Tipo de absorção
3279,30	Deformação O-H e N-H
3000-2800	Deformação C-H (grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$)
1633,60	Estiramento C=O e C-N (amida I)
1525	Deformação N-H e estiramento C-N (amida II)

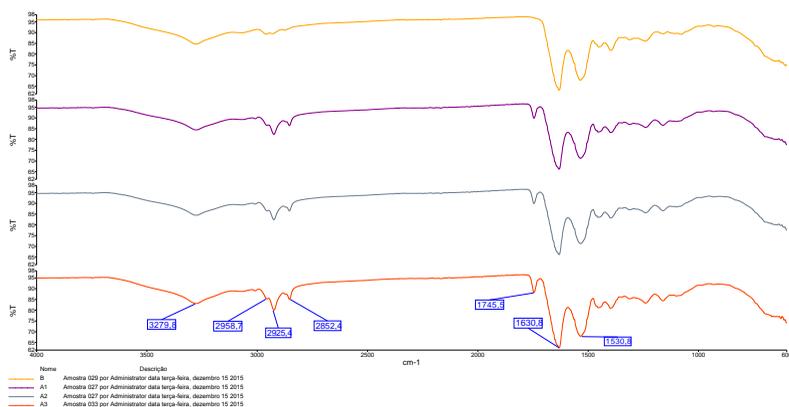
Figura 11: Espectro IV – vitamina D₃.**Tabela 7:** Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para vitamina D₃.

Comprimento de onda (λ) (cm ⁻¹)	Tipo de absorção
3302,30	Deformação O-H
2950-2800	Deformação C-H (grupos -CH ₂ e -CH ₃)
1720-1520	Estiramento C=C
1051,60	Estiramento C-O

No espectro de infravermelho da proteína isolada de soro de leite (Figura 10), observaram-se bandas da absorção características, referentes aos compostos carbonílicos e à amida primária (1633,6 cm⁻¹) e à amida secundária (1525 cm⁻¹). Na Figura 11 podemos identificar as principais bandas relacionadas à vitamina D₃, começando pela banda característica ao grupo OH na região de 3302,30 cm⁻¹, a banda de estiramento referente a ligação C-O em 1051,60 cm⁻¹ e do estiramento dos alcenos na região de 1720-1520 cm⁻¹.

As Figuras 12 e 13 são referentes aos espectros de infravermelho sobrepostos das amostras sem surfactante B, A1, A2, A3 e com surfactante BS, A1s, A2s, A3s.

Figura 12: Espectro de IV - micropartículas sem Surfactante



De acordo com Duongthingoc et al. (2013), o espectro de infravermelho revela dois principais picos associados ao isolado proteico de soro de leite. São eles a amida primária e secundária ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) referentes a vibrações de moléculas com estruturas β - folhas e α - hélices, encontradas nas principais proteínas do soro de leite bovino, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. Pela interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos puros (Figuras 10 e 11) e das micropartículas formuladas sem surfactante (Figura 12) podemos comprovar a presença das bandas características da amida I e amida II na região de $1630,80$ e $1530,80\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, referentes à matriz (LÓPEZ-RUBIO; LAGARON, 2012).

Percebe-se também um maior alargamento da banda característica do grupo hidroxila na região de $3279,80\text{ cm}^{-1}$ e um aumento da intensidade na região $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ referentes as ligações C-H o que sugere a presença, devido a encapsulação, do composto ativo de interesse junto à matriz. Outro fator que reforça a presença da vitamina D_3 , na amostra, é a banda característica do excipiente, possivelmente o óleo de origem vegetal com uma cadeia alquílica longa – de 14 a 18 carbonos ($1745,50\text{ cm}^{-1}$) presente no fármaco utilizado, isso pode ser observado nos espectros do fármaco e da vitamina D_3 pura, na Figura 13. Todas essas diferenças podem ser comparadas com a amostra sem o material encapsulado (B) verificando a ausência destas características citadas.

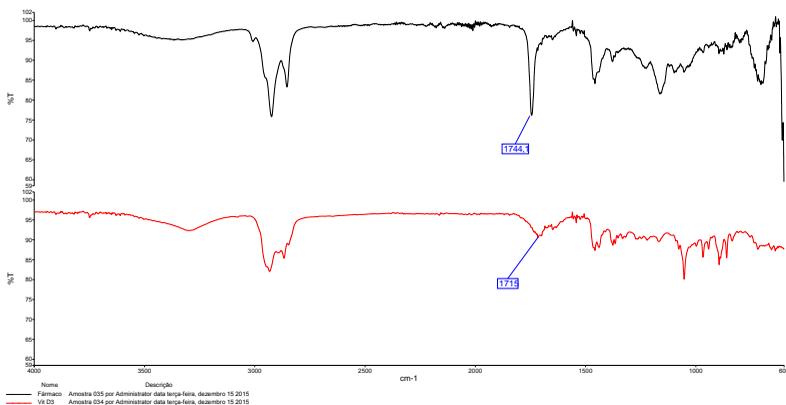
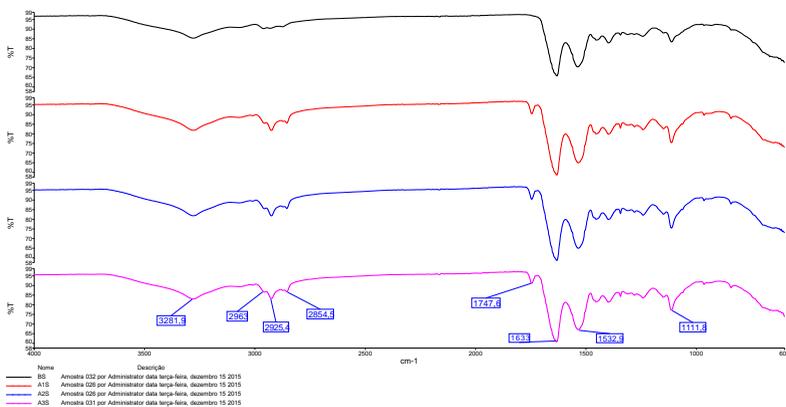
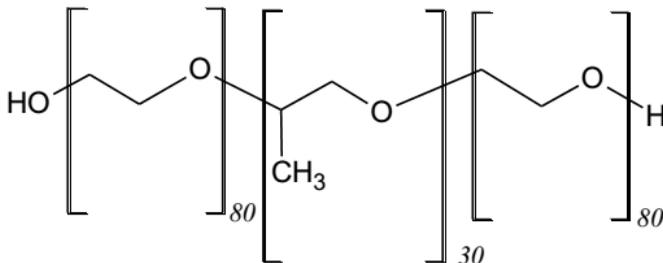
Figura 13: Espectro IV – fármaco e vitamina D₃.

Figura 14: Espectro IV - microparticulas com surfactante.



Comparando os dados dos espectros de infravermelho correspondentes das micropartículas formuladas com e sem surfactante, pode ser identificada a presença da banda de infravermelho $1111,80 \text{ cm}^{-1}$, característica de éteres, um grupo funcional presente na estrutura do surfactante Pluronic® F-68 utilizado como mostra a Figura 15. Além das demais bandas de absorção dos grupos funcionais presentes na proteína isolada de soro de leite, material de parede, e da vitamina estudada.

Figura 15: Estrutura molecular do surfactante Pluronic® F-68.



3.3.4. Determinação do perfil de liberação das micropartículas

A liberação da vitamina D₃ através da matriz de proteína isolada de soro de leite, para um meio externo foi avaliada, utilizando sacos de diálise em meio tamponado a pH 7,4. A análise foi realizada durante um período de quatro dias, e os resultados são ilustradas nas Figuras 16 e 17.

Figura 16: Liberação do composto bioativo, vitamina D₃, das micropartículas A1; A2 e A3.

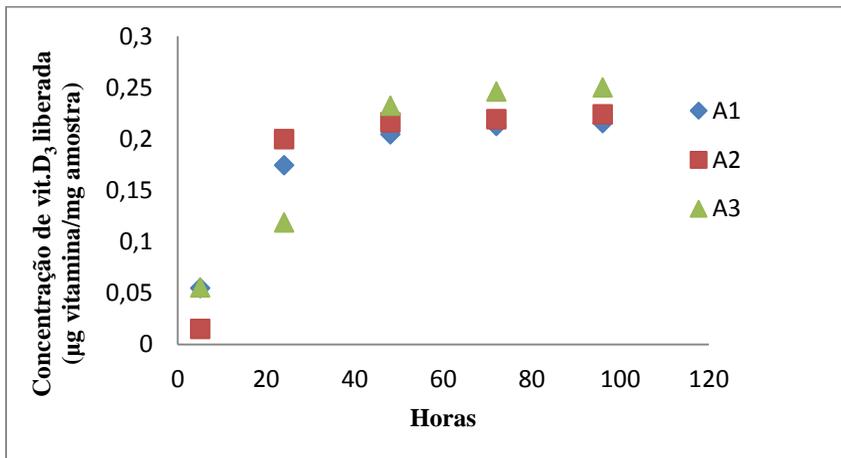
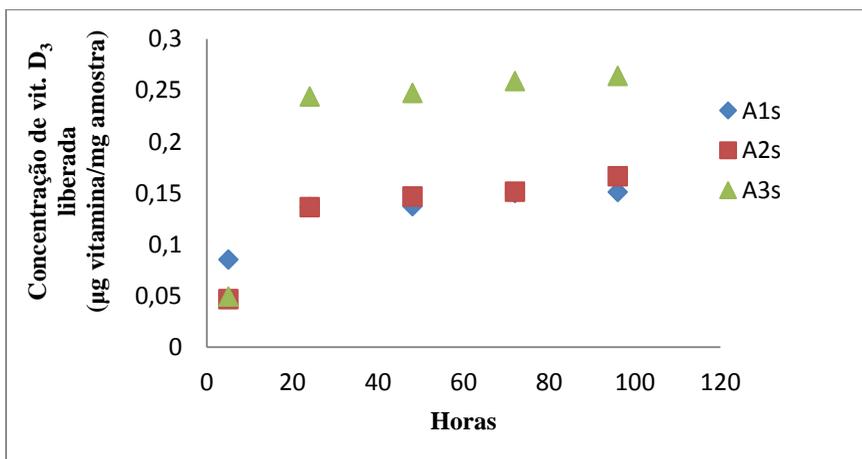


Figura 17: Liberação do composto bioativo, vitamina D₃, das micropartículas A1s; A2s e A3s.



As Figuras 16 e 17 ilustram que a análise de perfil de liberação das amostras durante um período de 96 horas (quatro dias), resultaram em um aumento de liberação do composto bioativo. Este aumento pode estar relacionado com a expansão da rede polimérica da matriz, conforme a penetração do meio aquoso durante o período de análise.

Além do aumento da liberação da vitamina estudada conforme o tempo de análise nota-se, um aumento conforme a concentração de vitamina nas micropartículas. Isso ocorre devido à presença de mais composto bioativo na superfície das partículas, resultando na maior liberação do fármaco para a fase externa até o equilíbrio termodinâmico. O mesmo comportamento, aumento da liberação conforme o tempo de análise e concentração de recheio foi observado nas micropartículas contendo surfactante em sua formulação (Figura 25).

Ao comparar os dados dos gráficos das Figuras 24 e 25, pode é possível perceber que as amostras sem surfactante exibiram um perfil de liberação similar, mesmo apresentando concentrações diferentes de vitamina, com valores de 0,2045; 0,2161 e 0,2324 μg vitamina / mg amostra para A1, A2 e A3, respectivamente. No caso das amostras contendo surfactante, essa similaridade não é observada gerando valores de 0,0137; 0,0146 e 0,2475 μg vitamina/mg amostra para A1s, A2s, e A3s, respectivamente. Essa diferença no perfil de liberação entre as partículas com e sem surfactante pode estar relacionada com a maior presença da vitamina na superfície da matriz nas amostras com surfactante. Nas amostras com surfactante houve uma liberação quase que máxima a partir do primeiro dia, enquanto para as amostras sem surfactante esse efeito só acontece a partir do terceiro dia. Provavelmente, o surfactante ocasionou uma maior liberação do conteúdo das partículas devido a uma maior solubilização da matriz polimérica provocada pelas características anfifílicas do composto.

Devido à natureza hidrofílica da matriz, isolado proteico de soro de leite, durante o processo de liberação, ocorrem interações entre o solvente e a matriz, que provocam o intumescimento, a expansão e relaxamento da rede polimérica. Sendo assim, podemos descrever essa liberação pela razão entre a vitamina liberada em um determinado tempo, em relação ao momento de equilíbrio (M_t/M_∞) (Figuras 18 e 19) segundo a segunda lei de Fick de acordo com a Equação 5:

$$M_t / M_\infty = ka t^n \quad 5$$

Onde: M_t denota a massa de recheio liberada em um certo período de tempo, M_∞ a massa de recheio liberada no equilíbrio, t representa o tempo, e K_a e n são parâmetros que dependem tanto da natureza, do meio de liberação e das interações entre o polímero e o composto ativo (MASTROMATTEO et al., 2010). Os parâmetros da segunda lei de Fick para as amostras encontram-se ilustrados na Tabela 8.

Figura 18: Liberação de vitamina D₃ pela razão M_t/M_∞ em função do tempo para as amostras A1; A2 e A3.

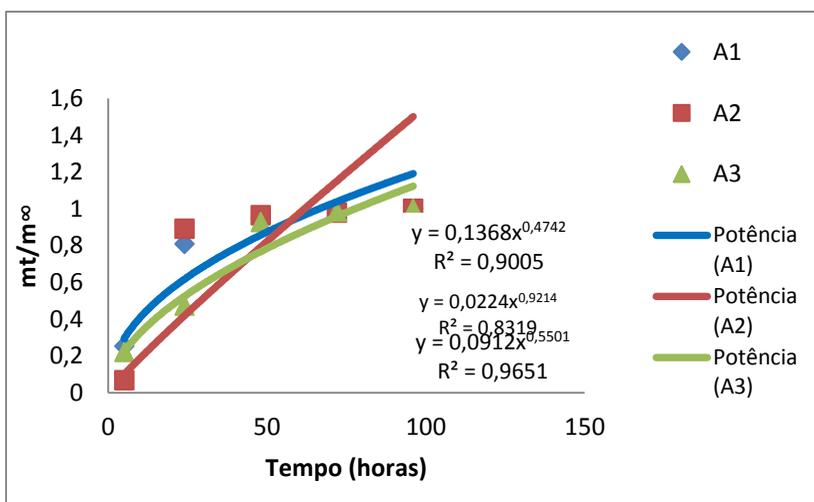


Figura 19: Liberação de vitamina D₃ pela razão M_t/M_∞ em função do tempo para as amostras A1s; A2s e A3s.

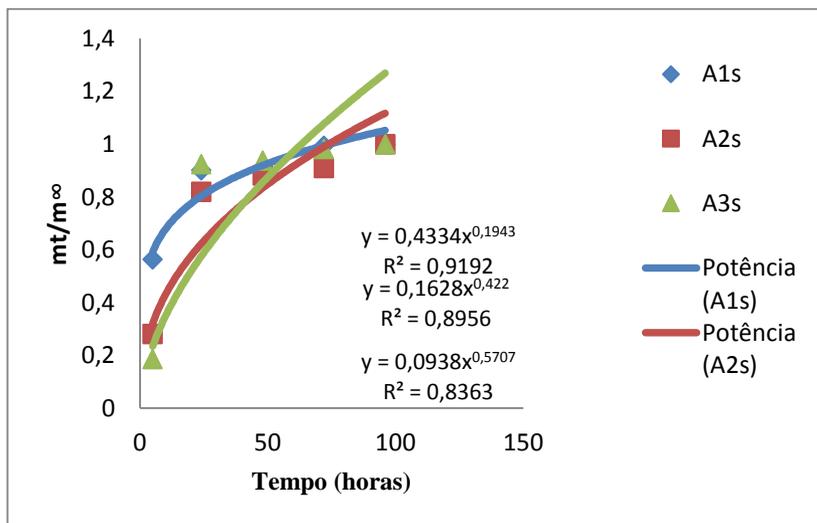


Tabela 8: Parâmetros obtidos pela equação $M_t/M_\infty = K_a t^n$ para as amostras com e sem surfactante.

Amostras	K_a	n	R^2
A1	$0,14 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,05$
A2	$0,02 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,01$
A3	$0,091 \pm 0,11$	$0,55 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,11$
A1s	$0,433 \pm 0,12$	$0,19 \pm 0,20$	$0,92 \pm 0,20$
A2s	$0,16 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$
A3s	$0,09 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,04$

Os valores obtidos pelo parâmetro n indicam como o composto ativo foi transportado/liberado ao meio, são observados três casos de liberação: em um primeiro caso, quando $n = 0,5$, a taxa de difusão é muito menor do que a taxa de relaxação, denominando-se transporte *Fickiano* do tipo I. Em um segundo caso, quando $n = 1,0$ a taxa de difusão é mais rápida, quando comparada com a taxa de relaxação, e o transporte é *Fickiano* do tipo II. Em um terceiro caso, na região entre 0,5 e 1,0 o processo de difusão é não Fickiana e é descrita como “difusão anômala”.

Observando os dados da Tabela 8, pode-se classificar a liberação da vitamina D₃ entre as micropartículas A1, A1s e A2s como transporte *Fickiano* do tipo I, Dessa forma pode-se afirmar que, a concentração de vitamina D₃ liberada para o meio aumenta em função do tempo, com a relaxação da matriz polimérica, e que, as amostras contendo surfactante apresentaram maior liberação ao primeiro dia, que as amostras sem surfactante, devido a uma maior solubilização/relaxação da matriz polimérica, em função do tempo. No entanto as micropartículas A2, A3 e A3s apresentam valores na região ente 0,5 e 1,0 classificando-se como uma difusão anômala (não Fickiana).

3.3.5. Ângulo de contato e energia livre superficial

Um ângulo de contato é formado ou não, quando uma interfase sólido-líquido é estabelecida, durante um contato de uma fase sólida e outra líquida, este fenômeno é chamado de molhabilidade. Deste modo, quando um solvente entra em contato com um sólido e é completamente adsorvido, ou seja, o solvente é capaz de molhar completamente o sólido, o ângulo de contato tem valor zero, quando a adsorção não ocorre em absoluto, o ângulo de contato é 180°C. Nos casos de uma molhabilidade parcial, os valores de ângulo de contato são intermediários entre estes extremos (SHAW, 1991; DEBACHER; HUMERES; GONZÁLES, 2010).

Assim, através das medidas do ângulo de contato formado em uma interface sólido - líquido entre a superfície das pastilhas de micropartículas, e os solventes de diferentes polaridades, formaldeído, água deionizada e diiodometano testados, as amostras foram caracterizadas pela sua hidrofiliicidade ou hidrofobicidade. A Tabela 9 apresenta os valores de ângulo de contato obtidos.

Tabela 9: Ângulo de contato das micropartículas B, A1, A2, A3 BS, A1s, A2s e A3s como os solventes: água deionizada, formaldeído e diiodometano.

Amostras	Ângulo de contato		
	Água deionizada*	Formaldeído*	Diiodometano*
B	81,35 ± 3,25	85,47±0,29	63,88±1,98
A1	81,49 ± 1,37	83,69±0,34	56,73±0,93
A2	81,52 ± 0,59	76,98±0,12	42,82±1,19
A3	81,66 ± 1,66	75,26±1,46	35,40±1,12
B S	53,68 ± 0,62	76,10±2,14	61,83±4,45
A1s	59,39 ± 0,34	68,73±0,89	45,99±2,59
A2s	63,01 ± 0,41	69,25±0,53	26,48±0,80
A3s	63,06 ± 3,26	66,44±0,86	48,24±0,81

*Média com base em triplicata ± desvio padrão dos resultados.

Analisando a Tabela 9, pode ser considerado que o valor do ângulo de contato das amostras B, A1, A2 e A3, formados com a água deionizada, são maiores quando comparados às mesmas amostras, contendo surfactante. É possível observar também, um aumento do ângulo de contato formado com a água deionizada, conforme o aumento da concentração de vitamina D₃, entre as amostras contendo surfactante.

O oposto ocorreu quando o diiodometano, solvente com caráter mais apolar, entrou em contato com a superfície das pastilhas. A Tabela 9 mostra que as micropartículas B e BS, que não contém o composto bioativo em sua formulação, na presença do diiodometano apresentam os maiores valores de medida de ângulo de contato, diminuindo este valor quanto maior a proporção de vitamina D₃ nas amostras. No caso das amostras sem surfactante, analisadas com a formamida, um solvente com uma polaridade intermediária, as medidas de ângulo de contato situaram-se entre os valores encontrados para a água e para o diiodometano, já as amostras contendo surfactante, apresentaram valores mais elevados, indicando uma maior concentração de vitamina, depositada na superfície das partículas.

Através dos dados de ângulo de contato das micropartículas, é possível obter seus valores de energia livre superficial. A energia livre superficial total (γ^T) pode ser determinada pelo método de Owens-Wendt, pela soma dos componentes dispersivo (γ^D) e polar (γ^P) do sólido utilizado, conforme a Equação 6, que quando aplicada com os dados dos solventes testados (γ^{L^D} e γ^{L^P}), na Equação 7 – (Equação de Owens-Wendt) é fornecido dados da hidrofobicidades das partículas

(DEBACHER; HUMERES; GONZÁLES, 2010; JAMSHIDIAN et al., 2012).

$$\gamma_S^T = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (6)$$

$$(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \right) \quad (7)$$

Os valores de dispersão e polaridades dos solventes aplicados foram: água deionizada ($\gamma^T = 72.8$ mN/m, $\gamma^d = 21.8$ mN/m, $\gamma^p = 51.0$ mN/m), diiodometano ($\gamma^T=50.8$ mN/m, $\gamma^d=50.8$ mN/m, $\gamma^p=0$ mN/m) e formamida ($\gamma^T = 58.0$ mN/m, $\gamma^d = 39.0$ mN/m, $\gamma^p = 19.0$ mN/m). Os dados da energia livre superficial, obtidos através dos cálculos de valores médios do ângulo de contato determinado para cada solvente estão mostrados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Valores de energia livre superficial das amostras sem surfactante.

Amostras	Energia Superficial Total	Energia Superficial Dispersiva	Energia Superficial Polar
B	26,50	19,85	6,65
A1	26,61	23,24	5,37
A2	34,26	30,74	3,52
A3	36,80	33,99	2,80

Tabela 11: Valores de energia livre superficial das amostras com surfactante.

Amostras	Energia Superficial Total	Energia Superficial Dispersiva	Energia Superficial Polar
BS	44,14	25,93	18,20
A1s	37,95	18,98	18,97
A2s	43,55	33,99	9,56
A3s	40,51	27,58	12,94

Os valores do ângulo de contato obtidos na análise em que a água deionizada foi utilizada como solvente foram menores que 90°C em ambas as amostras determinando assim, segundo Feng et al. (2003), que estas apresentam um caráter hidrofílico. Porém observando os dados de energia superficial apresentados na Tabela 11, nota-se um valor maior da energia superficial dispersiva em ambas as amostras, indicando que houve uma maior interação entre as micropartículas e os solventes apolares. Esta característica dispersiva das amostras pode indicar que o processo de secagem por atomização influenciou na característica hidrofílica da matriz utilizada. Outro fator que pode estar ligado aos dados obtidos é a presença da vitamina lipossolúvel, material de recheio, na superfície das micropartículas.

Ocorreu um aumento da energia livre superficial polar nas amostras contendo surfactante, o que pode estar associado ao fato de que as moléculas de surfactante, dispostas na superfície das partículas, estejam com sua cauda hidrofóbica voltada para o núcleo das partículas e sua cabeça polar ancorada na superfície, aumentando assim a energia livre polar dessas partículas, quando comparadas com as partículas sem a presença do surfactante.

Esta interação, sólido-líquido também pode ser observada através das imagens do espalhamento da gota na superfície das amostras, representando a molhabilidade, mostradas nas Figuras 20 e 21.

Figura 20: Representação da molhabilidade das micropartículas com surfactante das amostras B, A1, A2 e A3 como os solventes: água deionizada, formamida e diiodometano.

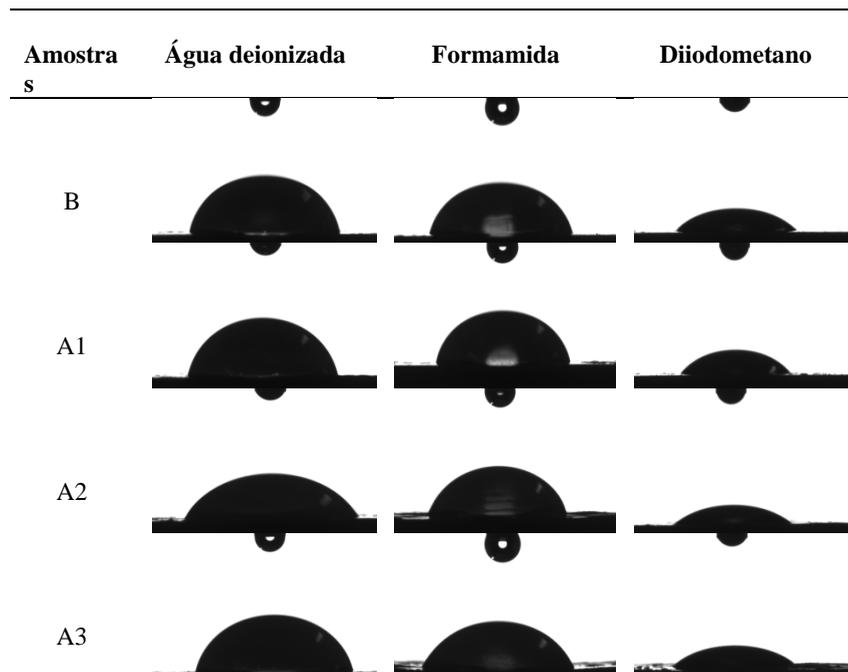
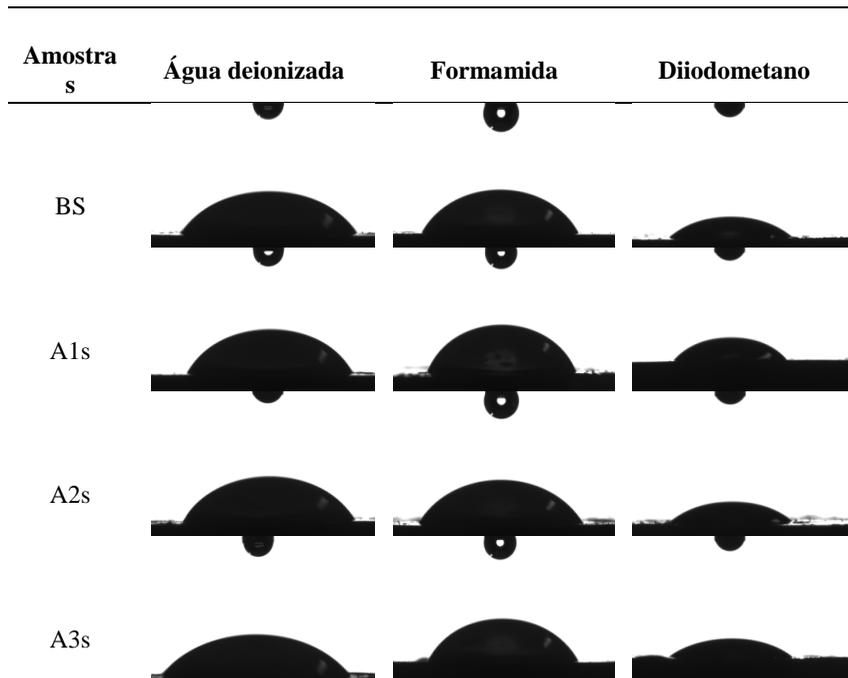


Figura 21: Representação da molhabilidade das micropartículas com surfactante das amostras B, A1, A2 e A3 como os solventes: água deionizada, formamida e diiodometano.



Além de representar a molhabilidade das amostras, as Figuras 18 e 19 apresentam características da tensão superficial de cada solvente. Podemos observar que a gota de água sobre a superfície das partículas, possui um volume muito maior do que as demais, seguido da formamida e por fim o diiodometano. Esse volume está relacionado com a tensão superficial de cada solvente, ou seja, com a força exercida com igual intensidade em todas as direções, necessária para se romper a película, filme superficial, formado pelas moléculas do solvente (ATKINS; PAULA, 2002; DEBACHER; HUMERES; GONZÁLES, 2010).

A água forma um filme superficial muito forte, sendo necessária uma força de superfície de valor elevada para rompê-lo, conseqüentemente um número maior de moléculas, o que torna a gota mais volumosa. Já a formamida precisa de uma força superficial, porém

não tão elevada como a da água. No caso do diiodometamo o filme superficial formado não possui ligações muito fortes, sendo facilmente rompido por uma tensão superficial baixa, resultando em uma gota com um volume menor (ATKINS; PAULA, 2002; DEBACHER; HUMERES; GONZÁLES, 2010).

3.3.6. Densidade aparente e densidade compactada

A densidade aparente e a densidade compactada das amostras foram determinadas através dos valores de volume e massa de acordo com as Equações 8 e 9.

$$\text{Densidade Aparente} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad 8$$

$$\text{Densidade Compactada} = \frac{\text{massa}}{\text{volume}} \quad 9$$

Através dos valores de densidade aparente e densidade compactada das micropartículas, é possível determinar o índice de Carr e índice de Hauser, estes dados estão relacionados com a compressibilidade/compactabilidade do pó, ou seja, com a fluidez das micropartículas (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). O índice de índice de Carr (I_{carr}) e de Hauser (I_{Hauser}) podem ser obtidos através das Equações 10 e 11, respectivamente.

$$I_{carr}(\%) = \frac{d_{cp} - d_{ap}}{d_{cp}} \times 100 \quad 10$$

$$I_{Hauser} = \frac{d_{cp}}{d_{ap}} \quad 11$$

Os dados de densidade aparente, densidade compactada, índice de Carr e índice de Hauser das micropartículas encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de densidade e Índice de Carr's e Hauser.

Amostras	Densidade Aparente (d_{ap}) ($mg.mL^{-1}$)*	Densidade Compactada (d_{cp}) ($mg.mL^{-1}$)*	Índice de Carr's (I_{Carr})	Índice de Hauser (I_{Hauser})
B	0,167±0,001	0,158±0,003	6,345±0,003	0,940±0,001
A1	0,168±0,001	0,184±0,005	8,690±0,001	1,095±0,001
A2	0,200±0,003	0,203±0,010	1,329±0,001	1,015±0,003
A3	0,200±0,001	0,208±0,002	3,938±0,003	1,041±0,002
BS	0,201±0,002	0,222±0,008	9,577±0,004	1,106±0,003
A1s	0,167±0,008	0,183±0,011	10,941±0,004	1,098±0,002
A2s	0,179±0,005	0,198±0,003	9,540±0,005	1,105±0,001
A3s	0,167±0,010	0,198±0,008	15,675±0,003	1,186±0,003

*Média±desvio padrão com base na triplicata dos resultados.

Os dados da Tabela 12 indicam que os valores de densidade aparente e compactada, das amostras com e sem surfactante aumentaram conforme a adição da vitamina. Tendo em vista que a densidade é diretamente proporcional à massa de uma amostra e inversamente ao seu volume, consequentemente as partículas contendo maiores concentrações de recheio apresentam valores de densidade mais elevados.

De acordo com Turchiuli et al. (2005) valores de Índice de Carr's e de Hauser de < 10 e 1,00 – 1,11 possuem uma fluidez excelente, de 11-15 e 1,12 – 1,18 fluidez boa e de > 38 e > 1,60 péssima respectivamente. Os resultados tanto do índice de Carr's quanto de Hauser para as micropartículas sem surfactante apontaram uma fluidez excelente para os pós. No caso das partículas contendo surfactante, a amostra A1s apresentou um Índice de Carr's correspondente a uma fluidez boa, já a de A3s apresentou uma fluidez boa em ambos os índices, as demais amostras apresentaram fluidez excelente em ambos os parâmetros.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento das formulações de matrizes de proteína isolada de soro de leite com e sem surfactante foi realizado com sucesso, e os valores de eficiência de encapsulação das micropartículas indicaram maior eficiência na encapsulação de menores concentrações de composto bioativo (20,0 % em relação à massa da matriz), sendo de 54,03 % para a amostra A1 e de 21,19 % para A1s.

As análises de distribuição de tamanho das micropartículas e suas respectivas micrografias revelaram que as amostras apresentaram tamanhos homogêneos em uma escala micrométrica de 10-100 μm , com um formato esférico, de superfície lisa e sem fissuras, proporcionando assim, menor permeabilidade de gases na parede da matriz, e consequentemente maior retenção e proteção do composto bioativo.

Os espectros de infravermelho permitiram a identificação as bandas e picos característicos referentes aos materiais puros nas amostras o que indica a presença da matriz, do surfactante e do fármaco nas amostras. Do mesmo modo, as análises térmicas como a termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial confirmam a alta estabilidade térmica das estruturas referentes à matriz, e permitiram a comparação dos efeitos do fármaco e da matriz proteica na entalpia de fusão do surfactante.

Os resultados de ângulo de contato indicaram uma maior interação entre as micropartículas e os solventes apolares. Os dados de perfil de liberação resultaram em um aumento de liberação do composto bioativo conforme o tempo e a concentração do composto bioativo de interesse.

Com base na caracterização das amostras podemos concluir que a formação das micropartículas de vitamina D₃ em matrizes de proteína isolada de soro de leite com e sem a presença do surfactante foram obtidas com sucesso. Indicando que o material de parede utilizado possui potencial como agente encapsulante da vitamina estudada, e que o processo de secagem por atomização apresentou-se como uma boa metodologia para formação deste material.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, M. A. E.; DAVOODI, D. Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. **Food Chemistry**, v.143, p.379-383, 2014.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O. ; RODRIGUES, P. H. J.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; De CARVALLHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de Coprodutos. **Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ANTUNES, A.J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: Manole, p. 135, 2003.
- ATKINS, P. W.; de Paula, J. **Físico-Química**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, 2007. ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de químicas: questionando a vida moderna e meio ambiente. Tradução Ricardo Bicca de Alencastro. 3. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- AVASARALA, J.; ZACHARIAH, P. Vitamin D deficiency in multiple sclerosis: Should testing and treatment be based on racial background. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 358, p. 417–418, 2015.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- BARANAUSKIEN, R.; VENSKUTONIS, P.R.; DEWETTINCK, K.; VERHE, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International**, v. 39, p.413–425,2006.
- CHINTA, D. D.; GRAVES, R. A.; PAMUJULA, S.; PRAETORIUS, N.; BOSTANIAN, L. A.; MANDAL, T. K. Spray-dried chitosan as a direct compression tableting excipient. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, p.43-48, 2009.
- DEBACHER, N. A.; HUMERES, E. ; GONZÁLES, G. Química de superfície e coloides. Princípios básicos & Aplicações. Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry** v.141, p. 1782–1788, 2013.

Favaro-Trindade, C.S.; Santana, A.S.; Monterrey-Quintero, E.S.; Trindade, M.A.; Netto, F.M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 336–340, 2010.

FENG, L.; SONG, Y.; ZHAI, J.; LIU, B.; XU, J.; JIANG, L.; ZHU, D. Creation of a superhydrophobic surface from an amphiphilic polymer. **Angewandte Chemie**, v. 115, n. 7, p. 824-826, 2003.

FRASCARELI, E. C. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 413-424, jul. 2012b.

HEANEY R. P.; ARMAS, L.A.G; SHARY, J.R.; BELL, N.H.; BINKLEY, N.; HOLLIS, B.W. 25-hydroxilation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. **American Journal Clinical Nutrition**, n.87, v.6, p. 1738-42, 2008.

JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E.A.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.J.; CLEYMAND, F.; DESOBRY, S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 380-389, 2012.

Lian, W. C.; Hsiao, H. C.; & Chou, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 13, p.200-206, 2012.

LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. **Caracterização de Polímeros**, 2001

MASTROMATTEO, M.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M.A. Advances in controlled release devices for food

packaging applications – Review. **Trends in Food Science & Technology** v.21, p.591-598, 2010.

MCMURRY, J. Química Orgânica. Tradução técnica Ana Flavia Nogueira e Izilda Aparecida Bagatin. São Paulo: Cengage Learning, v.1, 2009.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bonés of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 86, p. 325–332, 2004.

NING, Z.; SONG, S.; MIAO, L.; ZHANG, P.; WANG, X.; LIU, J.; HU, Y.; XU, Y.; ZHAO, T.; LIANG, Y.; WANG, Q.; LIU, L.; ZHANG, J.; HU, L.; HUO, M.; ZHOU, Q. High prevalence of vitamin D deficiency in urban health checkup Population **Clinical Nutrition**, p. 1-5, 2015.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011.

Rodríguez-Huezo, M.E.; Durán-Lugo, R.; Prado-Barragán, L.A.; Cruz-Sosa, F.; Lobato-Calleros, C.; Alvarez-Ramírez, J.; Vernon-Carter, E.J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

SARAIVA, G. L.; CENDOROGLO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAÚJO, L. M. Q.; VIEIRA, J. G. H.; MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z. C.; KUNII, I.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO, M. Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatireoidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, vol.51, n.3, p. 437-442, 2007.

SHAW, D.J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry, 4 ed., 1991.

SHIRAI, M.A.; OLIVATO, J.B.; GARCIA, P.S.; MÜLLER, C.M.O.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Thermoplastic

starch/polyester films: Effects of extrusion process and poly (lactic acid) addition. **Materials Science and Engineering**, v.33, p.4112–4117, 2013.

SOARES, F.C.; YAMASHITA, F.; MÜLLER, C.M.O.; PIRES, A.T.N. Effect of cooling and coating on thermoplastic starch/poly (lactic acid) blend sheets. **Polymer Testing**, v.33, p.34–39, 2014.

TENG, Z.; LUO, Y.; WANG, Q. Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D₃. **Food Chemistry**, v. 141, p.524–532, 2013.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.133–143, 2007.

TURCHIULI, C.; FUCHS, M.; BOHIN, M.; CUVELIER, M.E.; ORDONNAUD, C.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; DUMOULIN, E. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6 p.29– 35, 2005.

XU, X.; KHAN, M.A.; BURGESS, D.J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v.426, p. 211– 218, 2012.

ZHU, G. Y.; XIAO, Z. B.; ZHOU, R.J. F.; YI, P. Adv. Mater. Res. 2012, 440, 535. VASBINDER, A. J.; ALTING, A. C.; VISSCHERS, R. W.; DE KRUIF, C. G. Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. **International Dairy Journal**, v.13, p. 29–38, 2003.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29 (2): 420-430, abril-junho.2009.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA RETICULAÇÃO DE PROTEÍNA ISOLADA DE SORO DE LEITE APLICADA COMO MATRIZ DE MICROPARTÍCULAS DE VITAMINA D₃

RESUMO

A reticulação enzimática de proteínas isoladas de soro de leite para aplicação como material encapsulante de vitamina D₃ proporciona uma matriz com uma rede molecular mais rígida, dificultando assim, a difusão do composto bioativo encapsulado. Neste projeto foram obtidas e caracterizadas seis formulações de micropartículas de vitamina D₃, em matriz de isolado proteico de soro de leite, a partir do processo de secagem por atomização. As formulações foram realizadas com a mesma metodologia, diferenciando-se apenas em relação à concentração de recheio, e à adição/ou não da do agente reticulante. Através dos resultados das análises reológicas das emulsões, podemos concluir que o procedimento de reticulação foi realizado com êxito, devido ao aumento da viscosidade. Os espectros de infravermelho das partículas reticuladas revelaram a diminuição da intensidade das bandas referentes à matriz, amida I e amida II, indicando a rigidez das ligações cruzadas. As micrografias das amostras não reticuladas proporcionaram proteção ao composto bioativo através de uma parede esférica e lisa micropartículas contendo o agente reticulante, revelaram a formação de esferas com diversas concavidades resultando em uma maior resistência à difusão do soluto e a fratura mecânica. No entanto a eficiência de encapsulação das amostras polimerizadas demonstrou-se inferior, sendo de 10 % e de 57 % de eficiência para as amostras sem o agente reticulante. Indicando que a matriz reticulada não resultou em um bom agente encapsuante para a vitamina D₃ através do método de secagem por atomização. Porém as amostras não reticuladas declararam-se uma alternativa promissora para a encapsulação da vitamina D₃, pois proporcionaram a esta proteção e melhores rendimentos de encapsulação.

Palavras-chave: micropartículas, reticulação, proteína isolada de soro de leite.

1. INTRODUÇÃO

A proteína isolada de soro de leite, oriunda do beneficiamento do soro de leite, um subproduto da fabricação de queijo (SILVA; BOLINI, 2006; ALVES et al., 2014), apresenta características interessantes para aplicação como matriz na encapsulação de compostos bioativos. Dentre as características mais atrativas estão a formação de espuma, gelatinização, viscosidade, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, solubilidade, a capacidade emulsificante e a estabilidade das emulsões (ANTUNES, 2009).

Além das características citadas, a proteína isolada de soro de leite é rica em aminoácidos essenciais, todavia sua natureza hidrofílica limita sua aplicação em processos utilizados na fabricação de alimentos e como matriz no processo de encapsulação de compostos bioativos sensíveis à umidade (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

Uma alternativa para vencer esta limitação é promover uma reticulação enzimática da proteína isolada de soro de leite, uma técnica que favorece a incorporação de ligações inter e intramoleculares por ligações cruzadas (FRASCARELI et al., 2012b), sem apresentar potencial toxicológico como ocorre quando são utilizados reticulantes químicos (SELLING; BISWAS, 2010).

A transglutaminase, uma enzima naturalmente presente na maioria dos fluídos corporais e tecidos animais (LORAND, 202), é bastante aplicada na indústria, pois confere características únicas aos alimentos como, por exemplo, melhores aspectos sensoriais (NIELSEN, 1995; COLLAR et al., 2005).

A reticulação enzimática da proteína isolada de soro de leite com a transglutaminase promove reações cruzadas com as proteínas em maior proporção como a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, sendo estas mais intensas com α -lactoalbumina, devido a maior disponibilidade de resíduos de lisina e glutamina (FAERGEMAND; OTTE; QVIST, 1997).

As reações cruzadas entre as proteínas do isolado proteico de soro de leite formam uma rede molecular mais rígida, e como menor solubilidade em água, possibilitando sua aplicação como agente encapsulante (FRASCARELI et al., 2012b; RODEA_GONZÁLES et al., 2012).

Tendo em vista as características que tornam a proteína isolada de soro de leite atrativa para aplicação como matriz na encapsulação de compostos bioativos, e a possibilidade de diminuir seu caráter hidrofílico através de sua reticulação enzimática, este trabalho teve

como objetivo a produção de micropartículas de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite reticulada com a enzima transglutaminase. Aumentando assim, a proteção do composto ativo, vitamina D₃, e o potencial de aplicação destas partículas na indústria de alimentos.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Material

As micropartículas reticuladas foram preparadas a partir do isolado protéico de soro de leite comercial (PI), com 92 % de proteína, obtido pela Glanbia[®], água destilada, a enzima transglutaminase (ACTIVA WM[®]) adquirida da Ajinomoto, medicamento comercial de lote: 14040030 contendo 5,0µg de vitamina D a cada 0,036 mL, o tensoativo Pluronic[®] F-68 (Polioxietileno), e a vitamina D₃, adquiridos da SIGMA-ALDRICH[®].

2.2. Metodologia

2.2.1. Preparação das micropartículas

As micropartículas de isolado proteico de soro de leite reticuladas com a enzima transglutaminase foram produzidas a partir da modificação da metodologia de Gauche et al., (2008) e de Gan et al., (2008). Em uma primeira etapa, prepararam-se três soluções de PI 10 % (m/m) em água destilada, e estas foram mantidas sob agitação por um período de doze horas até a total dissolução dos sólidos.

Após a solubilização da matriz, foram adicionados 2,0g do surfactante Pluronic[®] F-68 às soluções, as quais foram novamente mantidas sob agitação até a formação de uma solução homogênea. Na segunda etapa adicionou-se a vitamina D₃ às soluções, nas seguintes proporções 20, 25 e 30 % (m/m em relação à massa de PI), formando três emulsões. Estas emulsões foram então homogeneizadas, como um homogeneizador Ultra-Turrax[®] para devida estabilização, por um período de 5 minutos a 5000 rpm.

Em uma terceira etapa a enzima transglutaminase foi adicionada à solução em uma proporção de 50U/g de proteína isolada de soro de leite, e as soluções foram mantidas sob agitação por 30 minutos. Em seguida as mesmas foram incubadas em uma estufa Biomatic (Ageon 355) a uma temperatura de 36°C por um período de 4horas.

Terminado o período de incubação, as soluções foram secas pelo método de atomização em um Mini Spray Dryer, da marca BÜCHI modelo B-290 no Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais da UFSC.

O mesmo procedimento de preparação das micropartículas foi feito, nas mesmas proporções, porém sem a adição da enzima na terceira etapa da metodologia, para análise e comparação das características físico-químicas das partículas preparadas com e sem a adição da enzima.

2.3. Eficiência de encapsulação e rendimento das micropartículas

O rendimento percentual dos produtos foi obtido através da relação entre o rendimento real e teórico das micropartículas produzidas (Equação 1). Já os valores de eficiência de encapsulação (EE), foram determinados pela quantificação da porção do composto bioativo presente no núcleo das micropartículas secas e também na superfície, em relação à quantidade total adicionada no início da emulsão, como mostrado nas Equações 1 e 2.

$$\text{Rendimento percentual} = \frac{\text{rendimento real}}{\text{rendimento teórico}} \times 100 \quad 1$$

$$\text{EE}(\%) = \frac{\text{vitamina D3 total} - \text{vitamina D3 superficial}}{\text{vitamina D3 total teórica}} \times 100 \quad 2$$

A quantificação foi realizada através da espectroscopia de UV – Vis, em um espectrofotometro HITACHI U-1800, com detecção em 265 nm, segundo o método de Abbsi et al. (2014) com algumas modificações. Uma curva de calibração ($R^2=0,996$) foi obtida, empregando vitamina D₃ medicamento.

2.3.1. Determinação da massa total de vitamina D₃

Em uma primeira etapa, 0,05g de micropartículas foram solubilizadas em 10,0 mL de água destilada, e mantidas sob agitação por 10 minutos em um agitador magnético Dist DI -03. Após a agitação, dissolveu-se uma alíquota de 1,0 mL em 10,0 mL de álcool etílico, e esta solução foi então centrifugada a uma velocidade de 6000 rpm por um período de 15 minutos em uma centrífuga Hermle modelo Z 200A. Em seguida o sobrenadante foi retirado e a vitamina, foi quantificada através de espectroscopia de UV – Vis em um equipamento da marca HITACHI, modelo U-1800, conforme o item 2.3.

2.3.2. Determinação da massa superficial de vitamina D₃

A massa superficial de vitamina D₃ foi obtida através da centrifugação de uma solução heterogênea contendo 0,05 g de amostra e 10,0 mL de álcool etílico por um período de 15 minutos a 6000 rpm, em uma centrífuga Hermle modelo Z 200A. Em seguida a vitamina presente no sobrenadante foi quantificada por meio de espectroscopia de UV – Vis em um espectro de absorção marca HITACHI modelo U-1800, conforme o item 2.3.

2.4. Caracterização físico-química das micropartículas

Após a determinação do rendimento, e da eficiência de encapsulação das micropartículas reticuladas, as mesmas foram caracterizadas.

2.4.1. Análise morfológica

2.4.1.1. Morfologia e distribuição de tamanho de partícula

Através das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), empregando um microscópio JEOL modelo JSM-6390LV, e de micrografias por difração de feixe de laser, obtidas em um equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK), foram obtidos dados sobre a morfologia e distribuição de tamanho das amostras. As micrografias foram obtidas através da dispersão de uma pequena quantidade de amostra em álcool etílico submetida à leitura no equipamento.

2.4.2 Análise térmica

2.4.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com o aparelho da marca Shimadzu Corporation (Quioto, Japão) situado no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. A análise foi realizada a temperatura ambiente até 600 °C, em uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (fluxo = 50 mL min⁻¹).

2.4.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Por meio de um equipamento de Microcalorimetria Exploratória Diferencial da marca TA Instruments, modelo Multicell DSC, foram avaliadas as mudanças de capacidade calorífica das micropartículas e de seus compostos puros, ambos em seu estado sólido. As amostras foram inicialmente resfriadas até $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida foi realizada a varredura na velocidade de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Para obter dados sobre as interações estruturais firmadas pelas micropartículas reticuladas com a enzima transglutaminase, realizou-se uma espectroscopia das amostras na região do infravermelho em um equipamento PerkinElmer FT-IR/NIR (Frontier Spectrometer) com transformada de Fourier, resolução de 4 cm^{-1} na faixa situada entre 4000 a 400 cm^{-1}

2.4.4. Comportamento reológico

As medidas de comportamento da viscosidade das soluções de proteína isolada de soro de leite reticuladas ou não com a enzima transglutaminase foram realizadas conforme o método proposto por Gauche et al. (2008) utilizando o reômetro da marca BROOKFIELD, modelo DV- III ULTRA. As análises foram realizadas em triplicata, a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma taxa de deformação de $200,0$ a $240,0\text{ rpm}$ aumentando linearmente um valor de $1,0\text{ rpm}$ a cada 20 segundos.

2.4.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas

O perfil de liberação das micropartículas foi determinado através da utilização de sacos de diálise (Cut-off de peso molecular de $12.000 - 16.000$ e porosidade de 25 Angstroms) segundo a metodologia de Xu, Khan e Burgess (2012), com algumas modificações. A estes sacos de diálise foram adicionados uma massa de $10,0\text{ mg}$ de amostra, juntamente com 10 mL de solução tampão pH $7,4$. Os mesmos foram então fechados e acondicionados dentro de frascos âmbar, contendo uma solução tampão de pH $7,4$, e mantidos sob leve agitação mecânica, durante todo o tempo de análise. Em intervalos de tempos estudados, foram coletadas alíquotas da fase externa ao saco de diálise, para avaliar

a concentração de composto bioativo presente no meio. A quantificação da vitamina D₃ foi realizada através de espectroscopia de UV – Vis. em um equipamento HITACHI modelo U-1800, conforme o item 2.3.

2.4.6. Densidade

2.4.6.1. Densidade aparente e compactada

O método de Chinta et al. (2009) com algumas modificações, foi utilizado para determinação da densidade aparente (d_{ap}) e compactada (d_{cp}) das micropartículas. Para determinar tanto a d_{ap} quanto a d_{cp} , uma massa de 0,5g de cada amostra foi adicionada a uma proveta graduada, através de um funil. Em uma primeira etapa, o volume apresentado na proveta foi registrado e tratado para obter-se o valor da densidade aparente, em seguida a massa foi compactada por 1200 vezes através de um compactador automático, Copley® Scientific modelo JV 1000, para colher os dados da densidade compactada.

2.4.7. Índice de Carr's e índice Hauser

Através dos valores de densidade aparente e compactada foram calculados os índices de Carr's e Índice Hauser de acordo com as Equações 3 e 4.

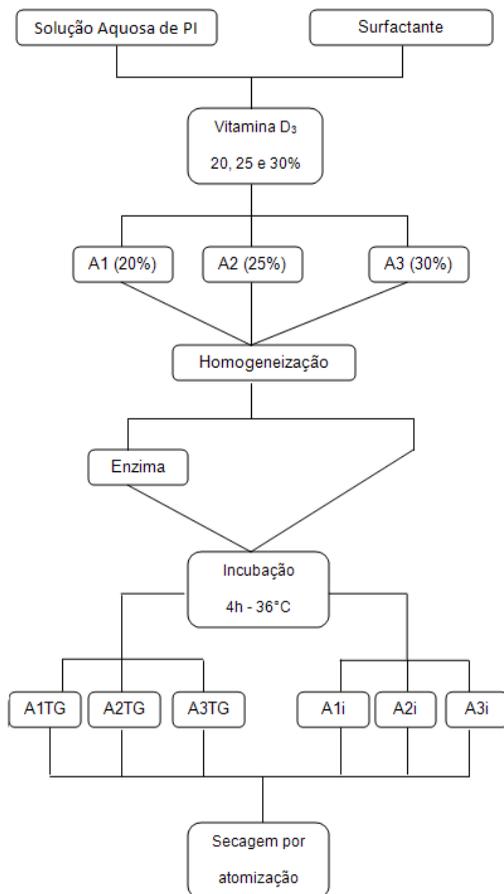
$$I_{carr}(\%) = \frac{d_{cp} - d_{ap}}{d_{cp}} \times 100 \quad 3$$

$$I_{Hauser} = \frac{d_{cp}}{d_{ap}} \quad 4$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seis formulações de micropartículas de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite foram produzidas. Em três delas utilizou-se a enzima transglutaminase, e diferentes concentrações de vitamina D₃, 20, 25 e 30 % (m/m em relação à massa de PI). As demais foram preparadas com os mesmos reagentes, nas mesmas proporções, com as três diferentes concentrações de vitamina, incubadas pelo mesmo período, porém sem a adição da enzima, como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Produção de micropartículas de vitamina D₃ reticuladas; A1TG, A2TG e A3TG, e não reticuladas; A1i, A2i e A3i, com a enzima transglutaminase.



Nesta secção todas as amostras foram preparadas com o surfactante em sua formulação, pois, micro e nanoestruturas são termodinamicamente instáveis e para sua obtenção é necessário que se utilize de mecanismos para estabilizá-las. O surfactante auxilia na redução da energia superficial do sistema, reduzindo a energia interfacial, também o que favorece a estabilização e formação das micropartículas. Conforme os resultados obtidos no Capítulo 2, as amostras que contém o surfactante em sua composição apresentaram maior rendimento no processo de secagem.

A Tabela 1 informa a denominação das amostras de micropartículas de vitamina D₃ em matriz de proteína isolada de soro de leite reticuladas e não reticuladas com a enzima transglutaminase.

Tabela 1: Denominação das formulações das micropartículas.

Amostras	Concentração de vitamina D ₃ (%)	Formulações contendo enzima	Formulações Não contendo enzima
Branco	0	B TG	BI
1	20%	A1 TG	A1 i
2	25%	A2 TG	A2 i
3	30%	A3TG	A3 i

3.1. Rendimento das micropartículas

Os valores de rendimento percentual das micropartículas são fornecidos na tabela 2.

Tabela 2: Rendimento percentual das micropartículas BTG, A1TG, A2TG, A3TG, Bi, Ai, A2i e A3i.

Amostras	Rendimento Real*	Rendimento Teórico*	Rendimento Percentual (%)
BTG	24,03±0,01	31,48±0,006	73,26±0,04
A1TG	23,98±0,16	35,50±0,007	67,56±0,47
A2 TG	22,43±0,34	36,54±0,007	61,40±0,95
A3 TG	21,82±0,19	37,61±0,004	58,03±0,51
BI	16,49±0,28	22,37±0,004	73,73±1,28
A1i	15,14±0,29	26,23±0,010	57,74±1,12
A2i	20,45±0,50	27,24±0,003	74,64±1,83
A3i	16,04±0,06	28,26±0,005	56,76±0,22

*Média com base em triplicata ± desvio padrão dos resultados.

Através de uma análise de variância (ANOVA) dos dados de rendimento percentual entre as amostras reticuladas e não reticuladas, como mesma concentração de vitamina D₃, foi possível constatar que houve diferença significativa entre os valores de rendimento percentual. Sendo os valores de $F = 61,57$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para BTG e Bi, de $F = 128,76$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A1TG e A1i de $F = 82,29$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A2TG e A2i e de $F = 10,23$ e $F_{\text{crítico}} = 7,70$ para A3TG e A3. Ambas apresentando $F < F_{\text{crítico}}$, indicando que a presença/ausência da matriz reticulada/incubada interferiu no rendimento das partículas.

3.2. Eficiência de encapsulação

Os resultados de eficiência de encapsulação (EE%) das micropartículas produzidas com e sem a adição da enzima encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Dados de Eficiência de encapsulação das micropartículas.

Amostra	A1i		A2i		A3i	
	A1TG	A2TG	A2TG	A2i	A3TG	A3i
Vit. D₃ Superficial ($\mu\text{g vit./0,05g amostra}$)*	0,224 \pm 0,082	0,386 \pm 0,068	0,316 \pm 0,020	0,298 \pm 0,027	0,298 \pm 0,027	0,298 \pm 0,027
Vit. D₃ Total ($\mu\text{g vit./0,05g amostra}$)*	0,327 \pm 0,056	0,467 \pm 0,081	0,821 \pm 0,016	0,374 \pm 0,048	0,374 \pm 0,048	0,898 \pm 0,052
Vit. D₃ Total Teórica (μg)	1,01	1,23	1,64	1,43	1,43	1,90
(EE%)	12,238 \pm 2,003	9,122 \pm 1,802	31,477 \pm 1,724	8,006 \pm 1,640	8,006 \pm 1,640	30,543 \pm 1,057

*Média com base em triplicata \pm desvio padrão dos resultados.

Por meio da tabela 3 pode-se observar que os valores de eficiência de encapsulação, tanto para as partículas reticuladas quanto para não reticuladas, foram superiores para as amostras com menores concentrações do composto bioativo em sua formulação. Essa relação entre a eficiência de encapsulação e a concentração do recheio (composto bioativo) pode estar relacionada a dois fatores. Primeiramente que com maiores concentrações de recheio teremos maior disponibilidade do mesmo no sistema, elevando assim, a quantidade retida na superfície e diminuindo a eficiência de encapsulação.

Ou seja, o aumento da quantidade de recheio não implica que a matriz encapsulará o mesmo na mesma proporção a que foi acrescida, sugerindo uma espécie de limite encapsulante pela matriz, uma proporção matriz/recheio que há maior eficiência de encapsulação. E esse excesso de recheio acaba sendo retido na superfície proporcionando um menor valor de eficiência de encapsulação.

Também foi possível observar, através da análise de variância (ANOVA) dos valores de EE% (Tabela 3), entre as amostras reticuladas e não reticuladas com a mesma concentração de vitamina D₃, que houve uma diferença significativa entre os valores de eficiência de encapsulação. Os valores de F e F_{crítico} foram de F= 562,68 e F_{crítico}=7,70 para A1TG e A1i de F= 160,58 e F_{crítico}=7,70 para A2TG e A2i e de F= 266,77 e F_{crítico}=7,70 para A3TG e A3i. Sendo $F > F_{\text{crítico}}$ para ambas as comparações, indicando que a reticulação/não reticulação da matriz, interfere na eficiência de encapsulação das partículas. E que os valores de EE% para as amostras reticuladas são bem inferiores quando comparadas com as amostras não reticuladas. Isso provavelmente ocorre devido ao processo de reticulação que proporciona uma estrutura muito mais rígida, através das ligações cruzadas formadas, o que dificulta não só a formação das microestruturas, mas também sua posterior encapsulação do recheio.

É esperado que devido a reticulação a estrutura proteica diminuisse sua interação com o surfactante, permitindo com que o mesmo interaje mais com o composto bioativo carregando-o para a interface do sistema, elevando sua concentração na superfície, e consequentemente diminuindo a EE%.

Vale a pena destacar o efeito oposto encontrado nas amostras que foram apenas incubadas. A exposição térmica no processo de incubação pode ter provocado uma leve deformação estrutural na cadeia proteica, o que torna as estruturas menos rígidas, facilitando a formação das micropartículas e consequentemente o seu respectivo

encapsulamento. Com as estruturas não tão rígidas a interação entre o surfactante e a matriz foi maior, conferindo maior estabilidade na micropartícula e tornando o recheio mais disponível, sendo menos carregado para a superfície, e facilitando seu encapsulamento. Podemos observar pelas micrografias na Figura 3, que as estruturas obtidas através das amostras incubadas são mais esféricas, lisas e com poucas deformações, apresentando maior área interna, quando comparada com as amostras reticuladas, o que pode ter auxiliado na maior EE%.

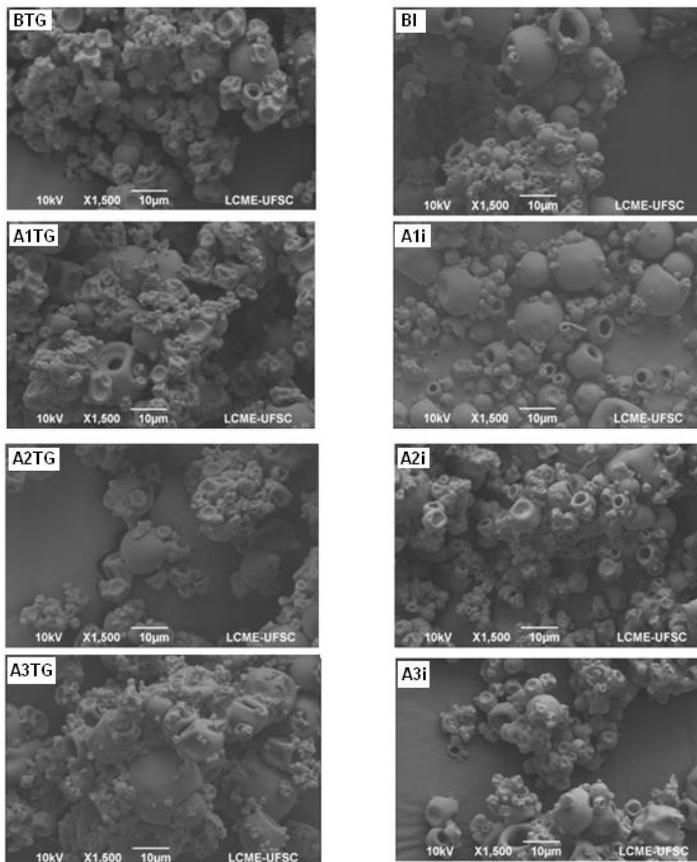
3.3. Caracterização físico-química das micropartículas

3.3.1. Análise morfológica

3.3.1.1. Morfologia

As propriedades estruturais, estabelecidas durante o processo de incubação e reticulação das partículas são ilustradas na Figura 2.

Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura das amostras reticuladas; BTG, A1TG, A2TG e A3TG, e não reticuladas Bi, A1i, A2i e A3i.



Dentre as amostras obtidas, A1TG e A1i apresentaram maior eficiência de encapsulação, e suas micrografias em magnificação de 500,1500 e 3000 vezes ilustram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 3: Micrografias da amostra A1TG. Onde A e B estão em uma magnificação de 500 vezes e C e D 1500 e 3000 vezes, respectivamente.

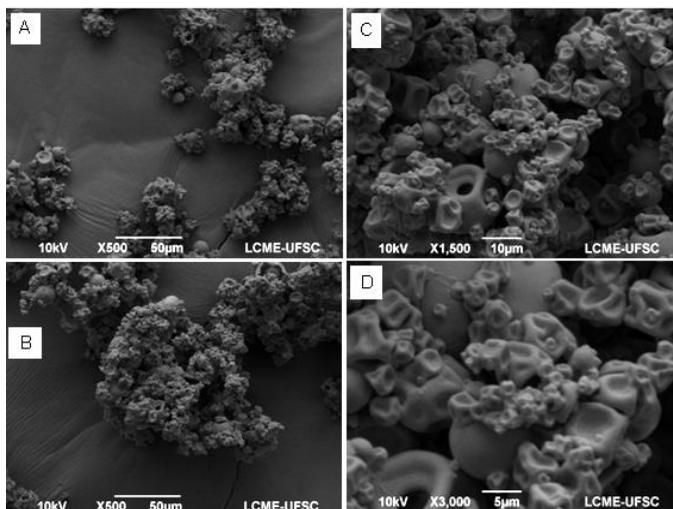
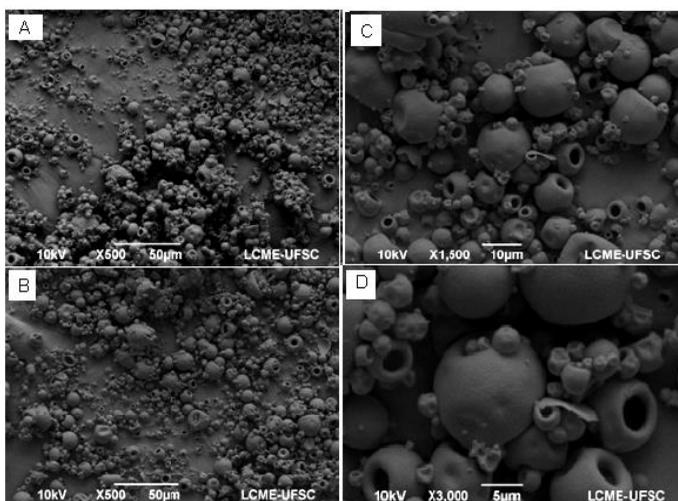


Figura 4: Micrografias da amostra A1i. Onde A e B são regiões distintas, de magnificação de 500 vezes e C e D são ampliações de 1500 e 3000 vezes do quadrante B.



Através das Figuras 3 e 4, pode-se observar uma grande diferença estrutural, das paredes externas das partículas reticuladas e não reticuladas. As micrografias da amostra não reticulada mostram uma parede esférica, lisa e sem rachaduras, aparentes, proporcionando maior proteção do composto bioativo encapsulado.

No caso das micropartículas contendo o agente reticulante, a parede externa apresentou diversas concavidades ou achatamento profundos. Segundo Lian, Hsiao e Chou (2002), a formação de tais achatamentos depende do material encapsulante utilizado e pode ser denominada como “efeito bola murcha” (*flat ball effect*).

Estudos também apontam, que as micropartículas que contém, concavidades em sua parede externa possuem maior resistência à difusão do soluto e a fratura mecânica (Rodríguez-Huezo et al., 2007). Essas características promovidas pela concavidade podem ser provenientes do processo de reticulação, onde ocorre a formação de ligações cruzadas, gerando uma rede polimérica mais rígida, e consequentemente diminuindo a difusão das partículas.

Além da presença de concavidades nas partículas reticuladas, é possível observar que estas se apresentam mais aglomeradas, formando um grumo de partículas, já as partículas apenas incubadas se posicionam de maneira mais afastadas. A criação destes grumos de partículas pode estar associada à formação de ligações cruzadas entre os resíduos de lisina e glutamina da matriz.

3.3.1.2. Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho das micropartículas reticuladas BTG, A1TG, A2TG e A3TG e da não reticulada A1i estão ilustradas nas Figuras 5 e 6 respectivamente.

Figura 5: Distribuição de tamanho das partículas reticuladas.

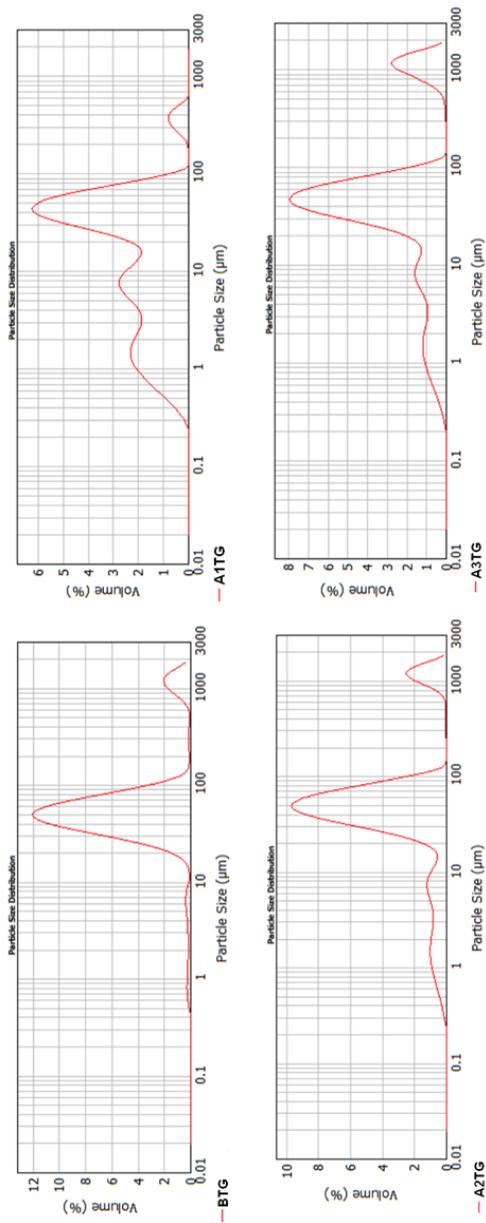
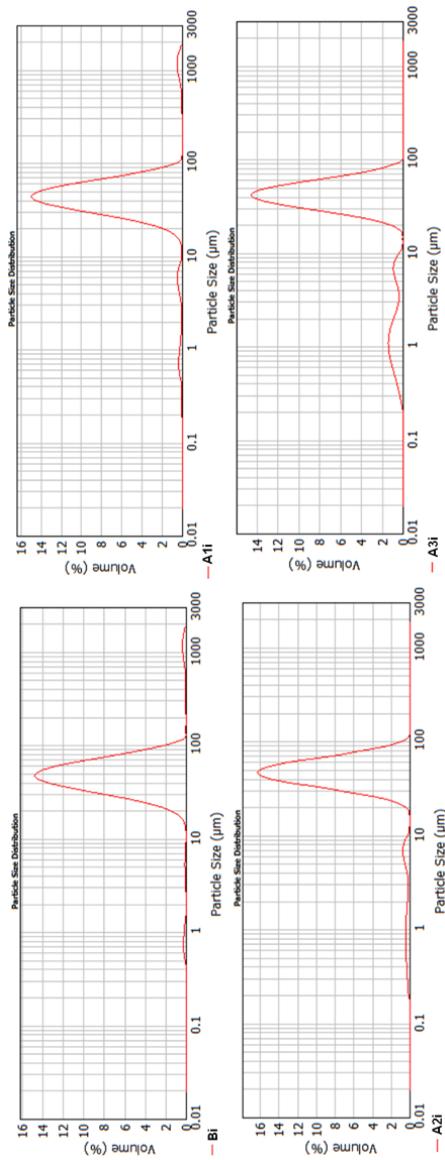


Figura 6: Distribuição de tamanho das partículas não reticuladas.



Ao analisar a Figura 5 pode-se perceber que, as amostras reticuladas apresentam maior variação na distribuição de tamanho das partículas. A maior proporção do material se apresentou na escala de 10 a 100 micrometros (maior pico do gráfico) uma das variações de tamanho das micropartículas, pode ser identificada em uma escala menor que 10,0 μm , isso pode ter ocorrido devido as diferentes intensidades de ligações cruzadas no processo de reticulação, que torna as estruturas mais fortes/rígidas formando estruturas de menor tamanho, área e volume. Também é possível perceber que a formação de partículas de maior tamanho estrutural, maior que 100 μm , que sugere que a reticulação possa ter apresentado não somente um efeito intrapartículas, mas também interpartículas favorecendo a aglomeração das moléculas, e resultado em maiores dimensões morfológicas.

Apesar da polidispersão das partículas reticuladas, ambas apresentam-se em escala micrométrica, na faixa de 47,7- 64,8 μm (BTG), 42,0 – 57,1 μm (A1TG), 44,2-60,0 μm (A2TG), e de 42,0-57,1 μm (A3TG). As micropartículas apenas incubadas A1i (Figura 6) apresentaram uma distribuição homogênea, com menor variação no tamanho das partículas, com valores de 43,1 – 58,6 μm . As demais amostras incubadas se comportaram da mesma maneira com valores de 43,1-58,6 μm (Bi), 37,1-50,3 μm (A2i), e de 38,0-52,9 μm (A3i).

3.3.2. Análise térmica

3.3.2.1. Análise termogravimétrica (TGA)

As propriedades térmicas das micropartículas reticuladas e não reticuladas foram obtidas através da análise termogravimétrica cujos gráficos e os dados de parâmetros de temperatura e massa, encontram-se nas Figuras 7 e 8 e tabela 4 respectivamente.

Figura 7: Análise termogravimétrica da amostra AITG reticulada com a enzima transglutaminase.

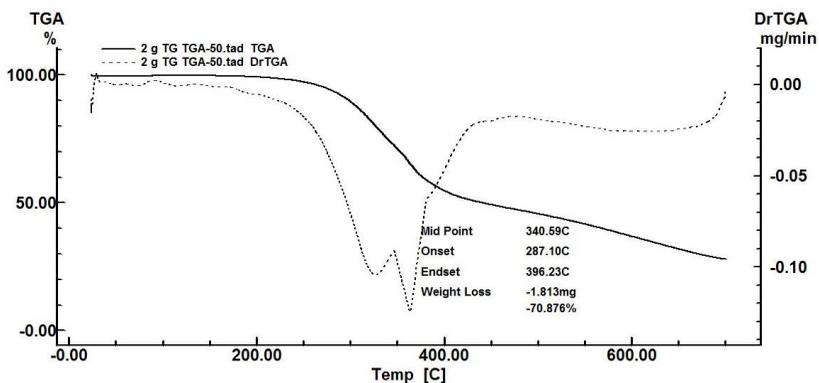


Figura 8: Análise termogravimétrica da amostra Ali, não reticulada com a enzima transglutaminase.

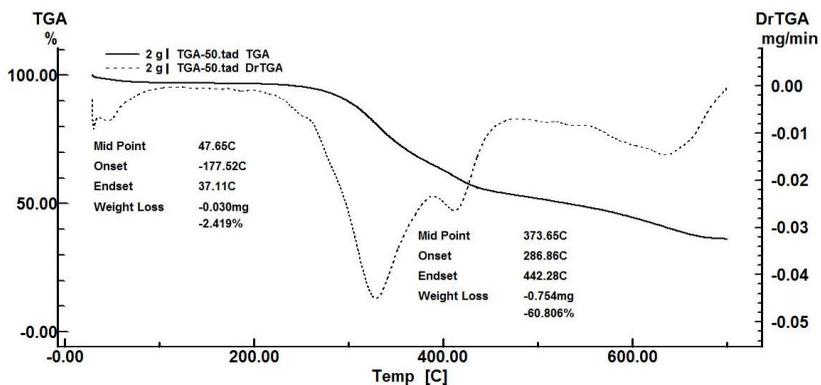


Tabela 4: Parâmetros termogravimétricos – Enzima transglutaminase e amostras BTG, A1TG, A2TG e A3TG.

Parâmetros		Enzima Tg	BTG	A1TG	A2TG	A3TG
1º Estágio	T _{máx} ^a	357,80	381,64	84,84	79,48	77,33
	M ^b	48,31	39,26	0,078	1,39	2,20
2º Estágio	T _{máx} ^a	-	695,42	396,23	384,56	409,94
	M ^b	-	16,07	70,87	48,61	70,87
% resíduos a 600°C		51,68	44,67	29,05	50,00	26,43

^a Temperatura de máxima degradação (°C). ^b Percentagem de perda de massa em cada estágio de degradação (mg).

Tabela 5: Parâmetros termogravimétricos – amostras BI, A1i, A2i e A3i.

Parâmetros		BTG	A1i	A2i	A3i
1º Estágio	T _{máx} ^a	79,41	47,65	72,06	75,04
	M ^b	3,41	2,41	3,18	4,15
2º Estágio	T _{máx} ^a	366,11	442,28	410,22	409,36
	M ^b	50,19	60,80	80,00	82,06
% resíduos a 600°C		46,40	36,79	16,82	13,79

^a Temperatura de máxima degradação (°C). ^b Percentagem de perda de massa em cada estágio de degradação (mg).

A perda de massa, determinada em função da temperatura de análise, indicada na Tabela 4 para a amostra de enzima transglutaminase pura, ocorre em apenas um estágio sendo este a uma T_{máx} 357,80°C. As amostras reticuladas apresentam perda de massa em T_{máx} mais elevadas quando comparadas às amostras não polimerizadas. A temperatura máxima de degradação elevada indica que as amostras reticuladas possuem maior estabilidade térmica, e esta estabilidade pode estar relacionada à reticulação das partículas (PORTO, 2007).

A estrutura molecular das proteínas pode ser destruída lentamente com o aquecimento, promovendo a clivagem das ligações peptídicas, que unem os resíduos de aminoácidos (NANDA; NAYAK,

2007). A porcentagem de massa residual a 600 °C das micropartículas reticuladas apresentou valores menores do que as micropartículas apenas incubadas. Esse resultado pode ser causado pela redução do número de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas com a formação de ligações cruzadas, aumentando assim o efeito da degradação (PORTO, 2007). Outro fator observado entre as amostras reticuladas e não reticuladas é a porcentagem de água/umidade perdida no primeiro estágio de degradação

Os resíduos resultantes das micropartículas contendo recheio também apresentaram valores menores do que as amostras brancas, BTG e BI. Este resultado, de diminuição na porcentagem de resíduos, pode estar associado à interação óleo-polímero.

3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As Figuras 9 e 10 ilustram os resultados da análise de calorimetria exploratória diferencial realizada com os reagentes puros, proteína isolada de soro de leite, surfactante, vitamina D₃ e enzima transglutaminase e as amostras reticuladas BTG e A1TG, e não reticuladas BI e A1i.

Figura 9: Termograma da enzima transglutaminase, PI, surfactante e vitamina D₃.

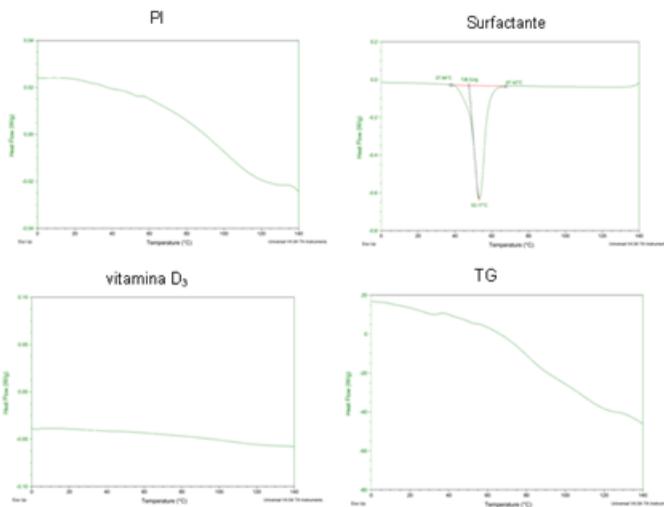
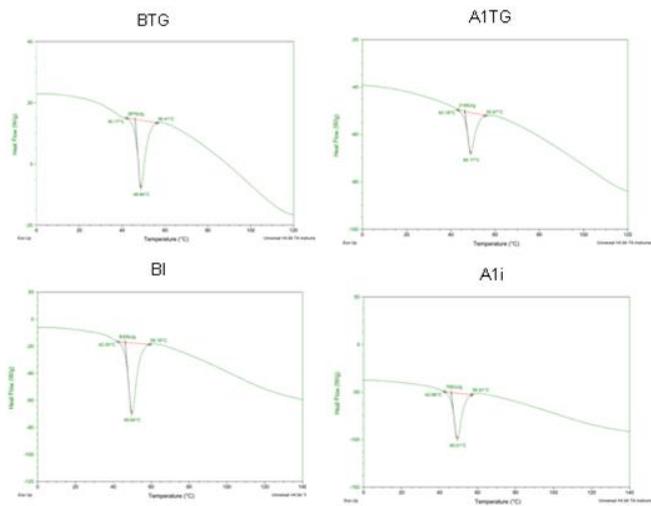


Figura 10: Termograma das amostras BI, BTG, A1TG e A1i.



Analisando os termogramas dos compostos puros, TG, PI, surfactante e fármaco (Figura 9), pode-se observar que apenas o surfactante apresentou transição referente a entalpia de fusão (Δ_{mH}). Este ponto foi importante, pois serviu como base para avaliar as demais amostras, auxiliando na identificação das alterações proporcionadas pelos outros compostos com e sem o método de reticulação.

Comparando os resultados obtidos da amostra BTG e BI (Figura 10) verificou-se que na amostra reticulada, a entalpia de fusão (Δ_{mH}) diminuiu de 8309 J.g^{-1} para 2876 J.g^{-1} . Essa diminuição está associada com a reticulação da enzima na cadeia polimérica da matriz, formando ligações cruzadas covalentes que apresentam maior rigidez e resistência térmica, reduzindo a interação matriz-surfactante que havia anteriormente (FAYAD, 2010).

O emprego do surfactante neste trabalho se deve à sua ação em reduzir a tensão interfacial do sistema, aumentando sua estabilidade termodinâmica e favorecendo a obtenção de micropartículas. Com sua natureza anfifílica o surfactante tende a ser adsorvido na interface do sistema, neste caso na superfície externa da matriz (ATKINS; de Paula, 2007).

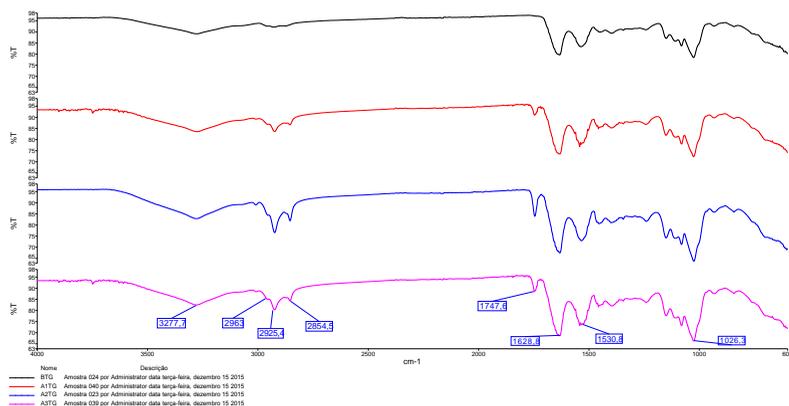
Com o surfactante na superfície das partículas e com menor interação com a matriz, a energia necessária para que ocorresse a desnaturação de sua estrutura foi menor. O mesmo efeito foi observado entre as amostras A1TG e A1i (Figura 9 e 10) neste caso a redução foi de 7063 J.g^{-1} para 2189 J.g^{-1} .

Comparando as amostras BTG com A1TG e BI com A1i nota-se que em ambos os casos foram detectados a redução da entalpia de fusão (Δ_{mH}) BTG (2876 J.g^{-1}) para A1TG (2189 J.g^{-1}), BI (8309 J.g^{-1}) para A1i (7063 J.g^{-1}) sendo que esta diferença está associada ao efeito lubrificante proporcionado pelo fármaco, conforme abordado no capítulo 2.

3.3.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para a identificação dos grupos funcionais, presentes na formulação das micropartículas reticuladas (Figura 11) a fim de se observar o efeito da transglutaminase em sua estrutura.

Figura 11: Espectroscopia de IV - micropartículas reticuladas BTG, A1TG, A2TG e A3 TG.



Segundo Muyonga et al. (2004) quando a banda diminui intensidade ou possui um deslocamento para um menor número de onda, isso está associado a uma maior desordem da proteína, isso ocorre devido a uma perturbação em sua estrutura terciária, que é associada com mudanças similares a uma desnaturação proteica.

Neste trabalho de acordo com o espectro apresentado acima na Figura 11 foi observado o contrário. Obteve-se menores intensidades nas bandas de estiramento e aumento no comprimento de onda da amida I que foi de 1633 cm⁻¹ para 1628,80 cm⁻¹, e na amida II que alterou de 1532,90 cm⁻¹ para 1530,80 cm⁻¹ e na região referente a hidroxila de 3281,90 cm⁻¹ para 3277,70 cm⁻¹. Essa diferença sugere maior rigidez na estrutura proteica além da menor disponibilidade para as interações de hidrogênio dos grupos hidroxilas (Muyonga et al., 2004).

Tabela 6: Comparação dos valores de transmitância entre as amostras reticuladas e não reticuladas.

Amostras	Deformação O-H e N-H *	Deformação C-H *	Estiramento C=O e C-N (amida I) *	Deformação N-H e estiramento C-N (amida II) *
BI	81,40	87,06	53,15	59,37
A1i	82,53	85,58	58,94	65,22
A2i	80,60	73,77	52,90	59,97
A3i	85,00	83,00	63,98	69,77
BTG	89,19**	92,25**	79,56**	83,29**
A1TG	83,56**	83,62	73,47**	76,77**
A2TG	82,91**	76,56**	67,41**	72,86**
A3TG	82,50	80,31	68,56**	73,19**

* Todos os valores são expressos em % referente a transmitância medida no experimento.

**Dados das amostras reticuladas que apresentaram maiores valores de T% comparados com as amostras não reticuladas.

Os valores de transmitância (Tabela 6) obtidos pelos espectros das amostras que foram submetidas ao processo de incubação com e sem a enzima transglutaminase revelaram que há uma redução na intensidade na maioria dos picos encontrados no material reticulado analisado. Esta redução ocorre devido a maior rigidez na estrutura proteica (DUONGTHINGOC et al, 2013), proveniente da reticulação da transglutaminase com as cadeias poliméricas da matriz, o que sugere que o processo de reticulação foi realizado com sucesso.

Tabela 7: Comparação dos valores de transmitância entre as amostras incubadas e não incubadas.

Amostras	Deformação		Estiramento	
	O-H e N-H *	Deformação C-H *	C=O e C-N (amida I) *	Deformação N-H e estiramento C-N (amida II) *
BI	81,40**	87,06**	53,15**	59,37**
A1i	82,53**	85,58**	58,94**	65,22
A2i	80,60**	73,77**	52,90**	59,97**
A3i	85,00	83,00**	63,98	69,77
BS	85,41	90,39	65,70	70,37
A1s	83,03	87,95	59,86	65,03
A2s	81,90	81,85	58,55	64,89
A3s	83,06	83,25	60,71	66,97

* Todos os valores são expressos em % referente a transmitância medida no experimento.

**Dados das amostras reticuladas que apresentaram maiores menores de T% comparada com as não incubadas.

Comparando-se os resultados de transmitância, obtidos através dos espectros de infravermelho, das amostras incubadas com as que não foram incubadas pode-se observar que em geral as amostras que foram submetidas ao processo de incubação apresentaram valores menores de transmitância, o que caracteriza maior intensidade nos respectivos picos de absorção. Podendo indicar que houveram maiores estiramentos e/ou desdobramentos o que é característico de uma estrutura de menor rigidez, o que era previsto devido a possibilidade de uma leve desnaturação térmica da estrutura proteica da matriz durante o processo de incubação (DUONGTHINGOC et al, 2013).

3.3.4. Comportamento reológico

As propriedades reológicas dos alimentos determinadas pela indústria, revelam informações importantes sobre a qualidade, vida de prateleira e de características de textura e fluxo que envolve tanto a percepção sensorial e aceitabilidade do produto, quanto seu transporte (ABU-JDAYIL; AICHINGER et al., 2003).

As propriedades de fluxo das emulsões reticuladas ou não, pela enzima transglutaminase foram realizadas em reômetro rotacional, com um cilindro concêntrico (*spindle* ULA), e coletadas através do *software* Rheocalc® 32 versão 2.5 (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA 02346 USA).

Através dos dados da análise foram geradas as curvas de tensão de cisalhamento versus Taxa de deformação para as amostras A1TG, A1i, BTG, BI, A2TG, A3TG, figuras 12, 13 e 14 respectivamente.

Figura 12: Comportamento de fluxo das emulsões A1TG e A1i.

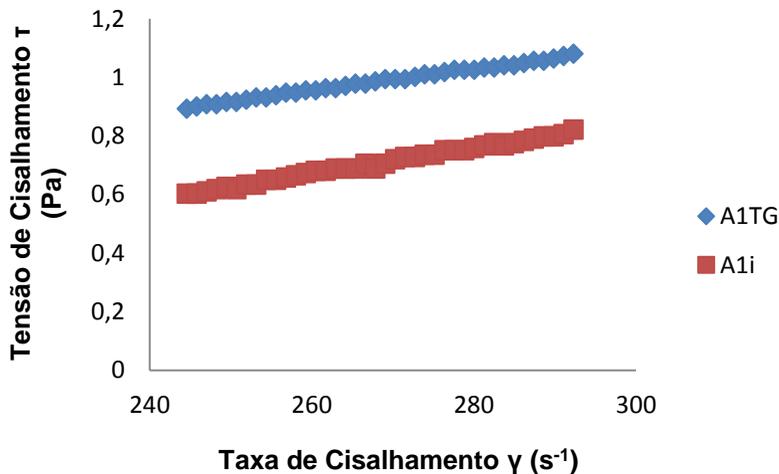


Figura 13: Comportamento de fluxo das emulsões reticuladas.

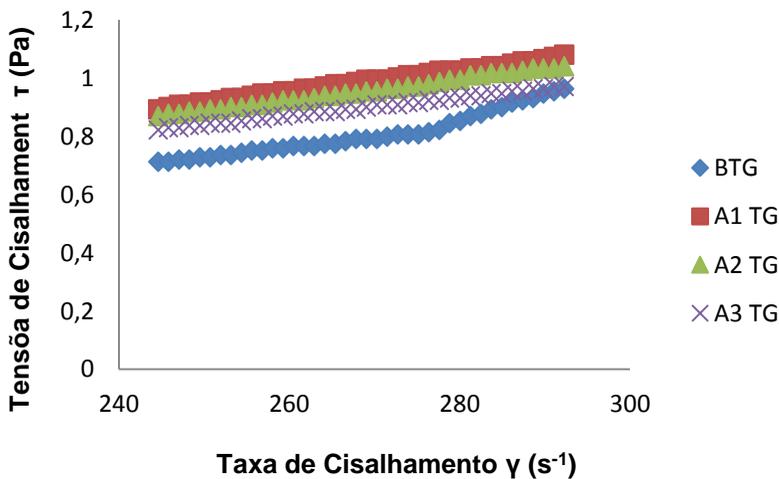
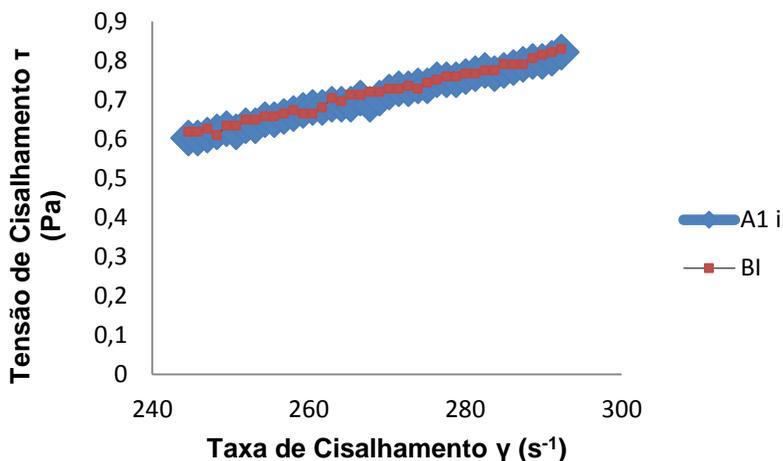


Figura 14: Comportamento de fluxo das emulsões não reticuladas: BI e A1i.



Diversos modelos reológicos são utilizados para descrever o comportamento de fluxo dos fluidos, no entanto, segundo Lizarraga, (2006) soluções proteicas de soro de leite apresentam comportamento reológico newtoniano quando pouco concentradas, e não newtoniano quando em altas concentrações, devido ao aumento da tensão de cisalhamento.

Devido à alta concentração proteica da matriz utilizada, o modelo de Bingham foi aplicado para os resultados obtidos na análise das emulsões, pois, através deste modelo podemos classificar tanto fluidos de comportamento não newtoniano (MANICA; de BORTOLI, 2004).

O modelo de Bingham foi utilizado para as amostras, aplicando-se coordenadas logarítmicas no gráfico de tensão de cisalhamento (σ) *versus* taxa de deformação (γ) (RAO, 1999). Os parâmetros do modelo de Bingham, limite de escoamento (σ_0) e viscosidade plástica (η_{pl}) foram obtidos através da Equação 5, e os resultados encontram-se na Tabela 8.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta_{pl} \cdot (\dot{\gamma}) \quad 5$$

Sendo: σ - tensão de cisalhamento (Pa), σ_0 - limite de escoamento (Pa), η_{pl} - Viscosidade plástica (Pa.s), $\dot{\gamma}$ - taxa de deformação (s^{-1}).

Tabela 8: Dados de viscosidade plástica e limite de escoamento das amostras.

Amostras	Viscosidade Plástica	Limite de	R ²
	(η_{pl}) mPa.s ⁻¹	escoamento (σ_0) (Pa)	
BTG	5,7±0,007	0,73±0,202	0,96±0,024
A1TG	5,3±0,001	0,53±0,510	0,99±0,008
A2TG	5,5±0,002	0,58±0,156	0,97±0,026
A3TG	5,8±0,006	0,63±0,155	0,99±0,002
BI	4,6±0,001	0,48±0,023	0,99±0,001
A1i	4,3±0,005	0,47±0,014	0,99±0,005
A2i	4,5±0,001	0,47±0,010	0,99±0,007
A3i	4,6±0,001	0,47±0,032	0,99±0,004

*Média com base em duplicata ± desvio padrão dos resultados.

Os dados da Tabela 8 revelam que ambas as amostras possuem comportamento não newtoniano, porém as amostras que foram reticuladas revelaram maiores valores de viscosidade plástica (η_{pl}), quando comparadas às amostras não reticuladas. Esse comportamento, aumento da viscosidade das emulsões, pode ser justificado tanto à maior concentração de sólidos, neste caso relacionado à adição da enzima transglutaminase, bem como à reticulação da matriz polimérica. Que resultou em uma maior interação proteína-proteína através da formação de ligações covalentes cruzadas, entre os resíduos de aminoácidos lisina e glutamina referentes às proteínas, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes na matriz. (PIAU; DEBIANE, 2005).

3.3.5. Determinação do perfil de liberação das micropartículas

O perfil de liberação das micropartículas reticuladas com a enzima transglutaminase, A1TG, A2TG e A3 TG, e das não reticuladas A1i, A2i e A3i, é ilustrado pelas figuras 15 e 16 respectivamente.

Figura 15: Perfil de liberação das amostras: A1TG, A2 TG e A3 TG.

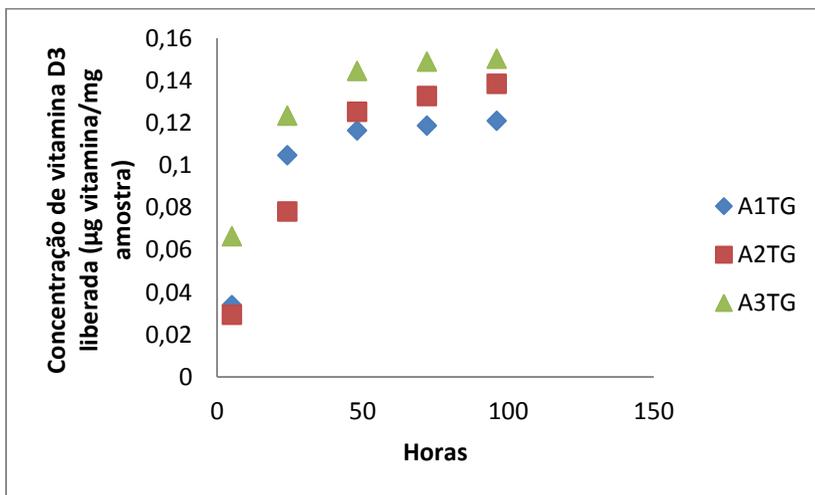
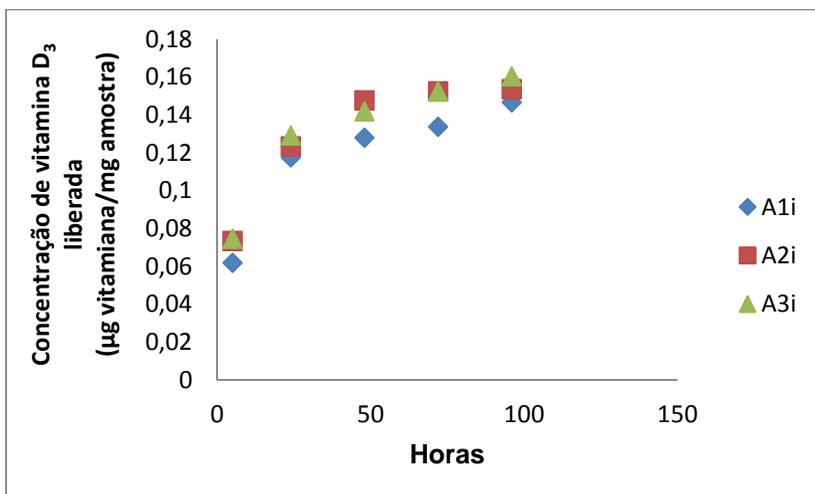


Figura 16: Perfil de liberação das amostras: A1i, A2i e A3i.



O perfil dos dados dos gráficos das Figuras 15 e 16 indica que, há um aumento da liberação do composto bioativo devido a dois fatores: primeiramente o aumento do tempo de exposição das amostras à análise e como um segundo fator, a elevação da concentração do recheio nas formulações.

Os dois fatores podem estar relacionados com a busca do equilíbrio termodinâmico entre o meio externo e interno do saco de diálise, em que ocorre uma expansão da rede polimérica da matriz durante a penetração do meio aquoso tamponado, e conseqüentemente a liberação do composto ativo.

Ao comparar o perfil de liberação entre as amostras reticuladas e não reticuladas, podemos observar que as amostras reticuladas liberaram o composto bioativo mais lentamente que as amostras apenas incubadas apresentando valores de 0,03397 µg vitamina/mg amostra, para A1TG e de 0,06182 µg vitamina/mg amostra para A1i no início da análise. O mesmo pode ser observado nas amostras com maiores concentrações de recheio, sendo de 0,02933 e 0,06645 µg vitamina/ mg amostra, para as partículas A2TG e A3TG respectivamente, e de 0,07343 e 0,07459 µg vitamina/mg amostra, para as partículas A2i e A3i respectivamente.

Essa liberação em menor velocidade/concentração constatada pode estar relacionada à reticulação da matriz, proporciona maior resistência à dissolução do soluto, devido à formação das ligações cruzadas entre os resíduos de lisina e glutamina.

Essa relação pode ser confirmada, ao descrever os dados da liberação das micropartículas pela razão entre a vitamina liberada em um determinado tempo, em relação ao momento de equilíbrio (M_t/M_∞) (Figura 17 e 18) segundo a segunda lei de Fick de acordo com a equação 6, onde M_t é a concentração de vitamina liberada em um tempo t , M_∞ a concentração de vitamina liberada no equilíbrio, e K_a e n são parâmetros que dependem tanto da natureza, do das interações entre o polímero o composto ativo e o meio.

$$M_t / M_\infty = k_a t^n \quad 6$$

Quando a taxa de difusão é muito menor do que a taxa de relaxação o parâmetro $n=0,5$ e o transporte é denominado *Fickiano* do tipo I. No entanto, quando a taxa de difusão é muito maior que a de relaxação, $n= 1,0$ e o transporte é *Fickiano* do tipo II. Na região entre 0,5 e 1,0 o processo de difusão é uma combinação Fickiniana e não

Fickiana e é descrita como “difusão anômala”. Os parâmetros da segunda lei de Fick para as amostras encontram-se na Tabela 9.

Figura 17: Liberação da vitamina D₃ pela razão Mt/M_{∞} em função do tempo para as amostras: A1TG, A2 TG e A3 TG.

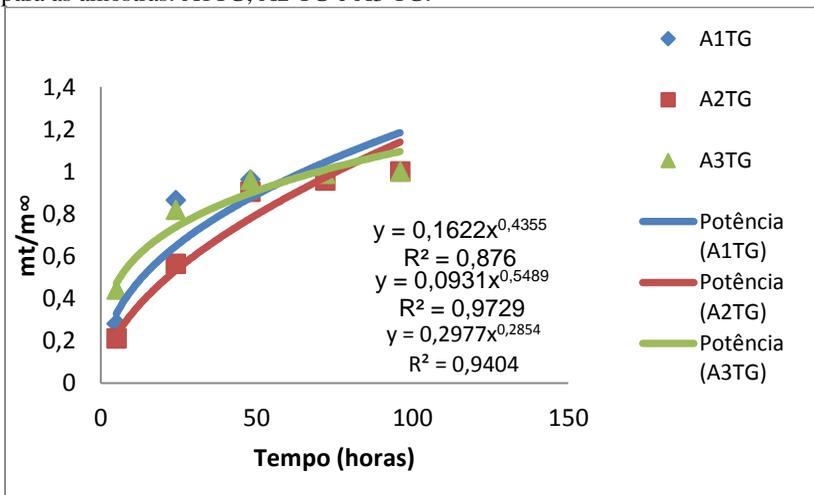


Figura 18: Liberação de vitamina D₃ pela razão Mt/M_{∞} em função do tempo para as amostras: A1i, A2i e A3i.

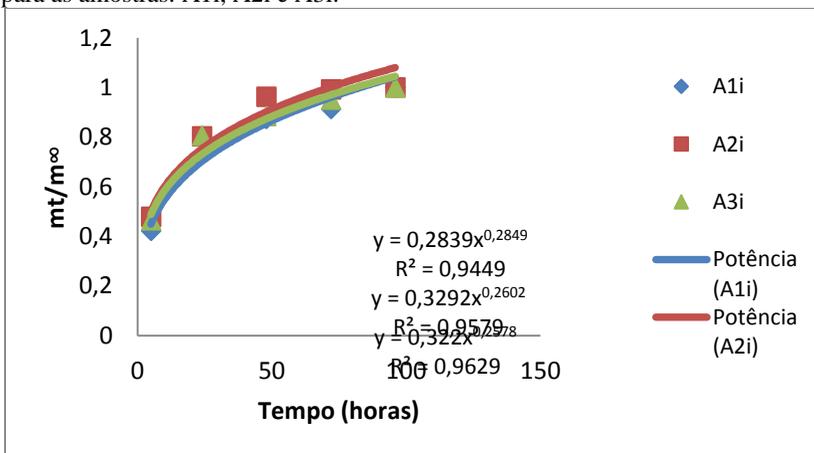


Tabela 9: Parâmetros obtidos pela equação $M_t/M_\infty = K_a t^n$ para as amostras

Amostras	K_a	n	R^2
A1TG	$0,16 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,01$
A2TG	$0,09 \pm 0,22$	$0,55 \pm 0,16$	$0,97 \pm 0,20$
A3TG	$0,30 \pm 0,15$	$0,28 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,18$
A1i	$0,28 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,02$
A2i	$0,33 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,05$
A3i	$0,32 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,01$

Observando os valores do parâmetro da tabela 9, podemos classificar a liberação da vitamina D₃ entre as micropartículas tanto das partículas reticuladas como não reticuladas como Fickiniana do tipo I, como exceção da A2TG, que revelou valores de n entre 0,5 e 1, classificando-se como difusão anômala. Dessa forma pode-se afirmar que, a concentração de vitamina D₃ aumenta em função do tempo, pela difusão. Já para a amostra A2TG, a concentração de vitamina D₃ aumenta em função do tempo não só pela difusão, mas também pela expansão polimérica da matriz.

3.3.6. Densidade e índice de Carr's e de Hauser

Quanto maior a densidade de um produto, menor o espaço necessário para seu armazenamento, sendo uma informação útil para a indústria alimentícia (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011). Os valores de densidade aparente (ρ_{ap}) e de densidade compactada (ρ_{cp}) das amostras foram determinados através da razão do valor de massa adicionado pelo volume lido diretamente na proveta.

Aliado à importância do conhecimento sobre a densidade dos produtos desenvolvidos, o índice de Carr's e o índice de Hauser, informam parâmetros relevantes para a indústria como a fluidez, compressibilidade e compactabilidade do pó. Os resultados de densidade aparente e compactado e dos índices de Carr's e Hauser encontram-se na Tabela 10:

Tabela 10: Densidade e índice de Carr's e de Hauser das micropartículas.

Amostras	Densidade Aparente (d_{ap}) (mg/mL)	Densidade Compactada (d_{cp}) (mg/mL)	Índice de Carr's (I_{Carr})	Índice de Hauser (I_{Hauser})
BTG	0,167±0,001	0,202±0,002	17,571±0,001	1,213±0,001
A1TG	0,168±0,001	0,221±0,001	24,200±0,002	1,319±0,002
A2TG	0,168±0,004	0,247±0,001	31,880±0,001	1,468±0,001
A3TG	0,179±0,001	0,211±0,003	15,300±0,002	1,180±0,002
BI	0,162±0,001	0,152±0,001	-5,824±0,001	0,944±0,001
A1 i	0,168±0,003	0,193±0,002	12,694±0,003	1,145±0,001
A2 i	0,167±0,003	0,174±0,001	3,793±0,003	1,039±0,003
A3 i	0,168±0,001	0,173±0,002	3,283±0,002	1,033±0,001

*Média com base em triplicata ± desvio padrão dos resultados.

Tanto os valores de densidade aparente quanto compactada, são mais elevados nas amostras reticuladas do que nas amostras apenas incubadas. Esse aumento pode estar relacionado com a formação de ligações cruzadas entre as macromoléculas da proteína com a enzima, aumentando assim o peso molecular das micropartículas, e consequentemente a densidade.

O parâmetro de fluidez medido pelos Índices de Carr's e de Hauser são classificados, de acordo com Turchiuli et al. (2005), como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11: Relação do índice de Carr's e de Hauser com a fluidez.

Índice de Carr's	Índice de Hauser	Fluidez
< 10	1.00-1.11	Excelente
11 – 15	1.12-1.18	Boa
16 – 20	1.19-1.25	Satisfatória
21 – 25	1.26-1.34	Razoável
26 – 31	1.35-1.45	Ruim
32 – 37	1.46-1.59	Muito Ruim
>38	>1.60	Péssima

Segundo a relação de fluidez sugerida por Turchiuli et al. (2005), as medidas de Índices de Hauser revelaram uma fluidez excelente para ambas as amostras. No caso do Índice de Carr's, todas as micropartículas não reticuladas resultaram em uma fluidez excelente, exceto a amostra A1i. Já as partículas reticuladas tiveram uma variação

grande entre uma fluidez boa, satisfatória, razoável e muito ruim. Esta variação pode estar relacionada com a desordem das moléculas devido à quebra, e a formação de ligações durante a reticulação.

CONCLUSÃO

Os valores de eficiência de encapsulação das amostras reticuladas e não reticuladas, indicaram maior eficiência para as amostras não reticuladas, e com menores concentrações de composto bioativo, sendo de 12,23 % para a amostra A1TG e de 56,13 % de para A1i.

As partículas reticuladas apresentaram tamanho em escala micrométrica, e formato esférico assim como as partículas não reticuladas, porém, apresentou concavidades, proporcionando as mesmas características como a resistência à fratura mecânica, e a difusão do soluto, e desta forma resultando em maior redução e proteção do composto bioativo. Os resultados da análise de perfil de liberação comprovaram que, a concentração de vitamina D₃ aumenta em função do tempo, pela difusão.

De acordo com os dados obtidos na análise reológica foi possível constatar que a adição da enzima transglutaminase nas amostras BTG, A1TG, A2TG e A3TG proporcionou um aumento na viscosidade das emulsões, indicando sua reticulação.

Os espectros de infravermelho também permitiram a confirmação da reticulação da PI, através da diminuição da intensidade das bandas referentes à amida I e amida II, características da matriz, devido à maior rigidez na estrutura proteica. As análises térmicas revelaram diferentes estágios de degradação de massa entre as amostras devido o processo de incubação e a resistência térmica entre as partículas reticuladas e não reticuladas.

Apesar da baixa eficiência de encapsulação das micropartículas reticuladas, o processo de reticulação da matriz PI com a enzima transglutaminase para formação de micropartículas de vitamina D₃ foi realizado com sucesso. No entanto micropartículas não reticuladas apresentaram grande potencial para aplicação como ingredientes em formulações industriais, devido aos seus elevados valores de eficiência de encapsulação, assim como a proteção do composto bioativo proporcionada por sua morfologia esférica e lisa.

REFERÊNCIAS

- ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behaviour of semisolid foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, v. 57, p. 97-102, 2003.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES, P. H. J.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; De CARVALLHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de Coprodutos. **Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: Manole, p. 135, 2003.
- ATKINS, P. W.; de Paula, J. **Físico-Química**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, 2007. CHINTA, D. D.; GRAVES, R. A.; PAMUJULA, S.; PRAETORIUS, N.; BOSTANIAN, L. A.; MANDAL, T. K. Spray-dried chitosan as a direct compression tableting excipient. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, p.43-48, 2009.
- COLLAR, C.; BOLLAÍN, C.; ANGIOLONI, A. Significance of microbial transglutaminase on the sensorial, mechanical and crumb grain pattern of enzyme supplemented fresh pan breads. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 479-488, 2005.
- DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry** v.141, p. 1782–1788, 2013.
- FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Enzymatic cross-linking of whey proteins by a Ca²⁺-independent microbial transglutaminase from *Streptomyces lydicus*. **Food Hydrocolloids**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 1997.
- FRASCARELI, E. C. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 413-424, jul. 2012b.
- GAN, C.Y.; CHENG, L.H.; EASA, A.M. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based

microcapsules containing fish oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p. 563–569, 2008.

GAUCHE, C. VIEIRA, J.T.C., OGLIARI, P.J., BORDIGNON-LUIZ, M.T. Crosslinking of Milk whey proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v.43, p. 788-794, 2008.

LIZARRAGA, M.S.; PIANTE VICIN, D.De; GONZÁLEZ, R.; RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L.G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 740-748, 2006.

LORAND, L. Transglutaminase: Remembering Heinrich Waelsch. **Neurochemistry International**, v. 40, p.7-12, 2002.

MANICA, R.; de BORTOLI, A.L. Simulation of sudden expansion flows for power law fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 121, p. 35-40, 2004.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 86, p. 325–332, 2004.

NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Thermal Degradation Analysis of Biodegradable Plastics from Urea-Modified Soy Protein Isolate. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 46, p.207–211, 2007

NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnol**, v.9, p.119-156, 1995.

PATOCKA, G.; CERVENKOVA, R.; NARINE, S.; JELEN, P. Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 399-405, 2006.

PIAU, J.-M.; DEBIANE, K. Consistometers rheometry of power-law viscous fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 127, p. 213-224, 2005.

PORTO, L. C. Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

RAO, M.A. Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications. New York: An Aspen Publication, p. 433, 1999.

RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 102-109, 2012.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.116-122, 2006.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p. 420-430, abril-junho.2009.

CONCLUSÃO GERAL

Através dos estudos da microencapsulação da vitamina D₃, via fármaco comercial, em diferentes matrizes de proteína isolada de soro de leite, sendo estas com e sem surfactante, reticuladas e não reticuladas, todas apresentaram maior eficiência de encapsulação quando preparadas com menores concentrações do composto bioativo, 54,03 % (A1), 21,19 % (A1s), 12,23 % (A1TG) e 56,13 % (A1i).

Todos os métodos utilizados proveram micropartículas, de acordo com a análise de distribuição de tamanho, de partícula, em escala micrométrica entre 10-100µm. Todas apresentaram formato esférico, liso, sem fissuras, com exceção das amostras reticuladas que apresentaram formato esférico com presença de muitas concavidades ou achatamentos profundos. Sendo que a primeira confere menor permeabilidade de gases pela matriz, frente a segunda que apresenta maior resistência mecânica e menor difusão de soluto. Ambas características são positivas conferindo maior proteção ao composto bioativo.

A reticulação enzimática foi comprovada por diversos fatores, a redução na intensidade dos picos característicos do infravermelho da matriz indicou a formação de uma estrutura proteica mais rígida, respondendo com menores deformações, de vibrações e de estiramentos, à radiação eletromagnética incidida. Outro fator indicativo da reticulação enzimática da matriz se revelou nas alterações reológicas das emulsões, com um aumento da viscosidade, das amostras reticuladas caracterizando um composto de alto peso molecular.

Com base nos resultados da encapsulação da vitamina D₃ em diferentes concentrações, e formulações de matrizes a base de soro de leite, foi possível concluir que a proteína isolada de soro de leite é um material com potencial para uso como agente encapsulante da vitamina D₃, resultando em partículas com maior eficiência de encapsulação quando formuladas sem reticulação enzimática e com baixas concentrações do composto bioativo (A1i).