UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IVANA MORAIS GEREMIAS DE ANDRADE

Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade *in vitro* de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas

---

Pirassununga
2017

IVANA MORAIS GEREMIAS DE ANDRADE

Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade *in vitro* de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas

“Versão corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Engenharia e Ciência de Materiais-Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria

Orientadora: Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho

Pirassununga
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MA553p   Morais Geremias de Andrade, Ivana
                Produção, caracterização e avaliação da
digestibilidade in vitro de géis biopoliméricos
mistos carregados com micropartículas lipídicas /
Ivana Morais Geremias de Andrade ; orientadora
Samantha Cristina Pinho. -- Pirassununga, 2017.
193 f.

                Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

                1. Gel carregado. 2. Micropartículas lipídicas
sólidas. 3. Encapsulação. 4. Curcumina. 5.
Digestibilidade in vitro. I. Pinho, Samantha
Cristina , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais FZEA, os quais me deram a oportunidade de atingir mais esta etapa importante da minha vida profissional.

À minha orientadora, Profa. Samantha Pinho, modelo de competência e dedicação profissional e também pela pessoa humana e maravilhosa que ela é.

A todo grupo de trabalho do Laboratório de Colóides e Funcionalidade de Macromoléculas, em especial, às amigas com os quais compartilhei inúmeros bons momentos: Camila Cazado, Cynthia, Juliana, Marília, Marluci, Nayla e Taize.

A todos os técnicos e professores do Departamento de Engenharia de Alimentos e Departamento de Engenharia de Biosistemas da FZEA que me ajudaram em tantos momentos, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos de cada um.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A Sinergy pela doação de matéria-prima e ao INFABIC (UNICAMP) pela realização das análises de microscopia confocal.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, com os quais eu convivi estes anos e que me ajudaram em muitas situações.

À minha família e amigos, em especial meus pais, Paulo e Lourdes, e ao meu esposo, Ricardo, pela presença, amor, paciência, conselhos e apoio.

Principalmente, a Deus, autor da minha vida e que me dá motivos pra lutar.

A todos que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

RESUMO

ANDRADE, I. M. G. **Produção, caracterização e avaliação da digestibilidade *in vitro* de géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas.** 2017. 193 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo desta Tese foi a produção, caracterização e avaliação da digestibilidade *in vitro* de géis biopoliméricos de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana (GX), incorporados por dispersão de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) encapsulando curcumina. Formulações de MLS compostas por óleo de babaçu e triestearina com 2 % (MLS-2) ou 4 % (MLS-4) de tensoativos (Tween 60 e Span 80) encapsulando curcumina foram produzidas por ultra-agitação e a estabilidade das MLS foram avaliadas durante 60 dias. As formulações de géis foram definidas variando-se as concentrações de IPSL, GX e de sal e o processo de gelificação foi conduzido a 90 °C por 30 min. As propriedades mecânicas e reológicas dos géis sem sal incorporados de diferentes concentrações de MLS-2 ou MLS-4 foram avaliadas. Os géis não-carregados e carregados com MLS e diferentes concentrações de sais foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, reológicas, umidade expremível (UE), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e confocal (CLSM) e estabilidade da cor. Ensaio de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos para os géis carregados e não-carregados e para as dispersões de MLS usando dois protocolos - Infogest e redução gradual do pH da fase gástrica (RG) - e a bioacessibilidade do curcuminóide foi avaliada. As dispersões MLS-2 e MLS-4 permaneceram estáveis durante 60 dias de armazenamento para as características avaliadas. As composições dos géis escolhidos foram de 12 % de IPSL, 0,2 % GX, nas condições sem sal; 0,1 M NaCl ou 0,1 M CaCl₂. As diferentes concentrações de MLS incorporadas ao gel influenciaram de maneiras distintas as propriedades mecânicas e reológicas e a concentração de 88 % m/m de MLS foi escolhida para ser incorporada aos géis. As imagens de MEV e de CLSM mostraram géis do tipo particulado, porosos e as MLS homogeneamente distribuídas na rede gelificada. A rigidez do gel carregado diminuiu com presença de sal e aumentou com a incorporação de MLS-2 no ensaio mecânico, mas nos ensaios reológicos a presença das MLS e a de sal não contribuíram com o reforço estrutural do gel. Os parâmetros colorimétricos dos géis carregados permaneceram estáveis após 30 dias. O processo de digestibilidade *in vitro* das amostras foi influenciado pela

heterogeneidade da matriz gelificada, pela presença de sal, pelo tipo de MLS incorporada ao gel e pelo o protocolo utilizado nos ensaios. Os géis carregados apresentaram maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) durante a fase duodenal que as dispersões de MLS, mas os resultados de bioacessibilidade do curcuminoide foram pouco afetados pela incorporação das MLS à matriz gelificada, independentemente do protocolo. Os géis carregados com MLS-4 apresentaram resultados superiores de liberação de AGL e de bioacessibilidade, nos dois protocolos. Porém, o tipo de protocolo teve pouco impacto sobre os comportamentos das amostras ao final da fase intestinal. Concluiu-se que a composição de tensoativos na MLS pode influenciar tanto nas propriedades mecânicas e reológicas quanto no processo de digestão simulada dos géis carregados. Após os resultados de digestibilidade, definiu-se a MLS-4 a formulação mais indicada para ser incorporada aos géis biopoliméricos, os quais podem ser empregados na produção de alimentos carregadores de compostos bioativos lipofílicos.

Palavras-chave: Gel carregado. Micropartículas lipídicas sólidas. Encapsulação. Curcumina. Digestibilidade *in vitro*.

ABSTRACT

ANDRADE, I. M. G. **Production, characterization and *in vitro* digestibility evaluation of biopolymer mixed gels filled with lipid microparticles**, 2017. 193 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

This Thesis aimed the production, characterization and *in vitro* digestibility evaluation of biopolymer gels of whey protein isolate (WPI) and xanthan gum (XG) incorporated with solid lipid microparticles (SLM) encapsulating curcumin. Two formulations of SLM composed by babacu oil and triestearin with 2 % (SLM-2) or 4 % (SLM-4) surfactants (Tween 60 and Span 80) and 0.03 % of curcumin were produced by ultra turrax and the stability of SLM for 60 days were evaluated. Gels formulations were determined using different compositions of WPI, XG and salt and gelation processes were carried out at 90 °C for 30 min. Mechanical and rheological properties of gels filled with different concentrations of SLM-2 and SLM-4 were investigated. Non-filled gels and gels filled with SLM-2 and SLM-4 and different salt concentrations were characterized as the mechanical and rheological properties, water holding capacity, scanning electron (SEM) and confocal (CLSM) microscopy and color stability. *In vitro* digestibility assays were carried out for filled and non-filled gels and for SLM dispersions using two protocols - Infogest and gradual reduction of gastric pH (GR) – and curcumin bioaccessibility were accessed. SLM-2 and SLM-4 dispersions were stable during 60 days for the parameters investigated. The chosen gels compositions were 12 % WPI, 0.2 % XG and without salt, 0.1 M NaCl or 0.1 M CaCl₂. Filled gels with different concentrations of SLM showed different mechanical and rheological behavior and the concentration of 88 % m/m SLM was chosen to be incorporated in gels. SEM and CLSM imagens showed particulate and porous gels structures with SLM homogeneously distributed in the gelled network. Salt decreased and SLM-2 increased gel rigidity, but in rheological measurements salt and SLM did not reinforce gels. The colorimetric parameters of filled gels were stable after 30 days. The *in vitro* digestibility processes of samples were affected by gelled matrix heterogeneity, salt concentration, type of SLM and by the digestibility protocol. Filled gels released more free fat acids (FFA) during duodenal step than SLM, but the incorporation of SLM in gelled matrix did not promote higher curcumin bioaccessibility results, independently of the protocol. Gels filled with SLM-4 showed the highest FFA release and curcumin

bioaccessibility results for both protocol. However, the type of protocol did not affect the samples behavior at the end of intestinal step. It was concluded that the different surfactant concentrations in SLM could change the mechanical and rheological properties as well as the *in vitro* digestion processes of filled gels. After digestion results, SLM-4 was the most indicated to be incorporated in mixed gels. The incorporation of SLM in mixed biopolymer gels could be used for production of foods as lipophilic bioactive compound carriers.

Keywords: Filled gel. Solid lipid microparticles. Encapsulation. Curcumin. *In vitro* digestibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Estrutura molecular da curcumina.	22
Figura 2.2– Representação estrutural de uma partícula lipídica sólida.	25
Figura 2.3–Diferentes tipos de partículas lipídicas sólidas que podem ser formadas pelo controle da cristalização dos lipídios em emulsões óleo em água (O/A).	27
Figura 2.4 –Diferentes estruturas de partículas lipídicas sólidas. (a) Estrutura cristalina organizada produzida com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura desorganizada produzida com mais de um tipo de lipídio.	27
Figura 2.5–Representação esquemática das etapas de gelificação induzida por aquecimento de proteínas globulares.....	33
Figura 2.6–Ligações envolvidas no processo de gelificação de proteínas globulares.....	33
Figura 2.7 – Formação de géis de proteínas do soro de leite particulado e filamentosos.	37
Figura 2.8 – Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer entre diferentes biopolímeros.....	40
Figura 2.9 – Representação esquemática de uma matriz proteica incorporada de gotículas de emulsão.	43
Figura 2.10 – Comportamento reológico das partículas ativas e inativas incorporadas em sistemas gelificados.	47
Figura 2.11 - Processos físico-químicos e fisiológicos do trato gastrointestinal humano de sistemas de encapsulação alimentícios nano e microestruturados.....	50
Figura 2.12 – Representação esquemática do processo de digestão de proteínas em solução pelo tratogastrointestinal.	52
Figura 2.13 - Representação esquemática do mecanismo de absorção de compostos bioativos lipofílico encapsulado pelo trato-gastrointestinal humano.....	54
Figura 4.1 –(a) Fluxograma de produção dos géis de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana (GX) adicionados de sal; (b) Tubo de politereftalato de etileno (PET) adaptado para o processo de gelificação dos géis biopoliméricos mistos; (c) tubos com diferentes amostras de dispersões biopoliméricas durante o processo de gelificação.	69
Figura 4.2 –Fluxograma de produção dos géis de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana (GX) incorporados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS).	70
Figura 5.1 -Valores de potencial zeta para dispersão de isolado proteico de soro de leite nativo (1 % m/v) em diferentes valores de pH.....	83
Figura 5.2–Curvas de intensidade de fluorescência intrínseca (a) e intensidade de fluorescência máxima (b) obtidas no ensaio de hidrofobicidade superficial para a amostra de isolado proteico de soro de leite nativo (em 476 nm) e desnaturado (90 °C por 30 min, sem adição de sal).	84

Figura 5.3 -Perfil eletroforético de isolado proteico de soro de leite (IPSL) nativo em gel com 12 % de poliacrilamida. Sistema SDS-PAGE.	86
Figura 5.4 – Curva de aquecimento (10 °C/min) para análise de calorimetria exploratória diferencial de IPSL 10 % (m/v de água destilada).	87
Figura 5.5 - Aspecto visual das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas no estudo. (a) MLS com concentração de curcumina superior a 0,03 % (m/m) de curcumina; (b) MLS produzidas com concentração de 0,03 % (m/m) de curcumina.	88
Figura 5.6– Fluxo de calor obtido por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina com 2 % e com 4 % de tensoativo.....	89
Figura 5.7 -Perfis de distribuição do diâmetro hidrodinâmico de partículas das amostras de micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina. (a) com 2 % (MLS-2) e (b) com 4 % ..... (MLS-4) de tensoativo.....	91
Figura 5.8–(a) Esquema de representação do mecanismo de auto-oxidação lipídica. (b) Produtos da reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído, formando um composto colorido (cromogênio).	94
Figura 5.9 - Resultados das análises de oxidação lipídica para as amostras de micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.	95
Figura 5.10 – Resultado das avaliações colorimétricas das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) ao longo do período de armazenagem.....	97
Figura 5.11 – Diagrama CieLab com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de nuances (Ângulo de Hue).....	98
Figura 5.12 -Padrões de estruturas dos gel de isolado proteico de soro de leite e goma xantana obtidos neste estudo. (a) Gel com água fracamente ligada; (b) gel fraco/ muito fraco; (c) gel não autossustentável; (d) gel firme.	99
Figura 5.13- Avaliação visual dos géis produzidos com diferentes concentrações de IPSL, goma xantana e forças iônicas, após 24 h de produção ($T_{armazenamento} = 7\text{ }^{\circ}\text{C}$).	100
Figura 5.14 - Géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e sem adição de sal carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina.	105
Figura 5.15 - Resultados dos ensaios de compressão uniaxial de géis 12 % IPSL/0,2 % GX em gel não-carregado (sem MLS) e géis carregados com diferentes concentrações de micropartícula lipídicas sólidas (MLS).....	106
Figura 5.16 – Valores dos módulos viscoelásticos para os géis 12 % IPSL/0,2 % GX sem adição de sal incorporados com 0, 25, 50 ou 88 % MLS-2 (A) e MLS-4 (B).	110

Figura 5.17 - Géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e diferentes forças iônicas carregados com 88 % de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina.....	111
Figura 5.18- Corte transversal dos géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e diferentes forças iônicas carregados com 88 % de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina.....	112
Figura 5.19 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos sem incorporação de micropartículas lipídicas sólidas: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl ₂ (e) e (f).....	115
Figura 5.20 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos com incorporação de micropartículas lipídicas sólidas com 2 % de tensoativos: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl ₂ (e) e (f).	116
Figura 5.21 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos com incorporação de micropartículas lipídicas sólidas com 4 % de tensoativos: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl ₂ (e) e (f).	117
Figura 5.22 – Detalhe da rede formada pela presença de goma xantana (indicada pela seta) nos géis carregados com MLS.....	118
Figura 5.23- Módulos viscoelásticos em função da frequência dos géis não-carregados (SP) e géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS), produzidos com 12 % (m/m) de IPSL e 0,2 % (m/m) de goma xantana e diferentes forças iônicas.	121
Figura 5.24 – Valores de croma (C^*_{ab}), ângulo de Hue (h°) e diferença total de cor (TCD) para os géis não-carregados (sem partícula – SP) e géis carregados: sem adição de sal (a,d e g); com adição de 0,1 M NaCl (b, e e h) e com adição de 0,1 M CaCl ₂ (c, f e i).	124
Figura 5.25 – Imagens dos géis mistos em diferentes etapas da digestão <i>in vitro</i> :(A) Gel carregado triturado antes da fase oral; (B) Gel carregado no início da fase gástrica; (C.1), (C.2), (C.3) Gel carregado ao final da FG, início da FI e final da FI, respectivamente; (D.1), (D.2) e (D.3) Gel não-carregado (sem MLS) ao final da FG, início da FI e final da FI, respectivamente; (E) Equipamento <i>pH stat</i> em operação durante a FI.....	127
Figura 5.26 -Valores de pH medidos durante a fase gástrica do protocolo Infogest para as dispersões de micropartículas lipídicas (a); géis não-carregados (b); géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (c) e géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (d).	129
Figura 5.27 -Valores de pH medidos durante a fase gástrica de acordo com o método de redução gradual do pH da fase gástrica para as dispersões de micropartículas lipídicas (a); géis não-carregados (b); géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (c) e géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (d).	130

Figura 5.28 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa gástrica das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo protocolo Infogest (pHgástrico = 3,0).....	133
Figura 5.29 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa gástrica das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e b) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo método de redução do pH durante a etapa gástrica...	134
Figura 5.30 -Valores de pH medidos para a FI de acordo com o protocolo Infogest.....	140
Figura 5.31 -Valores de pH medidos para a FI de acordo com o método de redução gradual de pH da FG.	141
Figura 5.32-Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa intestinal das para as micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo protocolo de Infogest (pH gástrico = 3,0).....	149
Figura 5.33 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa intestinal das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo método de redução do pH da etapa gástrica.....	150
Figura 5.34 -Perfil de liberação de ácidos graxos livres (AGL) da etapa intestinal de obtido pelo protocolo de Infogest.....	151
Figura 5.35 -Perfil de liberação de ácidos graxos livres (AGL) da etapa intestinal de obtido pelo método de redução gradual do pH.....	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Alguns estudos que investigaram a encapsulação da curcumina em sistemas coloidais. .	24
Tabela 2.2– Composição típica em ácido graxos do óleo de babaçu.	29
Tabela 2.3 –Composição proteica e propriedades físicas das proteínas do soro de leite bovino.	35
Tabela 2.4 –Sistemas de encapsulação utilizando a técnica do <i>pH-stat</i> para a avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> de compostos bioativos.	56
Tabela 4.1 - Temperatura de fusão, sigla e estrutura molecular dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas.	60
Tabela 4.2 –Valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e estrutura molecular dos tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas.	60
Tabela 4.3 – Formulações das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com diferentes composições de tensoativos encapsulando curcumina.	64
Tabela 4.4– Componentese concentrações empregadas na produção dos géis. IPSL -isolado protéico de soro de leite.....	68
Tabela 4.5–Componentes e concentrações empregadas na produção dos géis. O símbolo % representa g/100 g de dispersão protéica.	73
Tabela4.6 -Composição dos fluidos digestivos.	76
Tabela 5.1 -Composição centesimal do isolado proteicode soro de leite utilizado.	80
Tabela 5.2 - Dados da amostra de isolado proteico de soro de leite em diferentes condições experimentais, a 25 °C.....	81
Tabela 5.3–Valores de diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.	92
Tabela 5.4-Resultados do teste estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas para a concentração de curcumina encapsulada ao longo do período de armazenagem.	96
Tabela 5.5- Valores de pH das dispersões proteicas (antes da gelificação) e dos géis produzidos para o teste de varredura de concentrações (g componente/ 100 g de dispersão).	101
Tabela 5.7 -Umidade espremível (UE) e capacidade de retenção de água (CRA) dos géis com 12% IPSL e 0,2 % goma xantana com e sem incorporação das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas (MLS-2 e MLS-4).	113
Tabela 5.7 – Resultados dos ensaios mecânicos dos géis com 12% IPSL e 0,2 % goma xantana não-carregados (SP) e carregados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS) sem adição de sal (SS) ou com adição de 0,1 M NaCl.....	119
Tabela 5.8 -Valores de pH medidos durante a fase oral da digestão <i>in vitro</i> para os protocolos Infogest e de redução gradual do pH da fase gástrica (RG).	128

Tabela 5.9–Diâmetro médio de partícula da etapa intestinal para micropartículas lipídicas sólidas (MLS), géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS.	143
Tabela 5.10 – Porcentagens de ácidos graxos livres (AGL) liberados na etapa intestinal <i>in vitro</i> e os tempos (t) em que os perfis de liberação de AGL atingiram um <i>plateau</i> para as micropartículas lipídicas sólidas (MLS) e géis carregados com MLS.	153
Tabela 5.11 – Bioacessibilidade (%) da curcumina após o processo de digestão simulada <i>in vitro</i> para diferentes protocolos.	155

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 A microencapsulação no desenvolvimento de novas formulações alimentícias.....	20
2.1.1 Curcumina	22
2.1.2 Partículas lipídicas sólidas encapsulando biotivos.....	24
2.1.3 Óleo de babaçu	28
2.2 Gelificação proteica.....	30
2.2.1 Gelificação das proteínas do soro do leite.....	33
2.2.2 Géis biopoliméricos mistos de proteínas e polissacarídeos	38
2.4 Géis carregados com emulsão	42
2.4.1 Propriedades mecânicas e reológicas de géis carregados com emulsão	45
2.5 Processos de digestão de biopolímeros e de sistemas de encapsulação lipídicos	49
2.5.1 Digestão de proteínas	50
2.5.2 Processos de digestão de sistemas lipídicos de encapsulação e de absorção de componentes bioativos lipofílicos.....	53
2.5.3 Processos de digestão simulada em <i>pH stat</i>	55
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 Objetivo Geral	58
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 Material	59
4.1.1 Produção dos géis.....	59
4.1.2 Produção das micropartículas lipídicas sólidas	59
4.1.3 Avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas.....	60
4.1.4 Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> dos géis.....	61
4.2 Métodos	61
4.2.1 Caracterização do isolado proteico de soro de leite	61
4.2.1.1 Análises de turbidez e solubilidade proteica	61
4.2.1.2 Hidrofobicidade superficial.....	62
4.2.1.3 Fluorescência intrínseca	62
4.2.1.4 Determinação do ponto isoelétrico do isolado proteico de soro de leite.....	63

4.2.1.5 Determinação do comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial.....	63
4.2.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	63
4.3 Produção das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina	63
4.3.1 Determinação do comportamento térmico das micropartículas lipídicas sólidas por calorimetria exploratória diferencial	64
4.3.2 Avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina	65
4.3.2.1 Determinação do diâmetro médio e da distribuição de diâmetro de partícula.....	65
4.3.2.2 Determinação do potencial zeta	65
4.3.2.3 Quantificação de curcumina encapsulada	66
4.3.2.4 Oxidação lipídica.....	66
4.3.2.5 Determinação dos parâmetros colorimétricos	66
4.4 Produção e caracterização dos géis de isolado proteico de soro de leite	67
4.4.1 Definição das formulações de géis.....	67
4.4.2 Produção e avaliação visual dos géis de IPSL	68
4.5 Produção e caracterização dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas	69
4.5.1 Incorporação de diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas	70
4.5.1.1 Ensaio de compressão uniaxial dos géis carregados com diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas.....	71
4.5.1.2 Ensaios de reologia dinâmica oscilatória de pequena amplitude dos géis carregados com diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas.....	72
4.6 Caracterização das propriedades reológicas e de microestrutura dos géis não-carregados e géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas.....	72
4.6.1 Determinação da umidade espremível	73
4.6.2 Ensaios de compressão uniaxial dos géis carregados.....	74
4.6.3 Ensaios de reologia dinâmica oscilatória de pequena amplitude dos géis carregados....	74
4.6.4 Análise dos géis por microscopia eletrônica de varredura.....	74
4.6.5 Análise dos géis por microscopia confocal de varredura a laser.....	74
4.6.6 Estudo da estabilidade dos parâmetros colorimétricos dos géis	75

4.7 Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> dos géis.....	75
4.7.1 Determinação da atividade enzimática.....	75
4.7.2 Fluidos gastrointestinais simulados para a digestibilidade <i>in vitro</i>	76
4.7.3 Ensaio de digestibilidade simulada <i>in vitro</i>	76
4.7.4 Monitoramento da digestão simulada <i>in vitro</i>	78
4.7.4.1 Perfil de pH e de distribuição de tamanhos de partículas.....	78
4.7.4.2 Perfil de liberação de ácidos graxos livres.....	78
4.7.5 Determinação da bioacessibilidade da curcumina.....	79
4.8 Análises estatísticas.....	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 Caracterização do isolado proteico de soro de leite.....	80
5.1.1 Composição centesimal, turbidez e solubilidade.....	80
5.1.2 Determinação do ponto isoelétrico.....	82
5.1.3 Intensidade de fluorescência e hidrofobicidade superficial.....	83
5.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	85
5.1.5 Comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial.....	86
5.2 Produção e avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.....	87
5.2.1 Determinação da concentração de curcumina encapsulada.....	87
5.2.2 Comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.....	88
5.2.3 Estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.....	89
5.2.3.1 Distribuição de diâmetro de partícula, diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas.....	89
5.2.3.2 Quantificação da oxidação lipídica e da curcumina nas micropartículas lipídicas sólidas.....	93
5.2.3.3 Análises colorimétricas das micropartículas lipídicas sólidas.....	96
5.3 Produção dos géis mistos de isolado proteico de soro de leite e de goma xantana.....	99
5.3.1 Avaliação visual da formação dos géis mistos sem incorporação de micropartículas lipídicas sólidas.....	99

5.4 Produção e caracterização reológica dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas	105
5.4.1 Ensaio mecânico dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas	106
5.4.2 Caracterização reológica dinâmica oscilatória dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas	109
5.5 Caracterização dos géis não-carregados e carregados com micropartículas lipídicas sólidas e diferentes forças iônicas	112
5.5.1 Umidade espremível (UE) e capacidade de retenção de água (CRA).....	112
5.5.2 Microestrutura dos géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas	114
5.5.3 Caracterização mecânica géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas com diferentes forças iônicas	118
5.5.4 Caracterização reológica dinâmica oscilatória	119
5.5.5 Estabilidade dos parâmetros colorimétricos.....	122
5.6 Ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i>	126
5.6.1 Monitoramento da fase gástrica	128
5.6.2 Monitoramento da digestão simulada no intestino delgado	139
6 CONCLUSÕES	159
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	161
REFERÊNCIAS	162
ANEXOS	189

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tem se tornado um problema de saúde pública em muitos países, o que tem levado a indústria de alimentos a se empenhar no desenvolvimento de novos produtos que possuam atributos desejáveis de sabor e textura sem a necessidade de adição de altos teores de gorduras, açúcares e sal (NORTON; MOORE; FRYER, 2007). O consumo de gorduras saturadas e de ácidos graxos *trans* tem sido associado não apenas com a obesidade, mas também com altos níveis de colesterol no sangue, câncer e doenças do coração (HU et al., 1997; KRIS-ETHERTON et al., 2001; WILLETT, 2012). A preocupação com a ingestão de calorias em excesso tem levado os consumidores a preferirem o consumo de alimentos altamente nutritivos, que contenham compostos benéficos à saúde e que sejam capazes de ajudar na prevenção de doenças (STRATULAT et al., 2014).

Neste sentido, novas estruturas coloidais têm sido desenvolvidas pela indústria de alimentos a fim de melhorar a cor, o sabor, a textura, a qualidade nutricional, bem como possibilitar que os alimentos promovam benefícios à saúde (BORGOGNA et al. 2010; DICKINSON, 2013). Pode-se entender por alimento funcional aquele que é composto por determinados ingredientes que possuam alguma função fisiológica, além da nutricional (como ácidos graxos polinsaturados, carotenóides, vitaminas, coenzimas, polifenóis, por exemplo). Os compostos bioativos podem ser isolados de sua fonte natural e são incorporados aos alimentos funcionais como ingredientes (McCLEMENTS, 2015). O emprego de tecnologias de encapsulação tem sido proposto para incorporar, proteger e entregar componentes bioativos e melhorar as propriedades funcionais e/ou sensoriais de formulações alimentícias (GIROUX; BRITTEN, 2011).

Diversos sistemas à base de emulsões vêm sendo desenvolvidos com uso potencial para o controle da digestão e entrega de componentes bioativos lipofílicos no trato gastrointestinal (TGI), tais como emulsões convencionais, nanoemulsões, emulsões multicamadas, micro e nanopartículas lipídicas sólidas e partículas de hidrogel carregadas (ANSARI; KOHLI; DIXIT, 2008; GARTI, 1997; KHAN et al., 2006; KUKIZAKI; GOTO, 2007; McCLEMENTS et al., 2008; McCLEMENTS; DECKER; PARK., 2009; WISSING; KAYSER; MULLER, 2004). Os sistemas de entrega emulsionados são técnicas de encapsulação vantajosas porque são capazes de incorporar agentes lipofílicos e anfifílicos. Além disso, é possível controlar a estabilidade de componentes encapsulados e as

propriedades reológicas da estrutura (de líquidos viscosos para materiais plásticos ou sólidos elásticos) (SATO; MORAES; CUNHA, 2014).

A curcumina (diferuloilmetano) é um composto polifenólico natural isolado a partir de uma conhecida especiaria, a cúrcuma. O referido composto é um importante corante natural de alimentos e apresenta diversas atividades biológicas, tais como atividades antioxidantes, anti-inflamatória, anticancerígena ou antitumoral, antialérgica além de outros benefícios à saúde (CANO-HIGUITA; VÉLEZ; TELIS, 2015; TANG, 2004). Apesar de todos estes benefícios, a maior limitação da incorporação da curcumina como ingrediente funcional é devido à sua alta hidrofobicidade, instabilidade e baixa biodisponibilidade (ANAND et al. 2007; SAHU; KASOJU; BORA, 2008). A microencapsulação da curcumina pode superar estes inconvenientes por reforçar a estabilidade e melhorar a solubilidade deste biotivo em meio aquoso (CANO-HIGUITA; VÉLEZ; TELIS, 2015).

Um material coloidal complexo pode existir como uma emulsão lipídica e um gel biopolimérico (DICKINSON, 2012). Os lipídios são capazes de gerar características de sabor e textura únicas em alimentos (SATO; MORAES; CUNHA, 2014) e os géis proteicos e de polissacarídeos são excelentes para melhorar características estruturais em alimentos.

Novas estruturas que combinam polímeros e lipídios vem sendo estudadas e classificadas como géis carregados com emulsão (*emulsion-filled gels*). O gel carregado com emulsão consiste de uma matriz tridimensional na qual gotas de emulsão são incorporadas, sendo utilizado nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (DICKINSON, 2012; LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013). As propriedades reológicas deste sistema são típicas de um sólido e são determinadas predominantemente pelas propriedades da rede espacialmente contínua (DICKINSON, 2012).

Quanto à propriedade de formação de géis, diversas macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos, já são amplamente utilizadas na indústria de alimentos. Dentre estas macromoléculas, destacam-se as proteínas do soro do leite (PSL), as quais são separadas durante o processo de produção de queijos. Elas são empregadas na indústria de alimentos devido às suas propriedades de gelificação e emulsificação (GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007). Os géis de PSL vêm sendo estudados como potenciais dispositivos de microencapsulação para a liberação controlada de compostos bioativos. Betz e Kulozik (2011) desenvolveram um sistema de matriz de gel de PSL induzida termicamente e altamente acidificado para encapsular extrato de mirtilo rico em antocianina. Em outro trabalho,

sistemas de entrega consistindo de partículas de gel de PSL e alginato foram produzidos para encapsular riboflavina (vitamina B₂) (WICHCHUKIT et al., 2013). Os géis de biopolímeros são totalmente biodegradáveis e não há qualquer necessidade de agentes químicos reticulantes na sua preparação, o que possibilita a ampla utilização de hidrogéis em muitas aplicações alimentares e de bioprocessamento (GUNASEKARAN; KO; XIAO, 2007).

Na literatura, existem diversos trabalhos que estudaram géis carregados com emulsão. Lorenzo, Zaritsky e Califano (2013) produziram géis de gelatina incorporados de óleo de girassol e estudaram o comportamento reológico destas estruturas. Sato, Moraes e Cunha (2014), estudaram isoladamente géis de gelatina, alginato e as misturas dos dois para estabilizar emulsões de óleo de oliva. Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014) produziram géis de proteínas do soro contendo óleo de oliva emulsionado para avaliar a combinação das características reológicas com a microscopia confocal destas estruturas.

No entanto, apesar de na literatura investigada diversos trabalhos estudarem géis carregados com emulsão, não foram encontrados trabalhos que estudassem estas estruturas combinadas com outros tipos de sistemas lipídicos de microencapsulação. Dentre estes sistemas, as micropartículas lipídicas sólidas (MLS) podem ser uma boa alternativa para a substituição de outros sistemas, tais como emulsões convencionais e lipossomas. As MLS são emulsões óleo em água modificadas, pois substituem lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido à temperatura ambiente e são estruturas capazes de encapsular bioativos lipossolúveis, hidrofóbicos e instáveis (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; RADTIKE; WISSING, 2002).

Sistemas digestivos artificiais, os quais simulam o trato gastrointestinal humano (TGI) com maior precisão, tem sido extensivamente utilizados em estudos de liberação controlada de compostos bioativos (CHEN et al., 2010). Um sistema digestivo *in vitro* oferece vantagens sobre os estudos *in vivo* como a precisão, a reprodutibilidade (sem variações biológicas), facilidade na manipulação, a possibilidade de recolher amostras em qualquer posição do TGI, a qualquer momento durante a digestão, bem como a liberdade de restrições éticas, mesmo quando compostos tóxicos são utilizados (CHEN et al., 2010).

Dentro do contexto exposto, esta Tese teve como objetivo desenvolver e caracterizar géis mistos de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana carregados com micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina, bem como avaliar a digestibilidade *in vitro* destas estruturas e a bioacessibilidade do curcuminoide.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A microencapsulação no desenvolvimento de novas formulações alimentícias

A via oral tem sido o principal meio de administração de compostos bioativos necessários no tratamento de doenças crônicas. No entanto, diversos compostos ativos, especialmente hidrofóbicos, apresentam reduzida biodisponibilidade oral, em função da baixa permeabilidade, solubilidade ou/e por não serem estáveis nas condições do trato gastrointestinal (TGI) (McCLEMENTS; LI, 2010). Um alimento funcional pode ser produzido a partir um componente bioativo que foi encapsulado num sistema de entrega alimentício adequado, incluindo vitaminas, peptídios biotivos, antioxidantes microbianos, saborizantes, corantes, minerais e conservadores (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; SHEFER; SHEFER, 2003; UBBINK, 2002; UBBINK; KRUGER, 2006).

Há um crescente aumento de estudos de sistemas de encapsulação como veículos de administração oral, que possam permitir a entrega eficiente de compostos bioativos hidrofóbicos no intestino delgado, visando sua melhor absorção e aumento de bioacessibilidade. Os compostos bioativos necessitam ser bem protegidos em sistemas de distribuição coloidais durante o processamento e estocagem, mas uma vez digeridos, eles precisam ser adequadamente entregues no local apropriado para a digestão no tratogastrointestinal humano (BENSHITRIT et al., 2011; McCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009; VELIKOV; PELAN, 2008).

A encapsulação é a técnica em que o núcleo de material coloidal (líquido ou sólido) é revestido por um material de barreira, formando uma cápsula, com tamanhos micrométricos (microencapsulação) ou nanométricos (nanoencapsulação) (BAKRY et al., 2016; TROJER et al., 2013). A aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos tem possibilitado controlar a entrega de agentes de sabor e a produção de alimentos os quais possuam ingredientes funcionais, como probióticos e ingredientes bioativos (KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

De uma maneira geral, as técnicas de microencapsulação protegem o material bioativo localizado no núcleo da cápsula contra as condições do ambiente externo que venham a ser desfavoráveis à estabilidade deste núcleo, tais como degradação e perda de funcionalidade em função da luz; oxigênio, pH, umidade e interações com outros componentes da matriz alimentícia (VOS et al., 2010) e demais alterações químicas durante o processamento e armazenamento dos alimentos (FANG; BHANDARI, 2010). Esta proteção promove um

ganho da vida útil do composto encapsulado e possibilita que sua funcionalidade seja potencializada (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). O sucesso de um sistema de entrega constituído de um componente bioativo microencapsulado poderá ser mensurado pelo comportamento do bioativo durante o processamento e estocagem do material alimentício e após a sua ingestão (JOYE; DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014).

Segundo McClements, Decker e Weiss (2007), um sistema de encapsulação em alimentos deve possuir algumas características importantes, tais como:

- encapsular eficientemente uma quantidade suficiente do componente funcional de forma que possa ser facilmente incorporado nos sistemas alimentícios;
- proteger o componente funcional da degradação química (por exemplo, oxidação ou hidrólise) de modo que ele permaneça em seu estado ativo;
- liberar o componente funcional em um sítio particular de ação a uma taxa controlada e/ou em resposta a um estímulo ambiental específico;
- ser compatível com a matriz alimentícia;
- ser resistente a vários tipos de condições ambientais que um alimento sofre durante a sua produção, armazenamento, transporte e consumo.

Os sistemas lipídicos de microencapsulação tem sido estudados e aplicados pela indústria de alimentos, pois se tratam de matérias-primas biocompatíveis e biodegradáveis (LESMES; McCLEMENTS, 2009) e apresentam a capacidade de encapsular, proteger e entregar componentes bioativos lipofílicos, tais como corantes solúveis em óleo, aromas, conservadores, vitaminas e compostos nutracêuticos (FATHI; MARTIN; McCLEMENTS, 2014; JOYE; DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2014; MASWAL; DAR, 2014; McCLEMENTS, 2010; SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006; VELIKOV; PELAN; 2008; YAO; XIAO; McCLEMENTS, 2014).

Geralmente, o componente bioativo é misturado com uma fase oleosa com ou sem tensoativos e então será convertido em dispersões coloidais. A dispersão coloidal poderá então ser utilizada para produzir estruturas mais complexas, tais como emulsões multicamadas, coloidossomas ou hidrogéis carregados de partículas (McCLEMENTS, 2012; McCLEMENTS; LI, 2010; TING et al., 2014; TROJER et al., 2013). Desta forma, os sistemas de entrega lipídicos podem melhorar a dispersibilidade em água, a estabilidade

química e a biodisponibilidade oral de muitos agentes bioativos lipofílicos (McCLEMENTS, 2015).

2.1.1 Curcumina

A curcumina (diferuluilmetano) (*1,7 bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5diona*), cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 2.1, é um polifenol com pigmentação amarela, de baixa massa molecular (368,4 g/mol;ponto de fusão de 183,0 °C), e é o componente majoritário (2 a 8 % em base seca) dos rizomas da cúrcuma (*Curcuma longa* L.), que pertence à família das *Zingiberaceae* (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008; SUETH-SANTIAGO et al., 2015). A cúrcuma é uma especiaria muito utilizada na culinária asiática como agente saborizante e como corante e também possui aplicações medicinais em países do Oriente, como a Índia e a China (MAHESHWARE et al, 2006; SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005).

Figura 2.1 – Estrutura molecular da curcumina.

Fonte: GESCHER, A.J.; SHARMA, R.A.; STEWARD, W.P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, London, v.2, p. 371-379, 2001.

A curcumina é um dos ingredientes responsáveis pela atividade biológica da cúrcuma (MESA et al., 2000) e possui diversos efeitos benéficos à saúde comprovados, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica (GESCHER; SHARMA; STEWARD, 2001; RUBY et al., 1995; SHARMA et al., 2001), hipocolesterolêmica (RAO et al., 1970), antibacteriana (RAMAPRASAD; SIRSI, 1956), cicatrizante, antiespasmódica, anticoagulante, antitumoral (AMMON; WAHL, 1991) e atividade hepatoprotetora (SUBRAMANIAN; SELVAM, 1999). Além disso, a curcumina é capaz de captar radicais livres e de inibir a peroxidação lipídica (TÖNNESEN; GREENHILL, 1992) e de acordo com Anand et al. (2007), pode auxiliar no tratamento do diabetes.

A composição da curcumina comercial é comumente composta por curcumina (~77 %); desmetoxicurcumina (~17%); e bisdesmetoxicurcumina (~3%) (GOEL; KUNNUMAKARA; AGGARWAL, 2008). Este bioativo é lipofílico (log P_{ow} – coeficiente de

partição octanol/água de 3,07) e devido a sua natureza hidrofóbica, a curcumina é rapidamente eliminada pelo corpo e apenas uma pequena porção é absorvida pelo intestino (ADITYA et al., 2013; DONSI et al., 2011; GOEL; KUNNUMAKARA; AGGARWAL, 2008) e metabolizada nos hepatócitos à curcumina-glicuronídeo, sulfato de curcumina, tetrahidrocurcumina (OKADA et al., 2001; SOMPARN et al., 2007). Após ser metabolizada, os metabólitos são excretados por meio da bile e da urina (MESA et al., 2000). Nas condições do estômago, onde o pH é ácido e do intestino delgado (pH 6,5), a curcumina é estável, mas é instável em valores de pH superiores a 7 (GOEL; KUNNUMAKARA; AGGARWAL, 2008;).

No entanto, o fato da curcumina apresentar baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade/dispersibilidade em água em pH ácido e fisiológico, há uma limitação da incorporação deste biotivo em produtos alimentícios de base aquosa (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005; TANG, 2004; YADAV et al., 2009). O referido composto também sofre rápida hidrólise em condições alcalinas, produzindo, principalmente, ácido ferúlico, feruloilmetano e produtos de condensação amarelo escuro que invalidam seu uso na indústria farmacêutica e limitam seu uso na indústria de processamento de alimentos (GOEL; KUNNUMAKARA; AGGARWAL, 2008; WANG et al., 2009).

A incorporação da curcumina como ingrediente funcional tem sido estudada por diversos pesquisadores, empregando diferentes técnicas, com o objetivo de melhorar a solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade do referido bioativo em meio aquoso.

A Tabela 2.1 apresenta alguns estudos de sistemas coloidais encapsulando curcumina que avaliaram o desempenho destes sistemas quanto à solubilidade, biodisponibilidade e/ou estabilidade do composto bioativo.

Sistemas de entrega a base de lipídios já são utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentícia para melhorar a encapsulação de compostos bioativos lipofílicos (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007). A lipossolubilidade da curcumina permite que este composto possa ser encapsulado em matrizes lipídicas, as quais podem favorecer a sua biodisponibilidade oral em alimentos funcionais (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2005; ZOU et al., 2015). Sendo assim, sistemas de entrega a exemplo das micropartículas lipídicas sólidas, podem ser uma alternativa interessante para possibilitar a encapsulação da curcumina e sua consequente incorporação em formulações alimentícias de base aquosa.

Tabela 2.1 – Alguns estudos que investigaram a encapsulação da curcumina em sistemas coloidais.

Autores	Estrutura de encapsulação	Conclusão dos autores
Wang et al. (2009)	Microcápsulas de gelatina e amido poroso	Melhora da estabilidade da curcumina na presença de luz, calor, pH e aumento da solubilidade
Donsi et al. (2011)	Nanoemulsões de diferentes óleos vegetais e emulsificantes naturais	Melhora da solubilidade da curcumina em sistemas aquosos, proteção contra degradação e preservação da atividade antioxidante
Ahmed et al. (2012)	Nanoemulsões óleo em água ou emulsões convencionais empregando lipídios com cadeias de diferentes tamanhos	Maior biocessibilidade da curcumina para os lipídios com cadeia de tamanho médio e melhor bioacessibilidade para as emulsões convencionais
Yu e Huang (2012)	Nanoemulsões a base de organogéis	Aumento da biodisponibilidade da curcumina
Gómez-Estaca; Gavara; Hernández-Munõz (2015)	Micropartículas de curcumina e gelatina	Aumento da solubilidade e biodisponibilidade da curcumina; potencialização do efeito antioxidante
Hu et al. (2015)	Nanopartículas de zeína e pectina fortificadas com curcumina	As nanopartículas foram convertidas em pó e apresentaram boa dispersibilidade em água, possibilitando seu uso em aplicações alimentícias e farmacêuticas
Zhang et al. (2016)	Encapsulação da curcumina em emulsões e em hidrogéis de polissacarídeo (alginato e carragena) carregados com emulsão	Aumento da bioacessibilidade da curcumina após avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> , principalmente para a emulsão e o hidrogel de alginato
Silva et al. (2017)	Encapsulação da curcumina em lipossomas	Estabilidade da curcumina encapsulada após 60 dias de estocagem

Fonte: Própria autoria.

2.1.2 Partículas lipídicas sólidas encapsulando biotivos

No contexto da encapsulação, as partículas lipídicas sólidas se apresentam muito promissoras como sistemas coloidais de distribuição de compostos bioativos e de drogas (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; YADAV et al., 2009). As partículas lipídicas sólidas são produzidas a partir da substituição do núcleo de óleo

(lipídio líquido) em uma emulsão O/A por um lipídio sólido/parcialmente sólido a temperatura ambiente e/ou na temperatura corpórea, estabilizado por uma camada de tensoativo (DAS; CHAUDHURY, 2011; MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; RADTIKE; WISSING, 2002; UMEYOR et al., 2012; SALMINEN et al., 2014) e podem ser produzidos em escala micrométrica (micropartículas lipídicas sólidas, MLS) ou nanométrica (nanopartículas lipídicas sólidas, NLS) (MÜLLER; RADTIKE; WISSING, 2002).

Na literatura, a utilização das partículas lipídicas sólidas vem sendo alvo de pesquisa, com destaque para as MLS, com o objetivo de encapsular compostos benéficos à saúde, tais como β -caroteno (GOMES et al., 2013), ácido ascórbico (COMUNIAN et al., 2014; MATOS-JÚNIOR et al., 2015) e probióticos (OKURO et al., 2013; PEDROSO et al., 2012).

As MLS e NLS são úteis na encapsulação de bioativos lipossolúveis, hidrofóbicos e/ou instáveis quimicamente, possibilitando a produção de alimentos funcionais pela indústria de alimentos (WEISS et al., 2008). A substituição do lipídio líquido pelo lipídio sólido é interessante quanto à entrega de compostos benéficos à saúde uma vez que a mobilidade deste composto é reduzida no interior do lipídio sólido (MEHNERT; MÄDER, 2001).

A Figura 2.2 ilustra esquematicamente a estrutura das partículas lipídicas sólidas.

Figura 2.2– Representação estrutural de uma partícula lipídica sólida.

Fonte: Adaptado de LA TORRE, L. G. et al. Lipid matrices for nanoencapsulation in food: liposomes and lipid nanoparticles. SÁNCHEZ, H.H.; LÓPEZ, G.F.G. **Food nanoscience and technology**. New York: Springer Science Business Media, 2015. 114p.

Dentre as vantagens da produção das partículas lipídicas sólidas como sistemas de entrega de compostos bioativos, pode-se citar (BARRAT, 2000; COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995; GOMES et al., 2013; MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; RADTIKE; WISSING, 2002; YADAV et al., 2009):

- (i) produção das partículas por lipídios sólidos biodegradáveis por diversos métodos;
- (ii) a total biocompatibilidade dos lipídios pelo componente bioativo;
- (iii) alta capacidade de incorporarem compostos lipofílicos e melhorar a dispersibilidade em água e biodisponibilidade destas moléculas;
- (iv) a possibilidade do controle da distribuição do bioativo em local predefinido;
- (v) proteção do composto incorporado contra a degradação química;
- (vi) a não-toxicidade do sistema;
- (vii) a estabilidade físico-química destas estruturas e a facilidade da sua produção em escala industrial.

Segundo McClements et al. (2009), a estabilidade das partículas produzidas e a organização espacial dos cristais lipídicos no interior da partícula é geralmente controlado pela seleção do número e tipos de lipídios presentes, da natureza e concentração dos tensoativos usados na estabilização do sistema, tamanho de partícula e condições de resfriamento. Ainda de acordo com os autores, é possível controlar a localização relativa das diferentes fases dentro das partículas: núcleo sólido (S) – revestimento líquido (L); núcleo líquido (L) – revestimento sólido (S); núcleo sólido (S_1) – revestimento sólido (S_2). A Figura 2.3 ilustra os diferentes tipos de arranjos obtidos para estes sistemas.

De maneira geral, os compostos bioativos são incorporados entre as cadeias de ácidos graxos ou entre as camadas lipídicas ou nos agregados amorfos das imperfeições dos cristais da matriz das partículas lipídicas sólidas (DAS; CHAUDHURY, 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

A Figura 2.4 mostra os possíveis arranjos no interior das partículas lipídicas sólidas.

Figura 2.3—Diferentes tipos de partículas lipídicas sólidas que podem ser formadas pelo controle da cristalização dos lipídios em emulsões óleo em água (O/A).

Fonte: McCLEMENTS, D. J. et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.49, p. 577-606, 2009.

Figura 2.4 –Diferentes estruturas de partículas lipídicas sólidas. (a) Estrutura cristalina organizada produzida com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura desorganizada produzida com mais de um tipo de lipídio.

Fonte: PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MULLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 366, 2009.p. 171.

Estruturas nas quais o lipídio aparece organizado (Figura 2.4 (a)) podem ter maior limitação na encapsulação do bioativo, expulsando-o durante o tempo de armazenamento. No entanto, em estruturas em que se verifica um alto grau de desorganização (Figura 2.4 (b)), ocasionada pela mistura de diferentes lipídios, a expulsão do bioativo é reduzida. Isto ocorre em função das diferentes cadeias carbônicas serem espacialmente incompatíveis, criando lacunas do interior da matriz lipídica sólida (DAS; CHAUDHURY, 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER, MULLER, 2004). Como consequência da expulsão dos produtos encapsulados das partículas lipídicas, tem-se um controle limitado sobre a liberação de tais compostos, bem como um aumento da exposição deles para a fase

aquosa (TIKEKAR; NITIN, 2011). Desta forma, a criação de matrizes lipídicas sólidas menos organizadas se torna um pré-requisito para um alto nível de encapsulação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

2.1.3 Óleo de babaçu

A fim de se evitar baixa eficiência de encapsulação, bem como reduzir o risco de expulsão do bioativo encapsulado devido ao alto nível de cristalinidade do núcleo lipídico, lipídios naturais são preferíveis àqueles sintéticos, uma vez que são compostos por misturas de diferentes trigliceróis com cadeias de ácidos graxos de diferentes comprimentos e grau de insaturação (MEHNERT; MADER, 2001; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). Óleos vegetais, de maneira geral, apresentam muitas vantagens em sistemas de entrega a base de lipídios. Os triacilgliceróis (TAGs) tem a capacidade de solubilizar fármacos associada a alta concentração de grupos ésteres (POUNTON; PORTER, 2008).

Os óleos láuricos são aqueles em grande parte compostos por triacilgliceróis (TAGs) classificados com triacilgliceróis de cadeia média (MCTs). O termo “triacilgliceróis de cadeia média” é utilizado para se referir aos TAGs contendo ácidos graxos com cadeias carbônicas contendo de 8 a 12 carbonos (DAYRIT, 2015).

O óleo extraído da semente do babaçu (*Orbignya oleifera*), cuja palmeira é nativa da região Norte e das áreas de Cerrados brasileiras, apresenta coloração branca e levemente amarelada e corresponde a 4 % em massa da semente. Este óleo é composto majoritariamente por ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0), os quais são muito importantes na indústria cosmética e de alimentos. Tais gorduras são resistentes à oxidação enzimática e apresentam temperatura de fusão baixa e bem definida (URIOSTE et al., 2008). Santos et al. (2013) investigaram a composição em ácidos graxos de óleo de babaçu extraído de sementes de seis diferentes municípios do estado do Maranhão e encontraram valores de ácido láurico variando de 44,86 a 52,15 %.

A composição de ácidos graxos típica do óleo de babaçu é apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2– Composição típica em ácido graxos do óleo de babaçu.

Ácidos graxos	Porcentagem(%)
Caprílico (C8:0)	2,6 – 7,3
Cáprico (C10:0)	1,2 – 7,6
Láurico (C12:0)	40,0 – 55,0
Mirístico (C14:0)	11,0 – 27,0
Palmítico (C16:0)	5,2 – 11,0
Esteárico (C18:0)	1,8 – 7,4
Oleico (C18:1)	9,0 – 20,0
Linoleico (C18:2)	1,4 – 6,6

Fonte: Codex Alimentarius: codex standard for named vegetable oils, CX-STAN 210. 1999. v.8, 2001.

Os valores da Tabela 2.2 mostram que o óleo de babaçu é uma matéria-prima rica em MCTs. Em relação aos triacilgliceróis de cadeia longa (LCTs) os MCTs apresentam a vantagem de possuírem menores pontos de fusão (PF) e menores massas molares. Além disso, apresentam-se na forma líquida ou semi-sólida na temperatura ambiente. Tais características fazem que o processo de metabolização e absorção dos MCTs, que é feita por transporte para o fígado pelo sistema portal, sejam mais rápidas do que a dos LCTs, que exigem a formação de quilomícrons e chegam à circulação sistêmica através do sistema linfático. Além disso, os ácidos graxos de cadeia média ainda podem ser absorvidos na presença de lipase pancreática ou deficiência de sais de bile, ao contrário dos de cadeia longa (BEARE-ROGERS, 1988; MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2006).

Dayrit (2015), em estudo sobre o óleo de coco, o qual possui uma grande proporção de MCTs (54,3 % dos triacilgliceróis contendo ácido láurico) assim como o óleo de babaçu, afirma que tal óleo é mais solúvel em água e mais rapidamente solubilizado pela lipase do que outros óleos vegetais, que são compostos predominantemente por LCTs. O óleo coco também é mais rapidamente absorvido pelo organismo que os óleos com maior percentual de LCTs (PHAM et al. 1998; PORSGAARD; HOY, 2000).

Portanto, a utilização do óleo de babaçu como fonte de MCTs para a produção de sistemas de microencapsulação de compostos de bioativos apresenta-se como muito vantajosa. Porém, na literatura investigada existe um pequeno número de trabalhos que empregaram esta fonte em sistema de entrega a base de lipídios.

Lima et al. (2008) utilizaram óleo de babaçu para produzir diferentes formulações de emulsão O/A pela técnica de emulsificação por inversão de fase. Os autores concluíram que a formulação com 10 % de óleo e 4 % de oleato de sorbitan apresentou-se físico-quimicamente e reologicamente estável.

Pessoa et al. (2015) produziram uma microemulsão óleo em água a partir do óleo de babaçu. A estabilidade físico-química em termos de pH e condutividade das formulações estudadas variou de 30 a 90 dias.

Pereira (2015) empregou óleo de babaçu juntamente com triestearina como matrizes lipídicas na produção de micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina por método de alta energia. Diferentes partículas foram produzidas variando-se a concentração de óleo de babaçu e de tensoativos. A estabilidade físico-química das partículas foi de 30 dias e avaliações de digestibilidade *in vitro* indicaram que formulações com maior concentração de óleo de babaçu proporcionaram diferentes graus de bioacessibilidade da quercetina encapsulada.

2.2 Gelificação proteica

As proteínas são polímeros biológicos constituídos por aminoácidos e possuem grande variedade de estruturas (fibrosas, proteínas globulares e enoveladas) (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). A estrutura molecular assumida por uma proteína vai depender da sequência de aminoácidos, das condições ambientais predominantes e de fatores como pH, temperatura, pressão, solvente e composição iônica (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994).

Além de suas propriedades nutricionais, as proteínas exercem um importante papel no que diz respeito aos atributos sensoriais dos alimentos. Segundo Kinsella (1976), propriedades funcionais podem ser definidas como aquelas propriedades físicas e químicas as quais afetam o comportamento das proteínas em sistemas alimentares durante o processamento, estocagem, preparação e consumo.

As principais propriedades funcionais atribuídas às proteínas são a sua capacidade de formar e/ou estabilizar as estruturas em rede (géis e filmes), espumas, emulsões e sóis (FOEGEDING; DAVIS, 2011). Estas funcionalidades proteicas podem ser classificadas em três grupos distintos: propriedades de hidratação, relacionadas à interação proteína-água (absorção, retenção, molhabilidade, adesão, dispersibilidade, solubilidade e viscosidade); propriedades que envolvem interação proteína-proteína (precipitação e gelificação) e propriedades superficiais (tensão superficial, emulsificação e formação de espuma) (MESSENS; VAN CAMP; HUYGHEBAERT, 1997).

As propriedades físico-químicas que influenciam a funcionalidade das proteínas nos alimentos estão relacionadas ao seu tamanho, forma, composição e sequência de aminoácidos, carga líquida, distribuição de cargas, hidrofobicidade, hidrofiliicidade, estruturas (secundária, terciária e quaternária), flexibilidade e rigidez molecular em resposta a alterações do meio (pH, temperatura e força iônica) ou interações com outros ingredientes nos alimentos (DAMODARAN, 1997).

Uma importante característica das proteínas é a sua capacidade de formar géis. A gelificação pode ser definida como a transformação da proteína de um estado sol para uma estrutura tipo gel em função do calor ou outros agentes (DAMODARAN, 1989). No caso das proteínas globulares em solução aquosa há uma tendência destas moléculas de se agregarem e formarem ligações cruzadas intermoleculares sob aquecimento, força iônica e alterações de pH (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; CLARK, 1998; WALSTRA, 2003). Uma vez alcançadas um grau de ligação intermolecular no qual uma rede contínua é formada, a propriedade macroscópica de elasticidade é alcançada e é desenvolvido o gel (FOEDING; DAVIS, 2011).

Dois tipos de géis proteicos podem ser formados: coágulos (géis particulados) ou transparentes (filamentosos). O tipo de gel formado sofre influência da composição e sequência de aminoácidos, condições da solução, tais como pH, força iônica, tipo de proteína e concentração proteica e temperatura (DAMODARAN, 1989; BRYANT; McCLEMENTS, 2000a; MARANGONI et al., 2000). A estrutura do gel formado irá determinar sua capacidade de reter água, permeabilidade, textura e aparência (BRYANT; McCLEMENTS, 2000a).

Os géis com aparência opaca são formados quando flutuações da densidade dos polímeros se aproximam do tamanho macroscópico e efetivamente espalham luz, sendo que o aumento da turbidez está associado ao espessamento dos filamentos de proteína

(BARBUT,1995a; BARBUT, 1995b; TAKATA, 1981). Este tipo de gel está relacionado ao processo de agregação de moléculas aleatório (não linear), formam-se em pH próximo ao pI (ponto isoelétrico) e são classificados como géis particulados (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; OAKENFUL;PEARCE; BURLEY,1997). Por outro lado, os géis transparentes ou semitransparentes são formados pelo processo de agregação ordenada e são resultado da formação de uma rede de filamentos finos, produzidos pela associação de moléculas de pequenos diâmetros de maneira organizada, apresentando estrutura homogênea (BARBUT, 1995b; OAKENFUL;PEARCE; BURLEY,1997).

Para as proteínas globulares, a formação de uma matriz de gel termicamente induzida pode ser descrita por três etapas principais (BAIER; McCLEMENTS, 2005):

- (i) Desnaturação/ desdobramento;
- (ii) agregação/ coagulação;
- (iii) ligação cruzada.

A Figura 2.5 mostra o esquema de gelificação de proteína globular pelo calor e a Figura 2.6 apresenta os tipos de ligações formadas durante o processo de gelificação.

Na etapa (i) do processo de gelificação por indução térmica, as proteínas globulares passam de seu estado original (nativo) para um estado desnaturado ou desdobrado. Nesta etapa, haverá exposição de muitos sítios reativos que favorecerão as ligações intermoleculares. Neste estágio, a proteína pode passar de um estado conformacional intermediário com a estrutura secundária da proteína globular se mantendo intacta ou levemente expandida, favorecendo a mobilidade intramolecular de cadeias laterais e aumentando a hidrofobicidade superficial (HIROSE, 1993). Cineticamente, esta primeira etapa é vista como uma reação de primeira ordem e é considerada irreversível (TOBITANI; ROSS-MURPHY, 1997).

Na etapa de agregação (ii), ocorre a formação de agregados moleculares em função das ligações entre as proteínas desdobradas. Haverá então a formação de uma estrutura linear dos agregados. Por fim, no estágio (iii), as estruturas de agregados lineares irão se unir, formando uma rede tridimensional, a qual é caracterizada como gel. As etapas (ii) e (iii) são consideradas como reações de segunda ordem (TOBITANI; ROSS-MURPHY, 1997).

Figura 2.5—Representação esquemática das etapas de gelificação induzida por aquecimento de proteínas globulares.

Fonte: Adaptado de ALTING, A.C. et al. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 17, p.469-479, 2003.

Figura 2.6—Ligações envolvidas no processo de gelificação de proteínas globulares.

Fonte: CLARK, A.; ROSS-MURPHY, S.B. Modern biopolymer science. In: KAPASIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J.B. **Bridging the divide between fundamental treatise and industrial application**. London: Academic Press, 2009. p. 27.

2.2.1 Gelificação das proteínas do soro do leite

O soro do leite é o resíduo proveniente do processo de coagulação do leite para a produção de queijos e é caracterizado como um líquido translúcido. A partir do soro, as proteínas dele podem ser separadas e purificadas usando diversas técnicas e em diferentes concentrações proteicas, sendo os três principais tipos o soro em pó (11 a 14,5 % de proteína),

concentrado de soro (25 a 89 % de proteína) e isolado de soro (≥ 90 % de proteína) (GÉISER, 2003).

As proteínas do soro também possuem um importante papel no desenvolvimento de produtos com valor reduzido de calorias devido a sua capacidade de produzirem estruturas que se assemelham em termos de textura aos atributos produzidos pelas gorduras e por amidos. As propriedades espessantes e gelificantes das proteínas do soro são capazes de simular as propriedades reológicas normalmente atribuídas às gorduras e amidos em alimentos semissólidos, tais como molhos e sobremesas (DICKINSON, 2012; PURWANTI; PETERS; VAN DER GOOT, 2013). Além disso, as proteínas do soro têm a habilidade de se agregarem e espalharem luz, melhorar visualmente a aparência de alimentos, o que geralmente é alcançado por meio das propriedades ópticas de glóbulos de gorduras e grânulos de amido. As proteínas também promovem maior saciedade que gorduras e carboidratos, sendo que a incorporação destes componentes nas formulações alimentícias auxilia na redução de excesso de ingestão de alimentos (BENELAM, 2009).

A capacidade das proteínas do soro do leite de formarem gel quando submetidas a altas temperaturas fazem delas agentes primários para melhorar a estrutura de muitos produtos, tais como iogurtes e sobremesas gelificadas (EVANS; GORDON, 1979; MULVIHILL; ENNIS, 2003; SINGH; HEVEA, 2003). A gelificação das proteínas do soro é resultado de interações físicas (eletrostáticas e hidrofóbicas) e interações químicas (dissulfeto) entre as moléculas proteicas constituintes (VAN VLIET, LAKEMON; VISSCHERS, 2004). De acordo com Dickinson e Chen (1999), a presença de ligações dissulfeto intermoleculares na formação de géis de proteínas do leite por aquecimento leva a ligações cruzadas químicas permanentes na rede proteica, enquanto que as ligações covalentes, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio serão forças físicas que contribuirão para o complexo arranjo de interações reversíveis e dependentes da temperatura.

As proteínas do soro representam cerca de 20 % das proteínas totais do leite (80 % é de caseínas) e incluem a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* - BSA) e outros constituintes minoritários. No entanto, as proteínas majoritárias são a α -lactalbumina (α -la), com destaque para a β -lactoglobulina (β -lg) (FOX; McSWEENEY, 1998).

A Tabela 2.3 apresenta a composição proteica do soro do leite.

Tabela 2.3 –Composição proteica e propriedades físicas das proteínas do soro de leite bovino.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Concentração (g/ L)	Ponto isoelétrico (pI)
β -lactoglobulina	18,4	3,2	5,4
α -lactalbumina	14,2	1,2	4,4
Albumina sérica	66,0	0,4	5,1
Imunoglobulina G	150	0,7	5,0-8,0
Lactoferrina	77,0	0,1	7,9
Lactoperoxidase	78,0	0,03	9,6

Fonte: ETZEL, M.R. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health: manufacture and use of dairy protein fractions. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, supl. 2004. p. 997S.

Nos isolados proteicos de soro de leite (IPSL), a β -lg corresponde por 80 % das proteínas presentes e se desnatura e agrega por aquecimento a uma temperatura de cerca de 70 °C (BOYE et al., 1995; GEZIMATI; SINGH; CREAMER, 1996; WALSTRA, 2003). Devido a predominância da β -lg no IPSL, o seu processo de gelificação é geralmente comparado ao da β -lg pura (CORREDIG, 2006). No entanto, segundo Aguilera (1995), soluções de IPSL formam géis particulados com uma rede de fios de agregados proteicos quando aquecidos acima de 75 °C, em pH próximo do pI. Próximo ao pI haverá predominância de interação proteína-proteína, enquanto que acima do pI, prevalecerão as interações proteína-solvente (BERTRAND; TURGEON, 2006).

A β -lg nativa possui duas ligações dissulfeto e um grupo tiol livre o qual é normalmente inacessível ao solvente e apresentam aumento de reatividade em valores de pH acima de 6,5 (HAQUE; KINSELLA, 1987; MORR, 1975). A presença de um grupo tiol (-SH) está associada a formação de ligações dissulfeto (-S-S-) com outros grupos tiol por reações de oxidação. Os grupos tiol livres também podem participar nas interações tio dissulfeto com ligações dissulfeto em condições alcalinas (BOYE et al., 1995; BRYANT; McCLEMENTS, 1998). A β -lg possui um comportamento de equilíbrio de agregação complexo e dependente das condições do ambiente (SAWYER; KONTOPIDIS, 2000) e normalmente forma um dímero em pH básico e neutro, formando octômeros em valores de pH entre 4 e 6 depois de se dissociar e formar misturas de monômeros e dímeros em valores de pH abaixo de 3 (UHRINOVA et al., 2000).

A estrutura tridimensional compacta da β -lg contém cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos no interior enquanto as cadeias laterais polares estão localizados do lado de fora da estrutura. A gelificação da β -lg é o resultado do tratamento térmico aplicado à dispersão proteica que provoca parcial desdobramento expondo grupos de aminoácidos hidrofóbicos, possibilitando interações hidrofóbicas entre as regiões não-polares expostas das moléculas desdobradas de β -lg, que conduzem à agregação de proteínas parcialmente ou totalmente desnaturadas (TOTOSAUS et al., 2002). A evolução da estrutura agregada para a estrutura em rede também pode ser parcialmente reforçada por ligações cruzadas covalentes causadas pelo intercâmbio sulfidríla-dissulfeto. Por sua vez, a água é aprisionada na estrutura 3-D por forças capilares (DICKINSON, 2012).

Em pH 7, as ligações dissulfeto são fundamentais para determinar a formação da rede proteica da β -lg, porém em pH ácido a associação da β -lg é governada por forças não-covalentes (CORREDIG, 2006).

As características físicas dos géis formados irão depender do tipo e do número de junções formados entre as proteínas. As interações moleculares vão depender da qualidade do solvente, como por exemplo pH, força iônica e presença de outras moléculas (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). A presença de moléculas que afetam a qualidade do solvente tais como sais (Ca^{2+} , Na^+ e K^+), açúcares, polissacarídeos ou etanol, irá influenciar o delicado equilíbrio entre as forças repulsivas e atrativas entre as proteínas, alterando os mecanismos de agregação e o número de zonas de junção (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; CORREDIG, 2006). Íons divalentes como o cálcio são mais efetivos que os monovalentes, tipo sódio ou potássio, provavelmente devido à maior afinidade dos sítios de ligação carboxílicos e as ligações intermoleculares (CORREDIG, 2006). Segundo Corredig (2006), as interações eletrostáticas podem contribuir para a força do gel que aumenta até uma concentração crítica depois da qual tende a cair. Géis transparentes de β -lactoglobulina podem ser produzidos em condições de baixa força iônica e em valores de pH distantes do ponto isoelétrico. Nestas condições, haverá repulsão eletrostática entre as moléculas. Géis opacos e de estrutura heterogênea serão produzidos quando as forças repulsivas forem minimizadas (pH próximo do pI ou alta força iônica) (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; DOI et al., 1989; CORREDING, 2006), sendo que géis opacos possuem menor capacidade de retenção de água em relação aos géis translúcidos (filamentosos) (STADING; HERMANSSON, 1990).

Na ausência de um eletrólito, as proteínas desdobradas permanecerão separadas devido à forte repulsão eletrostática, no entanto, os minerais que estão presentes naturalmente nas proteínas do soro do leite não permitem esta situação (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). Quando a concentração de sal aumenta, a repulsão eletrostática entre as moléculas carregadas é progressivamente diminuída. Em concentrações relativamente baixas de sal, a maior parte da superfície das moléculas proteicas são incapazes de formarem ligações com outras proteínas devido a repulsão eletrostática residual entre elas. No entanto, ligações podem ser formadas entre a porção apolar de uma proteína com a porção apolar de outra proteína devido às interações hidrofóbicas atrativas e neste caso, as moléculas formarão estruturas agregadas organizadas ou géis filamentosos. Em concentrações salinas relativamente altas, a repulsão eletrostática entre as moléculas é completamente diminuída e, conseqüentemente, elas podem formar ligações em qualquer ponto da superfície e tal fato leva à formação de grandes agregados esféricos (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; DOI, 1993; KITABATAKE; DOI, 1993). A Figura 2.7 mostra os tipos de géis que podem ser formados pelas proteínas do soro do leite quando aquecidas.

Figura 2.7 – Formação de géis de proteínas do soro de leite particulado e filamentosos.

Fonte: BRYANT, C.M.; McCLEMENTS, D.J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v.9, 1998.p. 147.

Apesar da predominância da β -lg nos IPSL, a presença da α -lactalbumina (α -la) e da albumina sérica (BSA, *bovine serum albumin*) afetam o mecanismo de agregação desta mistura. A microestrutura do gel de IPSL formado por aquecimento irá depender das quantidades de α -la, β -lg e BSA presentes (BOYE et al., 2000). A contribuição das ligações não-covalentes durante o aquecimento se mostraram maiores para a α -la do que para a β -lg (SCHOKKER; SINGH; CREAMER, 2000). Além disso, a adição de α -la e BSA em soluções de β -lg aumenta a resistência dos géis formados durante o aquecimento (LEGOWO; IMADE; HAYAKAWA, 1993; MATSUDOMI et al., 1992, 1993).

A α -la (PM: 14,4 kDa) é uma proteína ligada ao cálcio e possui quatro ligações intramoleculares dissulfeto e nenhum grupo sulfidril livre (FOX, 1989). Uma propriedade característica da α -la é a sua capacidade de formar associações em valores de pH abaixo do pI. Para valores de pH iguais ou maiores ao do leite (aproximadamente 6,5), esta proteína apresenta-se como um monômero (SGARBIERI, 1996). A α -la não polimeriza facilmente, e não forma géis quando aquecida; no entanto, a presença de outras proteínas, especificamente aquelas que contêm grupos sulfidrilas livres, permite a ocorrência de interações entre α -la e a proteína adicionada (CALVO; LEAVER; BANKS, 1993).

Em relação à albumina sérica (BSA), ela apresenta 17 ligações dissulfídicas intermoleculares e um grupo tiol livre. A maioria dos resíduos hidrofóbicos desta proteína fica exposta e sujeita a interações intermoleculares para temperaturas maiores que 40 °C (MORR; HA, 1993). A BSA gelifica rapidamente quando aquecida e juntamente com a β -lg são as principais responsáveis pela gelificação do IPSL (ZEIGLER; FOEGEDING, 1990). O processo de gelificação da albumina sérica é muito semelhante aos descritos para proteínas globulares e consiste de duas etapas. A primeira fase envolve alterações conformacionais induzidas pelo calor na proteína com desdobramento de alguns segmentos polipeptídicos seguida de uma fase posterior de interações proteína-proteína, resultando em um acúmulo progressivo da estrutura em rede (BERNAL; JELEN, 1985).

2.2.2 Géis biopoliméricos mistos de proteínas e polissacarídeos

As proteínas e os polissacarídeos são hidrocoloides comumente utilizados em conjunto para a modificação de textura de alimentos. Diversas combinações de géis mistos de proteínas

e polissacarídeos podem ser produzidas com diferentes propriedades mecânicas (JONG; VAN DE VELDE, 2007; PICONE; CUNHA, 2010).

A presença de polissacarídeos em muitos sistemas alimentícios contribui para uma melhor estrutura e estabilização de proteínas (DICKINSON, 1993). As interações entre proteínas e polissacarídeos serão repulsivas ou atrativas, dependendo da natureza das interações entre os biopolímeros e as condições do meio (BERTRAND; TURGEON, 2006; LI; ELEYA; GUNASEKARAN, 2006). A distribuição macromolecular em solução leva a um efeito antagônico ou sinérgico na formação destes géis (BERTRAND; TURGEON, 2006).

Há uma diversidade de trabalhos na literatura que estudaram géis de IPSL combinados com polissacarídeos. Chung, Degner e McClements (2013) estudaram a influência de amido combinado com IPSL com adição de íons cálcio, sobre as características de géis produzidos por gelificação a frio. Segundo estes autores, a presença dos grânulos de amido inchados causou descontinuidade na formação da rede proteica desacelerando a cinética de gelificação deste tipo de gel quando comparado àqueles sem o amido. O aumento da turbidez associado aos grânulos de amido, de acordo com os autores, também pode ser vantajoso do ponto de vista de produção de alimentos em que a opacidade está associada apenas a presença de glóbulos de gordura.

Çakir e Foegeding (2011) produziram géis de IPSL e κ -carragena com diferentes forças iônicas (NaCl) a fim de avaliarem a microestrutura destes géis por microscopia confocal. Os autores encontraram diversas estruturas, desde homogênea a proteína contínua, bicontínua e κ -carragena contínua, dependendo da concentração deste polissacarídeo. Os géis formados eram particulados ou filamentosos, dependendo da concentração salina. Diferentes tipos de estruturas possibilitam a produção de formulações alimentícias com diferentes propriedades.

Outros trabalhos também combinaram IPSL e goma xantana na formação de géis a exemplo de Bryant e McClements (2000b). Os autores avaliaram a influência de goma xantana na separação de fases e propriedades ópticas e reológicas em soluções e géis de IPSL e da referida goma. Dependendo da força iônica e da condição do IPSL (nativo ou desnaturado), os autores verificaram que a goma xantana pode favorecer a separação de fases, além de alterar a taxa de gelificação, o módulo de cisalhamento e a opacidade dos géis e soluções investigados. Os autores concluíram que a influência da goma xantana na separação

de fases e nas propriedades ópticas e reológicas permite a obtenção de produtos utilizando este polissacarídeo com uma grande variedade de características físico-químicas.

A goma xantana é um polissacarídeo bacteriano aniônico produzido pela *Xanthomonas campestris*, cuja massa molecular pode exceder 10^6 Da. Esta macromolécula é composta por três sacarídeos, a saber: D-glicose, D-manose e D-gluconato (BERTRAND; TURGEON, 2006). A estrutura molecular da goma xantana não a torna capaz de gelificar, sendo necessário ou interações com outros polissacarídeos ou ligações cruzadas com íons metálicos (KANG; PETTITT, 1993).

As proteínas e os polissacarídeos iônicos possuem densidade de cargas, os quais estão relacionados à composição, respectivamente, de aminoácidos e ácido urônico e grupos piruvato (WHISTLER; BEMILLER, 1997). Quando um sistema ternário de biopolímeros consistindo de dois biopolímeros e um solvente são misturados, existem três possíveis interações entre eles: miscibilidade; coacervação/associação e incompatibilidade/segregação (KRUIF; TUINIER; 2001; SYRBE; BAUER; KLOSTEMEYER, 1998; TOLSTOGUZOV, 1991).

A Figura 2.8 ilustra os tipos de interações que podem ocorrer entre diferentes biopolímeros.

Figura 2.8 – Representação esquemática dos tipos de interações que podem ocorrer entre diferentes biopolímeros.

Fonte: KUHN, K.R.; PICONE, C.S.F.; CUNHA, R.L. Food gels. In: TÉLIS, V. R. N. **Biopolymer engineering in food processing**. Boca Raton: CRC Press, 2012.p. 111-144.

A coacervação ocorre quando existe uma atração muito forte entre as moléculas de biopolímeros, isto é, uma atração eletrostática entre as cargas opostas dos biopolímeros. Nesta interação, ocorrerá a formação de duas fases: uma rica dos dois biopolímeros e uma aquosa

(TOLSTOGUZOV, 2003). Na incompatibilidade termodinâmica (ou segregação de fases) haverá repulsão entre as moléculas dos biopolímeros, a qual geralmente é resultante de uma entropia do efeito da mistura destes componentes. Neste segundo caso, haverá a formação de uma fase aquosa rica em um dos biopolímeros e a formação de uma segunda fase aquosa rica do outro biopolímero (GRINBERG; TOLSTOGUZOV, 1997; KRUIF; TUINIER; 2001).

Pelo fato das interações entre proteínas e polissacarídeos darem-se principalmente por interações eletrostáticas, o pH é um fator muito importante nestes sistemas. As proteínas possuem carga líquida positiva abaixo do seu pI e formam complexos com polissacarídeos aniônicos, tais como a goma xantana (BERTRAND; TURGEON, 2006). Acima do pI da proteína, as cargas negativas provocam separação de fases. No entanto, a presença de fragmentos de cargas positivas na proteína acima de seu pI permite a complexação com polissacarídeos aniônicos (SCHMITT et al., 1998).

O mecanismo de separação de fases em sistemas de misturas de biopolímeros é frequentemente observado. Na literatura, há referências de que quando a soma das concentrações de polissacarídeo e proteína excedem 4 % m/m, há a formação de um sistema instável que espontaneamente se divide em uma fase rica em proteína e em uma fase rica em polissacarídeo, devido às interações repulsivas entre os dois polímeros (DICKINSON, 1995; TOLSTOGUZOV, 1986). Tal fenômeno é ocasionado por incompatibilidade termodinâmica e é controlada pelo equilíbrio entre interações biopolímero-biopolímero e biopolímero-solvente, podendo ocorrer quando as interações entre diferentes polímeros é energeticamente menos favorável que as interações entre biopolímeros similares (DICKINSON, 1995; MORRIS, 1995; SYRBE et al., 1995; SYRBE; BAUER; KLOSTEMEYER, 1998). Qualquer parâmetro ambiental será capaz de alterar este balanço, tais como pH, força iônica e temperatura, os quais podem modificar a extensão e a cinética de separação de fase dos biopolímeros (SANCHEZ et al., 1997). A desnaturação e a agregação das proteínas depois do aquecimento aumentam a incompatibilidade termodinâmica com a goma xantana (TOLSTOGUZOV, 1991), aumentando o seu volume ou tamanho molecular (TOLSTOGUZOV, 1997; SYRBE et al., 1995).

Quando as soluções mistas de proteínas e polissacarídeos são aquecidas, ocorre uma competição entre gelificação e processos de separação de fase. Uma vez que a gelificação ocorre, a estrutura do gel é estabelecida e a separação de fases é retardada (CLARK, 1995; ELEYA; TURGEON, 2000; OWENS; JONES, 1998). O controle da separação de fases e dos

processos de gelificação pode resultar na formação de um infinito número de distribuições de fases estáveis com interessantes propriedades estruturais e mecânicas (LI; ELEYA; GUNASEKARAN, 2006).

De acordo com Bryant e McClements (2000b), quando um sistema misto de biopolímeros é termodinamicamente instável, a separação de fases pode não ser observada na escala de tempo experimental por causa das barreiras de energia cinética associadas com o movimento restrito de moléculas através da rede de biopolímeros. A taxa e a extensão da separação de fase podem ser retardadas se um ou mais polímeros forem altamente viscosos ou formarem gel. Dependendo do tipo de proteínas e biopolímeros envolvidos, a rede formada poderá ser homogênea ou heterogênea (DICKINSON, 1995).

Especificamente em relação ao sistema biopolimérico misto IPSL-goma xantana, Sanchez et al. (1997) verificaram que ocorre efeito sinérgico nas interações entre os biopolímeros, formando um gel mais rígido em $\text{pH} \geq 7$ com concentrações de goma xantana de 0,05 ou 0,1 % m/m. No entanto, os mesmos autores verificaram um efeito antagônico entre os referidos biopolímeros se a goma xantana estiver em concentrações mais altas, com géis fracos e menos deformáveis.

Bertrand e Turgeon (2006) estudaram o efeito do pH (5,5 – 6,5), da adição de goma xantana e (0,01 %; 0,03 % e 0,06% v/v) e a presença de NaCl (100 e 500 mM) sobre a formação de géis IPSL-goma xantana. Os autores verificaram um efeito sinérgico sobre a força do gel nos pHs 6,0 e 6,5, em todas as concentrações da goma, porém, um efeito antagônico a pH 5,5, também em todas as concentrações do mesmo hidrocoloide. A adição de sal ora se mostrou sinérgica, ora se mostrou antagônica dependendo da combinação de sal e pH testada, levando a formação de géis com diferentes microestruturas.

2.4 Géis carregados com emulsão

Produtos lácteos tais como sorvetes, iogurtes e queijos, bem como produtos cárneos processados possuem elevados teores de gordura saturada e podem ser descritos como géis carregados com emulsão com alto teor de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Uma redução global do teor de gordura nos alimentos pode impactar nas propriedades sensoriais, estruturais e reológicas dos produtos, uma vez que os lipídios apresentam um importante papel como carregadores de vitaminas e ácidos graxos essenciais (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; VAN AKEN, 2011). Além disso, as gorduras emulsificadas exercem um

impacto favorável na textura (cremosidade) e palatabilidade destes alimentos (VAN AKEN, 2011; VAN AKEN; VINGERHOEDS; WIJK, 2011).

Os géis carregados com emulsão (*emulsion filled gels*) são matrizes de géis poliméricos (proteínas e polissacarídeos), nos quais gotículas de emulsão são incorporadas. Estas estruturas são classificadas como “sólidos macios” ou *soft solids* e podem ser produzidas a partir de uma emulsão estável incorporada numa fase contínua gelificada (DICKINSON, 2012, OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015). De acordo com Dickinson (2012), um gel carregado com emulsão apresenta rigidez final maior que aquela apresentada por um equivalente gel proteico, o que é um indicativo do forte reforço proporcionado pelas gotículas de óleo ao material “semissólido”.

A grande vantagem da aplicação dos géis carregados com emulsão em formulações alimentícias é a de que tais estruturas podem auxiliar na produção de alimentos com teor reduzido de gorduras. A combinação de agentes de gelificação e óleos na obtenção dos géis carregados é vista como muito eficaz para se alcançar tal objetivo. Tanto as proteínas quanto os polissacarídeos têm sido amplamente testados na produção dos géis carregados com emulsão (PARADISO et al., 2015).

A Figura 2.9 apresenta uma representação esquemática de um gel carregado com emulsão. No entanto, tal representação seria considerada um extremo, uma vez que este compósito é mais bem descrito por uma rede híbrida das ligações cruzadas das moléculas de biopolímeros com a agregação parcial das gotas de emulsão (REIFFERS-MAGNANI; CUQ; WATZKE, 1999).

Figura 2.9 – Representação esquemática de uma matriz proteica incorporada de gotículas de emulsão.

Fonte: DICKINSON, E. Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, West Sussex, v.93, 2013.715p.

Na literatura investigada, existem alguns trabalhos que avaliaram a influência da emulsão em sistemas de géis de biopolímeros incorporados de emulsões/óleos ou destas estruturas como sistemas de entrega de bioativos.

Abhyankar, Mulvihill e Auty (2011) estudaram a influência da incorporação de óleo de girassol emulsificado com proteínas do soro de leite ou caseinato de sódio em géis de proteína do soro de leite, sobre a reologia e a microestrutura dos géis carregados. Foram produzidos diferentes géis, variando-se o teor de emulsão incorporada, tipo de emulsificante e força iônica. Os autores concluíram que as propriedades reológicas dos géis carregados foram influenciadas pela concentração de NaCl, concentração de óleo, pela extensão da agregação das gotículas de óleo ou tipo de emulsificante proteico utilizado.

Lorenzo, Zaritzky e Califano (2013) avaliaram o comportamento reológico de géis de gelana (concentrações de 0,1 – 0,5 g/100 g) incorporados de diferentes concentrações de óleo de girassol (10 g, 20 g e 30 g/100 g emulsão). Os autores identificaram que independente da concentração de gelana no gel, a inclusão das gotículas de óleo provocou um reforço sobre a estrutura e força da matriz de gel.

Sato, Moraes e Cunha (2014) estudaram emulsões de óleo de oliva estabilizadas e gelificadas com gelatina, alginato ou pela mistura destes biopolímeros. Testes de compressão uniaxial sobre as emulsões gelificadas revelaram que as emulsões com alginato apresentaram valores de propriedades mecânicas menores do que para as emulsões com gelatina. Os autores também investigaram a estabilidade oxidativa e estabilidade ao pH das emulsões gelificadas. As emulsões gelificadas apresentaram uma menor quantidade dos produtos de oxidação após 30 dias se comparadas com a amostra não-gelificada. Além disso, as emulsões gelificadas pela mistura alginato-gelatina mostraram-se mais estáveis à oxidação e ao pH do que as amostras gelificadas com apenas um biopolímero.

Por sua vez, Mun, Kim e McClements (2015) investigaram a incorporação de β -caroteno em hidrogéis de amido de arroz carregados com emulsão O/A de óleo de milho (20 % m/ m) sobre a bioacessibilidade do bioativo utilizando um sistema simulado do trato-gastrointestinal (TGI). Os autores compararam a bioacessibilidade do β -caroteno nos hidrogéis carregados com hidrogéis sem a emulsão, e com a emulsão estabilizada por proteína. Como resultado, verificou-se que a bioacessibilidade do β -caroteno foi maior quando este foi encapsulado nos hidrogéis carregados em relação aos outros sistemas, uma vez que o

aumento da estabilidade contra a agregação das gotas das emulsões levou a uma maior exposição da área superficial lipídica.

2.4.1 Propriedades mecânicas e reológicas de géis carregados com emulsão

O estudo do comportamento reológico dos alimentos tem como objetivo a compreensão do impacto do processamento sobre estes materiais, bem como investigar a estruturas dos sistemas e revelar os aspectos críticos da textura dos alimentos (FOEGEDING; DRAKE, 2007). A aplicação da reologia é comum nas áreas de processamento, avaliação de propriedades sensoriais e manufatura de alimentos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1996).

As propriedades reológicas relacionam a tensão aplicada e a correspondente deformação sofrida por um material em função do tempo (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). Em fluidos denominados Newtonianos a deformação sofrida pelo material é diretamente proporcional à tensão aplicada, sendo denominados não-Newtonianos os fluidos que apresentam comportamento diferente do descrito (STEFFE, 1996).

Os géis alimentícios apresentam as propriedades de sólidos (elasticidade) e de líquidos (viscosidade) e são classificados como sólidos viscoelásticos (STEFFE, 1996). Nos alimentos com comportamento de sólidos viscoelásticos, existem três regimes distintos que relacionam a tensão e a deformação: (i) o regime linear, que como o próprio nome sugere, tem-se uma relação linear entre a tensão e a deformação e a lei de Hooke é obedecida; (ii) o regime em que a relação entre a tensão e deformação é não linear e antecede a fratura; (iii) e a fratura (VAN VLIET, 1999). Na região onde o regime é linear são realizados testes de pequena amplitude e não há alteração da estrutura do material. Na região não linear, são realizados testes de grande amplitude e há alteração da estrutura do material, o qual pode sofrer fratura (VAN VLIET, 1999).

Um aspecto extremamente importante sobre os géis carregados a ser considerada em aplicações alimentícias são as suas propriedades reológicas e mecânicas. Tais propriedades são fortemente afetadas pela inclusão de partículas em materiais semissólidos ou de sistemas gelificados, as quais influenciam as características de textura e melhoram a sensação de cremosidade do produto (VAN AKEN; OLIVER; SCHOLTEN, 2015; VAN AKEN; VINGERHOEDS; WIJK, 2011). A estabilização de emulsões por proteínas do soro de leite e a incorporação deste sistema em géis produzidos pelo mesmo tipo de proteína pode reforçar

as propriedades estruturais da matriz gelificada devido às fortes interações entre a proteína adsorvida na superfície das gotículas de óleo e a matriz de gel proteico (BARRANTES et al., 1996; LUCEY; MUNRO; SINGH, 1999; PEREIRA et al., 2006). Portanto, a obtenção de informações sobre as propriedades mecânicas e reológicas de géis carregados com emulsão é uma importante ferramenta analítica que possibilita a compreensão sobre a organização estrutural e as interações entre os componentes dos alimentos (LORENZO; ZARITZKY; CALIFANO, 2013).

As emulsões O/A geralmente apresentam comportamento reológico típico de líquidos, no entanto, se existir uma fase contínua viscoelástica de uma solução ou gel de biopolímero, então a emulsão também apresentará um comportamento viscoelástico. Para uma emulsão que contenha um teor baixo ou moderado de óleo, a transformação do estado líquido para o estado tipo semissólido é geralmente alcançada, por exemplo, por gelificação por aquecimento (DICKINSON, 2012).

As propriedades reológicas dos géis carregados com emulsão são fortemente dependentes das propriedades da rede gelificada do polímero (KOKINI; VAN AKEN, 2006). Dickinson (2013) afirma que o comportamento de tal estrutura é semelhante aos materiais tipo “borrachentos” (*rubber-like material*) na medida em que a elasticidade da estrutura em rede é dominada por contribuições entrópicas das cadeias flexíveis entre as ligações cruzadas. O material terá um comportamento elástico, quando houver predominância de contribuições entálpicas (VAN VLIET, 1988). Os fatores que podem afetar as propriedades reológicas dos géis carregados podem ser: a concentração de óleo e/ou do agente gelificante (SALA et al., 2009a); a natureza das interações matriz-gotícula (KOKINI; VAN AKEN, 2006); o estado físico do lipídio (sólido ou líquido) (OLIVER; SCHOLTEN; VAN AKEN, 2015; OLIVER; WIECK; SCHOLTEN, 2016); as características morfológicas da matriz gelificada (KOKINI; VAN AKEN, 2006) e o processo de gelificação (GUO et al., 2013).

A força final do gel será determinada pela magnitude das interações (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interação eletrostática, ligações covalentes, etc.) entre os diferentes elementos estruturais (matriz proteica – matriz proteica, matriz proteica – gota de óleo e gota de óleo – gota de óleo) (GUO et al., 2013). As interações entre a matriz biopolimérica e as gotículas de óleo são afetadas pelo tipo de agente tensoativo que estabiliza a gotícula (DICKINSON, 2012; CHEN, DICKINSON, 2000). Dependendo da natureza de

tais interações, poderão ocorrer duas situações (RING; STAINSBY, 1982; VAN VLIET, 1988), descritas a seguir e ilustradas na Figura 2.10:

- (i) as gotas estarão mecanicamente ligadas à rede do gel (ativas), resultando em pequenas deformações com consequente aumento do módulo elástico do gel com o aumento da fração volumétrica do material de enchimento;
- (ii) gotas mecanicamente desligadas (inativas), isto é, nenhuma interação entre a matriz do gel e as partículas dispersas, resultando em pequenas deformações com consequente diminuição do módulo elástico do gel com a diminuição da fração volumétrica do material de enchimento.

Figura 2.10 – Comportamento reológico das partículas ativas e inativas incorporadas em sistemas gelificados.

Fonte: GEREMIAS-ANDRADE, I. M. et al. Rheology of emulsion-filled gels applied to the development of food materials. **Gels**, Basel, v. 2, p.6, 2016.

As gotículas de emulsão estabilizadas por tensoativos não iônicos, tais como os polissorbatos, geralmente apresentam comportamento de partículas inativas quando incorporadas a géis carregados de IPSL. Por outro lado, gotículas emulsões estabilizadas por proteínas, tais como β -lg, geralmente apresentam comportamento de partículas ativas (SALA et al., 2009a, 2009b).

O trabalho de Yamamoto e Dickinson (1997) ilustra a influência da emulsão num sistema gelificado. Os autores avaliaram o comportamento reológico de uma emulsão estabilizada com β -lg (7 % m/m proteína, 33 % m/m óleo), mantida a 90 °C/30 min e depois

resfriada a 30 °C e compararam com uma solução aquosa de β -lg (10,4 % m/m, pH 7,0). Os valores do módulo armazenamento (G') foram muito maiores que o módulo de perda (G'') da emulsão, caracterizando um comportamento de um sólido viscoelástico. Além disso, o valor de G' da emulsão mostrou-se superior ao da solução proteica, significando uma maior rigidez da emulsão, indicando o reforço efetivo conferido pelas gotas de emulsão sobre o material semissólido.

A caracterização reológica de grande deformação (LAOS) de géis carregados também tem sido relacionada com a percepção de propriedades sensoriais e a microestrutura destes materiais (SALA et al., 2007).

Gwartney, Larick e Foegeding (2004) investigaram géis carregados filamentosos e particulados de IPSL e correlacionaram a firmeza, o número de mastigações e o tempo de deglutição com a concentração de gordura emulsionada. Os autores também verificaram que o aumento do conteúdo de óleo induziu o aumento da firmeza do gel.

Chojnicka et al. (2009) avaliaram as propriedades de lubrificação de géis carregados com emulsão e concluíram que a adição de gotículas de óleo no gel tem um efeito importante sobre as propriedades de lubrificação e que as gotículas ligadas e não ligadas também apresentam diferentes efeitos sobre o sistema.

Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014) avaliaram as propriedades estruturais de desintegração (módulo de Young e testes de fratura de tensão/deformação) e o comportamento da microestrutura da fase proteica e da fase emulsificada por microscopia confocal durante as avaliações de grande deformação de géis carregados de proteína de leite a pH 7 (gel filamentosos) e pH 5,4 (gel particulado). Os autores observaram que o gel carregado com pH 7 apresentou propriedades de desintegração diferentes das do gel carregado de pH 5,4. A microscopia confocal dos dois sistemas apontou que as gotículas de emulsão estavam ligadas com a rede proteica no gel com pH 7 e as gotículas moveram-se juntamente com a matriz durante o processo de deformação. No gel com pH 5,4, as gotículas não estavam ligadas a rede proteica ocasionando coalescência e movimentação das gotículas independente da matriz durante a deformação. De acordo com os autores, este resultado pode ser útil na concepção e de produtos alimentares com propriedades de liberação de gordura.

Oliver, Scholten e van Aken (2015) avaliaram o impacto sobre as propriedades de textura de géis carregados com emulsão quando uma gordura sólida saturada é substituída por um óleo líquido não saturado. As matrizes gelificantes formam agregados proteicos de soro,

proteína do soro e micelas de caseína. Os autores verificaram que as propriedades de fratura dos géis foram afetadas pela presença de gotas de emulsão em comparação com os géis livres de gordura, mas o estado físico da gordura não teve influência sobre as propriedades de fratura. A presença de gotas de emulsão (tanto sólida quanto líquida) aumentou a rigidez do gel quando comparado com o gel sem emulsão, indicando que as gotas foram parte ativa dos géis.

2.5 Processos de digestão de biopolímeros e de sistemas de encapsulação lipídicos

O conhecimento dos processos físico-químicos e fisiológicos básicos que ocorrem quando o alimento passa pelo trato-gastrointestinal (TGI) é necessário para o desenvolvimento de sistemas de entrega a fim de se controlar a digestão e entrega de componentes lipofílicos (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007; PARADA; AGUILERA, 2007). Após a ingestão de um alimento, particularmente, de um sistema de entrega a base de emulsão, alterações químicas e físicas complexas ocorrem desde a boca, estômago, intestino delgado e intestino grosso (McCLEMENTS; LI, 2010). Muitos sistemas de entrega de grau alimentício desenvolvidos para o consumo humano estão sendo estudados nos últimos anos. Neste sentido, compreender os processos físico-químicos e fisiológicos que ocorrem ao longo da passagem dos sistemas de entrega pelo trato gastrointestinal torna-se muito importante no sentido de se desenvolver sistemas de distribuição efetivos (LESMES; McCLEMENTS, 2009).

A Figura 2.11 ilustra alguns processos fisiológicos e físico-químicos em diferentes regiões do TGI de sistemas de encapsulação alimentícios nano e microestruturados.

De acordo com Wooster et al. (2014), muito se tem focado sobre a digestão de micronutrientes dos alimentos a fim de se compreender detalhadamente o processo de digestão dos mesmos. No entanto, segundo os mesmos autores, os alimentos são materiais complexos que consistem de vários nutrientes, com as mais diversas texturas e estruturas, e cuja digestão não pode ser reduzida a modelos muito simplificados.

Como discutido anteriormente, os géis carregados com emulsão vêm sendo desenvolvidos como sistemas de entrega de compostos bioativos lipofílicos. Sendo assim, compreender o processo de digestão de diversos componentes destes sistemas, tais como proteínas, lipídios e polissacarídeos, é crucial para a utilização destas estruturas como ingredientes ou novas formulações alimentares destinadas ao consumo humano. Ademais, há

uma necessidade em se compreender como a encapsulação de compostos bioativos em hidrogéis (géis de base aquosa) altera a bioacessibilidade de tais compostos, isto é, a liberação deles a partir da matriz do alimento e sua incorporação dentro de micelas mistas nas condições do trato-gastrointestinal (MUN et al., 2015).

Figura 2.11 - Processos físico-químicos e fisiológicos do trato gastrointestinal humano de sistemas de encapsulação alimentícios nano e microestruturados.

Fonte: YAO, M.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D.J. Bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology*, Palo Alto, v. 5, 2014.60p.

2.5.1 Digestão de proteínas

As proteínas são consideradas os macronutrientes que mais promovem a saciedade (MACKIE; MACIERZANKA, 2010). A avaliação da qualidade de uma proteína é determinada pela sua composição de aminoácidos essenciais e a sua digestibilidade, a fim de fazer estes aminoácidos biodisponíveis no intestino (HOFFMAN; FALVO, 2004).

As condições físico-químicas predominantes no TGI como variações de pH podem desestabilizar as proteínas (YU; LEE; CHIOU, 2002), e tal desestabilização proteica pode ser desejável dependendo da parte do TGI na qual o ingrediente bioativo vai ser destinado como estômago, intestino delgado e intestino grosso (GBASSI et al., 2012).

O fator mais importante na proteólise é a acessibilidade da enzima ao substrato e envolve tanto a exposição do local de clivagem e a flexibilidade da molécula e das suas cadeias laterais (MACKIE; MACIERZANKA, 2010).

Segundo Mackie e Macierzanka (2010), diversos são os processos que transformam a proteína presente em um alimento estruturado num nutriente capaz de ser absorvido pela mucosa gastrointestinal. Ainda segundo os autores, após o processo de mastigação e a formação do bolo na boca, o alimento passa pelo estômago onde o pH pode variar numa ampla faixa que pode estar entre 1 e 3 (Figura 2.12), o que, por sua vez, leva à ocorrência de agregação proteica. A pepsina gástrica hidrolisa a proteína em peptídeos, que podem variar muito de tamanho dependendo da proteína. Alguns biosurfactantes tais como fosfatidilcolina, podem interagir com a proteína e alterar suas propriedades. Apesar de não existir cisalhamento ou agitação considerável na porção principal do estômago, existe cisalhamento sendo exercido no canal pilórico e no esfíncter pilórico quando este esvazia o conteúdo do estômago no intestino delgado. Por fim, os autores descrevem o processo na digestão duodenal, em que a proteína presente no intestino delgado ficará exposta a diversas enzimas, tais como tripsina, quimiotripsina, elastase e outras e uma maior extensão de biosurfactantes tais como sais biliares e fosfolipídios, bem como aos produtos da lipólise (MACKIE; MACIERZANKA, 2010). A pepsina pode digerir cerca de 20 % das ligações carbônicas através de clivagem preferencial no terminal-N dos aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, triptofano e tirosina. A tripsina, por sua vez, promove a clivagem das ligações peptídicas na lisina e na arginina (HE; MU; WANG, 2013).

No que diz respeito a digestão das proteínas do leite, algumas destas proteínas possuem resistência à digestão, como é o caso da β -lg, principalmente no compartimento gástrico. Alguns polissacarídeos, tais como pectinas, goma arábica e xilana, podem retardar a susceptibilidade da β -lg à degradação por tripsina e quimiotripsina (MOUECOUCOU et al., 2004). A fosfatidilcolina, presente abundantemente no leite e também secretada pela mucosa gástrica, interage com outra proteína do leite, a α -la, retardando a quebra da mesma durante o processo de digestão gástrica simulada (MORENO; MACKIE; MILLS, 2005). Além disso, há na literatura referências que garantem que os biosurfactantes como os sais biliares e fosfolipídios são capazes de proteger a β -lg em sistema de digestão que simula a proteólise nas condições do TGI (MANDALARI et al., 2009).

No caso da digestão de proteínas gelificadas, Macierzanka et al. (2012) afirmam que as ligações cruzadas proteicas podem ser mais resistentes à proteólise em contraste com as fibrilas de β -lg. Estes autores avaliaram a digestão gastro-duodenal simulada de β -lg purificada e IPSL com valores de pH variando de 2,5 a 6,5, em diferentes regimes de

aquecimento. Os autores verificaram que géis do tipo particulados se mostraram mais resistentes ao processo de digestão simulada, com mais que 85 % e 40 % de β -lg remanescente, para as amostras sem aquecimento e aquecidas a 85 °C, respectivamente. O gel de IPSL aquecido a 85 °C apresentou 20 % de β -lg não digerida, após a proteólise. Estes resultados são interessantes no que diz respeito a utilização de tais ingredientes para induzir a saciedade e possibilitar soluções para problemas de obesidade.

A Figura 2.12 ilustra os processos de digestão das proteínas no TGI.

Figura 2.12 – Representação esquemática do processo de digestão de proteínas em solução pelo trato gastrointestinal.

Fonte: MACKIE, A.; MACIERZANKA, A. Colloidal aspects of protein digestion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v. 15, 2010. 103p.

2.5.2 Processos de digestão de sistemas lipídicos de encapsulação e de absorção de componentes bioativos lipofílicos

Como discutido anteriormente, compostos bioativos lipofílicos tem a sua bioacessibilidade melhorada quando encapsulados em lipídios digeríveis, tais como os triacilgliceróis antes de serem incorporados em produtos de base aquosa (HOU et al., 2012; THAKKAR et al., 2007; ZHANG et al., 2015). O termo bioacessibilidade é normalmente definido como a fração de um componente bioativo ingerido que eventualmente alcança a circulação sistêmica de uma forma ativa (VERSANTVOORT; VAN DE KAMP; ROMPELBERG, 2004). Muitas vezes, é importante controlar o perfil de liberação de componentes lipofílicos logo após a ingestão, como por exemplo, para liberação controlada de aromas (MALONE; APPELQVIST; NORTON, 2003; VAN RUTH; O'CONNOR; DELAHUNT, 2000). É possível controlar o processo de digestão de lipídios emulsificados, dificultando o acesso da lipase com a superfície da gota de emulsão, pela alteração da composição e estrutura do material que reveste o núcleo lipídico (LI et al., 2011).

A absorção de compostos bioativos encapsulados em sistemas de microencapsulação lipídicos (micro ou nanoparticulados) ocorrem principalmente no intestino delgado. De acordo com Yao, Xiang e McClements (2014) tais estruturas podem ser desorganizadas e reorganizadas em vários tipos de estruturas lipídicas quando atravessam o TGI, a exemplo das micelas mistas e dos quilomícrons. A passagem do bioativo da luz do intestino delgado para a circulação sistêmica inclui também sua passagem por um conjunto de enzimas que podem causar sua inativação na parede intestinal e no fígado (RANG; DALE; RITTER, 2001). Os sistemas de encapsulação devem ter a máxima liberação no TGI e serem absorvidos pela mucosa intestinal (McCLEMENTS; XIAO, 2012).

A digestão de lipídios da dieta em adultos humanos tem início no estômago e vai ser completada no intestino delgado, onde ocorrerá a absorção dos produtos da digestão (ARMAND et al., 1994; BEYSSERIAT; DECKER; McCLEMENTS, 2006; SARKAR et al., 2015). Após serem ingeridas, as partículas lipídicas nano ou micro estruturadas presentes em produtos alimentícios sofrem modificações consideráveis uma vez que elas passam através de diferentes regiões do TGI como resultado da exposição delas num ambiente fisiológico e físico-químico extremamente complexo (GOLDING et al., 2011; McCLEMENTS, DECKER; PARK, 2007; McCLEMENTS et al., 2009; SINGH; YE; HORNE, 2009). Desta forma, ocorrerão alterações na estrutura, dimensões, cargas, propriedades interfaciais e estado físico

das partículas lipídicas, os quais podem alterar o seu destino biológico (McCLEMENTS; XIAO, 2012).

Quando os triacilgliceróis são digeridos pelas lipases gástrica e pancreática são formados ácidos graxos e mono e diacilgliceróis (LOWE, 2002; MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007). Os produtos da digestão lipídica são então incorporados aos ácidos biliares e fosfolipídios em micelas mistas que solubilizam e transportam o bioativo às células epiteliais através da parede de mucosa (QIAN et al., 2012; YONEKURA; NAGAO, 2007; WANG et al., 2012) por meio de vários mecanismos de transporte passivos ou ativos (SINGH; YE; HORNE, 2009). Na ausência de produtos de digestão lipídicos, os sais biliares e os fosfolipídios formam micelas mistas simples nos fluidos intestinais (MADENCI; EGELHAAF, 2010). Essas micelas mistas simples podem solubilizar certos tipos de componentes bioativos, mas tendem a serem menos eficientes do que micelas mistas complexas contendo ácidos graxos livres e monoacilgliceróis (YAO; XIAO; McCLEMENTS, 2014). A Figura 2.13 ilustra o mecanismo de absorção de compostos bioativos a partir de um sistema particulado lipídico nano e micro estruturado.

Figura 2.13 - Representação esquemática do mecanismo de absorção de compostos bioativos lipofílico encapsulado pelo trato-gastrointestinal humano. F_B = fração do bioativo que foi liberada pelo alimento no TGI para se tornar bioacessível; F_A = fração do bioativo bioacessível que é absorvida pelo TGI e que seguirá para a circulação sistêmica; F_M = fração não metabolizada.

Fonte: YAO, M.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D.J. Bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v.5, 2014. p. 56.

2.5.3 Processos de digestão simulada em *pH stat*

Os meios artificiais experimentais têm sido utilizados para simular os processos digestivos tais como as forças mecânicas, diluições e fluidos biológicos, os quais os alimentos encontram durante sua passagem através de regiões específicas do TGI (estômago, intestino delgado e intestino grosso) ou no interior do TGI (LESMES; McCLEMENTS, 2009). Os métodos *in vitro* fornecem bons resultados, são mais baratos; reprodutíveis; são particularmente rápidos para rastrear a eficiência dos sistemas de entrega com diferentes composições ou estruturas e para estabelecer mecanismos físico-químicos adequados e não possuem restrições éticas (HUR et al., 2011; PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007; MINEKUS et al., 2014).

Os modelos *in vitro* consistem da adição de sistemas de entrega em vasos contendo componentes digestivos tais como enzimas, sais biliares, fosfolipídios, minerais e outros componentes. A molécula de triacilglicerol será hidrolizada por lipases resultando na formação de ácidos graxos, monoacilgliceróis e íons H^+ . Por sua vez, as moléculas de proteína são hidrolisadas por proteases levando à formação de peptídeos e aminoácidos e íons H^+ (MUN et al., 2015; ZHANG; DECKER; McCLEMENTS, 2014). A solução de hidróxido de sódio (NaOH) será adicionada para neutralizar o meio reacional e manter o valor de pH constante (7,0) durante todo o período de incubação (ZHANG; DECKER; McCLEMENTS, 2014).

Métodos de digestão simulada geralmente incluem as fases oral, gástrica e do intestino delgado e em alguns casos, a fase de fermentação do intestino grosso. Tais métodos são capazes de reproduzir as condições *in vivo*, levando em conta a presença de enzimas digestivas e as concentrações adequadas delas, o pH, o tempo de digestão e as concentrações de sais, entre outros fatores (MINEKUS et al., 2014). O método *in vitro* estático conhecido com *pH-stat* é uma ferramenta analítica muito utilizada em pesquisas farmacêutica e de alimentos para caracterizar a digestão lipídica simulando as condições do intestino delgado (ARMAND et al., 1992; DAHAN; HOFFMAN, 2006; DAHAN; HOFFMAN, 2008; NILSSON; BELFRAGE, 1979). A técnica de digestão lipídica por *pH-stat* se baseia na quantificação de ácidos graxos livres liberados pelos lipídios, geralmente triacilgliceróis, após a adição de valores de pH próximos ao neutro (ALI; SIDDIQUI; NAZZAL, 2010; BAUER; JAKOB; MOSENTHIN, 2005; DE MARIA et al., 2009; SNABE; NEVES-PETERSEN; PETERSEN, 2005).

Dentre as justificativas para a utilização do método do *pH-stat* podem-se considerar três pontos, a saber (DAHAN; HOFFMAN, 2008; MINEKUS et al., 2014; NIK; CORREDIG; WRIGH et al., 2010; NIK; WRIGHT, 2011):

- (i) a manutenção do pH em um valor constante, assim como os mecanismos fisiológicos;
- (ii) o processo de lipólise é simulado de maneira eficiente, sendo os resultados obtidos de alta confiabilidade;
- (iii) a extensão do processo de lipólise pode ser quantificado com alta margem de segurança, uma vez que a estequiometria da reação entre os ácidos graxos liberados e a quantidade de íons OH utilizados na titulação é 1:1.

A Tabela 2.4 apresenta alguns estudos presentes na literatura que utilizaram a técnica do *pH-stat* para simular a digestibilidade de sistemas de encapsulação lipídicos.

Tabela 2.4 –Sistemas de encapsulação utilizando a técnica do *pH-stat* para a avaliação da digestibilidade *in vitro* de compostos bioativos.

Tipo de sistema de encapsulação	Biotivo encapsulado	Referência
Hidrogéis de amido carregados com emulsões	β -caroteno	Mun, Kim e McClements, 2015
Micropartículas lipídicas sólidas de óleo de triestearina e óleo de babaçu	Quercetina	Pereira, 2015
Nanodispersão mista de proteína (zeína) e lipídios	Curcumina	Zou et al., 2016
Nanoemulsões excipientes contendo purê de manga	Carotenóides e compostos fenólicos	Liu et al., 2016
Nanoemulsões encapsulando curcumina para aplicação em bebidas	Curcumina	Joung et al., 2016
Emulsões encapsulando vitamina D ₂	-	Salvia-Trujillo et al., 2017
Nanoemulsões enriquecidas com fibras	β -caroteno	Gasa-Falcon et al., 2017
Complexos de peptídios de soro de leite e ferro	-	Caetano-Silva et al., 2017

Fonte: Própria autoria.

Diante do exposto, definiu-se para o presente trabalho a produção de géis mistos de IPSL e goma xantana como matrizes biopoliméricas. O material de enchimento dos géis carregados foram dispersões de micropartículas lipídicas sólidas de óleo de babaçu e triestearina como o sistema de encapsulação da curcumina. Por fim, definiu-se a técnica do *pH-stat* como o método *in vitro* para a realização dos testes de digestibilidade dos géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta Tese foi a produção, caracterização e avaliação da digestibilidade *in vitro* de géis biopoliméricos mistos de IPSL e goma xantana carregados com micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.

Para alcançar tal objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- (i) Desenvolvimento das formulações de géis biopoliméricos mistos variando-se as concentrações de IPSL, goma xantana e sal;
- (ii) determinação dos parâmetros de produção dos géis e caracterização quanto às propriedades de microestrutura e reologia;
- (iii) produção e análise da estabilidade ao longo do tempo de estocagem das formulações de micropartículas lipídicas sólidas de óleo de babaçu e triestearina encapsulando curcumina;
- (iv) produção dos géis biopoliméricos mistos carregados com dispersão de micropartículas lipídicas sólidas e caracterização quanto à microestrutura e as propriedades mecânicas e reológicas e avaliação de estabilidade dos géis;
- (v) realização de ensaios de digestibilidade *in vitro* pela técnica de *pH-stat* dos géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Água deionizada ultrapurificada proveniente de um sistema Direct Q3 (Millipore, Billerica, MA, EUA) foi utilizada para preparação de todas as soluções e dispersões utilizadas neste estudo.

4.1.1 Produção dos géis

Para a produção dos géis proteicos, foi utilizado isolado proteico de soro de leite (IPSL) comercial da Carbery (Cork, Irlanda), gentilmente doado pela Synergy Aromas (Vinhedo, SP, Brasil). A goma xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Du Pont, Cotia, SP, Brasil) foi o polissacarídeo incorporado aos géis.

Nas formulações de gel com adição de sal, cloreto de sódio (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) ou cloreto de cálcio dihidratado (Kyma, Americana, SP, Brasil) foram adicionados aos sistemas proteicos.

4.1.2 Produção das micropartículas lipídicas sólidas

A produção das micropartículas lipídicas sólidas foi feita empregando-se triestearina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e óleo de babaçu (obtido da castanha de *Orbygnia speciosa*, Jacy Fragrâncias, Santa Bárbara d'Oeste, SP, Brasil). O bioativo incorporado foi a curcumina (CAS 458-37-7, Merck, Darmstadt, Alemanha). Polisorbato 60 (Tween 60, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como tensoativo hidrofílico e o éster de monooleato de sorbitan (Span 80, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como tensoativo lipofílico. Goma xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Du Pont, Cotia, SP, Brasil) foi empregada como espessante para as duas formulações de micropartículas lipídicas sólidas e benzoato de sódio como agente antimicrobiano e antifúngico (SILVA et al., 2014; PEREIRA, 2015).

A temperatura de fusão dos lipídios utilizados, assim como os valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e a estrutura molecular dos tensoativos utilizados são apresentadas nas Tabelas 4.1 e 4.2 respectivamente.

Tabela 4.1 - Temperatura de fusão, sigla e estrutura molecular dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas.

Lipídio	Sigla	Temperatura de Fusão*	Molécula
Triestearina	TS	69,0°C	
Óleo de Babaçu	OB	25,5°C	—

*Fonte: SILVA (2013)

Tabela 4.2 –Valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e estrutura molecular dos tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas.

Tensoativo	EHL*	Molécula
Tween 60	14,9	
Span 80	4,3	

*Fonte: SILVA (2013).

4.1.3 Avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas

Para a quantificação de curcumina, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO, obtido da Merck, Darmstadt, Alemanha). Na avaliação da oxidação lipídica, utilizou-se etanol absoluto p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Merck, Darmstadt, Alemanha), butil-hidroxi-tolueno (BHT- Labsynth, Diadema, SP, Brasil), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e HCl (Chemycalis, Americana, SP, Brasil).

4.1.4 Avaliação da digestibilidade *in vitro* dos géis

Para determinar a atividade da pepsina foi utilizada hemoglobina (referência H2500 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), HCl, NaCl e NaOH (Synth, Diadema, SP, Brasil), pepsina suína (referência P6887) e ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Para os ensaios de atividade de tripsina, foi utilizado TAME (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester) (referência T4626) e pancreatina suína (8 x USP specifications, referência P7545) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil) e TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometane) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Já para determinação da atividade de lipase pancreática foi utilizado TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometane) (Merck, Darmstadt, Alemanha), NaCl, NaOH e HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil), $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Chemycalis, Americana, SP, Brasil), taurodeoxicolato de sódio, tributirina, lipase pancreática suína (referência L3126), pancreatina suína (8 x USP specifications, referência P7545) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Além dos materiais descritos, foi utilizado também extrato de bile suína (referência B8631 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Por fim, para preparação das soluções de eletrólitos foram utilizados: KCl, KH_2PO_4 , NaCl e HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil); NaHCO_3 , $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ e $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Chemycalis, Americana, SP, Brasil) e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização do isolado proteico de soro de leite

4.2.1.1 Análises de turbidez e solubilidade proteica

O índice de turbidez do IPSL foi avaliado em três condições: nativo; desnaturado (90 °C, por 30 min) e desnaturado (90 °C, por 30 min) na presença de 0,1 M de NaCl. Para cada condição, um volume de 50 mL de solução foi preparado na concentração de 1 mg IPSL/mL de água deionizada, tendo sido as medidas de turbidez realizadas em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK) a 600 nm (GBASSI et al., 2012; WILCOX, SWAISGOOD, 2002). A turbidez da goma xantana na concentração de 0,2 g/100 mL de água deionizada

também foi determinada seguindo o mesmo protocolo do IPSL (BRYANT; McCLEMENTS, 2000b).

A solubilidade proteica foi determinada seguindo-se a metodologia proposta por Morr et al. (1985), sendo que 50 mL de dispersão de 1 % m/m de IPSL, nativo e em concentração 0,1 M de NaCl foram homogeneizados por 1 hora em agitação magnética. Nesta etapa, o pH foi ajustado para 7,0 a cada intervalo de 15 min com NaOH ou HCl 1 M. As amostras foram então centrifugadas a 21000 g por 30 min, a 5 °C (modelo J2-21, Beckman, Pasadena, CA, EUA). O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 1. A concentração de nitrogênio total no filtrado foi quantificada pelo método micro Kjeldahl e o percentual de solubilidade proteica foi calculado.

4.2.1.2 Hidrofobicidade superficial

O protocolo para determinação da hidrofobicidade superficial do isolado proteico de soro de leite foi adaptado de Hayakawa e Nakai (1985). As amostras de IPSL, nativo e desnaturado a 90 °C por 30 min, foram dispersas em tampão fosfato 0,1 M, a pH 7,0, na concentração de 0,125 mg/mL. A amostra foi então homogeneizada em agitação magnética a temperatura ambiente por 1 h e centrifugada em tubos de 15 mL a 4000 g por 15 min e 4 °C (Legend MACH 1.6R, Sorwall, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As medições de fluorescência das amostras (volume de 3 mL), com sucessivas adições de sonda 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) 2 mM e do branco (sem a sonda), foram realizadas com $\lambda_{\text{excitação}}$ de 363 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 383 a 650 nm em abertura de fenda de 10 nm em espectrofluorímetro (LS55, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), no Laboratório de Biossensores e Sistemas Microeterogêneos do Departamento de Física e Química, FCFRP/ USP.

4.2.1.3 Fluorescência intrínseca

A fluorescência intrínseca das amostras de IPSL nativo e desnaturado (90 °C por 30 min) na concentração de 0,05 mg IPSL/ mL de tampão fosfato 0,01 M a pH 7,0 foi determinada por espectrofluorimetria (LS55, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) no Laboratório de Biossensores e Sistemas Microeterogêneos do Departamento de Física e Química, FCFRP/ USP, de acordo com a metodologia adaptada de Kalapathy, Hettiarachchy e Rhee (1997). As medidas foram realizadas com $\lambda_{\text{excitação}}$ de 363 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 383 a 650 nm. As leituras foram realizadas em triplicata.

4.2.1.4 Determinação do ponto isoelétrico do isolado proteico de soro de leite

O ponto isoelétrico da amostra de IPSL foi determinado por mobilidade eletroforética em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). Dispersões de 1 % de IPSL em água deionizada (m/v) foram preparadas com valores de pH variando de 3,5 a 6,5. As amostras foram diluídas em solução 1 mM de KCl e a mobilidade eletroforética foi calculada pelo equipamento utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski. Para cada medida foram feitas 10 corridas, fornecendo como resultado uma média do potencial zeta.

4.2.1.5 Determinação do comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico da amostra de IPSL (10 % m/v em água deionizada, 24 h de hidratação) foi analisado em duplicata por calorimetria exploratória diferencial (DSC), no intervalo de 0 a 110 °C, utilizando-se rampa de aquecimento de 10 °C/min, em equipamento TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), empregando-se um cadinho de alumínio vazio como referência, sob atmosfera inerte (45 mL N₂/min) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

4.2.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil de massa molecular foi obtido utilizando-se a técnica de eletroforese SDS-PAGE (Mini Protean II, BioRad, Hercules, CA, EUA). A amostra foi preparada na concentração de 4 mg/mL de proteína em tampão redutor. Foi utilizado gel de resolução com 12,0 % de acrilamida (12 % T; 2,67 % C) e gel de empilhamento com 4 % (4 % T; 2,67 % C), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida foi conduzida em 120 V utilizando gel com 0,75 mm de espessura. O padrão utilizado foi Bio-Rad (16-0304) com as seguintes frações protéicas: fosforilase b (97.400 Da), albumina (66.200 Da), ovalbumina (45.000 Da) anidrase carbônica (31.000 Da), inibidor de tripsina (21.500) e α -lactalbumina (14.400 Da).

4.3 Produção das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina

Para a produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS), foram utilizadas duas formulações, uma contendo 2 % de tensoativos (MLS-2) e outra contendo 4 % de tensoativos

(MLS-4). Tais formulações foram escolhidas baseadas na boa estabilidade que apresentaram no estudo de Pereira (2015) e são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Formulações das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com diferentes composições de tensoativos encapsulando curcumina.

Formulação	Composição (g/ 100 g)				
	Óleo de babaçu	Triestearina	Span 80	Tween 60	Água deionizada
MLS-4	2,8	1,2	2,8	1,2	92,0
MLS-2	2,8	1,2	1,4	0,6	94,0

Fonte: Própria autoria.

Adicionalmente, 0,05 % de goma xantana (m/m) e 0,02 % de benzoato de sódio (m/m) foram adicionados às dispersões de MLS como agentes estabilizante e antimicrobiano, respectivamente.

Testes preliminares variando-se a concentração de curcumina (0,1; 0,07; 0,05 e 0,03 % m/m) nas formulações de MLS estudadas determinaram a concentração a ser aplicada.

Para a produção das MLS, os lipídios (triestearina e óleo de babaçu) e o tensoativo hidrofóbico (span) 80 foram misturados e fundidos a 80 °C (10 °C acima da $T_{\text{fusão}}$ triestearina), nas concentrações apresentadas na Tabela 4.3, sendo que a curcumina foi solubilizada nesta fase oleosa. Dispersão do tensoativo hidrofílico (tween 60 e água) na temperatura de 80 °C foram misturadas à fase oleosa e imediatamente se iniciou o processo de ultra-agitação (T25,IKA, Staufen,Alemanha) a 18.000 rpm, por 5 min, ainda sob em temperatura controlada ($\approx 80^{\circ}\text{C}$).

Por fim, a dispersão final obtida foi deixada sob agitação magnética em banho de gelo até atingir cerca de 20 °C, a uma taxa de resfriamento aproximada de 5 °C/ min. Nesta etapa foram adicionados às dispersões de MLS a goma xantana e o benzoato de sódio (PEREIRA, 2015; SILVA et al., 2014).

4.3.1 Determinação do comportamento térmico das micropartículas lipídicas sólidas por calorimetria exploratória diferencial

O comportamento térmico das dispersões de MLS-2 e MLS-4 (10 % v/v em água deionizada) foi analisado em duplicata por calorimetria exploratória diferencial (DSC), no

intervalo de 0 a 110°C, utilizando-se rampa de aquecimento de 10° C/min, em equipamento TA5000 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), empregando-se um cadinho de alumínio vazio como referência, sob atmosfera inerte (45 mL N₂/min) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

4.3.2 Avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina

Para as análises de estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas, as formulações MLS- 2 e MLS-4 foram produzidas em triplicata e avaliadas quanto aos diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula; potencial zeta; quantificação de curcumina encapsulada; oxidação lipídica e colorimetria por um período de 60 dias. Todas as análises para a avaliação da estabilidade das micropartículas estão descritas nos itens a seguir:

4.3.2.1 Determinação do diâmetro médio e da distribuição de diâmetro de partícula

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partículas foram determinadas por espectroscopia de correlação de fótons (*PCS, photon correlation spectroscopy*) em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). O comprimento de onda do laser foi 657 nm, em ângulo de incidência 90°. As dispersões foram diluídas em água deionizada para evitar o efeito de espalhamento múltiplo. As análises de dados foram realizadas pelo software do equipamento. Para cada medida foram feitas dez corridas, fornecendo como resultado a média do diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho de partícula da amostra.

4.3.2.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética pelo equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). As amostras foram diluídas em solução 1 mM de KCl e a mobilidade eletroforética foi calculada pelo equipamento utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski. Para cada medida foram feitas 10 corridas, fornecendo como resultado a média do potencial zeta.

4.3.2.3 Quantificação de curcumina encapsulada

Inicialmente, foi construída uma curva padrão de curcumina em solvente dimetilsulfóxido, em concentrações variando de 0,5 a 6,0 µg/mL. A quantificação foi então determinada em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK) a 430 nm.

Para a quantificação de curcumina encapsulada, foi feita uma diluição 1:10 de dispersão de micropartículas em água deionizada. Em seguida, 1 mL desta primeira diluição foi novamente diluída em 9 mL de DMSO e pode-se realizar a leitura em triplicata da absorbância das amostras de micropartículas.

4.3.2.4 Oxidação lipídica

A concentração de malonaldeído (MDA) foi determinada como a substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como os produtos da reação da oxidação lipídica, utilizando-se a metodologia proposta por LEE et al. (2011). Para isso, preparou-se 100 mL de solução TCA (ácido tricloroacético) – TBA – HCl pela mistura de 15 g de TCA, 0,33 g de TBA, 1,8 mL de HCl 12 M e 83 mL de água deionizada. A esta solução, foram adicionados 3 mL de uma solução 2 % (m/ m) de BHT (butilhidroxitoluol) em etanol. As dispersões de micropartículas lipídicas sólidas (MLS-2 e MLS-4) foram então diluídas em água deionizada (1:10) e 2 mL desta diluição foram misturados com 2 mL da solução acima descrita em tubo de 15 mL. Após agitação, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 15 minutos, resfriadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 1000 x/20 min (Z 216 MK, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemanha). As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK) a 532 nm. Uma curva de calibração com massa conhecida de MDA foi construída utilizando o 1, 1, 3, 3 – tetraetoxipropano (TEP) como padrão, para quantificar o valor de MDA nas dispersões de MLS. O experimento foi conduzido em triplicata.

4.3.2.5 Determinação dos parâmetros colorimétricos

Análises de colorimetria instrumental foram realizadas em colorímetro (Miniscan XE Plus, Hunterlab, Reston, VA, EUA) no Laboratório de Processos de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos, FZEA/ USP. Os parâmetros de leitura foram: iluminante D65 e ângulo de visão com abertura de 10° e o sistema CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*). Os parâmetros L*a*b* foram obtidos e calculados os valores

de croma (C^*_{ab}) (Equação 1), ângulo de Hue (h_{ab}) (Equação 2) e diferença total de cor (TCD ou ΔE^*) (Equação 3).

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

Em que:

C^*_{ab} = croma (saturação da cor)

b^* = cromaticidade no eixo variando do amarelo a azul

a^* = cromaticidade no eixo variando de vermelho a verde

A tonalidade do sistema (ângulo de Hue) foi calculada pela expressão:

$$h^*_{ab} = \text{tg}^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

Em que

h_{ab} = ângulo de Hue (tonalidade definida em graus)

b^* = cromaticidade no eixo variando do amarelo a azul

a^* = cromaticidade no eixo variando de vermelho a verde

Por fim, o valor de TCD (diferença total de cor) foi calculado por:

$$TCD = \sqrt{(L^* - L^*_{0})^2 + (a^* - a^*_{0})^2 + (b^* - b^*_{0})^2} \quad (3)$$

Em que:

L^*_{0} , a^*_{0} e b^*_{0} são os parâmetros obtidos no dia zero de estocagem

L^* , a^* e b^* são os parâmetros obtidos no dia de amostragem

4.4 Produção e caracterização dos géis de isolado proteico de soro de leite

4.4.1 Definição das formulações de géis

Diferentes formulações de géis de IPSL foram testadas a fim de se determinar aquela(s) que seria(m) produzida(s) neste estudo.

Para isso, após prévia consulta à literatura, determinou-se que a goma xantana seria o polissacarídeo incorporado aos géis e NaCl ou CaCl_2 seriam os sais adicionados às formulações. A temperatura de gelificação foi fixada em 90 °C por um tempo de 30 minutos.

Os géis foram produzidos variando-se as concentrações de IPSL e a goma xantana e também a força iônica (NaCl e CaCl_2). Todas as possíveis combinações das concentrações de cada componente foram testadas, totalizando 60 formulações.

A Tabela 4.4 mostra os componentes e concentrações avaliados na produção dos géis proteicos.

Tabela 4.4– Componentese concentrações empregadas na produção dos géis. IPSL -isolado protéico de soro de leite.

Variável	IPSL (g/ 100 g)	Goma xantana (g/100 g)	NaCl (M)	CaCl_2 (M)
Concentração	8; 10 e 12	0; 0,1; 0,2 e 0,3	0; 0,05 e 0,1	0; 0,05 e 0,1

Fonte: Própria autoria.

4.4.2 Produção e avaliação visual dos géis de IPSL

Soluções-estoque de IPSL (20 % m/m) (pH 6,12), de goma xantana (2,0 % m/m) e de NaCl e CaCl_2 (1,5 M) foram preparadas em água deionizada à temperatura ambiente.

A Figura 4.1 (a) mostra o fluxograma de produção dos géis. As quantidades necessárias de cada solução-estoque foram calculadas e misturadas e acrescentadas de água deionizada, quando necessário. As misturas foram agitadas magneticamente por 2 h e estocadas sob refrigeração por aproximadamente 24 h para completa homogeneização. Após este período, cada dispersão foi colocada em tubos plásticos (Figura 4.1b) de 20 mm de diâmetro x 100 mm de comprimento, previamente tampados e vedados com fita tipo vedarossa. Os tubos foram acomodados em banho térmico (Figura 4.1c) (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 90 °C por 30 min. Após o processo de gelificação, os géis foram resfriados a temperatura ambiente e armazenados sob refrigeração, sendo avaliados visualmente após 24 h depois de produzidos.

Figura 4.1 –(a) Fluxograma de produção dos géis de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana (GX) adicionados de sal; (b) Tubo de politereftalato de etileno (PET) adaptado para o processo de gelificação dos géis biopoliméricos mistos; (c) tubos com diferentes amostras de dispersões biopoliméricas durante o processo de gelificação.

Fonte: Própria autoria.

4.5 Produção e caracterização dos géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas

A partir do teste descrito no item 4.4.2, definiram-se três formulações de gel que seriam avaliadas ao longo do trabalho. As amostras com 12 % de IPSL, 0,2 % de goma xantana sem sal e concentrações salinas 0,1 M de NaCl ou 0,1 M CaCl₂ foram escolhidas.

Em seguida foram realizados testes com incorporação de diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas (MLS-2 e MLS-4) a fim de verificar o comportamento dos

géis a partir da substituição parcial ou total da água nos sistemas. Os testes realizados foram ensaios mecânicos (compressão uniaxial) e ensaios reológicos de pequena amplitude (dinâmicos oscilatórios). A partir desta etapa, os valores de pH das dispersões biopoliméricas preparadas foram ajustados para 6,5 com NaOH 0,1 M. Para o estudo dos géis com diferentes proporções de MLS, optou-se pela avaliação apenas dos géis sem adição de sal (NaCl ou CaCl₂), pois o objetivo foi avaliar a quantidade de MLS poderia ser adicionada ao gel e o impacto da inclusão de partículas na matriz gelificada.

4.5.1 Incorporação de diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas

Géis proteicos com 12 % de IPSL e 0,2 % de goma xantana foram produzidos com a substituição parcial ou total da água deionizada pelas MLS (2 % ou 4 % tensoativos).

As concentrações mássicas de MLS incorporadas às formulações de gel foram de 25, 50 e 88 % (m/m). O maior valor incorporado corresponde a 100 % de substituição da massa de água deionizada pelas dispersões de micropartículas lipídicas sólidas.

A Figura 4.2 mostra o fluxograma de produção dos géis carregados com MLS.

Figura 4.2 – Fluxograma de produção dos géis de isolado proteico de soro de leite (IPSL) e goma xantana (GX) incorporados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS).

Fonte: Própria autoria.

As dispersões proteicas foram produzidas hidratando o IPSL com as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas. As formulações contendo 25 e 50 % de MLS tiveram a massa de líquido completado com água deionizada. A goma xantana foi adicionada lentamente sob agitação magnética a temperatura ambiente. As misturas permaneceram sob agitação por mais 2 h e foram estocadas refrigeradas por 24 h para completa homogeneização. Após este período, cada solução foi colocada em tubos plásticos de 20 mm de diâmetro x 100 mm de comprimento, previamente tampados e vedados com fita tipo veda-rosca. Os tubos foram colocados, então, em banho térmico a 90 °C por 30 min.

4.5.1.1 Ensaio de compressão uniaxial dos géis carregados com diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas

Os ensaios de compressão dos géis foram realizados em texturômetro (TA-XTplus Texture Analyser, Godalming, Surrey, Reino Unido). Os corpos de prova com dimensões de 20,0 mm de diâmetro e 30,0 mm de altura foram cortados e comprimidos por uma *probe* de alumínio (20 mm de diâmetro) em 80 % de sua altura original a uma velocidade de compressão constante de 0,1 mm/s. Foram utilizados cinco corpos de prova por amostra de gel. A força e a altura foram então convertidas em tensão verdadeira (σ_H) e deformação verdadeira (ε_H) para a construção da curva tensão *versus* deformação. A inclinação da região linear da curva permite a obtenção do módulo de Young aparente (E). As Eq. (5) e (6) mostram como foi realizado o cálculo da deformação e tensão, respectivamente.

As propriedades de ruptura (tensão- σ_{rup} - e deformação - ε_{rup}) foram determinadas a partir do ponto máximo da curva tensão-deformação.

$$\varepsilon_H = \int_{H_0}^H \frac{1}{H} dH = \ln \left(\frac{H}{H_0} \right) \quad (4)$$

$$\sigma_H = \frac{F(t)}{A(t)} \quad (5)$$

Em que: H_0 é a altura inicial do corpo de prova (mm), H é a altura assumida pelo corpo de prova durante a deformação (mm), $F(t)$ é a força medida durante a compressão (N) e $A(t)$ é a área da seção transversal (mm^2) do corpo de prova durante a deformação.

4.5.1.2 Ensaios de reologia dinâmica oscilatória de pequena amplitude dos géis carregados com diferentes proporções de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas

Os ensaios de reologia dinâmica oscilatória foram realizados utilizando uma *probe* de placa plana, 60 mm de diâmetro e gap de 1 mm em reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA). O processo de gelificação das dispersões biopoliméricas foi conduzido no próprio reômetro e graxa de silicone foi aplicada ao redor da amostra para prevenir perda de umidade durante o experimento. Para cada amostra, foi utilizada uma rampa de subida de 30 até 90 °C, em uma taxa controlada de 3 °C/min. A amostra permaneceu a 90 °C por 30 min para a formação do gel e em seguida, o gel foi resfriado de 90 para 30 °C, em uma taxa de 3 °C/min.

A partir da formação do gel, foram conduzidas as análises de varredura de deformação para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RVL) a uma frequência constante de 1 Hz, com a taxa de deformação variando de 0,01 a 30 %.

O teste de varredura da frequência (espectro mecânico) foi realizado após a determinação da RVL para cada amostra de gel. Para isso, repetiu-se o processo de produção do gel no reômetro descrito acima e em seguida a varredura de frequência foi realizada a uma taxa de deformação constante de 1 %, com frequência variando de 0,1 a 10 Hz.

Os testes descritos foram realizados em triplicata para cada amostra e os dados tratados pelo programa *Rheology Advantage Data Analysis* (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.6 Caracterização das propriedades reológicas e de microestrutura dos géis não-carregados e géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas

Definida a concentração de MLS incorporada aos géis a partir dos resultados obtidos nos experimentos descritos no item 4.5.1, as dispersões foram incorporadas também nas formulações de géis com adição de 0,1 M NaCl e 0,1 M CaCl₂. A Tabela 4.5 mostra as formulações finais dos géis não-carregados (sem incorporação de MLS) e géis carregados avaliados neste estudo.

Tabela 4.5—Componentes e concentrações empregadas na produção dos géis. O símbolo % representa g/100 g de dispersão protéica.

Formulação	Composição	Formulação	Composição	Formulação	Composição
SP/SS	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 88 % água di*; sem sal	MLS-2/SS	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 88 % MLS-2; sem sal	MLS-4/SS	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 88 % MLS-4; sem sal
SP/NaCl*	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % água deionizada; 0,1 M NaCl	MLS-2/NaCl*	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % MLS-2; 0,1 M NaCl	MLS-4/NaCl*	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % MLS-4; 0,1 M NaCl
SP/CaCl ₂ *	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % água deionizada; 0,1 M CaCl ₂	MLS-2/CaCl ₂ *	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % MLS-2; 0,1 M CaCl ₂	MLS-4/CaCl ₂ *	12 % IPSL; 0,2 % xantana; 81,3 % MLS-4; 0,1 M CaCl ₂

* Nas formulações adicionadas de NaCl e CaCl₂a adição de sal foi feita a partir do volume adequado (6,7 mL) de uma solução salina 1,5 M. SS= sem sal adicionado; SP = sem partícula (gel não-carregado).

Fonte: Própria autoria.

A partir da definição das formulações descritas na Tabela 4.5, os géis carregados foram produzidos conforme a Figura 4.2 e foram realizadas avaliações para caracterizar os géis quanto à umidade espremível, propriedades mecânicas, reologia e microestrutura.

4.6.1 Determinação da umidade espremível

A umidade espremível (UE) dos géis não-carregados e carregados foi calculada de acordo com o método proposto por Jauregui, Regenstein, Baker (1981) com modificações sugeridas por Beuschel et al. (1992). Amostras de gel (1- 2 g) foram pesadas em papel Whatman nº 1 e colocadas em tubo tipo Falcon. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min, a 6 °C (Z 216 MK, Hermle LaborTechnik , Wehingen, Alemanha). O percentual de umidade espremível foi calculado pela diferença entre o papel de filtro seco e o papel úmido. A capacidade de retenção de água (CRA) foi calculada segundo a Eq (6). O experimento foi realizado em triplicata.

$$\text{CRA (\%)} = 100 - \text{UE} \quad (6)$$

4.6.2 Ensaios de compressão uniaxial dos géis carregados

Os ensaios de compressão uniaxial das formulações apresentadas na Tabela 4.5 foram realizados em texturômetro (TA-Xt.plus Texture Analyser, Godalming, Surrey, UK). O protocolo do ensaio foi o mesmo descrito no item 4.5.1.1.

4.6.3 Ensaios de reologia dinâmica oscilatória de pequena amplitude dos géis carregados

Os ensaios de reologia dinâmica oscilatória foram realizados como descrito no item 4.5.1.2

4.6.4 Análise dos géis por microscopia eletrônica de varredura

Para observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura (MEV), utilizou-se a metodologia descrita por Picone, Takeuchi e Cunha (2011). Para isso, os géis foram cortados (1,0 x 0,5 x 0,5 cm) e fixados em glutaraldeído 2,5 % (m/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após 24 h a 7 °C, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) por 2 vezes, durante 20 min cada e em seguida, foi feita a fratura em N₂. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 120 min, seguida por duas lavagens em água deionizada, de 20 min cada. O processo de desidratação das amostras foi iniciado por lavagem em série de soluções etanólicas (30, 50, 70, 90 %, 20 min cada, e 100 % por 20 min, 3 vezes) e finalizado em desidratação no ponto crítico (critical point dehydration, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras secas foram fraturadas e os fragmentos foram fixados em suportes. A metalização das amostras foi realizada com ouro (200 seg/40 mA) (SCD 050, Balzers, Liechtenstein) e realizou-se a observação em microscópio eletrônico de varredura (TM 3000 Tabletop Microscope, Hitachi, Tóquio, Japão).

4.6.5 Análise dos géis por microscopia confocal de varredura a laser

A etapa da avaliação dos géis por microscopia confocal a laser seguiu o protocolo descrito por Abhyankar, Mulvihill e Auty (2014) com adaptações. Para corar a proteína foi utilizada Rodamina B (0,2 %, m/m em água deionizada, $\lambda_{\text{emissão}} = 543 \text{ nm}$), sendo diretamente adicionado nas soluções proteicas na concentração de 10 $\mu\text{L/mL}$ de dispersão proteica. A fase oleosa das dispersões MLS-2 e MLS-4 foi corada com vermelho do Nilo (1 mg/ mL de etanol,

$\lambda_{\text{emissão}} = 458 \text{ nm}$) durante a etapa de preparação das micropartículas lipídicas sólidas. Este corante foi adicionado no volume de 10 $\mu\text{L/g}$ de óleo. A avaliação foi realizada no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade de Campinas, em equipamento Carl Zeiss-ZEN (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) com objetiva de 40 e lente EC Plan-Neofluar 40x/ 130 OilDIC M27.

4.6.6 Estudo da estabilidade dos parâmetros colorimétricos dos géis

O estudo de estabilidade dos parâmetros colorimétricos ($L^*a^*b^*$) dos géis foi realizado ao longo de 30 dias para as formulações de géis descritas na Tabela 4.5 (armazenados a aproximadamente 7 °C, na ausência de luz). Nesta etapa, foram realizados testes de estabilidade também para géis não-carregados, nos quais foi adicionado curcumina em pó (curcumina livre: 0,026 % m/m). Amostras de cada formulação de gel com 20 mm x 20 mm foram analisadas em triplicata seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.3.1.5.

4.7 Avaliação da digestibilidade *in vitro* dos géis

4.7.1 Determinação da atividade enzimática

A determinação das atividades das enzimas utilizadas para os ensaios de digestibilidade foi realizada de acordo com o material eletrônico suplementar (ESI) fornecido por Minekus et al. (2014). Para a atividade da pepsina suína foi utilizada hemoglobina do sangue bovino como substrato, em que, uma unidade produz ΔA_{280} de 0,001 por minuto, a pH 2,0 e 37 °C, medido como produtos solúveis em ácido tiobarbitúrico (TCA). Para a tripsina, o p-tolueno-sulfonil-L-arginina (TAME) foi o substrato (sendo que uma unidade hidrolisa 1 mmol de TAME/min a 25°C, pH 8,1). A atividade da quimiotripsina utilizou o n-benzoil-L-tirosina etil éster (BTEE) como substrato, que é capaz de hidrolisar 1 mmol de BTEE/min, a pH 7,8, 25 °C. Por fim, a atividade da pancreatina utiliza tributirina como substrato e neste caso, uma unidade libera 1 mmol de ácido butírico/min a 37 °C e em pH 8,0 (MINEKUS et al., 2014). As concentrações de sais biliares foram estimadas por Pereira (2015).

4.7.2 Fluidos gastrointestinais simulados para a digestibilidade *in vitro*

A preparação dos fluidos simulados oral, gástrico e intestinal seguiram o protocolo descrito por Minekus et al. (2014) e são descritas na Tabela 4.6 a seguir. O ajuste do pH foi feito com NaOH 1 M ou HCl 1 M.

Tabela 4.6 - Composição dos fluidos digestivos.

Sal	Concentração na solução estoque	Volume na solução de eletrólitos (mL)		
		Fase oral (pH 7)	Fase gástrica (pH 3)	Fase intestinal (pH 7)
KCl	37,3 g/L	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68 g/L	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	84 g/L	13,6	12,5	42,5
NaCl	117 g/L	-	11,8	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5 g/L	0,15	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48 g/L	0,06	0,5	-
HCl	6 mol/L	0,09	1,3	0,7

*Preparo de 400 mL de fluido digestivo.

Fonte: MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, Cambridge, v.5, p.1113-1124, 2014.

4.7.3 Ensaios de digestibilidade simulada *in vitro*

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram realizados para as micropartículas lipídicas sólidas, para os géis biopoliméricos mistos puros e carregados.

O estudo de digestibilidade foi realizado pelo método de *pH stat* e contemplou três etapas: oral, gástrica e intestinal. Dois protocolos foram avaliados, sendo um deles o protocolo do grupo de estudos INFOGEST elaborado por Minekus et al. (2014), o qual padroniza os ensaios de digestibilidade *in vitro* realizados pelo método de *pH stat*. O segundo método foi escolhido considerando que ao longo da fase gástrica o pH do estômago não se mantém fixo em 3, mas decai gradualmente durante o processo digestivo gástrico (MALAGELADA; CO; SUMMERSKILL, 1979; EGGER et al., 2016). Desta forma, determinou-se que o pH da FG seria reduzido ao longo do ensaio de digestibilidade. Este segundo método foi denominado de “Redução Gradual do pH da fase gástrica” (RG).

O processo de digestão simulada *in vitro* foi realizado de acordo com a descrição a seguir:

(i) Fase oral (FO): em um béquer de 100 mL, 5 mL da dispersão de MLS (2 % ou 4 % de tensoativos) ou 5 g de gel (triturado duas vezes em espremedor de batatas Hercules UC25-000) foram misturados a 4,0 mL de fluido simulado salivar (FSS) descrito na Tabela 4.6, adicionados de 25 μ L de 0,3 M $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ e 975 μ L de água deionizada e misturados por 2 min em agitação magnética branda.

(ii) Fase gástrica (FG): foram adicionadas à 10 mL da solução digestiva resultante da etapa oral 6,4 mL de fluido simulado gástrico (FSG), 1,6 mL de solução de pepsina (25 000 U/mL em FSG), 5 μ L de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 0,3 M, 0,2 mL de HCl 1 M e 1,795 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado com HCl 1 M.

Como descrito anteriormente, para o protocolo Infogest, o pH da solução digestiva gástrica de cada amostra analisada foi ajustado em 3,0 no início da fase gástrica e deixado sob agitação em câmara agitadora com agitação orbital (MA420, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 200 rpm por 2 h a 37°C. O pH foi monitorado e corrigido para 3,0 em intervalos de tempo de 30 min.

Para o protocolo RG, o pH da solução digestiva gástrica de cada amostra analisada foi ajustado em 5,0 no início da FG e deixado sob agitação em câmara agitadora com agitação orbital 200 rpm por 2 h a 37 °C. O pH foi monitorado e corrigido em intervalos de tempo pré-determinados. O ajuste do pH foi feito com adaptações de Malagelada, Co e Summerskil (1979) a saber: (a) pH 5,0 no início da FG (0 min); (b) pH 4,5 após 30 min de digestão gástrica; (c) pH 4,0 após 60 min da FG e (d) pH 3,0 após 90 min até o final da FG (120 min).

(iii) Fase do intestino delgado (duodenal) (FI): 20 mL do produto resultante da fase gástrica (quimo) foi adicionado de 7,8 mL de fluido simulado intestinal (FSI), 40 μ L de 0,3 M $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, e 1,31 mL de água ultrapura. O processo de digestão simulada duodenal foi realizado em equipamento *pH stat* (Titrand 906, Metrohm, Herisau, Suíça) e a temperatura mantida constante a 37 °C por meio de água circulante em um vaso encamisado. O processo de titulação do equipamento foi realizado usando NaOH 1 M como titulante e o pH de controle de titulação foi fixado em 7,0. Imediatamente antes de ligar a função *pH stat* foram adicionados a cada amostra 3,2 mL de solução de lipase (25 000 U/mL em FSI), 5 mL de solução de pancreatina (800 U/mL em FSI) e 2,5 mL de extrato de bile suína 160 mM. Nas soluções digestivas contendo MLS, o ajuste do pH foi feito pela adição de 0,10 mL de HCl 1 M. Nas soluções digestivas contendo gel não-carregado ou carregado, o ajuste do pH foi feito pela adição de 0,15 mL de NaOH 1 M.

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram realizados seis vezes para cada uma das formulações deMLS, géis não-carregados e carregados.

4.7.4 Monitoramento da digestão simulada *in vitro*

4.7.4.1 Perfil de pH e de distribuição de tamanhos de partículas

O processo de digestão simulada foi monitorado quanto ao pH e quanto à distribuição e tamanhos médio de partícula para as fases gástrica e intestinal, em intervalos de tempo pré-determinados, para todas as formulações estudadas.

O monitoramento do pH foi realizado em equipamento *pH stat* (Titrando 906, Metrohm, Herisau, Suíça) utilizando-se a função para leitura de pH.

A distribuição e os tamanhos médios de partículas foram determinados por difração a laser em equipamento SALD-201V (Shimadzu, Kyoto, Japão). Pequenas alíquotas das soluções digestivas da etapa gástrica e intestinal foram diluídas em água deionizada para a realização das leituras.

4.7.4.2 Perfil de liberação de ácidos graxos livres

Durante as 2 h da etapa intestinal, o percentual de ácidos graxos liberados (AGL) foi monitorado e calculado com base na Eq. 7, que assume que dois ácidos graxos e um monoacilglicerol são liberados por molécula de triacilglicerol (MUN et al., 2015). Os volumes de NaOH 1 M gasto para neutralizar os AGL liberados e manter o pH do meio em 7,0 foi anotado a cada intervalo de 10 minutos para a realização do cálculo.

$$AGL(\%) = 100 * \frac{V_{NaOH} * m_{NaOH} * M_{lip}}{m_{lip} * 2} \quad (7)$$

Na Eq. (7), V_{NaOH} é o volume do titulante (em L), m_{NaOH} é a molaridade do hidróxido de sódio, M_{lip} é a massa molecular do lipídio de referência (ácido esteárico: 284,48 g/mol) e m_{lip} é a massa de lipídio (em g) presente na solução digestiva intestinal.

Os géis não-carregados foram utilizados como referência (“branco”) e o volume de titulante gasto nestas amostras foi subtraído do volume de titulante gasto para neutralizar as amostras de géis carregados.

4.7.5 Determinação da bioacessibilidade da curcumina

A bioacessibilidade da curcumina foi avaliada através da quantificação do bioativo presente na fase micelar, ao final da fase de digestão duodenal como descrito por Pereira (2015). Para isso, 10 mL do produto final da digestão intestestinal foram transferidos para tubos tipo Falcon e as micelas foram separadas por centrifugação (3300 rpm por 50 minutos). Em seguida, uma alíquota de 1 mL do centrifugado foi coletada e a curcumina extraída com a adição de 9 mL de etanol. As misturas foram centrifugadas novamente (3300 rpm por 10 minutos) e em seguida, o sobrenadante foi coletado e submetido a filtração em membrana de 0,45 µm (Millex LCR, Millipore, Billerica, MA, EUA). Por fim, a curcumina foi quantificada por espectrofotometria, sendo a absorbância determinada a 430 nm.

Para o cálculo da bioacessibilidade da curcumina levou-se em conta a quantidade de curcumina efetivamente encapsulada nas MLS-2 e MLS-4, para as dispersões não submetidas ao processo de digestão simulada, diluídas em etanol (1:50) e quantificadas por espectrofotometria (430 nm).

4.8 Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 95 % de significância, por meio do software SAS 9.3 (SAS Institute Co., Cary, NC, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do isolado proteico de soro de leite

5.1.1 Composição centesimal, turbidez e solubilidade

A composição centesimal do isolado proteico de soro de leite é apresentada na Tabela 5.1, sendo tais valores obtidos a partir da ficha de especificação do produto fornecida pelo fabricante (ver Anexo A). Os resultados obtidos foram coerentes com a literatura (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2008; HE; MU; WANG, 2013; LI; ELEYA; GUNASEKARAN, 2006) que também apresentaram teores de proteína maiores que 90 g/100 g de isolado. Pequenas diferenças na composição centesimal entre os isolados proteicos comerciais ocorrem pela variação da composição da matéria-prima e do método de obtenção.

Tabela 5.1 -Composição centesimal do isolado proteico de soro de leite utilizado.

Componente	Massa (g/100 g)
Proteína Bruta	91,0
Lipídios	< 0,5
Umidade	5,0
Cinzas	3,5
Cálcio	0,5
Sódio	0,15

Fonte: Própria autoria.

Segundo a ficha de especificações do fabricante (ver Anexo A), os aminoácidos que aparecem em maior concentração no IPSL são ácido glutâmico (16,71 g/100 g), ácido aspártico (11,48 g/100 g), leucina (9,67 g/100 g) e lisina (9,06 g/100 g).

As análises de turbidez e solubilidade proteica foram realizadas com a finalidade de caracterizar o IPSL para poder definir os parâmetros experimentais mais adequados para a produção dos géis. Alguns dados desta caracterização são apresentadas na Tabela 5.2.

A partir dos resultados exibidos na Tabela 5.2, nota-se que a turbidez da amostra de IPSL foi influenciada pelo tipo de tratamento aplicado. A turbidez resultante da goma xantana foi muito próxima daquela da amostra de IPSL desnaturado. De acordo com Bryant e McClements (2000b), a turbidez deste polissacarídeo aumenta com o aumento da sua

concentração, indicando que a goma xantana forma agregados que são capazes de espalhar luz. A avaliação de turbidez apontou que o tratamento do IPSL à 90 °C por 30 min favoreceu a formação de agregados protéicos, sendo adequada para o processo de gelificação.

Tabela 5.2 - Dados da amostra de isolado proteico de soro de leite em diferentes condições experimentais, a 25 °C.

Amostra	Turbidez (cm ⁻¹)	Amostra	Solubilidade (%)
Nativo (pH 7,0)	0,117 ^a ± 0,003	Nativo	100,0 ^a
Desnaturado (Após 90 °C/30 min, pH 7,0)	0,611 ^b ± 0,001	0,1 M NaCl	100,0 ^a
Desnaturado (após 90 °C/30 min) +0,1 M NaCl, pH 7,0	2,508 ^c ± 0,003	-	-
Goma xantana (pH 7,0)	0,659 ± 0,064		

Médias de resultados seguidas de letras distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística a $p < 0,05$.

Fonte: Própria autoria.

O tratamento com apenas a desnaturação da proteína a 90 °C/30 min, bem como a desnaturação associada à presença de NaCl, provocaram a agregação das proteínas do IPSL e consequentemente, a formação de partículas que dispersaram a luz.

Alguns autores já concluíram que o NaCl pode ter um efeito pronunciado sobre a agregação induzida pelo calor de proteínas de soro de leite (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; BRYANT; MCCLEMENTS, 2000a; MAJHI et al., 2006; MARANGONI et al., 2000; XIONG, 1992). Segundo Marangoni et al. (2000), em agregados de IPSL desnaturados por aquecimento, sais como o cloreto de sódio e o cloreto de cálcio podem induzir a agregação destes particulados a partir da dispersão de cargas.

Schimitt et al. (2007), estudando o aumento da concentração de NaCl (0 – 120 mM) em solução de IPSL 1 % m/m em pH neutro e tratado a 85 °C/15 min, identificaram aumento da turbidez com o aumento da concentração de NaCl. Os autores sugeriram que isso foi devido à neutralização da carga negativa da proteína desdobrada pelas cargas positivas dos íons sódio, resultando, assim, em agregação proteica e aumento da turbidez. O aumento da concentração de sais neutros, a exemplo do NaCl, numa dispersão proteica causa o efeito *salting-out*, favorecendo o aumento da agregação proteica em função aumento de interações

hidrofóbicas, bem como pela competição da proteína e dos íons do sal pela água (VOJDANI, 1996).

Em relação à solubilidade de uma proteína, esta é uma das principais características para determinação de suas funcionalidades, tais como a capacidade gelificante (NAKAI; CHAN, 1985). Termodinamicamente, a solubilidade é a manifestação do equilíbrio entre a interação proteína-proteína e proteína-solvente. A solubilidade está relacionada ao balanço de hidrofilicidade/hidrofobicidade superficial da proteína, e esta será solúvel em água quando as forças eletrostáticas repulsivas excederem as interações hidrofóbicas atrativas. As características de solubilidade estão relacionadas à composição superficial da proteína e termodinâmica das interações com o solvente (AÑÓN; SORGENTINI; WAGNER, 2001; DAMODARAN, 1997).

Os resultados para a solubilidade do IPSL, na condição nativo e em 0,1 M de NaCl atingiram o valor de 100 %, em pH 7,0 e temperatura ambiente (25 °C). Nota-se que o efeito de *salting-out* não foi observado na avaliação da solubilidade.

Pelegrine e Gomes (2008), em estudo de solubilidade de IPSL em solução 0,1 M NaCl e empregando a mesma metodologia utilizada no presente trabalho, obtiveram 100 % de solubilidade proteica a 40 °C, pH 6,8. Tais condições empregadas pelos referidos autores são muitos similares às empregadas no presente trabalho.

O pH também é um fator que pode influenciar a solubilidade proteica, uma vez que pode afetar a natureza e a distribuição de cargas da proteína (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003). As proteínas podem se tornar solúveis em valores de pH ácidos ou básicos em função do excesso de cargas do mesmo sinal, resultando em repulsão dessas cargas e causando a abertura da estrutura proteica, com consequente aumento da solubilidade (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003; DAMODARAN; FENEMMA, 2010). No caso do presente trabalho, o valor de pH 7 para a avaliação da solubilidade proteica (acima do ponto isoelétrico da amostra que ficou entre 4,0 e 4,5 conforme item a seguir) mostrou-se um valor adequado para alcançar 100 % de solubilidade do IPSL, tanto nativo quanto na presença de sal.

5.1.2 Determinação do ponto isoelétrico

Os valores de potencial zeta para o IPSL nativo (1 % em água deionizada, m/v) em diferentes valores de pH são apresentados na Figura 5.1.

A partir dos resultados da Figura 5.1 é possível observar que o valor de ponto isoelétrico (pI) para a amostra de IPSL nativa se encontrou entre 4,0 e 4,5.

Pelegrine e Gasparetto (2003), encontraram o pI de proteínas do soro pelo método da avaliação da solubilidade em diferentes valores de temperatura e pH, e observaram que o pI foi de 4,5, pois apresentou a menor solubilidade. Segundo os autores, tal comportamento deve-se ao fato de que no pI, as interações proteína-proteína prevalecem, já que as forças eletrostáticas repulsivas são mínimas e menos água interage com as moléculas proteicas. Os mesmos autores ainda concluíram que o pI não foi de 5,4, que é o pI da β -lg, uma vez que os IPSLs não são compostos exclusivamente desta proteína, mas sim de uma mistura de outras proteínas do soro.

O conhecimento do valor de pI é determinante para a estrutura final do gel, uma vez que valores de pH acima ou abaixo do pI irão definir os tipos de ligações e interações entre as cadeias biopoliméricas. Próximo ao pI haverá predominância de interação proteína-proteína, enquanto que acima ou abaixo do pI, prevalecem as interações proteína-solvente (BERTRAND; TURGEON, 2006).

Figura 5.1 -Valores de potencial zeta para dispersão de isolado proteico de soro de leite nativo (1 % m/v) em diferentes valores de pH.

Fonte: Própria autoria.

5.1.3 Intensidade de fluorescência e hidrofobicidade superficial

A Figura 5.2 mostra as curvas de intensidade de fluorescência intrínseca e intensidade de fluorescência máxima na análise de hidrofobicidade superficial para a amostra de IPSL nativa e desnaturada (90 °C por 30 min).

As curvas obtidas na análise de fluorescência intrínseca (FI) para as amostras de IPSL nativo e desnaturado mostram que o tratamento térmico aplicado à proteína provocou um aumento da intensidade de fluorescência, porém, não foi observado deslocamento do pico de máxima fluorescência significativo entre as condições nativo e desnaturado (pico em 420 nm). A determinação da fluorescência das proteínas possibilita monitorar alterações no resíduo do triptofano que resultam de modificações na estrutura da proteína e de suas interações (HEBERT et al., 1999). Os resíduos de triptofano fluorescem porque o anel indol é muito sensível às variações do meio, tais como pH, temperatura e concentração salina. De acordo com Lakowicz (1999), a β -lg é uma das muitas proteínas que exibem aumento da fluorescência intrínseca do triptofano e um deslocamento para o vermelho (*red shift*) após seu desdobramento. Segundo o autor, o aumento da fluorescência e o deslocamento para o vermelho geralmente indicam a mudança de um ambiente menos apolar para outro mais apolar.

Figura 5.2—Curvas de intensidade de fluorescência intrínseca (a) e intensidade de fluorescência máxima (b) obtidas no ensaio de hifobicidade superficial para a amostra de isolado proteico de soro de leite nativo (em 476 nm) e desnaturado (90 °C por 30 min, sem adição de sal).

Fonte: Própria autoria.

A ficha de especificações do IPSL utilizado neste estudo, disponível no Anexo A, apresenta o perfil de aminoácidos não-polares no produto.

No estudo da fluorescência de proteínas, os fluoróforos podem ser intrínsecos (triptofano, tirosina ou fenilalanina) ou extrínsecos, conhecidos com sondas, tais como a sonda aromática 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) (ALIZADEH-PASDAR; LI-CHAN, 2000). A fluorescência intrínseca de muitas proteínas deve-se a presença de aminoácidos aromáticos fluorescentes tais como o triptofano, a tirosina ou a fenilalanina (EFTINK, 1991, 1994). A sonda ANS (uma sonda hidrofóbica) tem se mostrado adequada para se determinar a hidrofobicidade das proteínas do soro (LIU et al., 2006; MORO; GATTI; DELORENZI, 2001). A sonda sofre alterações em uma ou mais propriedades de fluorescência resultando em interações não covalentes com as proteínas (SEMISOTNOV et al., 1991).

Com relação aos resultados de hidrofobicidade superficial do IPSL nativo e desnaturado apresentados na Figura 5.2(b), é possível verificar que o tratamento térmico influenciou no aumento da máxima intensidade de fluorescência da amostra. De acordo com Chen, Li e Tang (2015), o aquecimento pode resultar no desdobramento estrutural e na desnaturação proteica, causando um aumento na hidrofobicidade superficial. Em ambas as condições testadas, houve uma saturação das interações entre a proteína e a sonda ANS quando o volume de sonda adicionado foi de 60 μ L, uma vez que os valores de máxima fluorescência tornaram-se estáveis. De maneira geral, as mudanças estruturais na proteína resultam num aumento da hidrofobicidade superficial devido à exposição de grupos enovelados no interior da molécula intacta de proteína nativa (MINE, 1997). Desta forma, as medidas de intensidade fluorescência extrínseca são importantes para predizer a extensão das modificações estruturais na proteína (XIANG et al., 2011).

5.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A Figura 5.3 mostra o perfil eletroforético da amostra de IPSL nativo.

É possível verificar o domínio das frações de β -lactoglobulina (β -lg) e de α -lactalbumina (α -la) nas bandas de 18,4 kDa e 14 kDa, respectivamente. Este resultado ficou dentro do que se esperava para uma amostra de IPSL comercial e concorda com outros trabalhos como Segat et al. (2014), Yi et al. (2015), Zhang e Vardhanabhuti (2014) para amostras de IPSL, os quais também utilizaram amostras comerciais em seus estudos.

Figura 5.3 -Perfil eletroforético de isolado proteico de soro de leite (IPSL) nativo em gel com 12 % de poliacrilamida. Sistema SDS-PAGE.

Fonte: Própria autoria.

5.1.5 Comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial

A formação de gel por aquecimento de proteínas globulares envolve duas etapas distintas: 1) desdobramento parcial (desnaturação) da estrutura globular nativa e 2) agregação intermolecular (CLARK; LEE-TUFFNELL, 1986; MULVIHILL; DONAVAN, 1987). A desnaturação envolve a dissociação de ligações intramoleculares, e neste estudo, mostrou-se um processo endotérmico (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2008).

A Figura 5.4 exemplifica o termograma obtido para a amostra de IPSL nativo 10 % (m/v de água destilada).

É possível observar na Figura 5.4 um pico endotérmico com o seu valor de máximo em aproximadamente $75,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,3$ e entalpia de transição (ΔH_{trs}) de $1,223\text{ J/g} \pm 0,064$. Tal pico refere-se, provavelmente, à temperatura de desnaturação da β -lactoglobulina, que é a proteína majoritária presente no IPSL, o que ficou evidenciado pelo resultado da análise de SDS-PAGE, no item 5.1.4. A β -lg se desnatura e se agrega por aquecimento em aproximadamente $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BOYE; ALLI, ISMAIL, 1996; WALSTRA, 2003). Um pico menos acentuado (ou “ombro”) no termograma pode ser observado entre 55 e $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pode ser atribuído à fração da α -lactalbumina (PICONE; TAKEUCHI; CUNHA, 2011) também detectada na amostra de IPSL por SDS-PAGE, no item 5.1.4.

Pode-se observar no termograma que a partir de 90 °C nenhum fenômeno térmico é observado. Sendo assim, a temperatura de 90 °C foi escolhida para o processo de gelificação do IPSL neste trabalho.

Figura 5.4 – Curva de aquecimento (10 °C/min) para análise de calorimetria exploratória diferencial de IPSL 10 % (m/v de água destilada).

Fonte: Própria autoria.

5.2 Produção e avaliação da estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina

5.2.1 Determinação da concentração de curcumina encapsulada

As micropartículas lipídicas sólidas (MLS-2 e MLS-4) foram produzidas com concentrações de 0,1; 0,07; 0,05 e 0,03 g de bioativo/100 g dispersão. A curcumina foi solubilizada na fase lipídica a aproximadamente 80 °C, antes da mistura com a fase aquosa.

A eficiência de encapsulação de um sistema é influenciada pela quantidade máxima de bioativo que ele é capaz de solubilizar. Concentrações de bioativos inferiores ao valor de saturação são completamente solubilizados pelo sistema. Porém, para valores acima da capacidade de solubilização, pode-se formar uma fase sólida isolada (POOL et al., 2013).

Nas razões de 0,1; 0,07 e 0,05 g de bioativo/100 g de dispersão a curcumina não foi completamente solubilizada nas duas formulações de micropartículas testadas. Para estas três concentrações de curcumina, observou-se a presença de precipitado no fundo do recipiente (Figura 5.5(a)). Porém, para a concentração de 0,03 % (m/m), a completa solubilização do

bioativo na fase oleosa foi observada para ambos os sistemas de micropartículas e, portanto, esta foi a concentração definida a ser encapsulada (Figura 5.5(b)).

A Figura 5.5 ilustra o aspecto das dispersões de micropartículas obtidas durante a etapa de determinação de concentração de curcumina a ser encapsulada.

Figura 5.5 - Aspecto visual das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) produzidas no estudo. (a) MLS com concentração de curcumina superior a 0,03 % (m/m) de curcumina; (b) MLS produzidas com concentração de 0,03 % (m/m) de curcumina.

Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Comportamento térmico por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina

Antes de se iniciar a avaliação da estabilidade das dispersões de MLS-2 e MLS-4, foi realizada a avaliação do comportamento térmico das formulações por DSC. O termograma obtido para as dispersões frescas (dia 0) de micropartículas lipídicas sólidas é exemplificado na Figura 5.6.

Para a MLS-2, é possível observar dois picos endotérmicos de transição de fases, sendo o primeiro pico mais suave com o seu valor de máximo em $22,7\text{ °C} \pm 1,2$ e entalpia de transição (ΔH_{trs}) de $0,345\text{ J/g} \pm 0,188$. O segundo pico para MLS-2, mais acentuado teve seu máximo valor em $49,9\text{ °C} \pm 4,1$ e entalpia de transição (ΔH_{trs}) de $1,553\text{ J/g} \pm 0,223$. Para a MLS-4, tal como para a MLS-2, dois picos endotérmicos de transição de fases foram identificados, o primeiro mais suave com o seu valor de máximo em $23,1\text{ °C} \pm 3,3$ e entalpia de transição (ΔH_{trs}) de $0,384\text{ J/g} \pm 0,194$. O segundo pico para MLS-4, mais acentuado teve seu máximo valor em $49,5\text{ °C} \pm 1,3$ e entalpia de transição (ΔH_{trs}) de $1,272\text{ J/g} \pm 0,076$. Portanto, os valores máximos de temperaturas e os valores de ΔH_{trs} das dispersões de MLS-2 e MLS-4, tiveram valores muito próximos para os dois picos endotérmicos identificados nos

termogramas. Desta maneira, a concentração de tensoativos não influenciou no comportamento térmico das dispersões de micropartículas estudadas.

O primeiro pico endotérmico (22,7-23,1 °C) foi associado com a temperatura de fusão dos triacilgliceróis de cadeia média (óleo de babaçu), enquanto que o segundo pico endotérmico (49,5-49,9 °C) foi associado à temperatura de fusão dos triacilgliceróis de cadeia longa (triestearina) (SILVA et al., 2014). Os comportamentos térmicos das MLS revelam a heterogeneidade destes sistemas, fato que é desejável, uma vez que estruturas heterogêneas dificultam a expulsão do curcuminóide encapsulado. Isto ocorre em função das diferentes cadeias carbônicas serem espacialmente incompatíveis, criando lacunas do interior da matriz sólida, evitando a expulsão do bioativo (DAS; CHAUDHURY, 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER, MULLER, 2004).

Figura 5.6– Fluxo de calor obtido por calorimetria exploratória diferencial das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina com 2 % e com 4 % de tensoativo

Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina

5.2.3.1 Distribuição de diâmetro de partícula, diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas

Os perfis de distribuição do diâmetro hidrodinâmico de partícula das MLS-2 e MLS-4 ao longo de 60 dias de armazenamento são apresentados na Figura 5.7. Nas curvas de distribuição de tamanho pode-se observar que tanto para a MLS-2 quanto para a MLS-4 foram obtidas distribuições bimodais, significando a presença de duas populações distintas de partículas. O diâmetro hidrodinâmico médio de partícula da primeira população ficou em torno de 300 nm e o segundo, por volta de 1000 a 1500 nm, na maioria dos casos, tanto para MLS-2 quanto para MLS-4. A variação dos picos no eixo das abscissas com o tempo de avaliação não está relacionada a uma desestabilização do sistema, mas provavelmente à heterogeneidade dos diâmetros encontrados nas duas formulações de MLS (PEREIRA, 2015). Segundo Mehnert e Mäder (2001) a heterogeneidade de diâmetros é uma característica intrínseca do método de produção utilizado e das partículas lipídicas sólidas.

Os resultados referentes aos diâmetros hidrodinâmicos médios e de valores de potencial zeta das MLS-2 e MLS-4 são apresentados na Tabela 5.3. Os resultados indicam menor estabilidade do tamanho hidrodinâmico médio de partícula para a MLS-2 do que para a MLS-4 ao longo do período de armazenagem, o que pode ser observado pela avaliação estatística. Houve aumento maior que 200 nm no diâmetro médio de partícula entre o primeiro dia e o dia 60 para a formulação com 2 % tensoativo. A dispersão MLS-4 não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenagem avaliado. No entanto, observou-se que o desvio padrão para a MLS-4 foi alto. Tal desvio está relacionado com as diferentes médias de leituras para cada triplicada de MLS-4 avaliada, que variaram de 400 a 700 nm. As MLS-2 e MLS-4 não apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p > 0,05$) em relação ao tamanho de partícula para um mesmo dia de avaliação ao longo de todo o estudo de estabilidade. Por se tratar de dispersões com distribuições de tamanho de partícula bimodais, os valores da polidispersidade dos sistemas foram avaliados e o que se nota são valores entre 0,3 a 0,4 para MLS-2 e 0,3 a 0,35 para MLS-4 (exceto para o dia 3). Portanto, os dados de índice de polidispersidade confirmam que as dispersões de MLS mostraram-se muito estáveis ao longo do período avaliado.

Figura 5.7 -Perfis de distribuição do diâmetro hidrodinâmico de partículas das amostras de micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina. (a) com 2 % (MLS-2) e (b) com 4 % (MLS-4) de tensoativo.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 5.3—Valores de diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina.

Tempo (d)	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de Polidispersidade	Potencial zeta (mV)
MLS-2			
0	461,7 ^{dA} ± 29,4	0,32 ^a ± 0,01	-34,2 ^{cA} ± 2,0
3	499,0 ^{dcA} ± 53,9	0,29 ^a ± 0,08	-31,3 ^{cA} ± 1,6
7	492,5 ^{dcA} ± 15,9	0,32 ^a ± 0,02	-35,0 ^{cA} ± 1,6
15	457,4 ^{dA} ± 26,1	0,33 ^a ± 0,01	-24,3 ^{aA} ± 0,7
21	581,4 ^{bcA} ± 15,6	0,37 ^a ± 0,02	-26,2 ^{abA} ± 2,4
30	580,1 ^{bcA} ± 60,7	0,33 ^a ± 0,04	-30,6 ^{bcA} ± 1,5
45	619,6 ^{abA} ± 25,2	0,38 ^a ± 0,00	-22,7 ^{aA} ± 2,0
60	688,3 ^{aA} ± 17,0	0,38 ^a ± 0,01	-32,9 ^{cA} ± 1,7
MLS-4			
0	454,3 ^{aA} ± 101,2	0,29 ^a ± 0,02	-31,6 ^{cA} ± 2,7
3	595,7 ^{aA} ± 132,0	0,15 ^b ± 0,05	-31,7 ^{cA} ± 2,9
7	453,3 ^{aA} ± 118,2	0,28 ^a ± 0,02	-33,5 ^{cA} ± 0,9
15	419,1 ^{aA} ± 104,1	0,28 ^a ± 0,03	-24,5 ^{abA} ± 1,4
21	508,6 ^{aA} ± 159,9	0,32 ^a ± 0,05	-27,1 ^{bA} ± 1,0
30	550,9 ^{aA} ± 80,7	0,30 ^a ± 0,02	-26,7 ^{bb} ± 2,9
45	559,4 ^{aA} ± 157,6	0,35 ^a ± 0,05	-21,8 ^{aA} ± 1,5
60	542,8 ^{aA} ± 215,8	0,31 ^a ± 0,05	-32,4 ^{aA} ± 1,2

Médias de resultados seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ para a mesma formulação de partículas ao longo do tempo. Médias de resultados seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ para diferentes formulações de partícula em um mesmo tempo de análise.

Fonte: Própria autoria.

Pereira (2015) utilizou formulações de MLS encapsulando quercetina (0,3 mg/mL), com a mesma composição lipídica e de tensoativos e mesmas condições de produção empregadas no presente estudo. O autor encontrou diâmetros médios de partículas que variaram entre 947 a 1528 nm e 702 a 1123 nm para MLS com 2 % e 4 % tensoativos,

respectivamente. Os intervalos encontrados pelo autor foram diferentes daqueles do presente estudo, muito provavelmente pela concentração de bioativo encapsulado, uma vez que a concentração de bioativo empregada pelo autor foi dez vezes maior que aquela utilizada para as MLS encapsulando curcumina (0,03 mg/mL). Além disso, a quercetina é um composto que apresenta tensão interfacial, e que pode migrar para a interface das partículas, enquanto que a curcumina fica incorporada no núcleo lipídico.

Em relação ao potencial zeta, foi verificada a variação deste parâmetro tanto para a MLS-2 quanto a MLS-4 ao longo do período de armazenagem. Esta variação pode ser confirmada pelas diferenças estatísticas para ambas as amostras, ao longo do período de armazenagem. As duas formulações de MLS testadas, quando comparadas para um mesmo dia de avaliação, praticamente não apresentaram diferença estatística significativa entre si em relação ao potencial zeta ao longo de todo o estudo de estabilidade. Outro aspecto importante em relação ao potencial zeta é que os valores deste parâmetro não foram superiores a cerca de 30 mV em módulo, para as duas formulações de partículas, em nenhum dos tempos avaliados. A magnitude do potencial zeta indica a estabilidade do sistema coloidal. Se o sistema de partículas em suspensão possui, em módulo, alto valor de potencial zeta, as partículas irão se repelir e não haverá tendência para floculação ou coalescência (McCLEMENTS, 2005). Além disso, um coloide pode ser caracterizado como estável quando seu valor é maior que + 30 mV e menor que - 30 mV (McCLEMENTS, 2005). A presença de cargas negativas nas dispersões de MLS-2 e MLS-4, ainda que tais formulações foram produzidas com tensoativos não-iônicos, pode estar relacionada com interações dos tensoativos com água em dispersão.

Sendo assim, pode-se considerar que as amostras de MLS-2 e MLS-4 mantiveram-se estáveis ao longo do período de 60 dias.

5.2.3.2 Quantificação da oxidação lipídica e da curcumina nas micropartículas lipídicas sólidas

A oxidação é uma das mais importantes causas de deterioração durante o processamento e estocagem de alimentos, alterando o sabor, a cor, bem como a composição nutricional do produto (ASGHAR et al., 1988). O mecanismo de auto-oxidação é uma das principais causas de oxidação em óleos e gorduras (BELITZ; GROSH, 1997; RAMALHO; JORGE, 2006). O processo de oxidação é essencialmente uma reação em cadeia, induzida por radicais dividida em três fases: (i) iniciação; (ii) propagação e (iii) término (Figura 5.8 a).

Figura 5.8—(a) Esquema de representação do mecanismo de auto-oxidação lipídica. (b) Produtos da reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e malondialdeído, formando um composto colorido (cromogênio).

(a)

(b)

5.8(a)-Fonte: RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

5.8(b)-Fonte: OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Testes de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 655, 2005p.

Com a finalidade de se avaliar uma possível degradação das MLS produzidas em consequência da oxidação lipídica, as MLS-2 e MLS-4 foram avaliadas medindo-se a concentração de malonaldeído (MDA) como produto secundário da oxidação.

Os resultados da avaliação de oxidação lipídica ao longo do período de armazenagem em mmol de MDA/kg de MLS são exibidos na Figura 5.9.

A partir dos dados apresentados na Figura 5.9, nota-se que houve um aumento na média da concentração molar de MDA para a MLS-2 até o dia 7, alcançado o máximo valor (0,130 mmol MDA/kg). Depois deste período, a taxa de oxidação da referida amostra sofreu um declínio e permaneceu estável até o fim do estudo de estabilidade, o que ficou evidenciado pelos resultados da avaliação estatística. A MLS-4, no entanto, mostrou-se mais estável ao

longo do período de armazenagem, não apresentando diferença estatística significativa entre as médias de concentrações ($p > 0,05$) em nenhum dos tempos avaliados. Quando as amostras foram comparadas estatisticamente entre si, num mesmo dia de avaliação, elas pouco variaram, exceto para o dia 3 e dia 7.

A presença da goma xantana nas formulações de MLS produzidas pode ter auxiliado na baixa taxa de oxidação lipídica observada, uma vez que se trata de um heteropolissacarídeo que apresenta em sua estrutura moléculas de glicose, manose e ácido glicurônico. A ligação final da manose pode apresentar efeito quelante para os íons de metais pró-oxidantes, inibindo a oxidação lipídica (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; QUINTANA et al., 2002; SUN; GUNASEKARAN; RICHARDS, 2007). Além disso, a utilização de um polissacarídeo na estabilização de sistemas lipídicos permite a redução da difusão de oxigênio devido ao aumento da viscosidade, o que dificulta a oxidação lipídica (PARASKEVOPOULOU, BOSKOU, PARASKEVOPOULOU, 2007). A curcumina também pode ter sido responsável pelos baixos resultados de oxidação lipídica observados, uma vez que por apresentar função antioxidante, esse biotivo impede a peroxidação lipídica, atuando, portanto na proteção de biomoléculas (KUNCHANDY; RAO, 1990).

Figura 5.9 - Resultados das análises de oxidação lipídica para as amostras de micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina. MDA – Malonaldeído. Médias de resultados seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo do período de armazenagem. Médias de resultados seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para amostras diferentes num mesmo dia de avaliação.

Fonte: Própria autoria.

Em relação à preservação da curcumina, a Tabela 5.4 apresenta os valores de concentração de curcumina encapsulada quantificada ao longo do período de 60 dias. Os resultados demonstraram alta capacidade de proteção da curcumina pelas micropartículas partículas sólidas ao longo do período de armazenagem, em ambas as formulações testadas.

Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) ao longo do estudo de estabilidade, tanto para a MLS-2 quanto para a MLS-4. Também não se observou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) ao se compararem os resultados da MLS-2 e MLS-4 num mesmo dia de avaliação. De acordo com Müller, Mader e Gohla (2000) são quatro os fatores que mais influenciam a capacidade de encapsulação de um composto bioativo pela matriz lipídica: a solubilidade do composto no lipídio fundido; a miscibilidade do bioativo com o lipídio fundido; a estrutura físico-química da matriz lipídica e a forma polimórfica apresentada por esta matriz. Tais fatores podem ter influenciado a capacidade de encapsulação da curcumina pela mistura lipídica para a MLS-2 e MLS-4.

Tabela 5.4-Resultados do teste estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas para a concentração de curcumina encapsulada ao longo do período de armazenagem.

Período de armazenagem(dias)	Conc. de curcumina encapsulada (mg/mL)	
	MLS-2	MLS-4
0	2,41 ^{aA} ± 0,43	2,14 ^{aA} ± 0,20
3	2,25 ^{aA} ± 0,27	2,43 ^{aA} ± 0,21
7	2,26 ^{aA} ± 0,03	2,57 ^{aA} ± 0,25
15	2,74 ^{aA} ± 0,34	2,28 ^{aA} ± 0,10
21	2,33 ^{aA} ± 0,12	2,08 ^{aA} ± 0,15
30	2,09 ^{aB} ± 0,04	2,43 ^{aA} ± 0,02
45	2,41 ^{aA} ± 0,19	2,52 ^{aA} ± 0,38
60	2,09 ^{aA} ± 0,16	2,23 ^{aA} ± 0,32

Médias de resultados seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$. Médias de resultados seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma linha apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3.3 Análises colorimétricas das micropartículas lipídicas sólidas

A Figura 5.10 apresenta os resultados dos parâmetros Croma, ângulo de Hue e diferença total de cor (TCD) das MLS ao longo do estudo de estabilidade.

A comparação estatística entre os resultados da MLS-2 e MLS-4 para um mesmo dia de avaliação apontaram que a concentração de tensoativo teve influenciou o parâmetro Croma (mais elevado para MLS-4).

Figura 5.10 – Resultado das avaliações colorimétricas das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) ao longo do período de armazenagem. Médias de resultados seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si a ($p < 0,05$) para a mesma formulação de MLS ao longo do período de armazenagem. Médias de resultados seguidas de letras maiúsculas distintas mostram a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras MLS-2 e MLS-4 num mesmo dia de avaliação.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.11 – Diagrama CieLab com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de nuances (Ângulo de Hue).

Fonte:ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R.M. Qualidade de fruto de aceroleira Cv. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2011. 544p.

Os valores de ângulo de Hue (h_{ab}) se mantiveram relativamente estáveis na região de 103 a 105°, para a MLS-2 e MLS-4 ao longo de todo o estudo de estabilidade. No diagrama de h_{ab} , o valor de aproximadamente 100° representa o amarelo esverdeado (Figura 5.11), associada à curcumina encapsulada. A comparação estatística entre os resultados da MLS-2 e MLS-4 para um mesmo dia de análise apontaram que neste caso, a concentração de tensoativo não teve influência sobre o ângulo de Hue.

Por fim, os valores de TCD se comportaram de maneira semelhante àqueles de Croma, para ambas as formulações. A comparação estatística entre os resultados da MLS-2 e MLS-4 para um mesmo dia de análise apontaram que a concentração de tensoativo teve influência sobre o parâmetro TCD (mais elevado para MLS-2).

O comportamento relativamente estável dos parâmetros colorimétricos concorda com aqueles obtidos para a quantificação de curcumina (Tabela 5.4), os quais também permaneceram estáveis ao longo do estudo de estabilidade, para ambas as formulações de micropartículas estudadas. Neste sentido, os parâmetros colorimétricos podem ser ferramentas úteis para indicar a perda ou não de bioativos encapsulados.

5.3 Produção dos géis mistos de isolado proteico de soro de leite e de goma xantana

5.3.1 Avaliação visual da formação dos géis mistos sem incorporação de micropartículas lípicas sólidas

A Figura 5.12 exemplifica os quatro padrões de estrutura observados após os experimentos de gelificação (descritos no item 4.4.1), os quais foram classificados como descrito a seguir.

1. Gel com água fracamente ligada: caracterizado pelas estruturas que não foram capazes de reter água quando comprimidas;
2. Gel fraco/ muito fraco: estruturas que retiveram parcialmente água, porém, a presença de exsudado foi visível;
3. Gel não autossustentável: estrutura mole, incapaz de suportar o próprio peso;
4. Gel firme: estrutura firme, sem presença de exsudado.

A Figura 5.13 mostra os resultados das avaliações visuais das formulações de géis testadas. As imagens dos géis de todas as formulações testadas são apresentadas no Apêndice A. Os valores de pH das dispersões e do gel para cada formulação testada são apresentados na Tabela 5.5.

Figura 5.12 -Padrões de estruturas dos gel de isolado proteico de soro de leite e goma xantana obtidos neste estudo. (a) Gel com água fracamente ligada; (b) gel fraco/ muito fraco; (c) gel não autossustentável; (d) gel firme.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.13- Avaliação visual dos géis produzidos com diferentes concentrações de IPSL, goma xantana e forças iônicas, após 24 h de produção ($T_{\text{armazenamento}} = 7^\circ\text{C}$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 5.5- Valores de pH das dispersões proteicas (antes da gelificação) e dos géis produzidos para o teste de varredura de concentrações (g componente/ 100 g de dispersão).

Concentração IPSL	Concentração de goma xantana	Concentração salina (M)	NaCl		CaCl ₂	
			pH antes de gelificar	pH gel	pH antes de gelificar	pH gel
8	0	0	6,41	6,36	6,41	6,36
		0,05	6,14	6,27	5,81	5,85
		0,1	6,25	6,35	5,55	5,79
	0,1	0	6,35	6,39	6,35	6,39
		0,05	6,14	6,20	5,88	5,85
		0,1	5,93	6,30	5,74	5,79
	0,2	0	6,38	6,37	6,38	6,37
		0,05	6,15	6,22	5,85	5,85
		0,1	6,18	6,27	5,81	5,81
	0,3	0	6,34	6,40	6,34	6,40
		0,05	6,14	6,15	5,84	5,90
		0,1	6,95	6,30	6,83	5,81
10	0	0	6,41	6,34	6,41	6,34
		0,05	6,30	6,30	5,83	5,82
		0,1	6,21	6,20	6,81	5,79
	0,1	0	6,39	6,37	6,39	6,37
		0,05	6,30	6,30	5,85	5,90
		0,1	6,11	6,20	6,78	5,80
	0,2	0	6,36	6,36	6,36	6,36
		0,05	6,30	6,30	5,81	5,84
		0,1	6,12	6,21	6,65	5,81
	0,3	0	6,36	6,38	6,36	6,38
		0,05	6,15	6,19	5,84	5,85
		0,1	6,33	6,18	5,88	5,81
12	0	0	6,12	6,20	6,12	6,20
		0,05	6,11	6,10	5,82	5,85
		0,1	6,19	6,25	5,90	5,99
	0,1	0	6,17	6,17	6,17	6,17
		0,05	6,13	6,17	5,83	5,85
		0,1	6,15	6,20	5,92	5,94
	0,2	0	6,40	6,40	6,40	6,40
		0,05	6,15	6,15	5,83	5,85
		0,1	6,30	6,31	6,22	5,90
	0,3	0	6,14	6,14	6,14	6,14
		0,05	6,12	6,21	5,88	5,88
		0,1	6,16	6,25	5,98	5,86

Fonte: Própria autoria.

As imagens apresentadas no Apêndice A mostram que todos os géis formados apresentaram aparência opaca (esbranquiçados). De acordo com os dados da Tabela 5.5, pode-se notar que todos os géis produzidos apresentaram valores de pH que variaram entre 5,8 a 6,5. De acordo com Sanchez et al. (1997), géis particulados de IPSL são formados quando o pH é $\leq 6,5$, pois neste caso, a carga superficial das proteínas do soro é baixa e favorece a agregação aleatória proteína-proteína em detrimento das interações proteína-solvente, resultando numa rede heterogênea formada por grandes agregados. Géis opacos e de estrutura heterogênea de β -lg e de proteína do soro são produzidos quando as forças repulsivas são minimizadas (pH próximo do pI ou alta força iônica) (HERMANSSON, 1988; DOI et al., 1989; BRYANT; McCLEMENTS, 1998; COERREDING, 2006). Segundo Doi (1993), géis opacos de β -lg ocorrem na faixa de pH próximas de 4 a 6, que são próximos ao pI desta proteína. A β -lg é a proteína majoritária no IPSL utilizado no presente estudo, como demonstrado na avaliação de SDS-PAGE (Figura 5.3), o que justifica as estruturas dos géis apresentados no Apêndice A. Este resultado concorda com o obtido por Boye et al. (1995), que observou que a gelificação de concentrado proteico de soro de leite acima de 70 °C em pH neutro, pode ser atribuída predominantemente as alterações moleculares da β -lg e minimamente às alterações da α -la.

A opacidade dos géis particulados ocorre porque as partículas têm um tamanho grande o suficiente para espalhar luz. Outros fatores, tais como o tipo e concentração de proteína, temperatura e tempo de aquecimento também influenciam no tipo de estrutura de gel formado (BRYANT; McCLEMENTS, 1998). Numa solução proteica com baixa força iônica, as moléculas protéicas passam a interagir com as cargas resultante da dissociação do sal, causando o aumento da solubilidade da proteína em meio aquoso (interação proteína-solvente), fenômeno denominado “*salting in*”. Porém, em elevada força iônica, a repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas é completamente diminuída e, conseqüentemente, interações proteína-proteína podem ser formadas em qualquer ponto da superfície da molécula proteica, levando à diminuição da solubilidade da proteína e à formação de grandes agregados esféricos (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; DOI, 1993; HONGSPRABHAS; BARBUT, 1997; KITABATAKE; DOI, 1993), efeito este denominado “*salting out*”. Tal fenômeno ocorre porque há uma competição entre os íons do sal e as moléculas proteicas pelas moléculas de solvente (água), sendo que a água tem maior tendência de solvatação das partículas menores (íons) que para partículas maiores (proteína) (ARAKAWA; TIMASHEFF,

1984). A presença de 0,1 M de NaCl e 0,1 M CaCl_2 nos géis provocaram altas forças iônicas capazes de influenciar o tipo de estrutura formada, neste caso, favorecendo a formação de grandes agregados esféricos e consequentemente, géis particulados. De acordo com Kuhn e Foegeding (1991), o CaCl_2 é capaz de aumentar a solubilidade proteica em concentrações muito menores que o NaCl. Além disso, no presente estudo, é preciso considerar que a força iônica (I) nos géis com 0,1 M de CaCl_2 ($I=0,3$ M para CaCl_2) foi mais elevada que nos géis com 0,1 M NaCl ($I=0,1$ M para NaCl). Tanto os sais monovalentes quanto os sais divalentes podem formar interações eletrostáticas entre as moléculas proteicas carregadas, no entanto, os cátions divalentes tais como o Ca^{+2} podem ter um efeito adicional sobre a reticulação dos grupos de ácidos carboxílicos carregados negativamente (BRYANT; McCLEMENTS, 1998; BRYANT; McCLEMENTS, 2000a).

Pode-se observar a partir dos dados da Figura 5.12 e do Apêndice A que a maior parte das formulações testadas não resultou em estruturas firmes e capazes de reter água. Algumas formulações eram frágeis ou quebradiças e/ou não formaram gel autossustentável. Géis particulados de β -lg sofrem menores alterações conformacionais antes da agregação e podem ser mais rígidos e menos elásticos que géis formados pelo processo de agregação linear (STADING, HERMANSSON, 1990).

A concentração mássica de 8 % de IPSL mostrou-se insuficiente para produzir géis em qualquer condição avaliada. Na referida concentração ou se produziu uma estrutura incapaz de reter água quando comprimida ou estruturas tão fracas que foram incapazes de suportar seu próprio peso (formaram apenas um coágulo). A concentração de 10 % de IPSL resultou em géis mais firmes apenas nas formulações com 0,3 % de goma xantana e 0,1 M tanto de NaCl quanto CaCl_2 . Por fim, a concentração de 12 % de IPSL foi a que apresentou géis mais firmes com 0,2 % de goma xantana, para qualquer concentração salina, exceto para 0,05 M de CaCl_2 .

Vale ressaltar, que em qualquer uma das três concentrações de IPSL avaliadas, os géis que não tinham adição de goma xantana em sua composição foram incapazes de reter água quando comprimidos manualmente, como ilustrado na Figura 5.12. No entanto, quando incorporada qualquer concentração do referido polissacarídeo, não mais se obteve as estruturas classificadas como “gel com água fracamente ligada”.

Apesar de não apresentar a capacidade de gelificar, quando combinada com outros biopolímeros, a goma xantana pode apresentar efeito sinérgico. A presença de polissacarídeos exerce um importante papel sobre a estrutura e estabilização de proteínas (DICKINSON,

1993). Interações entre proteínas e polissacarídeos podem ser atrativas e se forem suficientemente fortes, ocorre a formação de um complexo proteína-polissacarídeo, em condições favoráveis (TOLSTOGUZOV, 1997). Este fenômeno é denominado coacervação ou incompatibilidade termodinâmica e ocorre devido a atração eletrostática entre as cargas opostas dos biopolímeros (SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998).

Neste caso, a goma xantana foi crucial para o aprisionamento da água no interior da estrutura proteica, sendo o valor de 0,2 % GX o que mais contribui com a firmeza do gel, pois em menores valores e na concentração 0,3 % da goma foi excessiva, os géis ficaram menos firmes. A hipótese é que na concentração de 0,02 % GX houve miscibilidade com o IPSL e não houve separação de fases no gel biopolimérico. Sanchez et al. (1997), avaliando a influência da concentração de goma xantana (0,05-0,5 % m/m) e do pH (5,5 -7,5) sobre a estrutura de géis com 14 % (m/m) de IPSL, concluíram que concentrações baixas da goma (0,05-0,1 %), possuem um efeito sinérgico na estrutura dos géis, promovendo maior rigidez, dependendo do pH. No entanto, para altas concentrações da goma (0,2-0,5 %), nota-se um efeito antagônico no qual a rigidez do gel diminui, independente do pH. De acordo com os autores, isso se deve ao fato de em que altas concentrações de goma xantana, haverá uma maior heterogeneidade do sistema, com uma rede de grandes agregados protéico que interagem fracamente. Em altas concentrações de goma xantana, o sistema apresentou separação de fases, as quais concentram, provavelmente, cada biopolímero em fases distintas, resultando num aumento da viscosidade da blenda biopolimérica. Uma alta concentração de IPSL promove extensivas interações proteína-proteína quando o sistema é aquecido, formando grandes agregados. O aumento da viscosidade reduz a capacidade dos grandes agregados protéicos interagirem e de formarem estruturas mais rígidas (ZASYPIN; DUMAY; CHEFTEL, 1996; SANCHEZ et al., 1997). Logo, com base nos resultados da varredura de concentrações realizadas, optou-se por três formulações de gel para dar seguimento ao estudo, todas com 12 % de IPSL/0,2 % xantana e nas concentrações salinas de 0 M ou 0,1 M de NaCl ou CaCl₂. Em todos os casos, os valores de pH foram ajustados para 6,5, utilizando-se NaOH 0,1 M.

5.4 Produção e caracterização reológica dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas

Como descrito no item 4.5.1, diferentes proporções mássicas de MLS-2 e MLS-4 encapsulando curcumina foram incorporadas ao gel com 12 % de IPSL/0,2 % de xantana sem adição de sal.

Vale ressaltar que as proporções de MLS-2 ou MLS-4 incorporadas ao gel proteico foram de 25 e 50 g/100 g de gel (substituição parcial da água do sistema) e 88 g/100 g de gel (substituição total da água do sistema).

Tal experimento teve por objetivo verificar a quantidade de MLS que poderia ser incorporada ao gel e como a estrutura do sistema seria afetada por tal incorporação, por isso decidiu-se inicialmente não adicionar os sais à formulações de gel. A Figura 5.14 mostra as imagens dos géis carregados com MLS produzidos nesta etapa do estudo.

Figura 5.14 - Géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e sem adição de sal carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina.

Fonte: Própria autoria.

As imagens da Figura 5.14 mostram que os géis proteicos carregados com diferentes proporções de MLS encapsulando curcumina apresentaram uma estrutura firme, sem a presença de exsudado. A coloração amarela das MLS (em função da curcumina encapsulada) nos géis também se tornou mais forte com o aumento da incorporação de MLS.

5.4.1 Ensaios mecânicos dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas

As propriedades mecânicas de resistência à compressão uniaxial para as formulações de géis carregados sem adição de sal estudadas nesta etapa são apresentadas na Figura 5.15.

Figura 5.15 - Resultados dos ensaios de compressão uniaxial de géis 12 % IPSL/0,2 % GX em gel não-carregado (sem MLS) e géis carregados com diferentes concentrações de micropartícula lipídicas sólidas (MLS). Médias seguidas pela mesma letra minúscula são estatisticamente iguais a $p < 0,05$ para o gel não-carregado e gel carregado com diferentes formulações de MLS. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula são estatisticamente iguais a $p < 0,05$ para géis carregados com diferentes concentrações de um mesmo tipo de MLS. Médias $\pm$ desvio padrão de cinco medições.

Fonte: Própria autoria.

A presença de componentes tais como as micropartículas lipídicas sólidas incorporadas aos géis alimentícios, favorecem a heterogeneidade das estruturas de gel e impactam nas suas propriedades mecânicas (OLIVER; WIECK; SCHOLTEN, 2016). As gotículas de emulsão em géis carregados podem estar mecânicamente ligadas à matriz gelificada e assim sendo, elas são consideradas partículas ativas; caso contrário, se não estiverem mecânicamente ligadas à matriz, são consideradas partículas inativas (SALA et al., 2009 a,b).

No caso das partículas ativas, o módulo elástico ou módulo de Young da matriz gelificada (E_m) pode sofrer aumento ou diminuição, dependendo do módulo da partícula (E_p). Se $E_p > E_m$, então a estrutura do gel será reforçada. Porém, a resistência da matriz do gel sempre irá diminuir se as partículas forem inativas (SALA et al., 2007).

A Figura 5.15 mostra que houve impacto da presença das diferentes proporções de MLS-2 e MLS-4 sobre as propriedades mecânicas dos géis carregados. Para os géis carregados com 25 e 50 % MLS-2, os efeitos de tais concentrações sobre as propriedades mecânicas investigadas não foi significativo ($p > 0,05$). Ao contrário, para a máxima concentração de MLS-2 no gel (88 %), nota-se grande aumento da rigidez do gel (E) e aumento da tensão de ruptura (σ_{rup}).

No caso da presença de MLS-4 nos géis mistos, se observa que as concentrações de 25 e 50 % diminuíram a força do gel, mas a máxima concentração de 88 % provocou aumento da força do gel. Nota-se, porém, que o gel com 88 % MLS-2 apresentou maior rigidez e maior tensão de ruptura que aquele com a mesma concentração de MLS-4, exceto para a deformação de ruptura (ϵ_{rup}).

De acordo com Sala et al. (2009b), com o aumento da fração volumétrica de óleo no gel (ϕ), o módulo de Young irá aumentar para partículas ativas e irá diminuir no caso de partículas inativas, seguindo a teoria de van der Poel. Em um estudo que investigou o impacto de diferentes biopolímeros na produção de géis carregados e diferentes tipos de tensoativos para a produção de gotas de emulsão ativas e inativas, percebeu-se que o aumento de ϕ não apresentou efeitos sobre σ_H dos géis para partículas ativas e provocou diminuição de σ_H para partículas inativas. Com relação à deformação, notou-se que o aumento de ϵ_H diminuiu para partículas ativas e não sofreu alterações para partículas inativas (SALA et al., 2009a). No presente estudo, a Figura 5.15 mostra que o aumento da concentração de MLS-2 e MLS-4 no gel provocou aumento de E e σ_{rup} , mas não causou alteração em ϵ_{rup} com exceção do gel carregado com 88 % MLS-2.

Portanto, é possível concluir que nos géis mistos carregados com 25 e 50 % (em ambas as formulações de partículas), o comportamento das MLS foi típico de partículas inativas. Porém, a concentração de 88 % MLS na matriz gelificada fez com que as partículas se comportassem como ativas. Tais efeitos podem estar relacionados à facilidade ou a dificuldade que as partículas mostraram para se ligar à estrutura porosa do gel. Como apresentado na sessão 5.3 e foi confirmado nas imagens de MEV e microscopia confocal (Figuras 5.19 a 5.21), os géis obtidos neste estudo foram formados pelo processo de agregação aleatória, originando estruturas porosas e heterogêneas. Os valores de E e de σ são muito afetados pela porosidade da matriz, porém, pequeno é o efeito sobre ε (SALA et al., 2009b). Assim sendo, a hipótese é de que menores concentrações de MLS (25 e 50 %) permitiram alta mobilidade das partículas no gel e, portanto, as interações partícula-matriz não foram favorecidas e as partículas atuaram como inativas. Por outro lado, com o aumento da concentração de MLS no gel para 88 % houve redução da mobilidade das partículas através matriz gelificada, o que favoreceu as interações partícula-matriz e as partículas atuaram como ativas.

Segundo Chen e Dickinson (2000), gotículas de emulsão estabilizadas por tensoativos não-iônicos, tais como polisorbatos, incorporadas a géis de IPSL produzidos por aquecimento, apresentaram comportamento de partículas inativas. Os tensoativos não-iônicos promovem alta estabilidade em emulsões e, supostamente, interagem pouco com a rede proteica (McCLEMENTS; MONAHAN; KINSELLA, 1993). No entanto, o que se notou neste estudo foi a ocorrência de uma possível interação tensoativo-proteína nas formulações de gel com 88 % MLS, uma vez que as cadeias de tensoativo podem ter interagido fortemente com as cadeias proteicas, formando um complexo (BOS; VAN VLIET, 2001; NYLANDER et al., 2008). A porção hidrofílica dos tensoativos não-iônicos pode alterar estericamente a conformação estrutural proteica e por consequência, resíduos hidrofóbicos da proteína podem ficar expostos, permitindo interações com as gotas de emulsão (NYLANDER et al., 2008). Logo, para máxima concentração de MLS no gel, interações partícula-proteína podem ter sido mais intensas e mais efetivas, causando o reforço da estrutura do gel.

O fato de a incorporação de 88 % MLS-2 ter tido maior efeito sobre a resistência do gel pode ser atribuído a menor estabilidade destas partículas quando comparadas às partículas MLS-4. A partícula com menor concentração de tensoativo (MLS-2), portanto, com interface menos empacotada (menor quantidade de moléculas de

tensoativos revestindo a interface) poderia ter permitido que a matriz proteica formasse interações proteína-tensoativo, as quais foram fortes o suficiente para aumentar a rigidez do gel. Apesar de no item 5.2 ter sido comentado a baixa variação entre a estabilidade das duas formulações de MLS para os parâmetros lá descritos, deve-se levar em conta que o processo de gelificação e a presença de biopolímeros pode ter efeitos sobre a estabilidade das MLS.

5.4.2 Caracterização reológica dinâmica oscilatória dos géis carregados com diferentes proporções de micropartículas lipídicas sólidas

As avaliações de varredura de deformação para a determinação da região de viscoelasticidade linear (RLV) das amostras dos géis MLS-2/SS e MLS-4/SS carregados com diferentes concentrações de partícula, demonstraram que os intervalos de RLV foram de 0,01 a 10 % de deformação. Sendo assim, qualquer valor de deformação selecionado dentro deste intervalo para a realização do teste de varredura de frequência garante dados dentro do intervalo de linearidade.

Após a determinação da RLV, procedeu-se aos ensaios de varredura da frequência, os quais foram realizados a uma deformação de 1 %. Testes preliminares que levaram em conta outros valores de deformação dentro da RVL determinada, apontaram que o valor de 1 % seria a máxima deformação possível em função da probe com geometria de placas planas escolhida no ensaio.

Os gráficos de varredura da frequência são apresentados na Figura 5.16 mostram que os géis avaliados nesta etapa do estudo apresentaram independência com a variação da frequência, no intervalo avaliado. Os valores de G' foram cerca de dez vezes maiores que os valores de G'' , o que é um comportamento típico de géis de IPSL ligados por interações não-covalentes, isto é, “géis físicos” (ROSS-MURPHY, 1991).

Os resultados para os géis incorporados de MLS-2 (Figura 5.16.a) indicaram que a maior concentração de partículas diminuiu o valor de G' do gel. Desta forma, o aumento da incorporação das MLS-2 levou as partículas a se comportarem como inativas. Por outro lado, para os géis carregados com MLS-4, apesar de todos os valores de G' e G'' terem sido menores que aqueles apresentados pelos géis não-carregados, portanto, partículas inativas, o aumento da concentração de MLS-4 promoveu aumento da elasticidade do gel.

Figura 5.16 – Valores dos módulos viscoelásticos para os géis 12 % IPSL/0,2 % GX sem adição de sal incorporados com 0, 25, 50 ou 88 % MLS-2 (A) e MLS-4 (B). Símbolos cheios representam o módulo de armazenamento (G'): $\blacklozenge$ géis não-carregados; $\blacktriangle$ 25, $\blacksquare$ 50 e $\bullet$ 88 % MLS. Símbolos vazios representam o módulo de perda (G''): $\lozenge$ géis não-carregados; $\triangle$ 25; $\square$ 50 e $\circ$ 88 % MLS.

Fonte: Própria autoria.

O comportamento de partículas inativas para MLS-2 e MLS-4 incorporadas aos géis nos ensaios reológicos à pequena deformação (independentemente da concentração) foram distintos daquele apresentados para os ensaios mecânicos em função das diferenças entre estes ensaios. Os ensaios mecânicos foram realizados após 5 dias da produção dos géis armazenados sob refrigeração, enquanto que os ensaios reológicos oscilatórios foram realizados a 30 °C e imediatamente após a gelificação *in situ*. As interações não-hidrofóbicas formadas durante a etapa de redução da temperatura de gelificação podem aumentar a força do gel (BRYANT, McCLEMENTS, 1998). Além disso, o estado físico dos óleos na partícula também pode ter influenciado o comportamento das mesmas como ativas ou inativas para os ensaios mecânico e

oscilatório. A temperaturas de fusão do óleo de babaçu e da triestearina foram cerca de 23 °C e 50 °C, respectivamente (item 5.2.2.1), logo, na temperatura utilizada no ensaio de compressão uniaxial, os lipídios emulsificados estavam sólidos. Já nos ensaios oscilatórios, o óleo de babaçu estaria líquido, o que pode ter influenciado no comportamento do gel. Deve-se ainda levar em conta que o envelhecimento dos géis submetidos ao ensaio de mecânicos (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), realizada após 5 dias de produção dos géis. A formação de ligações nos géis não é algo estático e pode sofrer alterações de maneira espontânea ou pela ação de forças externas durante o processo de envelhecimento do gel (MELLEMA et al., 2002; RENARD; VAN DE VELDE; VISSCHER, 2006). De acordo com Renard, Van de Velde e Visscher (2006), as alterações sofridas pelo gel durante o envelhecimento podem afetar seu comportamento reológico e a firmeza destes sistemas pode aumentar.

A partir dos dados obtidos pelos ensaios mecânicos e reológicos nesta etapa do estudo, a concentração de 88 % MLS de partículas foi definida como aquela a ser incorporada tanto nos géis sem sal como nos géis com NaCl e CaCl₂. Esta escolha também foi feita pelo fato de possibilitar a maior concentração de curcumina encapsulada nos géis. As Figuras 5.17 e 5.18 mostram as imagens dos géis incorporados de 88 % MLS para darem continuidade ao estudo.

Figura 5.17 - Géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e diferentes forças iônicas carregados com 88 % de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.18- Corte transversal dos géis com 12 % de IPSL; 0,2 % goma xantana e diferentes forças iônicas carregados com 88 % de micropartículas lipídicas sólidas (MLS) com 2 % ou 4 % de tensoativo encapsulando curcumina

Fonte: Própria autoria.

As imagens apresentadas nas Figuras 5.17 e 5.18 mostram que os géis carregados obtidos foram homogêneos, não sendo identificada visualmente qualquer separação de fases.

5.5 Caracterização dos géis não-carregados e carregados com micropartículas lipídicas sólidas e diferentes forças iônicas

5.5.1 Umidade espremível (UE) e capacidade de retenção de água (CRA)

A umidade espremível dos géis é apresentada na Tabela 5.7, bem como a capacidade de retenção de água. Nota-se que os resultados de UE e CRA foram baixos para todas as amostras analisadas, independente da incorporação ou não da dispersão de MLS-2 e MLS-4. Houve um pequeno aumento da CRA dos géis com partículas com relação aos géis sem partículas (maior para MLS-4 do que para MLS-2).

Os resultados obtidos no presente estudo discordam daqueles encontrados por Gwartney, Larick e Foeding (2004), que, ao estudarem diferentes formulações de géis filamentosos e géis particulados de IPSL (12 %) carregados com diferentes concentrações salinas e de óleo de girassol, concluíram que para os géis filamentosos, a CRA foi de 100 % independentemente da concentração de óleo no gel. Porém, para os géis particulados, o aumento da concentração de emulsão no gel aumentou a CRA de 60 % no gel sem óleo para 80 % no gel com 20 % de óleo.

Tabela 5.7 -Umidade espremível (UE) e capacidade de retenção de água (CRA) dos géis com 12% IPSL e 0,2 % goma xantana com e sem incorporação das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas (MLS-2 e MLS-4).

Parâmetro	Amostras		
	SP/SS	MLS-2/SS	MLS-4/SS
UE (%)	72,86 ^{aA} ± 0,79	59,96 ^{aA} ± 8,91	53,83 ^{aA} ± 8,43
CRA (%)	27,14 ^{bA} ± 0,79	40,04 ^{aA} ± 8,91	46,17 ^{aA} ± 8,43
	SP/NaCl	MLS-2/NaCl	MLS-4/NaCl
UE (%)	76,56 ^{aA} ± 1,03	74,46 ^{aA} ± 2,91	73,23 ^{aA} ± 4,63
CRA (%)	23,44 ^{aA} ± 1,03	25,54 ^{aA} ± 2,91	26,77 ^{aA} ± 4,63
	SP/CaCl ₂	MLS-2/ CaCl ₂	MLS-4/ CaCl ₂
UE (%)	72,46 ^{aA} ± 5,79	70,40 ^{aA} ± 12,11	67,54 ^{aA} ± 0,68
CRA (%)	27,54 ^{aA} ± 5,79	29,60 ^{aA} ± 12,11	32,46 ^{aA} ± 0,68

Médias de resultados seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$. Médias de resultados seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ para uma mesma variável (CRA ou UE).
Fonte: Própria autoria.

Como já discutido anteriormente, os géis obtidos no presente estudo apresentam estrutura particulada. Géis particulados apresentam uma estrutura dura/quebradiça e liberam grande quantidade de água quando comprimidos (CHANTRAPORNCHAI; McCLEMENTS, 2002; IKEDA; FOEGEDING; HAGIWARA, 1999). A menor CRA deste tipo de gel deve-se a presença de grandes poros, o que interfere na sua capacidade de reter o solvente através de forças capilares (ZIEGLER; FOEGEDING, 1990) e, como consequência, poderá haver maior liberação de água (PAZ; NETTO, 2006).

A adição de sal (NaCl ou CaCl₂) nos géis pode ter promovido altos valores de UE e baixos valores CRA em função do efeito “*salting out*”, ou seja, num meio com alta força iônica, houve alteração de cargas da proteína, favorecendo interações atrativas proteína-proteína, o que promoveu a agregação ou precipitação proteica (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984). Desta forma, houve um menor número de interações proteína-solvente, além do aumento da porosidade do gel em função da agregação proteica, permitindo a maior liberação da água do sistema (sinérise).

As micrografias dos géis apresentadas no item 5.5.2 evidenciam a presença de poros na estrutura dos géis biopoliméricos sem MLS e carregados com MLS investigados neste estudo.

Picone, Takeuchi e Cunha (2011) identificaram que géis proteicos combinando IPSL (10, 13 ou 15 % m/v) e caseinato de sódio (0 ou 5 % m/v) em diferentes valores de pH (5,8 ou 6,7) apresentaram menor CRA quando comparados a géis produzidos apenas

com IPSL. O pH próximo ao pI da amostra, além da porosidade dos géis produzidos a pH 5,8 foi uma das justificativas para os baixos valores de CRA determinados.

5.5.2 Microestrutura dos géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas

As micrografias obtidas por MEV e as imagens da microscopia confocal apresentadas nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21 foram utilizadas para a caracterização da microestrutura dos géis não-carregados (SP/SS, SP/NaCl e SP/CaCl₂) e géis carregados com MLS-2 (MLS-2 /SS, MLS-2 /NaCl e MLS-2/CaCl₂) e com MLS-4 (MLS-4 /SS, MLS-4 /NaCl e MLS-4/CaCl₂), respectivamente.

As imagens das Figuras 5.19 a 5.21 confirmam a estrutura particulada, heterogênea e muito porosa dos géis, como já discutido anteriormente. Grandes agregados esféricos proteicos de diferentes tamanhos podem ser visualizados de maneira mais clara nas micrografias obtidas por MEV. A estrutura porosa foi associada tanto ao tipo de gel formado quanto a presença de bolhas de ar, que podem ter sido incorporadas aos géis durante o processo de produção.

Nas Figuras 5.20 e 5.21 pode-se observar claramente a presença das MLS incorporadas à matriz biopolimérica (círculos amarelos/laranjas/vermelhos). As imagens da microscopia confocal mostram as partículas de diferentes tamanhos homogeneamente distribuídas na rede de gel. Desta forma, pode-se observar que não ocorreu separação de fases nos géis.

Nas micrografias obtidas por MEV (5.19 a 5.21 (a), (c) e (e)), pode-se observar a presença de finos filamentos envolvendo os agregados proteicos. A presença destes filamentos foi destacada na Figura 5.22 e associados à presença da goma xantana. Zasytkin, Dumay e Cheftel (1996) visualizaram o mesmo tipo de filamentos em micrografias de géis de β -lg/GX e atribuíram a presença destas finas redes à precipitação da GX durante a etapa de desidratação do gel. É possível observar miscibilidade dos biopolímeros, uma vez que de maneira geral, os agregados proteicos e a goma xantana não apresentaram separação de fases.

Figura 5.19 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos sem incorporação de micropartículas lipídicas sólidas: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl_2 (e) e (f). A cor verde nas imagens (b), (d) e (f) representam a matriz proteica.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.20 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos com incorporação de micropartículas lipídicas sólidas com 2 % de tensoativos: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl_2 (e) e (f). A cor verde representa a matriz proteica e as cores amarelo/laranja/vermelho representam as micropartículas lipídicas sólidas nas imagens (b), (d) e (f).

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.21 -Micrografias e imagens da microscopia confocal dos géis biopoliméricos mistos com incorporação de micropartículas lipídicas sólidas com 4 % de tensoativos: sem adição de sal (a) e (b); com 0,1 M de NaCl (c) e (d) e com 0,1 M de CaCl_2 (e) e (f). A cor verde representa a matriz proteica e as cores amarelo/laranja/vermelho representam as micropartículas lipídicas sólidas nas imagens (b), (d) e (f).

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.22 – Detalhe da rede formada pela presença de goma xantana (indicada pela seta) nos géis carregados com MLS.

Fonte: Própria autoria.

5.5.3 Caracterização mecânica géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com micropartículas lipídicas sólidas com diferentes forças iônicas

As amostras apresentadas na Tabela 4.5 foram submetidas aos ensaios de compressão uniaxial para a caracterização mecânica. A Tabela 5.8 apresenta os resultados para as amostras sem adição de sal e com 0,1 M NaCl. As amostras produzidas com 0,1 M CaCl_2 não apresentaram estrutura capaz de suportar o próprio peso e portanto, não foi possível realizar os ensaios mecânicos.

O módulo de elasticidade, ou módulo de Young (E), e os valores de tensão de ruptura foram maiores para as amostras sem adição de sal, do que para aquelas com NaCl, exceto para o gel MLS-4/NaCl. Novamente, destaca-se o efeito “*salting out*”, já descrito no item 5.5.1, pois a alta força iônica favorece a interação entre os agregados proteicos da matriz gelificada por meio de ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (DEMETRIADES; McCLEMENTS, 1998). O aumento do tamanho dos agregados proteicos bem como a diminuição do número de contatos proteína-proteína nos géis particulados em altas forças iônicas causam a diminuição do módulo elástico do gel (CHANTRAPORNCHAI; McCLEMENTS, 2002). Logo, para as condições de produção dos géis do presente estudo (90 °C/30 min e pH 6,5), a concentração de 0,1 M NaCl foi muito alta e incapaz de aumentar a força do gel (devido ao efeito “*salting out*”). A força iônica dos géis carregados adicionados de 0,1 M CaCl_2 foi superior à

força iônica dos géis carregados com 0,1 M NaCl (como mencionado no item 5.3.1) e, desta forma, o efeito *salting out* foi mais pronunciado para os géis contendo CaCl_2 . Géis de proteína globular contendo sais de cátions divalentes (a exemplo do CaCl_2) tem sua rigidez aumentada em concentrações de sal muito menores do que géis contendo sais de cátions monovalentes (a exemplo do NaCl) (FOEGEDING; BOWLAND; HARDIN, 1995). Íons divalentes como o cálcio são mais efetivos que os monovalentes, tipo sódio ou potássio, provavelmente devido à maior afinidade dos sítios de ligação carboxílicos e as ligações intermoleculares (CORREDIG, 2006).

Quanto à presença de MLS, o gel MLS-2/SS foi o mais rígido (maior valor de E) e o que mais resistiu a compressão antes de sofrer ruptura e a justificativa para este comportamento já foi discutida no item 5.4.1.

Tabela 5.7 – Resultados dos ensaios mecânicos dos géis com 12% IPSL e 0,2 % goma xantana não-carregados (SP) e carregados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS) sem adição de sal (SS) ou com adição de 0,1 M NaCl.

	E (kPa)	σ_{rup} (kPa)	ϵ_{rup}
SP/SS	$6,75 \pm 1,13^b$	$2,24 \pm 0,82^{bc}$	$0,32 \pm 0,09^b$
SP/NaCl	$4,63 \pm 0,32^c$	$1,52 \pm 0,16^c$	$0,34 \pm 0,04^{ab}$
MLS-2/SS	$13,55 \pm 0,79^a$	$5,30 \pm 0,61^a$	$0,42 \pm 0,06^{ab}$
MLS-2/NaCl	$4,12 \pm 0,45^c$	$1,55 \pm 0,23^c$	$0,40 \pm 0,02^{ab}$
MLS-4/SS	$7,67 \pm 1,54^b$	$2,58 \pm 0,79^{bc}$	$0,39 \pm 0,04^{ab}$
MLS-4/NaCl	$7,13 \pm 0,59^b$	$2,67 \pm 0,29^b$	$0,43 \pm 0,03^a$

Médias de resultados seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa a $p < 0,05$.

Fonte: Própria autoria.

5.5.4 Caracterização reológica dinâmica oscilatória

As avaliações de varredura de deformação para todas as formulações estudadas apresentadas na Tabela 4.5 mostraram que a região de viscoelasticidade linear (RLV) ficou entre 0,01 a 10 % de deformação. Sendo assim, qualquer valor de deformação selecionado dentro deste intervalo para a realização do teste de varredura de frequência garante dados dentro do intervalo de linearidade. Foi observado também que nas formulações avaliadas os valores do módulo armazenamento (G') foram muito maiores que o módulo de perda (G''), caracterizando um comportamento de um sólido viscoelástico (DICKINSON, 2012; YAMAMOTO; DICKINSON, 1997). A presença de

sal nos géis, bem como das micropartículas lipídicas sólidas não influenciaram os valores de G' e G'' quando comparados à formulação sem sal e sem partículas (SP/SS).

Após a determinação da RLV, procedeu-se a avaliação do comportamento de G' e G'' em função da variação da frequência sobre os géis. Este teste foi realizado a uma deformação de 1 %. Testes preliminares que levaram em conta outros valores de deformação dentro da RVL, apontaram que o valor de 1 % seria a máxima deformação possível dentro das condições operacionais escolhidas para o teste. Os gráficos de varredura da frequência são apresentados nas Figuras 5.23 e 5.24.

As Figura 5.23 e 5.24 mostram, que assim como já descrito no estudo reológico do item 5.4.2, G' e G'' não apresentaram dependência com a variação da frequência no intervalo investigado, o que é um comportamento típico de um gel de proteína globular (sólido visco-elástico) formado por aquecimento por meio ligações cruzadas não-covalentes (gel físico) (FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2008; ROSS-MURPHY, 1984).

A Figura 5.23 mostra a comparação para os ensaios reológicos dos géis com mesma força iônica. Na Figura 5.23(a), a comparação entre os géis não-carregados (SP/SS) e carregados sem adição de sal, mostra que o gel MLS-4/SS apresentou maiores valores de G' e G'' e que o gel MLS-2/SS, os menores valores. O tipo de MLS incorporada ao gel influenciou no comportamento reológico destes sistemas. O comportamento do gel MLS-2/SS concordou com aquele discutido no item 5.4.2, no qual a partícula MLS-2 atuou como inativa por causar a diminuição dos módulos viscoelásticos G' e G'' do gel quando comparada com a amostra SP/SS. No entanto, para o gel MLS-4/SS na Figura 5.23(a) esta amostra aparece com o maior valor de G' , tendo a dispersão MLS-4 atuado como ativa, o que contraria a discussão do item 5.4.2. Destaca-se, porém, que os valores de G' e G'' para SP/SS e MLS-4/SS foram muito próximos e que a heterogeneidade e porosidade da estrutura do gel, discutidas anteriormente e demonstrada pelas imagens de microestrutura, pode ter influenciado os resultados reológicos oscilatórios nesta situação.

Figura 5.23- Módulos viscoelásticos em função da frequência dos géis não-carregados (SP) e géis carregados com micropartículas lipídicas sólidas (MLS), produzidos com 12 % (m/m) de IPSL e 0,2 % (m/m) de goma xantana e diferentes forças iônicas. Símbolos preenchidos representam o módulo de armazenamento (G') e os vazios o módulo de perda (G'').

Para as amostras dos géis não-carregados e carregados e concentração 0,1 M NaCl (Figura 5.23(b)), a presença das partículas diminuíram os valores de G' e G'' dos

géis e MLS-2 e MLS-4 atuaram como inativas. Os valores de G' e G'' para MLS-4/NaCl foram superiores àqueles da amostra MLS-2/NaCl e o tipo de partícula incorporada influenciou no comportamento reológico destes géis. Em relação aos géis não-carregados e carregados e concentração 0,1 M CaCl_2 (Figura 5.23(c)), SP/ CaCl_2 e MLS-4/ CaCl_2 apresentaram valores próximos para G' e G'' e MLS-2/ CaCl_2 foi a amostra com menores valores de G' e G'' . Também nesta situação, as partículas atuaram como inativas e a concentração de tensoativos influenciou no comportamento reológico dos géis carregados.

De maneira geral, a presença das MLS-2 nos géis carregados causou um enfraquecimento da matriz biopolimérica (menores valores de G' e G'') numa maior proporção que aquela observada para os géis carregados com MLS-4 e este resultado concordou com aquele descrito no item 5.4.2. Como já foi sugerido anteriormente, a menor concentração de tensoativos na micropartícula pode estar associada à menor estabilidade da MLS-2 ao processo de gelificação. O fato do processo de gelificação ser conduzido a 90 °C por 30 min pode permitir que as MLS sofram agregação devido às atrações de van der Waals, interações hidrofóbicas e de depleção (SALA et al.,2007). Desta forma, uma provável agregação das partículas durante a gelificação dos géis carregados com MLS-2 poderia explicar a menor resistência destas amostras frente as forças de cisalhamento.

5.5.5 Estabilidade dos parâmetros colorimétricos

A Figura 5.24 apresenta os gráficos da avaliação dos parâmetros croma, ângulo de Hue e TCD (*total color difference*, ou diferença total de cor) calculados a partir dos parâmetros $L^*a^*b^*$ (sistema CieLab) medidos para os géis não-carregados e carregados ao longo de 30 dias.

Como já comentado anteriormente, nos géis não-carregados, a curcumina em pó foi adicionada à dispersão biopolimérica antes do processo de gelificação. Os géis com “curcumina livre” foram utilizados como referência para avaliar o efeito da microencapsulação do curcuminóide sobre a estabilidade da cor.

Os valores de croma (saturação da cor, C^*_{ab}) ficaram entre 60 e 70 para praticamente todas as amostras durante 30 dias. As amostras SP/SS e MLS-4/NaCl foram as únicas que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) ao longo do tempo de avaliação. As amostras incorporadas de MLS-4 também apresentaram os menores desvios padrões, provavelmente em função da estabilidade da MLS dada as maiores

concentrações de tensoativos. Para o valor de C^*_{ab} , a encapsulação da curcumina mostrou-se importante, principalmente para as amostras sem adição de sal.

Em relação ao ângulo de Hue, estes valores foram próximos a 100 para todas as amostras de géis não-carregados e carregados em todos os dias de avaliação. O efeito da encapsulação do curcuminoide não apresentou influência sobre o referido parâmetro. Como discutido no item 5.2.2.4, o valor de 100 no diagrama do ângulo de Hue representa a coloração amarela-esverdeada que é a mesma apresentada pelas MLS-2 e MLS-4 em função da presença da curcumina encapsulada.

Por fim, em relação aos valores de TCD (diferença total de cor) estes apresentaram variações estatísticas apenas para SP/SS e MLS-4/SS; porém, os desvios-padrões foram muito altos, principalmente nas amostras com curcumina livre. Os menores valores de desvios-padrão foram observados nos géis com MLS-4, mostrando que o processo de microencapsulação do curcuminóide e que a maior concentração de tensoativos na MLS foi importante para manter menores valores de TCD.

De maneira geral, a microencapsulação da curcumina foi vista como vantajosa para a estabilidade do valor de C^*_{ab} nos géis carregados e sem adição de sal. Para os valores de ângulo de Hue, a encapsulação do curcuminoide estatisticamente não interferiu na estabilidade deste parâmetro ao longo do tempo. No entanto, a microencapsulação da curcumina foi muito vantajosa para a estabilidade dos valores de TCD, uma vez que as amostras de géis adicionados de curcumina livre apresentaram altos valores de desvios-padrão para o referido parâmetro quando comparados aos géis carregados. A maior estabilidade atribuída à MLS-4 também foi importante para garantir a proteção do curcuminóide ao longo de 30 dias de avaliação.

Figura 5.24 – Valores de croma (C^*_{ab}), ângulo de Hue (h°) e diferença total de cor (TCD) para os géis não-carregados (sem partícula – SP) e géis carregados: sem adição de sal (a,d e g); com adição de 0,1 M NaCl (b, e e h) e com adição de 0,1 M CaCl_2 (c, f e i). Médias seguidas por mesma letra minúscula são estatisticamente diferentes a $p < 0,05$ para uma mesma amostra ao longo do tempo.

Fonte: Própria autoria autoria.

5.6 Ensaios de digestibilidade *in vitro*

A última etapa desta Tese contemplou a avaliação da digestibilidade *in vitro* das dispersões MLS-2 e MLS-4, dos géis não-carregados e carregados.

Como descrito no item 4.7.3, foram definidos dois protocolos distintos para se monitorar a fase gástrica da digestão simulada. Todas as formulações de géis não-carregados e carregados, sem adição de sal e com 0,1 M NaCl, foram selecionadas para esta fase do estudo. Os géis não-carregados e carregados com concentrações salinas de 0,1 M CaCl₂ foram descartados pois apresentaram características reológicas que menos contribuíram com o reforço estrutural dos géis biopoliméricos, quando comparadas com as demais amostras.

As fases gástrica (FG) e do intestino delgado (FI) da digestão *in vitro* foram monitoradas para todos os sistemas selecionados em intervalos de tempo pré-definidos e os resultados são discutidos a seguir.

A Figura 5.25 mostra as imagens das etapas contempladas nos ensaios de digestibilidade *in vitro*. Como não houve grandes diferenças visuais das amostras para os dois métodos avaliados neste estudo, as imagens são apenas ilustrativas de cada fase digestiva para ambos os métodos.

Figura 5.25 – Imagens dos géis mistos em diferentes etapas da digestão *in vitro*: (A) Gel carregado triturado antes da fase oral; (B) Gel carregado no início da fase gástrica; (C.1), (C.2), (C.3) Gel carregado ao final da FG, início da FI e final da FI, respectivamente; (D.1), (D.2) e (D.3) Gel não-carregado (sem MLS) ao final da FG, início da FI e final da FI, respectivamente; (E) Equipamento *pH stat* em operação durante a FI.

(A)

(B)

(C.1)

(C.2)

(C.3)

(D.1)

(D.2)

(D.3)

(E)

Fonte: Própria autoria.

5.6.1 Monitoramento da fase gástrica

Após as amostras de géis biopoliméricos não-carregados e carregados serem preparados para a digestão *in vitro* como descrito no item 4.7, procedeu-se com as leituras de pH de cada amostra estudada. As MLS-2 e MLS-4 também foram submetidas à fase oral (FO) e os valores de pH também foram mensurados. A Tabela 5.8 mostra os valores desta fase para cada amostra avaliada.

Tabela 5.8 -Valores de pH medidos durante a fase oral da digestão *in vitro* para os protocolos Infogest e de redução gradual do pH da fase gástrica (RG).

	Infogest	RG
Partículas		
MLS-2	7,7±0,0	7,5±0,0
MLS-4	7,6±0,1	7,4±0,1
Géis não-carregados		
SP/SS	7,0±0,0	6,9±0,1
SP/NaCl	6,3±0,9	6,9±0,2
Géis carregados		
MLS-2/SS	7,3±0,3	7,3±0,1
MLS-2/NaCl	7,0±0,0	7,0±0,1
MLS-4/SS	7,1±0,2	6,7±0,1
MLS-4/NaCl	6,9±0,0	6,9±0,1

Fonte: Própria autoria.

Os valores de pH da FO para todas as amostras estudadas ficaram muito próximas a 7,0 (valor de pH do FSS). As micropartículas lipídicas apresentaram valores de pH ligeiramente superiores aos dos géis (tanto não-carregados quanto carregados), em ambos os protocolos estudados. A presença de MLS nos géis carregados não teve grande influência sobre os valores de pH desta fase, se comparados com àqueles apresentados pelos géis não-carregados, também em ambos os protocolos.

Ao término da fase oral, procedeu-se a fase gástrica (FG) para cada amostra, seguindo os protocolos detalhados anteriormente. Após a determinação da atividade enzimática da pepsina utilizada no experimento (item 4.7), calculou-se que a massa de pepsina a ser adicionada na fase gástrica seria de 1,41 mg diluída em 10 mL de FGS, sendo esta quantidade necessária para atingir a atividade de 2000 U/mL na solução digestiva gástrica final (conforme estipulado no protocolo descrito em Minekus et al., 2014).

Ao longo da FG, pequenas alíquotas das soluções digestivas das amostras estudadas, foram avaliadas em intervalos de 1 h.

Os valores de pH no início da FG (amostras + FSS + FSG + solução de pepsina) para os géis não-carregados e carregados com MLS variaram entre 5,5 e 6,0 para a maior parte das amostras, em ambos os protocolos estudados. Tais valores concordam com aqueles encontrados por Guo et al. (2014a), para os quais géis de IPSL (10 % m/m) contendo óleo de soja (20 % m/m) e NaCl (10 mM ou 200 mM) submetidos à digestão gástrica *in vitro* obtiveram valores de pH variando entre 5,55 e 5,70.

Figura 5.26 -Valores de pH medidos durante a fase gástrica do protocolo Infogest para as dispersões de micropartículas lipídicas (a); géis não-carregados (b); géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (c) e géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (d).

Fonte: Própria autoria.

Para o protocolo Infogest (Figura 5.26), nas MLS-2 e MLS-4, os valores de pH apresentaram uma elevação nos primeiros 15 min, mas apenas decaíram após este período. Já para as amostras de géis, após o ajuste de pH para 3,0 no início da FG, houve oscilação dos valores de pH para acima de 3,0, indicando que as reações enzimáticas (pepsinólise) promoveram aumento do pH para estes sistemas. É importante notar que a presença do NaCl

nos sistemas nos quais ele foi adicionado não teve praticamente nenhum impacto sobre os valores de pH medidos ao longo de 120 min de FG, se comparadas com as amostras sem sal.

Já para o protocolo RG (Figura 5.27), após cada amostra de gel não-carregado e gel carregado ter seu pH ajustado, pequenos aumentos dos valores deste parâmetro também foram observados. Também neste caso, a atividade enzimática da pepsina sobre o gel pode ter provocado estas variações. Novamente, a presença do NaCl nos sistemas nos quais ele foi adicionado teve praticamente nenhum impacto sobre os valores de pH medidos ao longo de 120 min de digestão simulada da FG, quando comparado com as amostras sem o sal.

Figura 5.27 -Valores de pH medidos durante a fase gástrica de acordo com o método de redução gradual do pH da fase gástrica para as dispersões de micropartículas lipídicas (a); géis não-carregados (b); géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (c) e géis carregados com MLS-2 e diferentes forças iônicas (d).

Fonte: Própria autoria.

As Figuras 5.28 e 5.29 apresentam os perfis de distribuição de tamanho de partículas durante a FG para os protocolos Infogest e RG, respectivamente, para todos os sistemas estudados. Os dados para diâmetros hidrodinâmicos médios de partícula medidos nest etapa não foram levados em conta devido a presença de “grumos de gel” com tamanhos maiores que aqueles possíveis de serem analisados pelo difratômetro.

No protocolo Infogest para as MLS-2 e MLS-4 nota-se que em relação ao início da FG (0 h), os picos da distribuição de tamanho foram deslocados para a esquerda após 1 h e 2 h de ensaio. Portanto, houve uma diminuição dos diâmetros de partículas, além de um estreitamento dos picos. Este fato mostrou-se mais acentuado para MLS-2 que para MLS-4, indicando a maior instabilidade MLS-2 nas condições da digestão gástrica *in vitro* (pH ácido, alta concentração de sais e agitação mecânica) (GUO et al., 2014b).

Ainda de acordo com a Figura 5.28, para os géis sem MLS, é possível observar comportamentos diferentes para as amostras sem sal e com 0,1 M de NaCl. As curvas de distribuição de tamanho de partícula para o gel SP/NaCl mostraram que esta amostra foi mais estável durante a FG que o gel SP/SS, sendo este último menos resistente a ação enzimática (pepsina) e às condições do ambiente gástrico. Portanto, a presença de sal neste caso contribuiu para uma maior resistência do gel não-carregado durante a etapa gástrica.

Para os géis carregados, diferentes comportamentos ao longo da FG foram observados. Para o gel MLS-2/SS (Figura 5.28e) a curva de distribuição bimodal do início da FG (duas populações distintas de tamanhos de partículas), perdurou até o final da etapa gástrica, apresentando pequena variação. As curvas de distribuição de tamanhos de partícula da amostra MLS-4/SS (Figura 5.28f) indicaram grande instabilidade durante a FG, com redução dos tamanhos de partícula após 1 h (deslocamento dos picos para a esquerda) seguida de aumento dos tamanhos ao final da FG (deslocamento dos picos para a direita). Portanto, a amostra MLS-4/SS foi mais sensível à digestão gástrica que a MLS-2/SS, além de possivelmente ter ocorrido desestabilização das partículas para a MLS-4/SS, representado pelo aumento dos tamanhos de partícula ao final da FG.

Para os géis carregados com 0,1 M NaCl, nota-se que a curva monomodal do gel MLS-2/NaCl (Figura 5.28g) tornou-se bimodal (duas populações de partículas) após 1 h de FG permanecendo com este formato até o final da etapa gástrica, indicando uma possível desestabilização das MLS. O comportamento do gel MLS-2/NaCl foi similar àquele apresentado pela amostra MLS-2/SS. Finalmente, para o gel MLS-4/NaCl (Figura 5.28h), o qual no início da FG apresentou distribuição bimodal dos tamanhos de partícula, o que perdurou até o final da FG. O comportamento do gel MLS-4/NaCl foi distinto daquele apresentado pela amostra MLS-4/SS, sendo esta segunda amostra menos resistente ao processo de desintegração durante a FG.

Os resultados obtidos pelo protocolo RG exibidos na Figura 5.29 mostram que para a MLS-2 e MLS-4, no início da FG (0 h), as curvas foram monomodais, indicando apenas uma população de diâmetros de partículas. A MLS-4 teve seu comportamento praticamente inalterado do início ao final da FG. No entanto, para a MLS-2 os picos da curva de distribuição de tamanho foram deslocados para a esquerda após 1 h e 2 h de ensaio. Portanto, houve uma diminuição dos diâmetros de partículas, além de um estreitamento dos picos para a MLS-2, a qual se mostrou a mais instável, como ocorreu com os resultados obtidos pelo protocolo Infogest.

O gel SP/SS no protocolo RG (Figura 5.29c) mostrou-se mais instável ao processo de digestão gástrica *in vitro* que o gel SP/NaCl (Figura 5.29d), isso porque a curva de distribuição de tamanhos de partícula para o gel SP/SS foi deslocada para a esquerda com pico em 1 μm (redução dos tamanhos) após uma 1 h de FG. O gel SP/NaCl também teve a curva de distribuição de tamanho de partícula deslocada para a esquerda após 1 h de FG, no entanto, com menor redução dos tamanhos com relação ao início da etapa gástrica. Também no protocolo RG, a presença do sal na amostra sem MLS contribuiu para uma maior estabilidade deste sistema nas condições gástricas.

Para os géis carregados submetidos ao protocolo RG, o gel MLS-2/SS (Figura 5.29e) também foi mais estável à etapa gástrica, apresentando menor variação dos formatos das curvas de distribuição que o gel MLS-4/SS. Os tamanhos de partícula do gel MLS-2/SS foram reduzidos apenas no final da FG (2 h), enquanto que no gel MLS-4/SS, houve redução dos tamanhos de partícula após 1 h de etapa gástrica, seguido de novo aumento dos tamanhos ao final desta etapa, possivelmente em função de agregação das partículas lipídicas.

Para os géis carregados com 0,1 M NaCl, nota-se que o gel MLS-2/NaCl (Figura 5.29g) apresentou apenas um pico em $\sim 7 \mu\text{m}$ no início da FG, sendo este pico deslocado para a esquerda após 1 h e 2 h de FG, sofrendo redução de sua área. Finalmente, para o gel MLS-4/NaCl (Figura 5.29h), o pico da curva de distribuição estava em $\sim 10 \mu\text{m}$ e deslocou-se para a esquerda após 1 h e 2 h de FG. O comportamento do gel MLS-2/NaCl foi similar àquele apresentado pela amostra MLS-2/SS. Já o comportamento do gel MLS-4/NaCl foi distinto daquele apresentado pela amostra MLS-4/SS, sendo esta segunda amostra menos resistente ao processo de desintegração durante a FG, tal como ocorreu para estas amostras no protocolo Infogest.

Figura 5.28 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa gástrica das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo protocolo Infogest (pH_{gástrico} = 3,0).

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.29 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa gástrica das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e b) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo método de redução do pH durante a etapa gástrica.

Fonte: Própria autoria.

A composição dos alimentos, a estrutura, microestrutura, bem como as propriedades físico-químicas deles influenciam fortemente o processo de digestão destes sistemas no TGI (GUO et al., 2014a, 2014b; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014). Sendo assim, a partir dos comportamentos das amostras durante a FG para os protocolos Infogest e RG, a variação de pH ao longo da FG, a concentração de tensoativos das MLS, a presença de sal nos géis e a presença de micropartículas nos géis carregados foram todos fatores que influenciaram o comportamento das amostras estudadas ao longo da FG no processo de digestão simulada.

Os resultados para os perfis de distribuição de tamanho de partículas ao longo da FG apresentados nas Figuras 5.28 e 5.29 auxiliam no entendimento do processo de digestão das MLS, dos géis não-carregados e carregados. Tais resultados podem ter sido influenciados por diversos fatores, tais como (i) à resistência da β -lg à ação enzimática; (ii) a estrutura do gel e a força iônica; (iii) a presença da goma xantana; (iv) a presença das micropartículas lipídicas sólidas no gel e (v) a formulação de micropartícula (MLS-2 ou MLS-4) incorporada ao gel.

Em algumas amostras de géis biopoliméricos mistos puros e carregados foi observado que os perfis de distribuição de tamanho de partículas apresentaram pouca variação ao longo da FG (como discutido anteriormente), indicando alta resistência destas amostras à ação enzimática. A β -lactoglobulina (β -lg) nativa, que é a proteína presente em maior quantidade no IPSL, é descrita na literatura como muito resistente à ação da pepsina e da quimiotripsina (BORREANI et al., 2016; O'LOUGHLIN et al., 2012; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014; ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014), principalmente no compartimento gástrico (MACIERZANKA et al., 2012). Após tratamentos térmicos, a β -lg perde suas estruturas terciárias e quaternárias e expõe grupos hidrofóbicos que favorecem a hidrólise proteica pela ação da pepsina (O'LOUGHLIN et al., 2012). No entanto, Zhang e Vardhanabhuti (2014) mostraram que em agregados protéicos de IPSL (5 %, submetidos a 85 °C/30 min), os oligômeros de β -lg permanecem resistentes à pepsina após 120 min de digestão gástrica *in vitro*. Quando aquecidas, altas concentrações proteicas geram grandes agregados com menores áreas superficiais totais, as quais fornecem menos sítios de clivagem para a atuação da pepsina (ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014).

Para um sistema gelificado com características muito parecidas às do presente trabalho, Macierzanka et al. (2012) avaliaram a digestibilidade *in vitro* de gel particulado de IPSL produzido por aquecimento (4 % IPSL, 85 °C/30 min, pH 5,2) e verificaram que cerca de 40 % da β -lg não foi digerida após a FG. A estabilidade ácida da β -lg pode favorecer

ligações de hidrogênio entre dois grupos carboxílicos ou um grupo amino e outro grupo carboxílico, dificultando que a pepsina alcance os sítios de clivagem (MOUÉCOUCOU et al., 2004).

Além disso, ainda com relação ao tipo de gel, os géis avaliados ao longo deste estudo são do tipo particulado, como apresentado nas imagens obtidas por MEV e microscopia confocal (Figuras 5.19-5.21). Géis do tipo particulado (processo de gelificação ao acaso) podem ser mais difíceis de serem hidrolisados pela pepsina durante a digestão gástrica, devido à dificuldade da enzima em acessar os sítios de clivagem (MACIERZANKA et al., 2012; GUO et al., 2014a, 2014b). A ação da pepsina sobre grandes agregados de β -lg pode se dar apenas na superfície destas estruturas (MACIERZANKA et al., 2012).

A alta força iônica apresentada pelos géis com 0,1 M NaCl, pode também ter aumentado a resistência destas amostras ao processo de proteólise, visto que a alta força iônica favorece a interação entre os agregados proteicos da matriz gelificada (ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas) tornando os géis mais fortes (DEMETRIADES; McCLEMENTS, 1998; GUO et al., 2014a). Portanto, a resistência à hidrólise enzimática apresentada por alguns géis biopoliméricos mistos durante a FG, para ambos os protocolos investigados, podem ter sido influenciados pela resistência da β -lg à pepsinólise e pela estrutura particulada dos géis (influenciada pela alta força iônica nos géis com concentração 0,1 M NaCl).

No estudo de Guo et al. (2014b), os autores investigaram o comportamento de emulsões gelificadas de IPSL (10 % m/m proteína e 20 % óleo) na concentração de 0,1 M de NaCl e diâmetro da gota de óleo de cerca de 1 μ m. Os autores observaram que nos sistemas em que a matriz gelificada era do tipo particulada as gotículas passaram praticamente intactas pela digestão oral e gástrica simulada, em função da estabilização do revestimento de IPSL sobre as gotículas e da dificuldade da hidrólise proteica.

Com relação à porosidade da matriz dos géis produzidos neste estudo e evidenciada nas imagens de MEV (Figuras 5.19-5.21), esta pode ter impactado no processo de digestão proteica na FG, uma vez que a porosidade afeta a difusão de grandes moléculas através do gel (SARKAR et al., 2015), dificultando o acesso da enzima aos sítios de clivagem. Ainda que uma porção expressiva da matriz gelificada possa ter sido desintegrada durante a FO, é possível observar pelas imagens da Figura 5.25(B) que fragmentos de gel estavam presentes durante a FG. Em estudo conduzido por Sarkar et al. (2015) envolvendo emulsões

estabilizadas por IPSL incorporadas à géis com diferentes concentrações de gelatina, e consequentemente, com diferentes porosidades, os autores concluíram que o gel reduziu a difusão tanto de proteases quanto de lipases durante ensaios de digestão intestinal (etapa gástrica não foi realizada).

Outro aspecto importante a ser considerado nos resultados de digestibilidade apresentados nas Figuras 5.28 e 5.29 é a presença da goma xantana nos géis. Durante o processo de produção de gel biopolimérico de proteínas e polissacarídeos, as diferentes densidades de cargas dos biopolímeros podem causar repulsão entre eles e promover limitadas interações eletrostáticas (ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014). No entanto, um estudo envolvendo misturas de IPSL e polissacarídeos com diferentes densidades de cargas, mostrou que na presença de FSG e em pH próximo ao pI da proteína, há o aumento das interações eletrostáticas entre IPSL (positivamente carregada) e GX (negativamente carregada), possibilitando a formação de gel intragástrico para razões mássicas GX/IPSL iguais ou maiores que 0,02 (ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014). Segundo Zhang, Zhang e Vardhanabhuti (2014), a força deste gel intragástrico é baixa para a razão mássica GX/IPSL igual a 0,02 e os resultados de eletroforese apontaram que a proteína rapidamente sofreu proteólise (2 min de ensaio *in vitro*), tendo a GX pouco impactado na digestão proteica. Porém, os autores destacam que seus resultados se baseiam numa alta concentração de pepsina no ensaio. No presente estudo, a razão mássica GX/IPSL foi de aproximadamente 0,017 que é muito próxima ao 0,02 utilizado no trabalho de Zhang, Zhang e Vardhanabhuti (2014), o que pode indicar que a presença de GX possa ter dificultado ou desacelerado o processo de digestão proteica pela pepsina nos géis. Em outro estudo, Borreani et al. (2016) observaram pouca variação nos perfis de distribuição de tamanho de partícula ao longo de ensaio de digestão gástrica *in vitro* de misturas de proteínas do soro e alginato. Os autores atribuíram este comportamento da amostra à forte interação proteína-polissacarídeo, a qual dificultou a proteólise na FG e também à resistência da β -lg à pepsina, como já discutido anteriormente. Sendo assim, a presença de goma xantana nos géis mistos no presente estudo, associada aos outros fatores, pode ter dificultado e/ou desacelerado o processo de digestão proteica na FG.

É importante notar que nas dispersões de micropartículas e para a maior parte dos géis carregados investigados em ambos os protocolos, as micropartículas não sofreram grande desestabilização ao longo da FG. É desejável que sistemas de encapsulação lipídicos sejam

estáveis às condições gástricas, protegendo o bioativo e possibilitando que o mesmo seja liberado apenas em local do TGI onde haverá máxima absorção deste componente (ANAL; SINGH, 2007). A estabilidade das MLS se deve provavelmente aos tensoativos não-iônicos que revestem o núcleo lipídico (MARCIANI et al., 2007; VAN AKEN et al., 2011, ZHANG et al., 2016), uma vez que essa classe de tensoativos são menos sensíveis a fatores como pH e força iônica (DEMETRIADES; McCLEMENTS, 1998). Porém, Marciani et al. (2007) destaca que Tween 60 é estável ao pH gástrico; no entanto, o Span 80 apresenta instabilidade em meios ácidos. Outro fator que possibilita a proteção das gotas de emulsão quando estas estão incorporadas às matrizes gelificadas é a proteção proporcionada pela matriz biopolimérica contra a desestabilização da emulsão (MUN et al., 2015; GUO et al., 2016). Wooster et al. (2014) estudaram o impacto de diferentes biopolímeros (gelatina, amido e caseína) sobre a digestão lipídica de géis carregados de emulsão estabilizada por caseinato/monogliceróis. Os autores verificaram que os géis de caseína (iogurtes) e os géis de amido protegeram a emulsão contra a coalescência durante a etapa de digestão gástrica.

No que se refere à influência da concentração de tensoativos das dispersões de MLS e dos géis carregados na digestão gástrica, observa-se que a MLS-2 mostrou-se mais instável que a MLS-4, para ambos os protocolos testados, quando o ensaio foi realizado apenas com as micropartículas lipídicas. Portanto, a maior concentração de tensoativos (4 % m/m) na partícula pura, levou a maior estabilidade frente à digestão simulada gástrica. Durante o processo de digestão, as MLS ficam expostas a condições drásticas de pH, altas concentrações de sais e de íons Ca^{2+} e estes fatores podem alterar a camada interfacial das partículas (LI et al., 2011) desestabilizando-as, o que pode ter ocorrido para a MLS-2.

Por outro lado, quando incorporadas, nota-se que os géis carregados com MLS-2, especialmente o gel MLS-2/SS, apresentaram maior estabilidade que o gel MLS-4/SS, também em ambos os protocolos testados. Assim como discutido para os resultados dos ensaios mecânicos do item 5.4.1, os tensoativos de baixo peso molecular, tais como os utilizados neste estudo, podem se associar a proteínas formando complexos proteína-tensoativo (BOS; VAN VLIET, 2001; NYLANDER et al., 2008). Logo, a partícula com menor concentração de tensoativo (MLS-2), portanto, com interface menos empacotada (menor quantidade de moléculas de tensoativos revestindo a interface) poderia ter permitindo que a matriz proteica formasse interações proteína-tensoativo, as quais foram fortes o suficiente para aumentar a resistência do gel à digestão gástrica. Na presença de sal, este

resultado pode não ter sido tão evidente porque a resistência à pepsina foi associada ao aumento da agregação proteica (interações proteína-proteína) devido à alta concentração salina, o que dificultou a pepsinólise.

O protocolo RG de maneira geral facilitou a desintegração dos géis na FG quando comparado ao protocolo Infogest. As curvas de distribuição de tamanhos de partículas para as amostras de gel para o protocolo RG apresentaram maiores tamanhos de partícula no início da FG e uma grande redução dos tamanhos após 1 h e 2 h de ensaio gástrico (Figura 5.29). Este resultado pode estar associado ao fato de que enquanto no protocolo Infogest o pH permanece um pouco abaixo do pI da proteína (pI do IPSL próximo 4,0, neste estudo), no protocolo RG o pI foi alcançado após 1 h do início da digestão gástrica. Como já discutido anteriormente, a β -lg apresenta estabilidade ácida (ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014), portanto, o valor de pH 3,0 (fixo) usado no protocolo Infogest não teria favorecido a desestabilização proteica. Porém, em valores próximos ao pI, as forças eletrostáticas repulsivas foram minimizadas, favorecendo a formação de agregados proteicos e a dominância das ligações de van der Waals (DEMETRIADES; McCLEMENTS, 1998, ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014), as quais foram mais facilmente rompidas pela pepsina que neste ponto pode atuar com maior atividade (pH ótimo da pepsina de 2,5) (MINEKUS et al, 2014). Portanto, a metodologia utilizada na FG teve expressiva influência sobre o comportamento dos géis nesta etapa.

5.6.2 Monitoramento da digestão simulada no intestino delgado

Após a determinação da atividade enzimática da lipase pancreática utilizada no experimento (item 4.7), calculou-se que a massa de lipase a ser adicionada na fase intestinal seria de 4,42 mg/10 mL de FSI, sendo esta quantidade necessária para atingir a atividade de 2000 U/mL na solução digestiva intestinal final (conforme estipulado no protocolo descrito em Minekus et al., 2014). Já para a pancreatina, a massa a ser adicionada foi calculada em 2,52 mg/10 mL de FSI baseada na atividade da tripsina, sendo esta quantidade necessária para atingir a atividade de 100 U/mL na solução digestiva intestinal final (conforme estipulado no protocolo descrito em Minekus et al., 2014).

Os valores de pH monitorados ao longo da fase do intestino delgado (FI) são apresentados nas Figuras 5.30 e 5.31, para os protocolos Infogest e RG, respectivamente.

Figura 5.30 - Valores de pH medidos para a FI de acordo com o protocolo Infogest.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.31 -Valores de pH medidos para a FI de acordo com o método de redução gradual de pH da FG.

Fonte: Própria autoria.

Em ambos os protocolos estudados, para as dispersões de partículas os resultados foram $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,5-7,0 e pH_{final} acima de 7,0; para os géis não-carregados $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0-7,0 e pH_{final} ~7,5 e para os géis carregados $\text{pH}_{\text{inicial}}$ ~6,5 e pH_{final} 7,0. Os géis não-carregados (SP/SS e SP/NaCl) apresentaram aumento crescente dos valores de pH no decorrer da FI, enquanto que para os géis carregados, os valores de pH se estabilizaram antes de 20 min do início da FI. Isso se deve justamente a liberação dos ácidos graxos livres nestes últimos sistemas. O tipo de MLS incorporada e a presença de 0,1 M NaCl nos géis carregados não impactaram nos valores de pH monitorados ao longo da FI.

A Tabela 5.9 apresenta os dados para diâmetros hidrodinâmicos médios de partícula na FI ao longo do tempo para os dois protocolos testados, enquanto as Figuras 5.32 e 5.33 apresentam os perfis de distribuição de tamanhos de partículas para os protocolos Infogest e RG, respectivamente.

Tabela 5.9—Diâmetro médio de partícula da etapa intestinal para micropartículas lipídicas sólidas (MLS), géis biopoliméricos mistos e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio de partícula (µm)				
	Infogest				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Partículas					
MLS-2	6,3±2,2 ^{aA}	6,2±1,2 ^a	6,9±0,8 ^{aA}	6,8±0,6 ^a	7,1±1,0 ^{aA}
MLS-4	7,3±0,4 ^{aA}	5,9±1,4 ^a	5,0±0,4 ^{aA}	6,0±0,5 ^a	6,2±2,7 ^{aA}
Géis sem MLS					
SP/SS	1,0±0,1 ^{bA}	5,4±1,7 ^a	7,4±0,4 ^{aA}	7,2±0,4 ^a	7,0±0,8 ^{aA}
SP/NaCl	2,3±1,8 ^{bA}	6,2±1,6 ^a	7,3±0,4 ^{aA}	7,2±0,3 ^a	7,4±0,4 ^{aA}
Géis carregados					
MLS-2/SS	1,1±0,1 ^{aA}	3,3±1,6 ^a	2,1±1,5 ^{aA}	4,0±3,1 ^a	1,3±0,1 ^{aA}
MLS-2/NaCl	1,0±0,1 ^{aA}	3,4±0,0 ^a	4,8±1,7 ^{aA}	4,8±3,2 ^a	2,6±1,5 ^{aA}
MLS-4/SS	2,1±1,8 ^{aA}	3,2±1,2 ^a	3,8±2,7 ^{aA}	1,7±0,7 ^a	4,0±2,8 ^{aA}
MLS-4/NaCl	1,0±0,0 ^{aA}	3,0±1,7 ^a	3,4±3,4 ^{aA}	2,9±1,7 ^a	5,0±3,6 ^{aA}
Redução gradual do pH (RG)					
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Partículas					
MLS-2	7,6±0,0 ^{aA}	6,9±0,7 ^a	5,7±2,0 ^{aA}	6,2±0,5 ^a	6,0±1,1 ^{aA}
MLS-4	5,8±1,5 ^{aA}	5,2±3,6 ^a	5,3±1,2 ^{aA}	3,7±3,1 ^a	5,6±2,0 ^{aA}
Géis não-carregados					
SP/SS	1,1±0,1 ^{bA}	6,0±1,7 ^a	7,1±0,5 ^{aA}	7,4±0,3 ^a	7,1±0,5 ^{aA}
SP/NaCl	1,2±0,1 ^{bA}	4,3±3,3 ^{ab}	6,6±0,4 ^{aA}	7,2±0,5 ^a	7,2±0,8 ^{aA}
Géis carregados					
MLS-2/SS	1,8±1,5 ^{aA}	4,3±3,0 ^a	5,5±1,8 ^{aA}	5,8±1,5 ^a	4,0±0,3 ^{aB}
MLS-2/NaCl	1,9±1,4 ^{aA}	5,5±1,8 ^a	4,9±1,3 ^{aA}	3,9±0,9 ^a	5,2±3,9 ^{aA}
MLS-4/SS	1,0±0,0 ^{cA}	5,7±2,1 ^{ab}	6,7±0,0 ^{aA}	3,7±0,4 ^b	4,2±0,2 ^{abA}
MLS-4/NaCl	1,9±1,5 ^{aA}	4,6±1,3 ^a	5,0±1,5 ^{aA}	4,0±2,8 ^a	4,3±3,1 ^{aA}

Letras minúsculas na mesma linha representam diferença estatística para uma mesma amostra ao longo do tempo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma coluna representam diferença estatística para uma mesma amostra e protocolos diferentes num mesmo tempo de análise ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Os dados de tamanhos médios de partículas da FI apresentados na Tabela 5.9 e Figuras 5.32 e 5.33 para as MLS mostram que em relação à FG, houve aumento substancial do diâmetro médio hidrodinâmico de partícula, tanto para MLS-2 quanto para MLS-4, nos dois protocolos.

Os diâmetros médios de partículas da dispersão de MLS-2 não variaram ao longo do tempo de digestão intestinal ($p>0,05$) para ambos os protocolos, o mesmo comportamento apresentado pela dispersão MLS-4. Porém, os gráficos de distribuição de tamanho para o protocolo Infogest e RG apontam a diminuição dos tamanhos após 2 h de FI em relação ao início desta etapa. As leituras de tamanhos médios de partículas podem ser dificultadas nos fluidos intestinais devido à diversidade de tamanhos em função da presença de gotículas de óleo, micelas, vesículas, enzimas, etc (McCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009; SINGH; YE; HORNE, 2009). As técnicas de difração a laser podem apresentar limitações para medições de sistemas que sofrem coalescência (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007). Desta forma, com base nos gráficos de distribuição de tamanhos de partículas (Figuras 5.32 e 5.33 a e b), pode-se entender que em relação ao início da etapa intestinal, houve diminuição dos tamanhos de partícula para MLS-2 e MLS-4 após 2 h de FI.

No caso do protocolo Infogest, os tamanhos de partícula para as dispersões MLS-2 (Figura 5.32a) e MLS-4 (Figura 5.32b) reduziram após 30 e 60 min, respectivamente, o que foi associado à digestão lipídica pela lipase. Mas os tamanhos de partícula para as dispersões de MLS aumentaram novamente após 2 h de FI, indicando uma possível agregação lipídica (MUN et. al. 2007). Já para o protocolo RG, as curvas de distribuição de tamanhos de partícula para ambas as dispersões de MLS apresentaram comportamentos muito semelhantes durante a digestão intestinal (Figura 5.33 a e b), uma vez que os tamanhos de partículas foram reduzidos em 60-120 min de FI para MLS-4 e MLS-2, respectivamente, possivelmente em função da lipólise.

Na presença de lipase, a coalescência de emulsões é favorecida (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007). Isso ocorre porque os produtos da lipólise, tais como mono e diacilgliceróis e ácidos graxos livres, atuam sobre a superfície das gotículas de emulsão O/A e não são capazes de estabilizá-las contra a coalescência (McCLEMENTS, 2005; VAN AKEN et al., 2011). Os sais biliares podem competir com substâncias que estejam na superfície das gotas de emulsão, deslocando-as e possibilitando o acesso da lipase ao núcleo hidrofóbico (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007; SARKAR; HORNE; SINGH, 2010). Portanto, a

capacidade da lipase em acessar o lipídio emulsificado é dependente tanto da composição do meio quanto das propriedades das camadas interfaciais ao redor da gotícula (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007; GOLDING; WOOSTER, 2010). O tipo de tensoativo usado na estabilização da emulsão é um dos fatores que define a composição e as propriedades destas camadas interfaciais (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007). Os tensoativos não-iônicos tais como os utilizados neste estudo, podem ser deslocados da superfície das gotas de emulsão pelos sais biliares e por produtos resultantes da lipólise, favorecendo a coalescência do sistema (VAN AKEN et al., 2011). No entanto, Mun, Decker and McClements (2007) observaram menor taxa de remoção do Tween 20 da superfície de gotas de emulsão pelos sais biliares, quando comparado a outros tipos de tensoativos. No protocolo Infogest a maior estabilidade da MLS-4 à lipólise pode ser justamente associada à maior dificuldade da enzima em acessar o lipídio devido a maior concentração de tensoativos.

Os tamanhos de partículas dos géis carregados foram maiores que para as dispersões de MLS no início da etapa intestinal (Tabela 5.9 e Figuras 5.32 e 5.33), o que pode ser associado ao atraso do processo de lipólise das MLS incorporadas aos géis carregados (MUN et al. 2015; MUN, KIM; McCLEMENTS, 2015; GUO et al., 2016), uma vez que a digestão prévia da matriz gelificada é necessária para permitir o acesso da lipase à superfície das partículas (McCLEMENTS, LI, 2010).

Com relação aos géis não-carregados, SP/SS e SP/NaCl, nota-se que tais amostras apresentaram comportamentos muito semelhantes durante a etapa intestinal, para ambos os protocolos (Tabela 5.9 e Figuras 5.32 e 5.33 c e d). Por esta razão, tanto a presença de sal nos géis quanto o tipo de protocolo usado não influenciaram significativamente o comportamento dos géis sem partículas durante a etapa intestinal simulada. A digestão protéica ocorreu provavelmente porque as proteases pancreáticas (tripsina e quimiotripsina) hidrolisaram os grupos hidrofóbicos da β -lg que foram expostos durante o processo de formação de gel (STANCIUC et al., 2008). Além disso, Gass et al. (2007) observaram que os sais biliares podem desestabilizar a β -lg e a BSA facilitando a hidrólise destas proteínas pela ação das proteases pancreáticas.

Para o protocolo Infogest, ao se comparar os tamanhos de partícula dos géis não-carregados ao final da FG com aqueles do início da FI (Tabela 5.9, Figuras 5.32 c e d), nota-se que houve redução dos tamanhos de partícula (1 μ m entre 0-30 min). Porém, após 30 min

da FI, houve um aumento desta variável para cerca de 7 μm , os quais não sofreram alteração ($p>0,05$) até o final da etapa intestinal.

Ao contrário do protocolo Infogest, para o protocolo RG, houve pouca variação dos tamanhos de partícula dos géis não-carregados ao final da FG com relação ao início da FI (Tabela 5.9, Figuras 5.33 c e d), ao menos para a amostra SP/SS. Porém, após 30 min da FI houve o aumento dos tamanhos médios de partícula para cerca de 7 μm para os géis SP/SS e SP/NaCl, os quais não variaram ($p>0,05$) até o final da etapa intestinal.

A comparação estatística entre os tamanhos médios de partículas medidos ao longo da FI, para os diferentes protocolos e em um mesmo tempo de avaliação do gel SP/SS mostrou que os tamanhos não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$), mesmo resultado apresentado pelo gel SP/NaCl. Portanto, ao longo da FI, o protocolo utilizado na fase gástrica não afetou o comportamento dos géis não-carregados.

A Figura 5.25 apresenta as imagens representativas dos géis sem incorporação de partículas no final da FG (D.1), durante a FI (D.2) ao final da FI (D. 3). É possível notar que para os géis não-carregados, ao final de 2 h do processo de digestão intestinal, a solução digestiva apresentou aspecto límpido. As forças mecânicas da agitação e a presença das proteases da FI foram as causas da hidrólise proteica (MUN et al., 2015; MUN; KIM; McCLEMENTS, 2015).

Os resultados de tamanhos médios de partícula para os géis carregados ao longo da FI mostram certa diversidade de comportamentos, para ambos os protocolos estudados. No entanto, tal como ocorreu com os géis não-carregados para o início da FI (0-30 min), nota-se que os tamanhos médios de partícula de todas as amostras de géis carregados foram de cerca de 1 μm (Tabela 5.9 e Figuras 5.32-33 e, f, g e h).

Os géis carregados submetidos ao protocolo Infogest tiveram seus tamanhos de partículas reduzidos quando passaram do final da FG para o início da FI. Já os géis carregados submetidos ao protocolo de RG, estes tiveram seus tamanhos de partículas praticamente inalterados quando passaram do final da FG para o início da FI. Novamente, destaca-se que o protocolo RG favoreceu uma maior desintegração dos géis na fase gástrica, uma vez que o pH do meio gástrico atingiu o valor de pI da proteína, onde há predominância de interações de van der Waals (DEMETRIADES; McCLEMENTS, 1998, ZHANG; ZHANG; VARDHANABHUTI, 2014) facilmente hidrolisadas pelas enzimas.

Ao longo da FI, ao se comparar os tamanhos médios de partículas para uma mesma formulação de gel carregado, num mesmo tempo de análise e em protocolos distintos, estes tamanhos não apresentaram diferença estatística significativa ($p>0,05$). Porém, destaca-se que para algumas medidas de tamanhos médios de partículas dos géis carregados, os desvios padrão foram altos, não sendo esta variável a mais adequada para se comparar os diferentes protocolos.

A análise dos géis carregados para o protocolo Infogest através das curvas de distribuição de tamanhos (Figura 5.32 e, f, g e h), mostra que o tipo de partícula (MLS-2 ou MLS-4) incorporada ao gel, influenciou os comportamentos destes sistemas no decorrer da FI. Para os géis MLS-2/SS e MLS-2/NaCl, houve aumento dos tamanhos de partícula em 30-90 min seguido de redução dos tamanhos ao final da FI. Em relação aos géis MLS-4/SS e MLS-4/NaCl, os tamanhos de partícula iniciaram ($t=0$ min) em aproximadamente $1\ \mu\text{m}$, mas após 30 min de FI houve aumento dos tamanhos. Desta maneira, a presença de 0,1 M NaCl nos géis carregados praticamente não impactou no comportamento de tais sistemas.

No protocolo Infogest, é possível notar que o gel carregado com MLS-2 foi o que mais sofreu com o processo digestivo intestinal. Este resultado é oposto ao que ocorreu na FG para os géis carregados com MLS-2, para o referido protocolo. Se na FG possíveis interações proteína-tensoativo tornaram o gel MLS-2/SS mais resistente à proteólise que o gel MLS-4/SS, na etapa intestinal a ação das proteases possivelmente levou à hidrólise das interações proteína-tensoativo. A possível hipótese para este fato é o deslocamento do complexo proteína-tensoativo da superfície da micropartícula pela ação de sais biliares (SARKAR; HORNE; SINGH, 2010), o que permitiu as proteases acessarem os sítios de clivagem proteicos. Uma vez desfeito o complexo proteína-tensoativo, as MLS-2 ficaram susceptíveis a lipólise. A dispersão MLS-2 mostrou-se mais instável que as MLS-4 nas etapas gástrica e intestinal (Figura 5.28 e 5.32 a e b). Dessa maneira, os tamanhos de partícula dos géis carregados com MLS-2 aumentaram em função de uma possível coalescência das MLS (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007; VAN AKEN et al., 2011) e em seguida, diminuíram ao final da FI, devido à quebra dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis (CARRIERE et al., 2005; LOWE, 2002, MUN et al., 2015). Nos géis carregados com MLS-4, uma provável agregação das partículas pode ter sido atrasada e a lipólise dificultada devido à maior estabilidade destas micropartículas, como discutido anteriormente, resultando em maiores tamanhos de partículas ao final da FI.

Vale lembrar que na fase gástrica do protocolo Infogest (Figura 5.28), a resistência à digestão dos géis MLS-2/NaCl e MLS-4/NaCl pode estar relacionada sobretudo à resistência promovida pela alta força iônica nestes sistemas.

A análise dos géis carregados para o protocolo RG através das curvas de distribuição de tamanhos (Figura 5.33 e, f, g e h), mostra que o tipo de partícula (MLS-2 ou MLS-4) incorporada ao gel, teve pouca influência sobre os comportamentos destes sistemas no decorrer da FI. Para todos os géis carregados, os picos da curva dos tamanhos de partícula aumentaram em 30-60 min de FI e diminuíram novamente ao final desta etapa. A presença de 0,1 M NaCl nos géis carregados, também não impactou na distribuição dos tamanhos de partículas.

Os tamanhos de partícula dos géis carregados e dos géis não-carregados no protocolo RG foram praticamente os mesmos ($\sim 1 \mu\text{m}$) no início da FI. Após 30 min de FI os tamanhos de partícula para os géis carregados aumentaram em função de uma possível coalescência das MLS (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007; VAN AKEN et al., 2011) e diminuíram ao final da FI, devido à hidrólise lipídica. O protocolo RG aplicado aos géis carregados favoreceu a desintegração da matriz gelificada destes sistemas na fase gástrica (Figura 5.29) e consequentemente, facilitou a lipólise das MLS (2 e 4 % tensoativos) na fase intestinal.

A Figura 5.25 apresenta as imagens representativas das amostras de gel carregados ao final da FG (C.1), durante a FI (C.2) ao final da FI (C.3). Após 120 min da etapa intestinal, nota-se que a solução digestiva estava turva, com uma fina camada de óleo no topo. Este último fato pode ser atribuído à digestão do lipídio pela lipase pancreática e à formação de micelas ou micelas mistas a partir dos produtos de digestão lipídica (HUR; DECKER; McCLEMENTS, 2009; MUN; KIM; McCLEMENTS, 2015), já que para os géis não-carregados a solução digestiva final ficou límpida (Figura 5.25-D.3) por uma possível completa digestão da matriz gelificada.

Figura 5.32—Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa intestinal das para as micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo protocolo de Infogest (pH gástrico = 3,0).

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.33 -Perfis de distribuição de tamanho de partícula da etapa intestinal das micropartículas lipídicas sólidas (a e b); géis biopoliméricos não-carregados (c e d) e géis biopoliméricos mistos carregados com MLS (e, f, g e h) obtidos pelo método de redução do pH da etapa gástrica.

Fonte: Própria autoria.

Os perfis de liberação dos ácidos graxos livres (AGL) das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas e para os géis carregados foram monitorados ao longo de toda a FI e são apresentados nas Figuras 5.34 e 5.35, para o protocolo Infogest e RG, respectivamente.

Figura 5.34 -Perfil de liberação de ácidos graxos livres (AGL) da etapa intestinal de obtido pelo protocolo de Infogest.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5.35 -Perfil de liberação de ácidos graxos livres (AGL) da etapa intestinal de obtido pelo método de redução gradual do pH.

Fonte: Própria autoria.

Os perfis de liberação de AGL ilustrados nas Figuras 5.34 e 5.35 mostram que a presença da matriz biopolimérica desacelerou a taxa de liberação dos AGL dos géis carregados quando comparada com àquelas apresentadas para as dispersões de MLS, em ambos os protocolos. Os pontos em que as curvas de liberação de AGL sofre inflexão, isto é, os tempos em que a liberação de ácidos graxos livres das amostras passa a ser constante (*plateau*) foram destacados na Tabela 5.10 (tempo de inflexão). Por meio destes valores,

pode-se observar o quanto a presença da matriz biopolimérica desacelerou a taxa de liberação de AGL durante a FI para os diferentes protocolos.

Os tempos de inflexão das curvas de liberação de AGL para o protocolo RG foram relativamente superiores àqueles apresentados no protocolo Infogest, para a maioria das amostras avaliadas. Este resultado mostra que apesar da redução gradual do pH da FG ter facilitado a digestão proteica dos géis carregados na FG e a digestão lipídica na FI, a taxa de liberação de AGL não teria sido acelerada. Porém, pelas Figuras 5.34-35 e Tabela 5.10 é necessário destacar que os valores de desvio padrão dos perfis de liberação de AGL nas amostras avaliadas foram altos, principalmente para os géis carregados.

Tabela 5.10 – Porcentagens de ácidos graxos livres (AGL) liberados na etapa intestinal *in vitro* e os tempos (t) em que os perfis de liberação de AGL atingiram um *plateau* para as micropartículas lipídicas sólidas (MLS) e géis carregados com MLS.

	Infogest		RG	
	AGL (%) liberados	t (min)	AGL (%) liberados	t (min)
	ao final da FI		ao final da FI	
Partículas				
MLS-2	25,0 ± 3,4 ^{bA}	5	22,8 ± 3,2 ^{cA}	5
MLS-4	29,7 ± 2,7 ^{bB}	5	33,6 ± 2,6 ^{abcA}	20
Géis carregados				
MLS-2/SS	39,9 ± 5,5 ^{aA}	20	34,7 ± 4,9 ^{abcA}	50
MLS-2/NaCl	27,3 ± 7,0 ^{bA}	50	29,8 ± 7,2 ^{bcA}	55
MLS-4/SS	45,1 ± 7,0 ^{aA}	40	46,5 ± 4,7 ^{aA}	60
MLS-4/NaCl	42,2 ± 5,6 ^{aA}	50	37,1 ± 15,2 ^{abA}	45

Letras minúsculas na mesma coluna representam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras e um mesmo protocolo ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas na mesma linha representam diferenças estatísticas para a mesma amostra em protocolos diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Minekus et al. (2014), a não-remoção dos produtos resultantes da digestão pode inibir a atividade enzimática, e trata-se de uma limitação dos modelos *in vitro* estáticos que simulam a digestão intestinal. Além disso, a taxa de difusividade das enzimas digestivas pela matriz biopolimérica para acessar a gotícula de emulsão é dependente do tamanho dos poros da matriz gelificada, os quais podem sofrer alterações durante sua passagem pelo TGI (McCLEMENTS; LI, 2010). Dessa forma, os altos desvios padrão para os

perfis de liberação de AGL, com destaque para os géis carregados, podem estar fortemente relacionados a maneira como as enzimas digestivas foram capazes de se difundir através da matriz gelificada heterogênea.

Os percentuais de AGL liberados foram superiores para os géis carregados se comparados com as partículas puras para o protocolo Infogest, como confirmado pela avaliação estatística ($p < 0,05$). Não é possível observar o impacto das diferentes concentrações de tensoativos das partículas sobre os resultados de AGL liberados.

Mun et al. (2015), avaliando a digestibilidade *in vitro* de géis de amido de feijão carregados com emulsão, também obteve percentuais de AGL superiores para os géis carregados que para as emulsões puras. De acordo com o autor, tal resultado foi devido a uma porção de proteínas nos géis, uma vez que a digestão proteica permite a liberação de peptídeos, aminoácidos e prótons (H^+), que reduzem o pH do meio digestivo e aumentam o consumo de NaOH (MUN et al., 2015). Desta forma, a presença dos produtos da proteólise no presente trabalho, poderiam justificar os maiores resultados de liberação de AGL para os géis carregados com MLS-2 e MLS-4 para o protocolo Infogest.

Para o protocolo RG, os percentuais de AGL liberados variaram bastante e não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre as dispersões de MLS e os géis carregados na maioria dos casos. Este resultado reforça que a matriz biopolimérica dos géis no protocolo RG foi pouco resistente à digestão gástrica, oferecendo às MLS incorporadas ao gel pouca proteção à lipólise quando submetidas à etapa duodenal. Também neste protocolo, não houve impacto das diferentes concentrações de tensoativos sobre os valores de AGL liberados ao final da FI.

Estatisticamente não houve diferença entre os valores de AGL liberados para um mesmo tipo de amostra, mas submetidas a protocolos diferentes ($p > 0,05$), exceto para a dispersão MLS-4. Portanto, aparentemente, o protocolo utilizado para a avaliação da digestibilidade *in vitro* das MLS-2 e para os géis carregados teve pouco impacto sobre o valor total de AGL liberados ao final da FI.

De acordo com Pafumi et al. (2002), o valor de AGL liberados passa a não aumentar após um determinado tempo, ainda que os lipídios não tenham sido completamente digeridos, devido ao efeito inibitório que os AGL exercem sobre a atividade da lipase. Por serem moléculas com atividade superficial (tensoativa), os ácidos graxos tendem a se adsorver sobre a superfície das micropartículas e em quantidades suficientemente altas, podem deslocar a

lípase desta superfície, dificultando o acesso da enzima ao lipídio emulsificado (MUN; DECKER; McCLEMENTS, 2007).

Ao final da FI de cada amostra avaliada, foram realizadas as determinações da bioacessibilidade da curcumina encapsulada das dispersões de MLS e das amostras de gel. Para efeito de comparação, a mesma massa de curcumina encapsulada no gel carregado foi adicionada aos géis não-carregados (denominada “curcumina livre”) para a determinação da bioacessibilidade. A Tabela 5.11 mostra os resultados obtidos.

Para o cálculo da bioacessibilidade da curcumina levou-se em conta a quantidade de curcumina efetivamente encapsulada nas MLS-2 e MLS-4, que foi $183,6 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ e $199,2 \pm 12,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 5.11 – Bioacessibilidade (%) da curcumina após o processo de digestão simulada *in vitro* para diferentes protocolos.

	Infogest	RG
Partículas		
MLS-2	$63,6 \pm 6,6^{\text{cdA}}$	$67,9 \pm 3,4^{\text{aA}}$
MLS-4	$78,4 \pm 1,0^{\text{abA}}$	$77,2 \pm 0,9^{\text{aA}}$
Géis não-carregados		
SP/SS	$34,6 \pm 3,4^{\text{eA}}$	$32,4 \pm 5,9^{\text{bA}}$
SP/NaCl	$39,2 \pm 0,8^{\text{eA}}$	$36,3 \pm 2,7^{\text{bA}}$
Géis carregados		
MLS-2/SS	$73,9 \pm 6,3^{\text{abAc}}$	$77,8 \pm 0,2^{\text{aA}}$
MLS-2/NaCl	$60,3 \pm 2,1^{\text{dA}}$	$66,8 \pm 3,0^{\text{aB}}$
MLS-4/SS	$71,3 \pm 4,3^{\text{bcdA}}$	$74,6 \pm 7,0^{\text{aA}}$
MLS-4/NaCl	$83,3 \pm 3,5^{\text{aA}}$	$67,4 \pm 8,6^{\text{aB}}$

Letras minúsculas na mesma coluna representam diferença estatística significativa entre diferentes amostras e mesmo protocolo ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas na mesma linha representam diferença estatística significativa para uma mesma amostra e protocolos diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Para o protocolo Infogest, a dispersão MLS-4 apresentou maior bioacessibilidade de curcumina que a dispersão MLS-2. Este resultado mostra que a maior concentração de tensoativo pode ter promovido maior estabilidade da MLS-4 durante a digestão simulada e consequentemente, maior proteção do curcuminóide. A curcumina encapsulada no interior do

núcleo lipídico fica protegida da degradação química causada pelos componentes da fase dispersa (solução digestiva) durante o processo de digestão *in vitro* (ZHANG et al., 2016).

Os géis não-carregados, em ambos os protocolos, apresentaram os menores valores de bioacessibilidade da curcumina, já que nestes sistemas o curcuminóide não estava encapsulado, o que o deixou mais susceptível a degradação química (ANAND et al., 2007). Além disso, os compostos bioativos hidrofóbicos tais como a curcumina são eficientemente solubilizados em micelas mistas, as quais são formadas pelos produtos da lipólise (MADENCI; EGELHAAF, 2010; YAO; XIAO; McCLEMENTS, 2014) e na ausência destes produtos, como é o caso da digestão dos géis não-carregados, a curcumina foi solubilizada de maneira menos eficiente em micelas simples. Dentre os géis carregados no protocolo Infogest, a amostra MLS-4/NaCl foi a que apresentou a maior bioacessibilidade da curcumina e a MLS-2/NaCl a menor. Portanto, o tipo de MLS incorporada ao gel teve maior impacto sobre a bioacessibilidade da curcumina do que a estrutura da matriz biopolimérica. No entanto, não é possível generalizar que os géis carregados tiveram valores de bioacessibilidade da curcumina superiores ao das MLS puras, devido aos resultados da avaliação estatística.

Para o protocolo RG, apenas os géis não-carregados adicionados de curcumina livre apresentaram baixos valores de bioacessibilidade, novamente comprovando a eficiência da encapsulação para a proteção do curcuminóide. No entanto, a avaliação estatística apontou que a bioacessibilidade da curcumina dos géis carregados e das dispersões de MLS não diferiram entre si ($p > 0,05$). Este resultado também concorda com aqueles apresentados nas discussões anteriores que verificaram que nos géis carregados, para o protocolo RG, a matriz biopolimérica não promoveu proteção às MLS na etapa duodenal, já que desintegração da rede de gel ocorreu na etapa gástrica. A concentração de tensoativos nas MLS também não influenciou a bioacessibilidade da curcumina nas amostras avaliadas.

Por fim, a comparação estatística entre a bioacessibilidade da curcumina apresentada por um mesmo tipo de amostra, mas para diferentes protocolos, mostra que apenas nos géis carregados MLS-2/NaCl e MLS-4/NaCl o protocolo utilizado impactou nestes resultados.

A encapsulação da curcumina em emulsões produzidas por triacilgliceróis de cadeias médias, como é o caso do óleo de babaçu, tem sido reportada por aumentar a bioacessibilidade do curcuminóide em relação a emulsões produzidas por triacilgliceróis de cadeias longas (AHMED et al., 2012).

Tikekar, Pan e Nitin (2013) avaliaram a liberação após digestão simulada intestinal da curcumina encapsulada em emulsão estabilizada por nanopartículas de sílica e o valor foi de 60 % de liberação. Os resultados dos autores foram próximos aos das dispersões de MLS no presente trabalho, em ambos os protocolos.

Com relação a géis carregados com emulsão, não foram encontradas referências de tais sistemas com o curcuminóide encapsulado. No entanto, Mun, Kim e McClements (2015) avaliaram a bioacessibilidade de β -caroteno encapsulado em emulsões e em géis de amido de arroz carregados de emulsão após digestão intestinal *in vitro*. Para um conteúdo inicial de 4 % de óleo, a bioacessibilidade do bioativo para a emulsão pura e para o gel carregado foram cerca de 5 % e 55 %, respectivamente. Dessa maneira, os autores também obtiveram um aumento na bioacessibilidade do bioativo para o gel carregado em relação à emulsão, tal como discutido para o presente estudo.

Os valores de bioacessibilidade não foram proporcionais aos valores de AGL liberados na FI. Este fato pode estar relacionado a limitações do método de titulação por *pH stat* para a quantificação de AGL liberados (HELBIG et al., 2012). Helbig et al. (2012) compararam a cromatografia gasosa e a titulação por NaOH como métodos de quantificação de AGL liberados de emulsões submetidas a ensaios de digestibilidade *in vitro* em *pH-stat*. Os autores encontraram que o método da titulação por NaOH subestimou a quantidade real de AGL liberados, sendo 60 % menor que àquela quantificada por cromatografia gasosa em emulsões estabilizadas por IPSL.

A detecção dos prótons liberados durante a lipólise pelo método da titulação em *pH stat* requer a ionização parcial dos AG liberados. Numa determinada faixa de pH, os AGL não serão completamente ionizados e a titulação deles será dificultada ou até mesmo impossibilitada (BEISSON et al., 2000). Para o meio com pH 9, todos os AGL seriam liberados (HELBIG et al., 2013). Porém, a força iônica do meio, a presença dos íons Ca^{2+} e dos sais biliares alteram o pKa dos AGL liberados, influenciando a titulação (BEISSON et al., 2000; HELBIG et al., 2013). Desta forma, o valor de pH próximo a 7 no presente trabalho, bem como a alta concentração salina do meio digestivo intestinal e a presença dos sais biliares, podem ter limitado o volume de NaOH utilizado na titulação durante a FI e consequentemente, subestimado a concentração AGL liberados. Sendo assim, a bioacessibilidade da curcumina das micropartículas lipídicas sólidas e dos géis carregados

foram altas, mas o método de *pH stat* pode ter apresentado limitações quanto à quantificação dos AGL liberados.

O gel carregado MLS-4/NaCl para o protocolo Infogest foi o que apresentou o maior valor para a bioacessibilidade da curcumina e portanto, foi a amostra mais vantajosa dentre as demais considerando apenas este resultado. Também com relação aos resultados da bioacessibilidade, ficou claro a encapsulação do curcuminóide como um processo importante para a incorporação deste bioativo em formulações alimentícias. Por fim, ainda com base nos dados da Tabela 5.11, nota-se que a proteção conferida pela matriz biopolimérica em alguns casos, também favoreceu o aumento da bioacessibilidade da curcumina em relação às dispersões de MLS.

6 CONCLUSÕES

Ao final da presente Tese , foi possível concluir que:

- as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas com 2 % e 4 % de tensoativos apresentaram boa estabilidade ao longo de 60 dias de estocagem para os parâmetros investigados. A concentração de tensoativo neste caso não influenciou significativamente na estabilidade das dispersões;
- a concentração mínima de 10 % de IPSL foi necessária para se produzir géis firmes e a incorporação da goma xantana foi essencial para possibilitar géis sem sinérese. Os géis apresentaram estruturas particuladas, porosas e opacas;
- a substituição total ou parcial de água deionizada pelas dispersões de MLS-2 e MLS-4 na hidratação dos géis biopoliméricos mistos foi bem sucedida, possibilitando a obtenção de géis carregados firmes e visualmente sem separação de fases, nos quais as micropartículas ficaram homoganeamente distribuídas na rede biopolimérica;
- diferentes concentrações mássicas de MLS-2 e MLS-4 (0, 25, 50 e 88 % MLS) incorporadas ao géis biopoliméricos sem adição de sal levam a diferentes comportamentos em termos de propriedades mecânicas e reológicas;
- as propriedades mecânicas e reológicas dos géis carregados com 88 % MLS foram influenciadas pela heterogeneidade da matriz de gel, pela adição de NaCl e CaCl₂ e pela concentração de tensoativos nas MLS;
- para a avaliação da digestibilidade *in vitro* das dispersões de MLS e dos géis não-carregados e carregados, a heterogeneidade da matriz de gel, a presença de sal, o tipo de MLS incorporada ao gel e o protocolo utilizado nos ensaios (Infogest ou RG) tiveram grande influência sobre o comportamento das amostras;
- a matriz de gel, de maneira geral, possibilitou proteção às MLS contra o processo de lipólise, o que resultou na desaceleração da cinética de liberação de AGL na etapa duodenal, resultando em maiores valores de AGL liberados e em alguns casos, maiores valores de bioacessibilidade da curcumina para os géis carregados que para as dispersões de MLS;
- as MLS estabilizadas por 4 % de tensoativos apresentaram-se como as mais estáveis ao final dos ensaios de digestibilidade *in vitro*, tanto para a partícula pura quanto para o gel carregado, o que foi associado à maior concentração de tensoativos;

- a encapsulação do curcuminóide nas MLS foi vista como muito útil para se obter maiores valores de bioacessibilidade da curcumina ao final da FI;
- a incorporação de MLS aos géis biopoliméricos foi importante para possibilitar diferentes características mecânicas, reológicas e maiores valores de bioacessibilidade do curcuminóide após a realização de ensaios de digestibilidade *in vitro*;
- os géis incorporados de MLS-4 apresentaram-se como os mais estáveis quanto aos parâmetros colorimétricos medidos ao longo do tempo e quanto aos ensaio de digestibilidade *in vitro*. Portanto, pode-se concluir que, para determinados parâmetros, a formulação de MLS com maior concentração de tensoativos é a mais interessante para a produção de géis carregados de emulsão como produtos alimentícios com possíveis propriedades benéficas à saúde.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

As sugestões apresentadas para eventuais trabalhos futuros incluem:

- Utilização de diferentes tipos de biopolímeros para a produção dos géis mistos, bem como outros métodos de gelificação, a exemplo da gelificação a frio;
- Monitoramento microscópico das alterações sofridas durante os ensaios de digestibilidade simulada;
- Monitoramento da digestão protéica durante os ensaios de digestibilidade simulada por eletroforese;
- Aplicação dos géis carregados de IPSL/goma xantana incorporados com micropartículas lipídicas sólidas encapsulando curcumina na produção de alimentos funcionais.

REFERÊNCIAS

ABHYANKAR, A.R.; MULVIHILL, D.M.; AUTY, M.A.E. Combined confocal microscopy and large deformation analysis of emulsion filled gels and stirred acid milk gels. **Food Structure**, Chicago, v. 1, n. 2, p.127-136, 2014.

ABHYANKAR, A.R.; MULVIHILL, D.M.; AUTY, M.A.E. Combined microscopic and dynamic rheological methods for studying the structural breakdown properties of whey protein gels and emulsion filled gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.25, n. 3, p. 275-282, 2011.

ADITYA, N.P. et al. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: in vitro digestion and antiprostata cancer activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.61, p. 1878-1883, 2013.

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemical and Cell Biology**, Exeter, v.41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGUILERA, J. Gelation of whey proteins: whey proteins undergo gelation through a series of steps involving denaturation, aggregation, strand formation and network formation. **Food Technology**, Chicago, p.49-83, 1995.

AHMED, K. et al. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, London, v. 132, p. 799-807, 2012.

ALI, H.; SIDDIQUI, A.; NAZZAL, S. The effect of media composition, pH, and formulation excipients on the in vitro lipolysis of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v.31, p.226-232, 2010.

ALIZADEH-PASDAR, N.; LI-CHAN, E. C. Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p. 328-334, 2000.

AMMON, H.P.; WAHL, M.A. Pharmacology of Curcuma longa. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 57, n. 1, p. 1-7, 1991

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

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANSARI, M.J.; KOHLI, K.; DIXIT, N. Microemulsions as potential drug delivery systems: a review. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v.62, p.66-79, 2008.

AÑÓS, M. C.; SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J.R. Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.4852-4858, 2001.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v.23, p. 5912-5923, 1984.

ARMAND, M. et al. Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.3, p.333-341, 1992.

ARMAND, M. et al. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.266, 3 pt. 1, p. G372-G381, 1994.

ASGHAR, A. et al. Perspectives of warmed-over flavor. **Food Technology**, Chicago, v.42, p.102-108, 1988.

BAIER, K.S.; McCLEMESTS, J.D. Influence of cosolvent system on the gelation mechanism of globular protein: thermodynamic, kinetic and structural aspects of globular protein gelation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.4, p.43-54, 2005.

BAKRY, A.M. et al. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.15, p.143-182, 2016.

BARBOSA-CANÓVAS, G. V. et al. The rheology of semiliquid foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v.39, p.1-69, 1996.

BARBUT, S. Effects of calcium level on the structure of pre-heated whey protein isolate gels. **Food Science and Technology**, London, v.28, p.598-603, 1995a.

BARBUT, S. Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. **Food Research International**, Oxford, v.28, p.437-443, 1995b.

BARRANTES, E. et al. The manufacture of set-type natural yoghurt containing different oils – 2: Rheological properties and microstructure. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.6, p.827-837, 1996.

BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, London, v.3, p.163-169, 2000.

BAUER, E.; JAKOB, S.; MOSENTHIN, R. Principles of physiology of lipid digestion. **Asian Journal of Animal Sciences**, Faisalabad, v.18, p.282-295, 2005.

BEARE-ROGERS, J. **Dietary fat requirements in health and development**. Champaign: American Oil Chemists Society, 1988.

BEISSON, F. et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.102, p.133-153, 2000.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Lipids and edible fats. In: BELITZ, H.D.; GROSCH, W. SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. New York: Springer-Verlag, 1997.

BELITZ, H.; GROCH, W.; SCHIRBELE, P. **Food chemistry**. 4. ed. Berlin: Springer, 2009.

BENELAM, B. Satiation, satiety and their effects on eating behaviour. **Nutrition Bulletin**, West Sussex, v.34, p.126-173, 2009.

BENSHITRIT, R.C. et al. Development of oral food-grade delivery systems: current knowledge and future challenges. **Food & Function**, Cambridge, v. 3, p.10-21, 2011.

BERNAL, V.; JELEN, P. Thermal stability of whey proteins: a calorimetric study. **Journal of Dairy Science**, New York, v.68, p.2847-2852, 1985.

BERTRAND, M.; TURGEON, S.L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.21, p.159-166, 2006.

BEYSSERAT, M.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS D.J. Influence of dietary fiber on properties of oil-in-water emulsions passed through an *in vitro* human digestion model. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 20, p. 800-809, 2006.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 21, p.703-710, 2011.

BORREANI, J. et al. Adding neutral or anionic hydrocolloids to dairy proteins under *in vitro* gastric digestion conditions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.57, p.169-177, 2016.

BORGOGNA, M. et al. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.122, p. 416-423, 2010.

BOS, M.A.; VAN VLIET, T. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.91, p.437-471, 2001.

BOYE, J.I. et al. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.5, p.337-353, 1995.

BOYE, J.I.; ALLI, I.; ISMAIL, A. A. Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p.996-1004, 1996.

BOYE, J.I. et al. Microstructural properties of heat-set whey protein gels: effect of pH. **LWT-Food Science and Technology**, London, v.33, p.165-172, 2000.

BRYANT, C.; McCLEMENTS, D.J. Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 65, p. 801-804, 2000a.
BRYANT, C.; McCLEMENTS, D.J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.14, p.383-390, 2000b.

BRYANT, C.; McCLEMENTS, D.J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.9, p.143-151, 1998.

CAETANO-SILVA, M.E. et al. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as a whey peptide-iron complexes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, 2017. In press.

ÇAKIR, E.; FOEGEDING, E. A. Combining protein micro-phase separation and protein-polysaccharide segregative phase separation to produce gel structures. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p.1538-1546, 2011.

CALVO, M. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of α -lactalbumin. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 3, p.719-727, 1993.

CANO-HIGUITA, D.M.; VÉLEZ, H.A.V.; TELIS, V.R.N. Microencapsulação de oleoresina de cúrcuma em misturas binárias e ternárias de goma arábica, maltodextrina e amido modificado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.39, n. 2, p.173-182, 2015.

CARRIERE, F. et al. Does the pancreas really produce much more lipase than required for fat digestion? **JOP: Journal of the Pancreas**, Genova, v.6, p.206-215, 2005.

CHANTRAPORNCHAI, W.; McCLEMENTS, D. J. Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.16, p.467-476, 2002.

CLARK, A. H.; LEE-TUFFNELL, C. D. Gelation of globular proteins. In: HILL, S. E.; MITCHELL, J. R.; LEDWARD, D. A. **Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier, 1986. p. 203-272.

CLARK, A. H. Kinetics of demixing. In: HARDING, S. E.; HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. **Biopolymer mixtures**. Nottingham: Nottingham University Press, 1995. p.37-64.

CLARK, A. H. Gelation of globular protein. In: HILL, S. E.; MITCHELL, J. R.; LEDWARD, D. A. **Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier, 1998. p. 77-138.

CHEN, J.; DICKINSON, E. Effect of surface character of filler particles on rheology of heat-set whey protein emulsion gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.12, p.373-381, 1999.

CHEN, J. et al. Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 33, p.299-307, 2000.

CHEN, L. et al. In vitro study of the release properties of soy-zein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.58, p.9861-9867, 2010.

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

CHEN, F.P.; LI, B.S.; TANG, C.H. Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: influence on curcumin stability/bioaccessibility and in vitro protein digestibility. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.63, p.3559-3569, 2015.

CHONJNICKA, A. et al. The interactions between oil droplets and gel matrix affect the lubrication properties of sheared emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.23, p.1038-1046, 2009.

CHUNG, C.; DEGNER, B.; McCLEMENTS, D.J. Creating novel food textures: modifying rheology of starch granule suspensions by cold-set whey protein gelation. **LWT- Food Science and Technology**, London, v.54, p.336-345, 2013.

COMUNIAN, T.A. et al. Fabrication of solid lipid microcapsules containing ascorbic acid using a microfluidic technique. **Food Chemistry**, London, v.152, p.271-275, 2014.

CORREDIG, M. Protein-protein interactions in food. In: ANILKUMAR, G.G.; McPHERSON. **Ingredient interactions: effects on food quality**. 2nd. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006, p. 294-296.

COUVREUR, P.; DUBERNET, F.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics**, London, v.41, p. 2-13, 1995.

DAHAN, A.; HOFFMAN, A. Use of a dynamic in vitro lipolysis model to rationalize oral formulation development for poor water soluble drugs: correlation with in vivo data and the relationship to intra-enterocyte processes in rats. **Pharmaceutical Research**, New York, v.23, p.2165-2174, 2006.

DAHAN, A.; HOFFMAN, A. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.129, p.1-10, 2008.

DAMODARAN, S. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In: KINSELLA, J. E.; SOUCIE, W.G. **Food proteins**. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 1989. p.21.

DAMODARAN, S. Food proteins: an overview. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. p. 1-24.

DAMODARAN, S. P., K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre, Atmed. 2010.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 12, p. 62-76, 2011.

DAYRIT, F.M. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 92, p.1-15, 2015.

DE MARIA, P. D. et al. Role of apparent pK(a) of carboxylic acids in lipase-catalyzed esterifications in biphasic systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.59, p.220-224, 2009.

DEMETRIADES, K.; McCLEMENTS, D.J. Influence of pH and heating on physicochemical properties of whey-protein stabilized emulsions containing a nonionic surfactant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.46, p.3936-3942, 1998.

DIAS, M.I.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARREIRO, M.F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, Cambridge, v.6, p. 1035-1052, 2015.

DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, p.15-28, 2004.

DICKINSON, E. Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. **Journal of Science Food Agricultural**, West Sussex, v. 93, p.710-721, 2013.

DICKINSON, E. Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 28, p.224-241, 2012.

DICKINSON, E. Protein polysaccharide interactions. In: DICKINSON, E.; McCLEMENTS, D.J. **Advances in food colloids**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 81-101.

DICKINSON, E. Protein-polysaccharide interactions in food colloids. In: DICKINSON, E.; WALSTRA, P. **Food colloids and polymers: stability and mechanical properties**. Oxford: Woodhead Publishing, 1993. p. 77-93.

DICKINSON, E.; CHEN, J. Heat-set whey protein emulsion gels: role of active and inactive filler particles. **Journal Dispersion Science and Technology**, New York, v.20, p.197-213, 1999.

DOI, E. et al. Relationship of SH groups to functionality of ovalbumin. In: KINSELLA, J.E.; SOUCIE, W.G. **Food proteins**. Champaign: American Oil Chemistry's Society, 1989. p. 252-266.

DOI, E. Gels and gelling of globular proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.4, p.1-5, 1993.

DONSI, F. et al. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion based delivery systems. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v.1, p.1666-1671, 2011.

EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. **Methods of Biochemical Analysis**, Hoboken, v.35, p.127-205, 1991.

EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biophysical Journal**, Saint Louis, v.66, p.482-501, 1994.

EGGER, L. et al. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: from knowledge to action. **Food Research International**, Barking, v.88, p.217-225, 2016.

ELEYA, M.M.O.; TURGEON, S. L. Rheology of k-carrageenan and b-lactoglobulin mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.14, p.29-40, 2000.

EVANS, M. T. A.; GORDON, J. F. Whey proteins. In: GRANT, A. R. **Applied protein chemistry**. London: Applied Science, 1979. p. 31-67.

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

FATHI, M.; MARTIN, A.; McCLEMENTS, D.J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends Food Science & Technology**, Cambridge, v. 39, p.18-39, 2014.

FITZSIMONS, S.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.D. Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 22, p.576-586, 2008.

FOEGEDING, E. A.; BOWLAND, E.L.; HARDIN, C.C. Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.9, p.237-249, 1995.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food protein functionality: a comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p.1853-1864, 2011.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited review: sensory and mechanical properties of cheese texture. **Journal of Dairy Science**, New York, v.90, p.1611-1624, 2007.

FOX, P. F. The milk protein system. In: FOX, P. **Developments in dairy chemistry**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. v. 4, p. 1-53.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.146-237.

GARTI, N. Double emulsions: scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.123, p. 233-246, 1997.

GASA-FALCON, A. et al. Influence of mandarin fiber addition on physico-chemical properties of nanoemulsions containing betacarotene under simulated gastrointestinal digestion conditions. **LWT- Food Science and Technology**, London, 2017. In press.

GASS, J. et al. Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.133, p.16-23, 2007.

GBASSI, G.K. et al. Whey proteins analysis in aqueous medium and in artificial gastric and intestinal fluids. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, Cameroon, v.6, p.1828-1837, 2012.

GÉISER, M. The wonders of whey protein. **NSCA's Performance Training Journal**, Colorado Springs, v.2, p.13-15, 2003.

GESCHER, A.J.; SHARMA, R.A.; STEWARD, W.P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, London, v.2, p.371-379, 2001.

GEZIMATI, J.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Heat-induced interactions and gelation of mixtures of bovine α -lactoglobulin and serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p.804-810, 1996.

GIROUX, H. J.; BRITTEN, M. Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 28, p.337-343, 2011.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curcumin": from kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.75, p.787-809, 2008.

GOLDING, M. et al. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. **Soft Matter**, Cambridge, v.7, p.13-23, 2011.

GOLDING, M.; WOOSTER, T. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v.15, p.90-101, 2010.

GOMES, G. V. L. et al. Characterization and shelf life of β -carotene loaded solid lipid microparticles produced with stearic acid and sunflower oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.56, p.663-671, 2013.

- GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUNÓZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v.29, p.302-307, 2015.
- GRINBERG, V.Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.11, p. 145-158, 1997.
- GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, London, v. 83, p.31-40, 2007.
- GUO, Q. et al. Impact of colloidal structure of gastric digesta on in-vitro intestinal digestion of whey protein emulsion gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.54, p. 255-265, 2016.
- GUO, Q. et al. Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels. **Soft Matter**, Cambridge, v. 10, p.1214-1223, 2014a.
- GUO, Q. et al. Behaviour of whey protein emulsion gel during oral and gastric digestion: effect of droplet size. **Soft Matter**, Cambridge, v.10, p.4173-4183, 2014b.
- GUO, Q. et al. The breakdown properties of heat-set whey protein emulsion gels in the human mouth. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.33, p.215-224, 2013.
- GWARTNEY, E. A.; LARICK, D. K.; FOEGEDING, E. A. Sensory texture and mechanical properties of stranded and particulate whey protein emulsion gels. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.69, p.333-339, 2004.
- HAQUE, Z.; KINSELLA, J. E. Heat-induced changes in the hydrophobicity of kappa casein and b-lactoglobulin. **Agricultural and Biological Chemistry**, Oxfordshire, v.51, p. 2245-2247, 1987.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.50, p.486-491, 1985.
- HE, J.S.; MU, T.H.; WANG, J. A comparative in vitro study of the digestibility of heat- and high pressure induced gels prepared from industrial milk whey proteins. **High Pressure Research**, Oxfordshire, v.33, p. 328-335, 2013.
- HEBERT, S. et al. Fluorescence spectroscopy investigation of acid- or rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Science**, New York, v.82, p.2056-2062, 1999.
- HELBIG, A. et al. In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.28, p.10-19, 2012.
- HELBIG, A. et al. Lipid digestion of protein stabilized emulsions investigated in a dynamic in vitro gastro-intestinal model system. **Food Digestion**, New York, v.4, p.58-68, 2013.

HERMANSSON, A.M. Gel structure of food biopolymers. In: BLANSHARD, J.M.V.; MITCHELL, J.R. **Food structure: its creation and evaluation**. London: Butterworths, 1988. p.25-40.

HIROSE, M. Molten globule state of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.4, p.48-51, 1993.

HOFFMAN, J.R.; FALVO, M.J. Protein-which is best? **The Journal of Sports Science and Medicine**, Bursa, v.3, p.118-130, 2004.

HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Protein and salt effects on Ca²⁺-induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.62, p.382-385, 1997.

HOU, Z. Q. et al. Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.26, p.205-211, 2012.

HU, F. B. et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v.337, p.1491-1499, 1997.

HU, K. et al. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. **Food Chemistry**, London, v.182, p.275-281, 2015.

HUR, S.J.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. **Food Chemistry**, London, v. 114, p.253-262, 2009.

HUR, S. J. et al. Impact of salt and lipid type on in vitro digestion of emulsified lipids. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 126, p. 1559-64, 2011.

IKEDA, S.; FOEGEDING, E.A.; HAGIWARA, T. Rheological study on the fractal nature of the protein gel structure. **Langmuir**, Washington, v.15, p.8584-8589, 1999.

JAUREGUI, C. A.; REGENSTEIN, J. M.; BAKER, R. C. A simple centrifugal method for measuring expressible moisture, a water-binding property of muscle foods. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.46, p.1271-1273, 1981.

JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M.; SAKARIAH, K.K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.16, p.533-548, 2005.

JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.21, p. 1172-1187, 2007.

JOUNG, H. J. et al. Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: antioxidant property and in vitro digestion. **Journal of Food Science**, Champaign, v.81, p.N745-N753, 2016.

JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; McCLEMENTS, D.J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 40, p. 1-15, 2014.

KALAPATHY, U.; HETTIARACHCHY, N. S.; RHEE, K. C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 74, p. 195-199, 1997.

KANG, K.S.; PETTITT, D.J. Xanthan-gellan-welan and rhamosan. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 341-397.

KHAN, A.Y. et al. Multiple emulsions: an overview. **Current Drug Delivery**, Bussun, v.3, p.429-43, 2006.

KINSELLA, J. E. Functional properties of food proteins: a survey. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.7, p.219-280, 1976.

KITABATAKE, N.; DOI, E. Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. **Food Review International**, New York, v.9, p.445-471, 1993.

KOKINI, J.; VAN AKEN, G. Discussion session on food emulsions and foams. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.20, p. 438-445, 2006.

KRIS-ETHERTON, P. et al. Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health: conference summary from the nutrition committee of the American Heart Association. **Circulation**, Baltimore, v.103, p.1034-1039, 2001.

KRUIF, C.G. de; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 15, p. 555-563, 2001.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J.C.; CREAN, A.M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.50, p.951-968, 2010.

KUKIZAKI, M.; GOTO, M. Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification. **Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.293, p.87-94, 2007.

KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmacology**, Faisalabad, v. 58, p. 237-40, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. Protein fluorescence. In: LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Academic/Plenum Publishers, 1999. p. 466-485.

LEE, S.J. et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.59, p.415-427, 2011.

LEGOWO, A. M.; IMADE, T.; HAYAKAWA, S. Heat-induced gelation of the mixtures of β -lactalbumin and α -lactoglobulin in the presence of glutathione. **Food Research International**, Oxford, v.26, p.103-108, 1993.

LESMES, U.; McCLEMENTS, D. J. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 20, p.448-457, 2009.

LI, J.; ELEYA, O. M.M.; GUNASEKARAN, S. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 20, p.678-686, 2006.

LI, Y. et al. Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 122-130, 2011.

LIMA, C. G. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo Óleo de babau (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 239-245, 2008.

LIU, X. et al. Modification of whey protein concentrate hydrophobicity by high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v.6, p.310-317, 2006.

LIU, X. et al. Enhancement of nutraceutical bioavailability using excipient nanoemulsions: role of lipid digestion products on bioaccessibility of carotenoids and phenolics from mangoes. **Journal of Food Sciences**, Champaign, v.81, n. 3, p.N754-N761, 2016.

LORENZO, G.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.30, p.672-680, 2013.

LOWE, M. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, Rockville, v. 43, n. 12, p. 2007-2016, 2002.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.9, p.275-279, 1999.

MACIERZANKA, A. et al. The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.134, p. 2156-2163, 2012.

MACKIE, A.; MACIERZANKA, A. Colloidal aspects of protein digestion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v.15, p.102-108, 2010.

MADENCI, D.; EGELHAAF, S. U. Self-assembly in aqueous bile salt solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v.15, p.109-115, 2010.

MAJHI, P. R. et al. Electrostatically driven protein aggregation: β -lactoglobulin at low ionic strength. **Langmuir**, Washington, v.22, p.9150-9159, 2006.

MAHESHWARE, R.K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 18, p. 2081-2087, 2006.

MALAGELADA, J.R.; GO, V. L.W.; SUMMERSKILL, W.H.J. Different gastric, pancreatic, and biliary responses to solid-liquid or homogenized meals. **Digestive Disease and Sciences**, New York, v. 24, p. 101-110, 1979.

MALONE, M.E.; APPELQVIST, I.A.M.; NORTON, I.T. Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 1. Lubrication and deposition considerations. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.17, p.763-773, 2003.

MANDALARI, G. et al. Physiological phosphatidylcholine protects bovine beta-lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.53, suppl 1, p. S131-S139, 2009.

MARANGONI, A. G. et al. On the structure of particulate gels: the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.14, p.61-74, 2000.

MARCIANI, L. et al. Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystinin release and gallbladder contraction. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 292, p. G1607-G1613, 2007.

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 1374-1382, 2006.

MASWAL, M.; DAR, A.A. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.37, p.182-195, 2014.

MATOS-JÚNIOR, F. E. et al. Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. **Food Research International**, Oxford, v.67, p. 52-59, 2015.

MATSUDOMI, N. et al. Enhanced heat-induced gelation of β -lactoglobulin by α -lactalbumin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxfordshire, v. 56, p.1697-1700, 1992.

MATSUDOMI, N. et al. α -Lactalbumin enhances the gelation properties of bovine serum albumin. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.41, p.1053-1057, 1993.

McCLEMENTS, D.J.; MONAHAN, F. J.; KINSELLA, J. E. Effect of emulsion droplets on the rheology of whey protein isolate. **Journal of Texture Studies**, Westport, v.24, p.411-422, 1993.

McCLEMENTS, D. J. **Food emulsion**: principles, practice, and techniques. Boca Raton: CRC Press, 2005.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, Champaign, v.72, p.109-124, 2007.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A, PARK, Y. Physicochemical and structural aspects of lipid digestion. In: McCLEMENTS, D. J. **Understanding and controlling the microstructure of complex foods**. BocaRaton, FL: CRC Press, 2007. p. 483-503.

McCLEMENTS, D.J. et al. Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components. **Food Biophysics**, New York, v.3, p.219-228, 2008.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.49, p.48-67, 2009.

McCLEMENTS, D. J. et al. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.49, p. 577-606, 2009.

McCLEMENTS, D.J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annual Review Food Science Technology**, Palo Alto, v.1, p.241-269, 2010.

McCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v.159, p. 2013-228, 2010.

McCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid Interface Science**, Oxford, v.17, p.235-45, 2012.

McCLEMENTS, D.J.; XIAO, H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. **Food & Function**, Cambridge, v.3, p. 202-220, 2012.

McCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 219, p. 27-53, 2015.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.47, p. 165-196, 2001.

MELLEMA, M. et al. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 98, p. 25-50, 2002.

MESA, M. D et al. Efectos nutricionales y farmacológicos de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminóides. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 41, p.307-321, 2000.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v.8, p.107-112, 1997.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, Cambridge, v.5, p.1113-1124, 2014.

MINE, Y. Effect of dry heat and mild alkaline treatment on functional properties of egg white proteins. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v.45, p.2924-2928, 1997.

MORO, A.; GATTI, C.; DELORENZI, N. Hydrophobicity of whey protein concentrates measured by fluorescence quenching and its relation with surface functional properties. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v.49, p. 4784-4789, 2001.

MORENO, F.J.; MACKIE, A.R.; MILLS, E.N. Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p.9810-9816, 2005.

MORR, C. V. Symposium: milk proteins in dairy and food processing. **Journal of Dairy Science**, Amsterdam, v.58, p.977-984, 1975.

MORR, C. V. et al. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.50, n.6, p.1715-1718, 1985.

MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.33, n.6, p.431-476, 1993.

MORRIS, V.J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A.M. **Food polysaccharides and their application**. New York: Springer, 1995. p. 41-375.

MOUÉCOUCOU, J. et al. Beta-lactoglobulin/ polysaccharide interactions during in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1670, p.105-112, 2004.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.54, p.S131-S155, 2002.

MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. Whey Proteins and their thermal denaturation: a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, Carlow, v. 11, p. 43-75, 1987.

MULVIHILL, D.M.; KINSELLA, J.E. Gelation of β -lactoglobulin: effects of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.53, p.231-236, 1988.

MULVIHILL, D. M.; ENNIS, M. P. Functional milk proteins: production and utilization. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. v. 1, parte B, p. 1176-1128.

MUN, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, Barking, v.40, p.770-781, 2007.

MUN, S.; KIM, Y.; McCLEMENTS, D. J. Control of b-carotene bioaccessibility using starch-based filled hydrogels. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.173, p.454-461, 2015.

MUN, S. et al. Control of lipid digestion and nutraceutical bioaccessibility using starch-based filled hydrogels: Influence of starch and surfactant type. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.44, p.380-389, 2015.

NAKAI, S.; CHAN, L. Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 68, p.2763-2772, 1985.

NIK, A.M.; CORREDIG, M.; WRIGHT, A.J. Changes in WPI-stabilized emulsion interfacial properties in relation to lipolysis and β -carotene transfer during exposure to simulated gastric-duodenal fluids of variable composition. **Food Digestion**, New York, v. 1, p. 14-27, 2010.

NIK, A.M.; WRIGHT, A.J. Micellization of beta-carotene from soy-protein stabilized oil-in-water emulsions under *in vitro* conditions of lipolysis. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Heidelberg, v. 88, n. 9, p. 1397-1407, 2011.

NILSSON, N.O.; BELFRAGE, P. Continuous monitoring of free fatty-acid release from adipocytes by pH-stat titration. **Journal of Lipid Research**, Rockville, v.20, p.557-560, 1979.

NORTON, I.; MOORE, S.; FRYER, P. Understanding food structuring and breakdown: engineering approaches to obesity. **Obesity Reviews**, Oxford, v.8, p.83-88, 2007.

- NYLANDER, T. et al. Protein/emulsifier interactions. In: HASENHUETTL, G.L.; HARTEL, R.W. (Ed.). **Food emulsifier and their applications**. New York: Springer, 2008. p. 89-156.
- OAKENFUL, A.; PEARCE, J.; BURLEY, R.W. Protein gelation. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.11-143.
- OKADA, K. et al. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 31, p. 2090-2095, 2001.
- OKURO, P. K. Co- encapsulation of Lactobacillus acidophilus with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, Oxford, v.53, p. 96-103, 2013.
- OLIVER, L.; SCHOLTEN, E.; VAN AKEN, G.A. Effect of fat hardness on large deformation rheology of emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.4, p.299-310, 2015.
- OLIVER, L.; WIECK, L.; SCHOLTEN, E. Influence of matrix inhomogeneity on the rheological properties of emulsion-filled gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.52, p.116-125, 2016.
- O'LOUGHLIN, I.B. et al. Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.60, p. 4895-4904, 2012.
- OWENS, A. J.; JONES, R. A. L. Rheology of simultaneously phase separating and gelling biopolymer mixture. **Macromolecules**, Washington, v.31, p.7336-7339, 1998.
- PAFUMI, Y. et al. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.28070-28079, 2002.
- PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.72, p. R21-R32, 2007.
- PARADISO, V.M. et al. Production and characterization of emulsion filled gels based on inulin and extra virgin olive oil. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.45, p.30-40, 2015.
- PARASKEVOPOULOU, D.; BOSKOU, D.; PARASKEVOPOULOU, A. Oxidative stability of olive oil-lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.101, p.1197-1204, 2007.
- PAZ, J.C.S.N.; NETTO, F.M. Caracterização estrutural e funcional de géis simples e mistos de isolados protéicos de soja e de soro de leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Rio de Janeiro, p. 8-14, 2006.

PEDROSO, D. L. et al. Protection of bifidobacterium lactis and lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, Barking, v.26, p.127-132, 2012.

PEREIRA, R. et al. Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: a sensory perspective. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.20, p.305-313, 2006.

PEREIRA, C.P. **Digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de babaçu e determinação de bioacessibilidade de quercetina encapsulada**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

PELEGRINE, D. H. G.;GASPARETTO, C.A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**,Campina Grande,v.5, p.57-65, 2003.

PELEGRINE, D. H. G.; GOMES, M.T.M. Whey proteins solubility curves at several temperatures values. **Ciência e Natura**,Santa Maria, v.30, p.17-25, 2008.

PESSOA, R.S. et al. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v.9,p.21-31, 2015.

PICONE, P.S.F.; CUNHA, R.L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.24,p. 502-511, 2010.

PICONE, P.S.F.; TAKEUCHI, K.P.; CUNHA, R.L. Heat-induced whey protein gels: effects of pH and the addition of sodium caseinate. **Food Biophysics**, New York, v.6, p. 77-83, 2011.

PHAM, L.J.et al. Triacylglycerols and regiospecific fatty acid analyses of Philippine seed oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg,v.75, p.807-811, 1998.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. E. **Structure function properties of food proteins**. San Diego: Academic Press, 1994.

POOL, H.et al. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food and Function**, Cambridge, v. 4, p.162-174, 2013.

PORTER, C.J.H.; TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, W.N.Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**,London, v.6, p. 231-248, 2007.

PORSGAARD, T.; HOY, C.E.Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v.130, p.1619-1624, 2000.

POUTON, C.W.; PORTER, C.J.H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 625-637, 2008.

PURWANTI, N.; PETERS, J.P.C.M.; VAN DER GOOT, A.J. Protein micro-structuring as a tool to texturize protein foods. **Food & Function**, Cambridge, v. 4, p. 277-282, 2013.

QIAN, C. et al. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on b-carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.135, p.1440-1447, 2012.

QUINTANA, J.M. et al. Linear and nonlinear viscoelastic behavior of oil-in-water emulsion stabilized with polysaccharides. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 33, p. 215-236, 2002.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p.755-760, 2006.

RAMAPRASAD; C.; SIRSI, M. M. Studies on Indian medicinal plants: Curcuma longa Linn.: in vitro antibacterial activity of curcumin and the essential oil. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v.15, p.239-241, 1956.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAO, D.S. et al. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, v.100, p.1307-1315, 1970.

REIFFERS-MAGNANI, C. K.; CUQ, J. L. WATZKE, H. J. Composite structure formation in whey protein stabilized O/W emulsions. 1. Influence of the dispersed phase on viscoelastic properties. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 13, p. 303-316, 1999.

RENARD, D. et al. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.242, p.163-166, 2002.

RENARD, D.; VAN DE VELDE, F.; VISSCHER, R.W. The gap between food gel structure, texture and perception. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.20, p.423-431, 2006.

RING, S.; STAINSBY, G. Filler reinforcement of gels. **Progress in Food and Nutrition Science**, New York, v.6, p.355-361, 1982.

ROSS-MURPHY, S. B. Incipient behavior of gelatin gels. **Rheologica Acta**, v. 30, p.401-411, 1991.

ROSS-MURPHY, S. B. **Rheological methods**. In: CHAN, H.W.-S. Biophysical methods in food research. Londres: Critical reports on applied chemistry. London: SCI, 1984, p. 195-290.

RUBY, A. J. et al. Antitumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 94, p. 79-83, 1995.

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U. Fluorescence study of the curcumin: casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, p. 2905-2912, 2008.

SALA, G. et al. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: effect of gelling agent concentration and oil droplet size. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.23, p.1853-1863, 2009a.

SALA, G. et al. Deformation and fracture of emulsion-filled gels: effect of oil content and deformation speed. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.23, p.1381-1393, 2009b.

SALA, G. et al. Oil droplet release from emulsion-filled gels in relation to sensory perception. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 21, p. 977-985, 2007.

SALMINEN, H. et al. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.426, p.256-263, 2014.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Influence of particle size on lipid digestion and b-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. **Food Chemistry**, London, v.141, p.1472-1480, 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. The influence of lipid droplet size on the oral bioavailability of vitamin D₂ encapsulated in emulsions: an *in vitro* and *in vivo* study. **Food & Function**, Cambridge, v. 22, n. 8, p. 767-777, 2017.

SANCHEZ, C. et al. Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels: effect of pH and xanthan concentration. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 41, n. 6, p. 336-343, 1997.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A. Nanoscale materials development: a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 17, p. 547-556, 2006.

SANTOS, D.S. et al. Extraction and evaluation of fatty acid composition of *Orbignya phalerata* Martius oils (Arecaceae) from Maranhão state, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 355-362, 2013.

SARKAR, A.; HORNE, D. S.; SINGH, H. Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.24, p.142-151, 2010.

SARKAR, A. et al. Impact of protein gel porosity on the digestion of lipid emulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 63, p.8829-8837, 2015.

SATO, A.C.K.; MORAES, K.E.F.P.; CUNHA, R.L. Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 34, p. 184-192, 2014.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v.1482, p.136-148, 2000.

SCHMITT, C. et al. Structure and techofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v.38, p. 686-753, 1998.

SCHMITT, C. et al. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties. **Langmuir**, Washington, v.23, p.4155e4166, 2007.

SCHOKKER, E.P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. **Internatinal Dairy Journal**, Amsterdam, v.10, p. 843-853, 2000.

SEGAT, A. et al. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, Oxford, v.66, p.365-372, 2014.

SEMISOTNOV, G. V. et al. Study of the molten globule intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. **Biopolymers**, Hoboken, v.31, p.119-128, 1991.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades - degradações - modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996, p.149-155.

SHARMA, R.A. et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.7, p.1894-1900, 2001.

SHARMA, R.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P. Curcumin: the story so far. **European Journal of Cancer**, New York, v.41, p.1955-1968, 2005.

SHEFER, A.; SHEFER, S. Novel encapsulation system provides controlled release of ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 57, p. 40-43, 2003.

SILVA, J.C. **Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas de óleo de palmiste**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SILVA, J. C. et al. Characterization, physicochemical stability, and evaluation of in vitro digestibility of solid lipid microparticles produced with palm kernel oil and tristearin. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, p.532-538, 2014.

SILVA, G.S. et al. Characterisation of curcumin-loaded proliposomes produced by coating of micronised sucrose and hydration of phospholipid powders to obtain multilamellar

liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.52, p.772-780, 2017.

SINGH, H.; HEVEA, P. Functional milk proteins: production and utilization. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. v. 1, parte B, p. 1261-1287.

SINGH, H.; YE, A.Q.; HORNE, D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.48, p.92-100, 2009.

SNABE, T.; NEVES-PETERSEN, M.T.; PETERSEN, S.B. Enzymatic lipid removal from surfaces - lipid desorption by a pH-induced "electrostatic explosion". **Chemistry and Physics of Lipids**, Shannon, v.133, p.37-49, 2005.

SOMPARN, P. et al. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 30, n. 1, p. 74-78, 2007.

STADING, M.; HERMANSSON, A.M. Viscoelastic behavior of β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.4, p.121-135, 1990.

STANCIUC, N. et al. Denaturation impact in susceptibility of beta-lactoglobulin to enzymatic hydrolysis: a kinetic study. **Revue Roumaine de Chimie**, Bucharest, v.53, p.921-929, 2008.

STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering. 2nd. ed. East Lansing, MI: Freeman Press, 1996.

STRATULAT, I. et al. Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 6, p. 48-59, 2014.

SUBRAMANIAN, L.; SELVAM, R. Prevention of CCl₄-induced hepatotoxicity by aqueous extract of turmeric. **Nutrition Research**, New York, v.19, p.429-441, 1999.

SUETH-SANTIAGO, V. S. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, p. 538-552, 2015.

SUN, C.; GUNASEKARAN, S.; RICHARDS, M. P. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 21, p. 555-564, 2007.

SYRBE, A. et al. Whey + polysaccharide mixtures: polymer incompatibility and its implication. In: DICKINSON, E.; LORIENT, D. **Food macromolecules and colloids**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. p. 328-339.

SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems - an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.179-193, 1998.

- TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.67,p.147-156, 2005.
- TAKATA, T. **Gels**. New York: Scientific American, 1981. v.244, p.124-136.
- TANG, C. H. Functional foods from spice turmeric. In: TANG, C.H. **Plantfunctional foods**. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.p. 379-402.
- THAKKAR, S. K. et al.Beta-Carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to beta-carotene content in different genotypes of cassava. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.137, p.2229-2233, 2007.
- TIKEKAR, R.V.; NITIN, N.Effect of physical state (solid vs. liquid) of lipid core on the rate of transport of oxygen and free radicals in solid lipid nanoparticles and emulsion.**Soft Matter**, Cambridge, v.7,p.8149-8157, 2011.
- TIKEKAR, R.V.; PAN, Y.; NITIN, N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion.**Food Research International**, Barking, v.51, p. 370-377, 2013.
- TING, Y.W. et al.Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam,v.7, p.112-128, 2014.
- TOBITANI,A.; ROSS-MURPHY, S. Heat-induced gelation of globular proteins: 1 Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels.**Macromolecules**, Washington, v.30, p.4845-4854, 1997.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of protein–polysaccharide mixtures. In: MITCHELL, J.R.; LEDWARD, D.A. **Functional properties of food macromolecules**. Londres: Elsevier Applied Science Publ., 1986. p. 395-415.
- TOLSTOGUZOV, V.Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.4, p. 429-468, 1991.
- TOLSTOGUZOV, V. B. Protein-polysaccharide interactions. In:DAMODARAN, S.; PARAF, A. **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997. p. 171-198.
- TOLSTOGUZOV, V.Some thermodynamic considerations in food formulation.**Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.17,p. 1-23, 2003.
- TÖNNESEN, H.H.; GREENHILL, J.V. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII. Curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger.**International Journal Pharmaceutics**,Amsterdam, v.87, p.79-87, 1992.
- TOTOSAUS, A. et al. A review of physical and chemical protein-gel induction.**International Journal of Food Science and Technology**, West Sussex, v. 37, p. 589-601, 2002.

TROJER, M.A. et al. Encapsulation of actives for sustained release. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v.15, p.17727-17741, 2013.

UBBINK, J. Flavor delivery systems: trends, technologies and applications. In: **ABSTRACTS of papers of the American Chemical Society**. 16th. Washington: American Chemical Society, 2002. v.223, p.244-254.

UBBINK, J.; KRUGER, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.17, p.244-254, 2006.

UMEYOR, E. C. et al. Preparation of novel solid lipid microparticles loaded with gentamicin and its evaluation in vitro and in vivo. **Journal of Microencapsulation**, London, v.29, p.296-307, 2012.

UHRINOVA, S. et al. Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the beta lactoglobulin dimer. **Biochemistry**, Washington, v.39, p.3565-3574, 2000.

URIOSTE, D. et al. Synthesis of chromatographic standards and establishment of a method for the quantification of the fatty ester composition of biodiesel from babassu oil. **Química Nova**, São Paulo, v.31, p.407-412, 2008.

VAN AKEN, G. A.; VINGERHOEDS, M. H.; WIJK, R. A. de. Textural perception of liquid emulsions: role of oil content, oil viscosity and emulsion viscosity. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.25, p.789-796, 2011.

VAN AKEN, G.A. et al. Differences in *in vitro* gastric behavior between homogenized milk and emulsions stabilized by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.25, p.781-788, 2011.

VAN AKEN, G. A.; OLIVER, L.; SCHOLTEN, E. Rheological effect of particle clustering in gelled dispersions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.48, p.102-109, 2015.

VAN VLIET, T. Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. **Colloid & Polymer Science**, Heidelberg, v.266, p.518-524, 1988.

VAN VLIET, T. Factors determining small-deformation behaviour of gels. In: DICKINSON, E.; RODRIGUEZ PATINO, J. M. **Food emulsions and foams: interfaces, interactions and stability**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. p.307-317.

VAN VLIET, T.; LAKEMON, C.M.M.; VISSCHERS, R.W. Rheology and structure of milk protein gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v.9, p.298-304, 2004.

VAN RUTH, S. M.; O'CONNOR, C. H.; DELAHUNTY, C. M. Relationships between temporal release of aroma compounds in a model mouth system and their physico-chemical characteristics. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.71, p.393-399, 2000.

VELIKOV, K.P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **Soft Matter**, Cambridge, v.4, p.1964-1980, 2008.

VERSANTVOORT, C.H.M.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C.J.M. **Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food**. Bilthoven, the Netherlands: Off. Insp. Health Insp., 2004. Disponível em: <<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320102002.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2015.

VOJDANI, F. Solubility. In: Hall, G. M. (Ed.). **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic and Professional, 1996, p. 11-61.

VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, Barking, v.20, p.292-302, 2010.

WALSTRA, P. Proteins. In: WALSTRA, P. **Physical chemistry of foods**. New York: Marcel Dekker, 2003. cap.7.

WANG, Y. et al. Study on the antibacterial activity of microcapsule curcumin against food borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.136, p.71-74, 2009.

WANG, P. et al. Preliminary study into the factors modulating β -carotene micelle formation in dispersions using an in vitro digestion model. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 26, p.427-433, 2012.

WEISS, J. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, New York, v.3, p.146-154, 2008

WICHCHUKIT, S. et al. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 33, p.66-73, 2013.

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**, Washington, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

WILLETT, W. C. Dietary fats and coronary heart disease. **Journal of International Medicine**, Chichester, v. 272, p. 13-24, 2012.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MULLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Review**, Amsterdam, v.56, p.1257-72, 2004.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Carbohydrate chemistry for food scientists**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1997.

WOOSTER, T.J. et al. Impact of different biopolymer networks on the digestion of gastric structured emulsions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.36, p.102-114, 2014.

XIANG, B. Y. et al. Pulsed electric field-induced structural modification of whey protein isolate. **Food Bioprocess Technology**, New York, v.4, p.1341-1348, 2011.

XIONG, Y. L. L. Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.40, p.380-384, 1992.

YADAV, V. R. et al. Novel formulation of solid lipid microparticles of curcumin for anti-angiogenic and anti-inflammatory activity for optimization of therapy of inflammatory bowel diseases. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 61, p.311-321, 2009.

YAMAMOTO, Y.; DICKINSON, E. Rheology of protein gels and protein stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. In: DICKINSON, E.; BERGENSTAH, B. **Food colloids: proteins, lipids and polysaccharides**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1997. p.326-334.

YAO, M.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v.5, p.53-81, 2014.

YI, J. et al. Glycation inhibits trichloroacetic acid (TCA)-induced whey protein precipitation. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v.240, p.847-852, 2015.

YONEKURA, L.; NAGAO, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.51, p.107-115, 2007.

YU, B.; LEE, T.T.; CHIOU, P.W. Effects of sources of protein and enzyme supplementation on protein digestibility and chyme characteristics in broilers. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v.43, p.424-431, 2002.

YU, H.; HUANG, Q. Improving the oral bioavailability of Curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, p.5373-5379, 2012.

ZASYPIN, D. K.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J.C. Pressure and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.10, p.203-211, 1996.

ZHANG, Z.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. **Food Research International**, Oxford, v.64, p.520-526, 2014.

ZHANG, S.; VARDHANABHUTI, B. Effect of initial protein concentration and pH on in vitro gastric digestion of heated whey proteins. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.145, p.473-480, 2014.

ZHANG, S.; ZHANG, Z.; VARDHANABHUTI, B. Effect of charge density of polysaccharides on self assembled intragastric gelation of whey protein/polysaccharide under simulated gastric conditions. **Food & Function**, Cambridge, v.5, p. 1829-1938, 2014.

ZHANG, R. et al. Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: in vitro digestion study. **Food Research International**, Oxford, v. 75, p.71-78, 2015.

ZHANG, Z. et al. Encapsulation of curcumin in polysaccharide-based hydrogel beads: impact of bead type on lipid digestion and curcumin bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v.58, p. 160-170, 2016.

ZIEGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. **Advances in Food Nutrition and Research**, Maryland Heights, v.34, p.203-298, 1990.

ZOU, L. et al. Enhancing nutraceutical bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v.15, p.72-83, 2015.

ZOU, L. et al. Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. **Food Research International**, Oxford, v.81, p.74-82, 2016.

ANEXOS

Anexo A – Ficha de especificações técnicas fornecida pelo fabricante da amostra de isolado protéico de soro de leite utilizado neste trabalho.

ISOLAC		TECHNICAL SPECIFICATION	
Product Description	Isolac is a free flowing whey protein isolate produced by micro-filtration and spray drying process.		
Ingredient Listing	Whey Protein Isolate		
Chemical	Specification	Typical	Test Method
Protein (N*6.38) (% dry basis)	90.0 Min	91.0	Kjeldahl
Total Nitrogen (TN) (%)	14.1 Min	14.3	Kjeldahl
Moisture (%)	6.00 Max	5.00	Oven
Fat (%)	1.00 Max	<0.5	NIR
Ash (%)	4.00 Max	3.50	Furnace 550°C
Lactose (%)	2.00 Max	1.0	HPLC
pH	6.00 Min	6.30	10% Aq Soln
Microbiological			
Standard Plate Count (SPC)	<50,000 / g	<10,000 / g	ISO 4833:2003
Coliforms	<10 / g	<10 / g	ISO 4832:2008
E.coli	<10 / g	<10 / g	ISO 16649-2:2001
Staph. aureus	<10 / g	<10 / g	ISO 8888:2003
Salmonella	Not Detected / 25g	Not Detected / 25g	ISO 6579:2002
Yeast & Moulds	50 / g Max	<10 / g	ISO 8811:2004
Physical			
Scorched particles	Disc B or better	Disc A	ADPI Bulletin 916
Bulk Density	0.40 ± 0.10 g/cc	0.38 g/cc	IDF134:1996
Appearance	Homogenous, free-flowing powder		Visual
Colour	Creamy white		Visual
Organoleptic	Typical, free from off-flavour		Taste
Mineral Profile			
Calcium (mg/100g)	500		Atomic Spectroscopy
Sodium (mg/100g)	150		Atomic Spectroscopy
Potassium (mg/100g)	300		Atomic Spectroscopy
Magnesium (mg/100g)	60		Atomic Spectroscopy
Phosphorous (mg/100g)	250		Atomic Spectroscopy
Chloride (mg/100g)	<50		Titration

Continuação - Anexo A – Ficha de especificações técnicas fornecida pelo fabricante da amostra de isolado protéico de soro de leite utilizado neste trabalho.

ISOLAC			TECHNICAL SPECIFICATION
Typical Nutritional Information			Diet Suitability
Amino Acid Profile	(g per 100g Powder)	(g per 100g Protein)	This product is suitable for individuals with the following dietary requirements: Kosher, Halal, Vegetarian, Ovo-Lacto Vegetarian, Coeliacs, Diabetics, GMO Free, Nut/Seed free.
Leucine	9.67	10.75	
Isoleucine	5.00	5.56	
Valine	4.91	5.46	
Total Branched Chain Amino Acids	19.58	21.77	
Aspartic Acid	11.48	12.76	
Glutamic Acid	16.71	18.57	
Serine	5.24	5.82	
Glycine	1.70	1.89	
Histidine	1.48	1.65	
Arginine	1.91	2.12	
Threonine	7.22	8.02	
Alanine	5.31	5.90	
Proline	5.85	6.51	
Tyrosine	2.82	3.31	
Methionine	2.22	2.47	
Cystine	2.42	2.69	
Phenylalanine	3.04	3.38	
Lysine	9.06	10.07	
Tryptophan	1.96	2.18	
Protein Utilisation*			Storage
PER	3.5		
BV	104		
PDCAAS	0.98		Store under clean, cool, dry conditions not exposed to direct sunlight or strong odours and avoiding direct contact with walls and floors. Recommended shelf life is 36 months
* As per scientific literature			
Digestibility %	98 Min		
Fatty Acid Profile			Packaging
Saturates (%)	<0.5		
Mono-unsaturates (%)	<0.5		
Polysaturates (%)	<0.5		Packed in 20kg multiwall papersacks with polythene liners. Each sack will be heat sealed. The product will be palletised and shrink wrapped.
Cholesterol (mg/100g)	7		
Carbohydrates			
Lactose (%)	<0.2		Labelling
Glucose (%)	<0.1		
Sucrose (%)	<0.1		
Energy	364Kcal / 1525 KJ		The following will be printed in large blue writing on white sacks. "Isolac", Manufactured by Carbery Food Ingredients and processor EU number.
Fibre	Nil		
			Coding
			Each sack will be individually coded by an automatic ink jet system to ensure traceability

APÊNDICES

Apêndice A– Imagens fotográficas dos géis de isolado proteico de soro de leite (*whey protein isolate* – WPI) nas concentrações de 8 a 12 % WPI, 0 a 0,3 % de goma xantana, em diferentes concentrações salinas.