



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS



Rayla Novais da Costa

**NANOESTRUTURAS DE β -LACTOGLOBULINA E SUA CAPACIDADE DE
ENCAPSULAR MOLÉCULAS BIOATIVAS**

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

OURO BRANCO, MG
NOVEMBRO DE 2016

Rayla Novais da Costa

**NANOESTRUTURAS DE β -LACTOGLOBULINA E SUA CAPACIDADE DE
ENCAPSULAR MOLÉCULAS BIOATIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

Prof.Dr. Igor José Boggione Santos

OURO BRANCO, MG
NOVEMBRO DE 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Rayla Novais da Costa

**NANOESTRUTURAS DE β -LACTOGLOBULINA E SUA CAPACIDADE DE
ENCAPSULAR MOLÉCULAS BIOATIVAS**

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Prof^a. MsC. Alessandra Costa Vilaça

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Urzedo

Ouro Branco, ____/____/____

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer em todos os momentos que faltou-me força para continuar e por ser a luz que me guia em cada incerteza.

A minha família, por terem trilhado comigo este caminho fazendo com que a realização deste sonho, hoje, fosse possível.

Ao meu amor, Renan, pelo companheirismo, paciência e por nunca me deixar desacreditar que no final tudo daria certo.

A UFSJ, principalmente aos professores do Campus Alto Paraopeba por me proporcionar base e conhecimento necessário para trilhar caminhos mais distantes na Engenharia de Bioprocessos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Boggione, pela paciência, pelo profissionalismo e dedicação em compartilhar seus conhecimentos, instigando ainda mais o meu amor pela Nanotecnologia.

Ao Wilquer, pela dedicação, ajuda e esforço durante todos os experimentos. Por me proporcionar, não só ajuda, como também boas risadas.

Ao Prof. Dr. Edson, pela prestatividade na análise de dados e por ser um exemplo de profissional, principalmente para os alunos da Engenharia de Bioprocessos.

A banca examinadora, Prof^a. MsC. Alessandra Costa Vilaça e Prof^a. Dr^a. Ana Paula Urzedo, por aceitarem meu convite e por contribuírem com a minha formação acadêmica.

A Jenyfer Figueiredo, pela amizade e ajuda durante o TCC e durante os cinco anos de graduação.

Dedico este trabalho a Deus por me conceder o discernimento para que este fosse possível. A minha família e ao Renan por serem meu motivo de perseverança nesta caminhada.

RESUMO

Um dos derivados do leite mais produzidos atualmente é o queijo, e sua produção leva à geração acentuada de um subproduto com alto potencial poluidor quando não descartado corretamente, o soro do leite. Além da questão ambiental também estão envolvidos prejuízos econômicos ao mercado leiteiro brasileiro. Dessa maneira, pesquisas envolvendo a reutilização desse subproduto estão em constante desenvolvimento. Portanto, o presente trabalho visa otimizar a obtenção de nanoestruturas de β -lactoglobulina, proteína do soro do leite, e aplicá-las como dispositivo encapsulador das moléculas bioativas Quercetina e Vitamina B2. A melhor nanoestrutura obtida foi com o tratamento a 100°C, NaCl a 50mmol L⁻¹ por 60 minutos. A partir disso, preparou-se nanoestruturas sob essas condições e também sem o tratamento térmico para realizar os testes de espuma e emulsão. O primeiro mostrou que a espuma formada pela proteína nanoestruturada possui estabilidade maior do que a espuma formada pela proteína pura. O mesmo foi observado no teste de emulsão. A encapsulação do bioativo Quercetina utilizando a nanoestrutura de β -lactoglobulina apresentou eficiência de 85,16%. Por outro lado para a vitamina B2 não obteve-se eficiência na encapsulação, determinando a hidrofobicidade da nanoestrutura de β -lactoglobulina. De modo geral, a β -lactoglobulina mostrou-se um excelente dispositivo encapsulador da molécula bioativa, quercetina.

Palavras-chave: Proteína do soro do leite, tratamento Box-Behnken, Encapsulação, Quercetina, Vitamina B2.

ABSTRACT

Nowadays one of the most produced milk derivatives is the cheese and its production leads to the generation of a secondary product with high polluter potential when not correctly disposed, the whey. In addition to the environmental issues are also involved economic losses to the Brazilian dairy market. Thus, research involving the reuse of this secondary product are in constantly development. Therefore, this study aims at optimizing the achievement of β -lactoglobulin nanostructures, whey protein, and apply them as an encapsulator device of the bioactive molecules, Quercetin and Vitamin B2. The best nanostructure was obtained with treatment at 100 °C, NaCl 50 mmol.L⁻¹ during 60 minutes. Under these conditions and also without heat treatment the nanostructures were prepared to make the foam and emulsion tests. The first showed that the foam formed by the nanostructured protein had greater stability than the foam formed by the pure protein. The same was analysed in the emulsion test. Encapsulation of Quercetin using the nanostructure of β -lactoglobulin had an efficiency of 85.16%. In contrast to vitamin B2 whose no encapsulation efficiency was achieved, determining the hydrophobicity of the β -lactoglobulin nanostructure. In general, the β -lactoglobulin showed to be an excellent encapsulator device of the bioactive molecule, quercetin.

Keywords: Whey, Box-Behnken treatment, Encapsulation, Quercetin, Vitamin B2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina.....	6
Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de nanosistemas de encapsulação. A: nanoemulsão; B: microemulsão; C: nanopartícula sólida de lipídeo; D: nanopartícula biopolimérica.....	8
Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides, onde a estrutura da quercetina apresenta substituintes -OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4'.....	11
Figura 4: Estrutura básica da riboflavina.....	12
Figura 5: Superfície 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x [NaCl] (mmol.L ⁻¹) x Temperatura (°C).....	19
Figura 6: Superfície 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x Tempo(min) x Temperatura (°C).....	20
Figura 7: Superfície 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x [NaCl] (mmol.L ⁻¹) x Tempo(min).....	20
Figura 8: Eficiência da encapsulação EE(%) em função da concentração [] de Quercetina e Vitamina B2 na dispersão de β -lg, e seu respectivo desvio padrão.....	24
Figura 9: Relação entre eficiência da encapsulação EE(%) e capacidade de ligação (LC%) para a Quercetina.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições utilizadas no delineamento experimental realizado para formação da nanoestrutura de β -lactoglobulina.....	14
Tabela 2: Preparação de diferentes concentrações de quercetina em nanopartícula para determinar a eficiência de encapsulação EE (%)......	16
Tabela 3: Preparação de diferentes concentrações de vitamina B2 em nanopartícula para determinar a eficiência de encapsulação EE (%)......	17
Tabela 4: Valores de Tamanho (nm) e PDI (Polidispersividade) das amostras preparadas no delineamento experimental e analisadas no equipamento NanoZeta Sizer Malvern (Inglaterra, Reino Unido).....	18
Tabela 5: Valores de tamanho (nm), tempo(min), temperatura(°C) e concentração de NaCl (mmol.L ⁻¹) de cada NP.....	19
Tabela 6: ANOVA dos dados obtidos no software Statistica.....	21
Tabela 7: Valores de VI e FS obtidos para cada amostra. Onde FS ₃₀ , FS ₆₀ e FS ₁₂₀ são os valores de FS nos intervalos 30, 60 e 120 min, respectivamente.....	22
Tabela 8: Valores de IAE(m ² g ⁻¹) e ESI para as emulsões 1 e 2.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -lg	β -lactoglobulina
BSA	Albumina do Soro Bovino
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EE	Eficiência de encapsulação
ESI	Estabilidade da Emulsão
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FS	Foam Stability
GMP	Glicomacro-peptídeos
GRAS	Generally Recognised As Safe
IAE	Índice de Atividade Emulsificante
Ig's	Imunoglobulinas
LC	Loading Capacity
LDL	Low Density Lipoprotein
NaCl	Cloreto de Sódio
NP	Nanoestrutura
PDI	Polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol
Q	Quercetina
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
USDA	United States Department of Agriculture
V	Vitamina B2
VI	Volume Increment

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
θ	Teta
ζ	Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Histórico da Nanotecnologia	4
3.2 Proteínas do soro do leite.....	5
3.2.1 A β -lactoglobulina	6
3.3 Técnicas de encapsulação.....	7
3.4 Nanosistemas de encapsulação.....	8
3.4.1 Nanoemulsões.....	8
3.4.2 Microemulsões	9
3.4.3 Nanopartículas sólidas de lipídeo	9
3.4.4 Nanopartículas biopoliméricas.....	9
3.5 Os nutracêuticos.....	9
3.5.1 A Quercetina	10
3.5.2 A Vitamina B2	12
3.6 Perspectivas futuras da nanotecnologia na indústria de alimentos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Material	13
4.2 Métodos.....	14
4.2.1 Delineamento experimental	14
4.2.3 Teste de emulsão	15
4.2.4 Encapsulação	16
4.2.4.1 Encapsulação de Quercetina	16
4.2.4.2 Encapsulação de Vitamina B2.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Delineamento experimental.....	18
5.2 Teste de espuma.....	22
5.4 Teste de emulsão.....	23
5.5 Encapsulação	24
5.5.1 Encapsulação das moléculas bioativas: Quercetina e Vitamina B2	24
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios constitui hoje um dos setores em maior crescimento no Brasil. Tal crescimento deve-se, principalmente, ao aumento da concorrência no mercado e da demanda de derivados de leite no país (PRESTES; PAYES, 2012).

Segundo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA), em 2014 o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite, ficando atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. Esse aumento significativo na produtividade está vinculado à diversos fatores, dentre eles o aumento da demanda, que é consequência do aumento populacional. Atrelado a isso as indústrias tendem a investir cada vez mais em tecnologias inovadoras que visam potencializar o seu poder de produção e concorrência com relação às demais indústrias do setor (PRESTES; PAYES, 2012). Estes investimentos provocaram um “salto” no volume de leite produzido anualmente no Brasil, passando de 19,767 bilhões de litros em 2000 para 35,174 bilhões de litros em 2014, de acordo com dados do IBGE (MILKPOINT, 2016).

Concomitantemente ao aumento na indústria leiteira cresce também a produção de derivados do leite, como a de queijos que, de acordo com dados do relatório da Mintel, atingirá R\$ 20 bilhões em vendas ou o equivalente ao consumo de 8 kg de queijo por habitante até o ano de 2017 (MILKPOINT, 2016). Essa produção acentuada de queijos de todas as categorias é alarmante uma vez que para cada 1 kg de queijo produzido são gerados 9 kg de soro com alta concentração de matéria orgânica e alto potencial poluidor (ROBBINS et al., 1996). Segundo OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL (2012) apesar das campanhas de conscientização ao meio ambiente, as indústrias de laticínios estão cada vez mais adotando medidas de produção rápida e econômica sem se preocuparem com o destino de seus resíduos. Os impactos causados por tal falta de cuidado com a destinação desse subproduto pode ir desde a geração de odores desagradáveis até ao comprometimento físico-químico de águas e solos, uma vez que, quando lançado no meio sem tratamento prévio, o soro pode gerar graves danos e possuir uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) que fica em torno de 60.000 mg/L (CHAVEZ et al., 2010; MURARI et. al, 2013), enquanto a Resolução CONAMA 430/2011 dita que esta deve ser de no máximo 180 mg/L ou deve passar por um tratamento que a reduza em no mínimo 70% antes de serem lançados no meio ambiente.

Dado o tamanho impacto gerado pelo descarte errôneo do soro do leite, alternativas de

realizar o seu reaproveitamento tem surgido ao longo dos anos sendo a maioria delas na alimentação humana e animal. Dentre essas, grande parte são simples e eficazes, cujos alguns exemplos são: intensificador de coloração de produtos cárneos embutidos (DAGUER et al., 2010), incrementador no volume de pães e bolos (ZAVAREZE et al., 2010), gerador de espumas estáveis em sorvetes e sobremesas lácteas (ANTUNES, 2003) e fonte de proteínas e prevenção de estresse metabólico na alimentação de atletas e fisioculturistas (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). Porém, algumas de suas aplicações ainda estão em estudo e necessitam de cuidados especiais quanto à sua comercialização, como por exemplo o uso das proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (β -lg), como forma de aumentar a vida de prateleira de substâncias sensíveis e como nanoveículos para transporte de nutracêuticos.

As nanoestruturas, então, surgem como alternativas promissoras para dispositivos encapsuladores que protegem os ingredientes bioativos durante o processamento, estocagem e possíveis interações com outros constituintes alimentares no organismo (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011). Apesar de vários materiais como gorduras, amidos, alginatos, proteínas e lipídeos poderem ser empregados como dispositivos encapsuladores, as proteínas do soro são extensamente utilizadas, pois são ingredientes de alimentos *Generally Recognised As Safe* (GRAS), ou seja, são ingredientes considerados seguros permitidos pela indústria de alimentos. Além disso, quando em escala nanométrica são estáveis e biodisponíveis, o que as tornam um excelente meio protetor e transportador dos ingredientes funcionais, os nutracêuticos.

O desenvolvimento de moléculas nutricionais bioativas constitui um mercado crescente (TAVARES et al., 2014). Além de serem benéficos à dieta e reduzirem o risco de doenças, os nutracêuticos surgem como solução aos maus hábitos alimentares resultantes da tendência contemporânea de consumir alimentos pré-preparados (CENCIC; CHINGWARU, 2010). Sendo assim, eles fornecem aos alimentos maior valor nutricional agregado e impactam positivamente na saúde da população como forma de repor os nutrientes ausentes nos *fast-foods*. Portanto, nutracêuticos são muitas vezes entendidos como alimentos funcionais, mas são na verdade alimentos da bioengenharia, ou seja, parte de alimentos que após passarem por um bioprocessamento, mais precisamente pela encapsulação, tornam-se mais eficientes aumentando sua solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade ou controlando sua liberação no organismo.

A encapsulação não é apenas utilizado em nutrientes, mas também em uma vasta variedade de alimentos, como: agentes aromatizantes, adoçantes artificiais, corantes, agentes com sabor e aromas indesejáveis, entre outros. Por outro lado, técnicas de encapsulação são

mais aplicadas nas indústrias de cosméticos e farmacêuticos do que na de alimentos. Uma das restrições da indústria de alimentos é a preocupação com a segurança e efeitos adversos que podem ser causados pelas moléculas encapsuladas, uma vez que estes produtos são muitas das vezes feitos para consumo diário (TAVARES et al., 2014). Felizmente, a nanotecnologia oferece diversos nanosistemas de transporte dos ingredientes bioativos que os tornam mais aplicáveis à indústria de alimentos, como: nanoemulsões, nanolipossomos, nanopartículas e nanotubos. Além das vantagens já mencionadas, o uso de nanoproteínas do soro é também uma alternativa ao uso de nanopartículas de lipídeo que requerem o uso de solventes orgânicos e surfactantes para sua produção, e o mais importante, por serem reversíveis possuem desenovelamento controlado o que é fundamental para a sua liberação direcionada (TAVARES et al., 2014).

Apesar das vantagens apresentadas e todo o potencial do uso das proteínas do leite como encapsuladores na indústria de alimentos, o seu uso contendo nutracêuticos ainda é pouco estudado. Além disso, ainda há limitações quando estas são aplicadas em escala industrial, uma vez que quando introduzidas devem manter-se física e quimicamente compatíveis com a matriz do alimento sem modificar o cheiro e o sabor do mesmo e sem oferecer efeitos nocivos ao organismo. Portanto, maiores estudos são necessários.

A utilização de nanoestrutura de β -lg como dispositivo encapsulador vem em primeira instância por esta ser o maior constituinte no soro do leite (até 57%) o que a torna uma das alternativas mais promissoras para o uso do soro de leite, pois além de aumentar a vida de prateleira de substâncias sensíveis, esta representa uma maneira eficiente e segura de liberação dos nutracêuticos no organismo. Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivos investigar a efetividade da nanoestrutura da proteína do soro, β -lg, no encapsulamento de Quercetina e Vitamina B2, via nanopartícula biopolimérica, assim como identificar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da nanoestrutura via encapsulação de Quercetina e Vitamina B2 uma vez que a primeira é hidrofóbica e a segunda hidrofílica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a obtenção de nanoestruturas de β -lg e aplicá-las como dispositivo encapsulador de moléculas bioativas (quercetina e vitamina B2).

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as melhores condições para formação da nanoestrutura de β -lg.
- Investigar a estabilidade da nanoestrutura de β -lg obtida.
- Investigar a encapsulação de Quercetina e a encapsulação de Vitamina B2 em nanoestruturas de β -lg.
- Identificar a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da nanoestrutura via encapsulação de Quercetina e Vitamina B2.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico da Nanotecnologia

Segundo TOLOCHKO (2008) é muito difícil descrever o histórico da nanotecnologia devido a dois fatores: 1: a ambiguidade do termo “nanotecnologia” e 2: o não conhecimento da época correta em que os primeiros estágios da nanotecnologia foram desenvolvidos. Apesar disso, sabe-se que o termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em uma conferência industrial internacional em Tóquio no ano de 1974.

Na segunda metade dos anos 80 ao início dos anos 90 um número considerável de descobertas foram alcançadas o que promoveu o início do desenvolvimento da nanotecnologia. Desde então, pesquisas no ramo de nanotecnologia tem aumentado assim como aplicações e empresas inovadoras na área (TOLOCHKO, 2008).

De acordo com SRINIVAS et al (2009) entende-se como nanotecnologia o ato de criar materiais funcionais, veículos e sistemas que estejam entre uma escala nanométrica de 1 a 100 nm. Os materiais nanoestruturados possuem várias propriedades que os tornam produtos atrativos, como por exemplo, bio-persistência, superfícies reativas, composição e solubilidade (SRINIVAS, 2009). Além disso, revestir nanopartículas com materiais biocompatíveis, tem se mostrado como uma forma de reduzir a toxicidade em algumas aplicações.

Mais precisamente, no setor alimentício a nanotecnologia possui um potencial para produzir novos ingredientes alimentares e produtos inovadores que trazem consigo benefícios consideráveis à saúde humana (SOUZA et al., 2005). Isso pode ser atingido através do desenvolvimento de novas estruturas para aplicações em alimentos funcionais, como o uso de nanoestruturas de proteínas do soro para encapsulamento de bioativos e posterior implementação em alimentos.

3.2 Proteínas do soro do leite

As proteínas do leite, como toda proteína de alimentos, são biopolímeros estruturalmente e quimicamente versáteis com alto valor nutricional agregado e que por esse motivo possuem únicas e diversas propriedades funcionais que dão à elas alta aplicabilidade como nanocarreadores (TAVARES et al., 2014). Elas são divididas em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas estão presentes em 94% do leite como micelas naturalmente enoveladas de 50 a 500 nm, funcionam como veículo natural de transporte de minerais ao bebê, possuem pH 4,6, possuem atributos terapêuticos contra o câncer e estrutura não-fixa o que faz com que modificações no pH, força iônica e pressão hidrostática modifiquem o seu tamanho (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; TAVARES, et al., 2014; SAHU; KASOJU; BORA, 2008). As proteínas ou frações encontradas no soro do leite são a α -lactoalbumina, β -lg, albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulina (Ig's) e glicomacropéptidos (GMP). Por outro lado, as grandes candidatas a nanosistemas de transporte são a α -lactoalbumina e β -lactoglobulina. Além de possuírem as mesmas funções das caseínas, a α -lactoalbumina age como coenzima durante a síntese do leite e modula a síntese da lactose, e a β -lg tem sido extremamente estudada devido sua habilidade de ligar-se à compostos hidrofóbicos e hidrofílicos como compostos de sabor, vitaminas, ácidos graxos e polifenóis. (TAVARES et al., 2014).

As proteínas do leite, em geral, são capazes de formar complexos covalentes eletrostáticos com moléculas de interesse e de prender biotativos através da formação de géis (TAVARES et al., 2014). Essa é uma importante propriedade funcional da β -lg, a fornecendo a habilidade de formar matrizes de gel induzidas a frio pela adição de cátions a grupos carboxílicos em β -lg desnaturada (GRAVELAND-BIKKER; KRUIF, 2006) e a possibilita de ser sistema de transporte de bioativos biocompatível. Entretanto, o controle e a manutenção do tamanho dos hidrogéis formados tem sido difícil de alcançar. Dessa forma, as nanoproteínas surgem como uma solução à esta limitação, uma vez que são particularmente interessantes por serem de fácil preparação e sua distribuição de tamanho poder ser monitorada.

Nanotubos auto enovelados a partir da proteína do leite hidrolizada, α -lactoalbumina, são também potenciais carreadores para nanoencapsulação de nutrientes, suplementos e fármacos (SEKHON, 2010). Apesar disso, a grande aposta para o transporte e liberação de nutracêuticos são as β -lg por estarem em maior proporção no soro do leite (de 45% a 57%) do que a α -lactoalbumina, serem estáveis em condições ácidas e resistentes a digestão por proteases

gástricas. Além disso, possuem tamanho aproximado de 3,6 nm e ao sofrerem desnaturação (por pressão, temperatura, pH e etc.) com componentes desnaturados podem se remontar formando estruturas maiores, como fibrilas ou agregados, que podem ainda se agregar e formar redes ainda maiores (SEKHON, 2010).

3.2.1 A β -lactoglobulina

A β -lg está presente em até 57% do soro do leite. Ela é uma proteína globular pequena (18.3 kDa) conhecida por ser estável em pH baixo (KO; GUNASEKARAN, 2005) e por ter habilidade em formar interações tridimensionais, ou seja, por formar um gel (MADALENA et al., 2016). Sua estrutura possui três sítios de ligação: a parte solvente cônica do β -barril como sítio principal, o segundo sítio situa-se próximo da α -hélice e o terceiro sítio na interface dimérica, sendo que ela liga-se a compostos hidrofóbicos preferencialmente no seu cálice interior, e cavidades próximas à α -hélice (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; TAVARES et al., 2014). Os parâmetros de interação dependem da natureza química do ligante, das condições físico-químicas do meio e da conformação da proteína, sendo que a ligação ao ligante pode induzir mudanças na estrutura da β -lg (TAVARES et al., 2014). Além disso, elas conjugam-se com nutrientes via amino grupos ou ligações iônicas e hidrofóbicas (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011). A Figura 1 apresenta a estrutura tridimensional da β -lg.

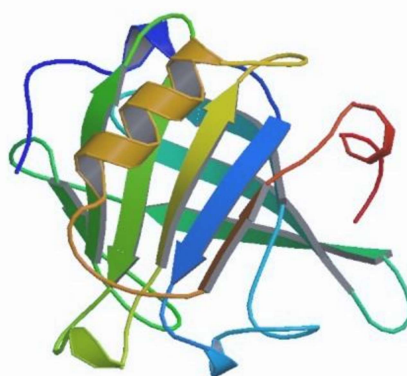


Figura 1: Estrutura tridimensional da β -lactoglobulina. Fonte: Adaptado de RCSB Protein Data Bank
<<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1BEB>>

Nanoestruturas de β -lg podem ainda se associar a compostos diferentes, o que faz com que elas sejam melhor absorvidas pelo intestino por permanecerem mais tempo nele, o que consequentemente aumenta a sua biodisponibilidade (MADALENA et al., 2016). Essas propriedades devem-se à escala nanométrica que por si só a oferecem uma área de superfície

maior facilitando sua interação com compostos diferentes, favorecendo a encapsulação de moléculas bioativas.

O uso de proteínas do leite, especialmente da β -lg como carreadores de compostos bioativos dá-se, principalmente, pelo aprisionamento desses compostos em hidrogéis construídos por essas proteínas. Tal capacidade de formar estruturas em gel oferecem à elas a possibilidade de formarem sistemas de transporte de nutracêuticos que sejam GRAS, uma vez que a proteína do leite por si só já é reconhecida como segura pela indústria de alimentos (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011). O reconhecimento da β -lg como GRAS é de extrema importância, pois qualquer substância que seja intencionalmente adicionada a alimentos é um aditivo alimentar que, portanto, necessita de rigorosa inspeção e aprovação segundo o FDA para garantir que seja segura sob as condições de sua intenção de uso.

A formação de nanopartículas de β -lg pode ser induzida, não somente por agregação térmica, como também por dessolvatação. Além disso, o tamanho da nanopartícula formada depende de diversos fatores, como pH e concentração de cálcio (0-5mM), no qual para maiores concentrações menor o volume da partícula (TAVARES et al., 2014).

3.3 Técnicas de encapsulação

Algumas das técnicas de encapsulação mais comuns são: o revestimento em leiteo fluidizado, congelamento por pulverização, secagem por pulverização (*spray-drying*), congelamento por aspersão, encapsulação por hidrogel (SINGH, 2016), extrusão e inclusão molecular. Esta última, aplicada neste trabalho, refere-se ao processo que ocorre a nível molecular, cuja nanoestrutura serve como cápsula com uma cavidade que interage com o encapsulado (MARTIN DEL VALLE, 2004).

É necessário que a técnica de encapsulação escolhida seja realizada de maneira correta, pois sabe-se que o tamanho da cápsula e o seu material afeta o nível de proteção e disponibilidade do material encapsulado. Além disso, é indispensável que a encapsulação não comprometa o alimento a ser consumido, uma vez que sua textura, sabor e aroma devem permanecer os mesmos. Por esse motivo, 2 fatores devem ser considerados: (i) efeito do processamento do alimento e estoque do nutracêutico (Ex.: oxigenação e aquecimento); (ii) proteção das moléculas bioativas contra degradação durante a passagem pelo estômago que depende do tempo de residência gástrico (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011).

O objetivo da encapsulação é principalmente proteger a função bioativa do nutraceutico sob condições adversas através da incorporação deste no núcleo de um dispositivo encapsulador. Além disso, a encapsulação oferece a possibilidade de desenvolver produtos funcionais com liberação direcionada de nutrientes sem modificar o seu sabor (TAVARES et al., 2014). Portanto, a escolha da técnica de encapsulação é uma tarefa que requer muita cautela e que deve ser capaz de proteger o nutraceutico durante todas as etapas do processo que incluem a engenharia, a formulação e o armazenamento (TAVARES et al., 2014).

3.4 Nanosistemas de encapsulação

Além da técnica de encapsulação, é muito importante atentar-se também ao nanosistema mais propício, pois assim como a técnica ele também deve ser capaz de proteger e liberar a molécula bioativa, sem alterar o seu sabor, textura e odor. Existem diferentes tipos de sistemas de encapsulação de moléculas bioativas, alguns deles são: nanoemulsões, microemulsões, nanopartículas sólidas de lipídeos e nanopartículas biopoliméricas (Figura 2) (SINGH, 2016).

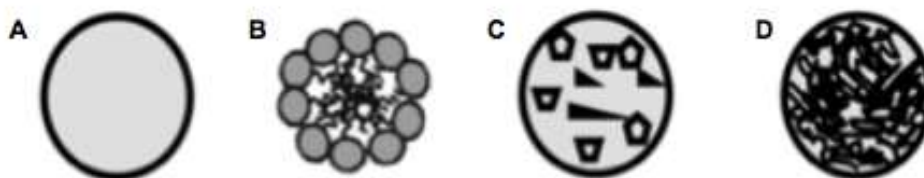


Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de nanosistemas de encapsulação. A: nanoemulsão; B: microemulsão; C: nanopartícula sólida de lipídeo; D: nanopartícula biopolimérica. Fonte: Adaptado de SINGH, 2016.

3.4.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões são uma dispersão contendo pelo menos um líquido miscível e/ou um cristal líquido na forma de gotículas de diâmetro aproximado de 20 a 200 nm (Figura 2A). São geralmente translúcidas, possuem uma estabilidade cinética maior que as microemulsões, mas possuem aplicação limitada na indústria de alimentos, pois os tensoativos utilizados em sua preparação geralmente não são de qualidade alimentar (SINGH, 2016). Um exemplo de nanoemulsão seria um sistema óleo-água.

3.4.2 Microemulsões

As microemulsões são misturas termodinamicamente estáveis formadas por água, óleo e uma ou mais moléculas anfífilas que se autoenovelam espontaneamente formando gotículas na escala nanométrica (Figura 2B). Para a solubilização de moléculas com cadeia longa de triglicerídeos é necessário o uso de etanol como co-tensioativo, o que em alguns casos acaba limitando a sua aplicação em alimentos (FLANAGAN et al., 2006).

3.4.3 Nanopartículas sólidas de lipídeo

Possuem diâmetro em torno de 50 a 1000 nm e são feitas de lipídeos que se solidificam sob temperatura ambiente formando, assim, uma matriz cristalina sub-arrefecida na qual o composto bioativo é incorporado (Figura 2C), por exemplo uma mistura de água, óleo e etanol. Assim como nos outros sistemas, neste a molécula também é solubilizada por um surfactante (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Este tipo de nanosistema tem sido usado para a liberação de drogas e seu uso em alimentos ainda é muito limitado.

3.4.4 Nanopartículas biopoliméricas

A propriedade das proteínas de formarem um gel são muito exploradas para a encapsulação e liberação de bioativos. Essa formação acontece pelo enovelamento das moléculas de proteína, desencadeado por acidificação, cisalhamento, adição de íons, tratamento térmico ou tratamento a altas temperaturas (SINGH, 2016). Um exemplo deste nanosistema é a própria nanoestruturação da β -lg via tratamento térmico e força iônica que foi utilizada neste experimento. O controle do enovelamento faz com que nanopartículas adequadas possam ser produzidas, fazendo com que a estrutura em gel sirva como uma matriz para o aprisionamento das moléculas bioativas.

3.5 Os nutraceuticos

Os nutraceuticos foram definidos pela primeira vez por Dr. Stephen De Felice em 1989 como “alimentos ou partes de alimentos que fornecem benefícios médicos ou de saúde incluindo a prevenção e tratamento de doenças”. Dessa maneira, é necessário atentar-se à diferença existente entre um nutraceutico e um alimento funcional. Um alimento funcional é

essencialmente um alimento que além de suas funções básicas podem oferecer benefícios adicionais à saúde (SINGH, 2016). Por outro lado, um nutracêutico é uma forma isolada ou concentrada de um alimento, por exemplo as moléculas bioativas quercetina e a vitamina B2, que agem de forma mais específica no organismo (BHASKARAN, 2010). Quercetina e vitamina B2 são, ambos, substâncias naturais com propriedades terapêuticas mas que infelizmente por serem sensíveis a vários fatores, como luminosidade e oxigênio, elas muitas das vezes não exercem suas funções no organismo como deveriam pois se perdem durante o processamento industrial e estocagem, tal fator as tornam compostos de significativo interesse científico.

3.5.1 A Quercetina

A quercetina é o principal flavonóide presente na dieta humana com potencial anticarcinogênico, antioxidante e com efeitos protetores renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004). Seu potencial antioxidante é dado pelas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos. No tratamento do câncer o uso de compostos antioxidantes é dado como terapêutico, pois eles reduzem os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia. Mais precisamente a quercetina, pode regular o ciclo celular, diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais tornando-se, assim, um potente composto antitumoral (BEHLING et al., 2004). Como protetores cardiovasculares, os flavonóides inibem a oxidação do LDL, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (MINETTO, 2009). Além disso, a ingestão de quercetina pode também melhorar a capacidade antioxidativa hepática, reduzindo os riscos de falência induzida por isquemia-reperfusão no fígado (BEHLING et al., 2004).

A quercetina é encontrada em frutas, grãos, flores, vinho e chá e estima-se que seu consumo diário seja entre 50 a 500 mg. Ela constitui da classe de compostos flavonóides que se diferem quanto a sua composição química e características particulares. Sua estrutura consiste de um esqueleto de difenil propano (C6C3C6) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano, como mostra a Figura 3.

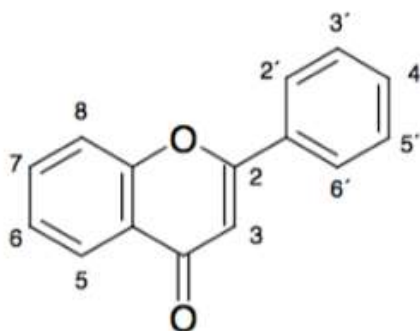


Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides, onde a estrutura da quercetina apresenta substituintes -OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4'. Fonte: Adaptado de BEHLING et al., 2004.

Nos alimentos a quercetina é encontrada geralmente na forma glicosilada, às vezes, como β -glicosidase. A quercetina-3-rutinosídeo é uma das formas importantes na qual a quercetina é encontrada nos alimentos, porém sua disponibilidade é de apenas 20% da disponibilidade da quercetina-4'-glicosídeo (BEHLING et al., 2004). Uma vez que a quercetina glicosilada é mais rapidamente absorvida pelo organismo, a conversão de rutinosídeo para glicosídeo é uma das estratégias para aumentar a sua biodisponibilidade nos alimentos. Ainda de acordo com BEHLING et al. (2004) a única forma da quercetina absorvida pelo estômago é a sua forma aglicona, fator alarmante, uma vez que a forma mais abundante nos alimentos é a forma glicosilada. Entretanto, processos como a fermentação de uvas para a produção do vinho, liberam a forma aglicona e glicosilada podendo resultar em uma absorção mais eficiente da quercetina no estômago (CRESPY et al. 1999). Sua absorção depende também da solubilidade do veículo usado na sua administração, uma vez que ela é insolúvel em água.

Além dos problemas naturais que afetam a biodisponibilidade da quercetina, esta, assim como a vitamina B2, também está sujeita a problemas oriundos do processamento industrial, uma vez que fatores como temperatura, luz, oxigênio, umidade e pH contribuem para alterações nutricionais (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008). Em trabalho realizado por BOTREL; OLIVEIRA (2012) o cozimento em microondas de cebolas (que naturalmente possuem quercetina em sua composição) com potência moderada não afeta o conteúdo de flavonóides, porém, sob potência alta, há perdas de 16% de quercetina 3,4'-diglicosídeo e 18% para quercetina 4'-glicosídeo.

Apesar do consumo de alimentos ricos em polifenóis, incluindo os flavonóides, e sua biodisponibilidade estarem sendo amplamente estudados, a sua absorção intestinal e

metabolismo não estão totalmente elucidados até o momento. Este estudo é de extrema importância para a avaliação da sua função fisiológica uma vez que, diferente de outros compostos, a quercetina glicosilada não é absorvida no estômago o que afeta a sua ação no organismo.

A encapsulação de quercetina utilizando nanoestruturas de β -lg surge, então, com uma nova alternativa para aumentar sua biodisponibilidade (CERQUEIRA et al., 2014), melhorar e direcionar sua liberação, intensificando assim suas vantagens fisiológicas.

3.5.2 A Vitamina B2

A vitamina B2, também conhecida como riboflavina, é uma vitamina que pertence ao grupo das hidrossolúveis com funções antiinflamatórias e analgésicas. Ela participa do metabolismo de diversos nutrientes, como precursora de coenzimas (Flavina Adenina Dinucleotídeo – FAD e Flavina Mononucleotídeo – FMN), e no ciclo respiratório. É encontrada em frutas, verduras, sementes e no levedo da cerveja, ou pode ser produzida por meio de síntese química ou fermentação microbiana (LACERDA et al., 2007). É um composto de coloração amarelo fluorescente, solúvel em água e de estrutura planar, como mostra a Figura 4.

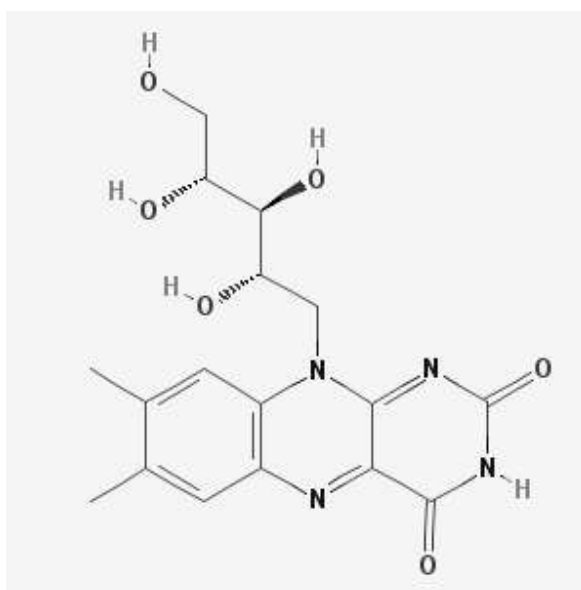


Figura 4: Estrutura básica da riboflavina. Fonte: Adaptado de PubChem-Open Chemistry Data Base
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/riboflavin>>.

A vitamina B2 é um importante protetor de doenças cardiovasculares e processos tumorais, por esse motivo a deficiência de riboflavina tem sido correlacionada como um fator de risco para o câncer, embora pesquisas adicionais sejam necessárias para a confirmação deste fato em humanos (SOUZA et al., 2005). Dada sua importância, a deficiência de vitaminas do complexo B no organismo pode variar de aguda a crônica, estando em animais, relacionada com desenvolvimentos anormais do feto e em humanos com quadros hematológicos, principalmente relacionados ao sistema hematopoiético (LACERDA et al., 2007; SOUZA et al., 2005).

Um influenciador da deficiência da riboflavina é a sua fotossensibilidade que gera perdas significativas da vitamina durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Por esse motivo, o processamento e estocagem de alimentos que contenham vitamina B2 deve ser feito de maneira cautelosa. Portanto, a sua encapsulação utilizando a proteína do soro do leite β -lg nanoestruturada, surge como solução a este problema.

3.6 Perspectivas futuras da nanotecnologia na indústria de alimentos

A nanotecnologia surge, então, como solução aos problemas enfrentados pela indústria de alimentos na manutenção das funções biológicas dos nutrientes em produtos alimentícios. Ela oferece alternativas atraentes, como o uso de proteínas do soro do leite em escala nanométrica como forma de aprimorar a aplicação de compostos benéficos ao organismo nos alimentos. Entretanto, é necessário ainda estudar a liberação controlada destas moléculas bioativas no organismo. Dessa forma, apesar do uso de proteínas nanoestruturadas oferecer um maior valor agregado aos alimentos e melhorar sua vida de prateleira a aplicação da nanotecnologia agregada à alimentos em escala industrial ainda requer pesquisas adicionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A β -lg foi cedida pela Davisco Foods International (Minnesota, EUA), ambas quercetina e a vitamina B2 foram adquiridas da Sigma Aldrich (Missouri, EUA), o NaCl de grau analítico Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). A água destilada foi purificada através de osmose reversa Hidrotek (Santa Iria de Azóia, Portugal). E os demais reagentes foram de grau analítico sem maiores purificações.

4.2 Métodos

4.2.1 Delineamento experimental

As nanoestruturas de β -lg são formadas a partir de sua desnaturação e posterior interação entre elas. Sabe-se que a temperatura e a força iônica são indutores da desnaturação da mesma, portanto para otimizar sua obtenção utilizou-se altas temperaturas e o NaCl por ser também um aditivo alimentar GRAS comumente utilizado.

Foi realizado o delineamento experimental Box-Behnken com o objetivo de otimizar a obtenção da nanoestrutura de β -lg. Para isso, soluções de proteína em NaCl foram preparadas sob agitação e aquecimento de acordo com a Tabela 1.

Após o tempo de agitação e aquecimento, as soluções foram armazenadas à 4°C para posteriores análises.

O experimento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi realizado no Nanozeta sizer (Malvern, Inglaterra) com o objetivo de determinar o tamanho da nanoestrutura e o índice de polidispersividade (PDI). As medidas foram realizadas utilizando um detector de fotodiodo de avalanche (Brookhaven BI-APD, USA) e um correlacionador (TURBOCORR, Brookhaven, USA). A fonte de luz (CVI Melles Griot, USA) foi um laser HeNe de 35 mW de potência e comprimento de onda equivalente a 632,8 nm, linearmente polarizada. Para controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. As dispersões de nanoestruturas foram adicionadas em uma cubeta e esta inserida no equipamento para a análise.

Tabela 1: Condições utilizadas no delineamento experimental realizado para formação da nanoestrutura de β -lactoglobulina.

Box-Behnken			
NP's*	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaCl (mmol.L⁻¹)
1	62,5	120	0
2	25,0	60	0
3	100	60	0
4	62,5	120	50
5	62,5	60	25
6	100	120	25
7	25,0	60	50
8	100	10	25
9	25,0	120	25
10	62,5	10	50
11	62,5	60	25
12	25,0	10	25
13	62,5	10	0
14	62,5	60	25
15	100	60	50

*NP's - nanoestrutura

4.2.2 Teste de espuma

Amostras de 8,00 mL da melhor nanoestrutura obtida foram homogeneizadas em Ultra Turrax (Biovera, Brasil) por 1 min em 14000 rpm. Após a homogeneização acompanhou-se a altura da espuma medindo-as em intervalos de tempo de 5, 10, 30, 60 e 120 min a fim de calcular as variáveis incremento de volume (VI) e estabilidade da espuma (FS), conforme as equações 1 e 2.

$$VI = \left[\frac{\left(\frac{V_T}{V_E} \right) - V_T}{V_T} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$FS = \left(\frac{V_{Et}}{V_{Et0}} \right) \quad (2)$$

Onde V_T é o volume total da solução, V_E é o volume da espuma V_{Et} e V_{Et0} são os volumes da espuma correspondentes aos instantes t (5, 15, 30, 60 e 120 min) e no tempo zero, respectivamente. O teste foi realizado em duplicata e amostras de proteína sem tratamento térmico, porém no mesmo solvente da nanoestrutura, foram utilizadas como controle.

4.2.3 Teste de emulsão

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) da proteína nativa e da proteína nanoestruturada foram determinados de acordo CAMERON et al. (1991). Para isso, duas amostras a 0,1% (m/v) de proteína foram preparadas. Com o objetivo de formar a emulsão, 2,50mL de óleo de girasol, 7,35 mL de água destilada e 150,0 μ L de dispersão de proteína foram agitadas em Ultra Turrax por 1 min a 14000 rpm. Após esse processo, 10,0 μ L do fundo de cada emulsão foram retirados em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 15 e 30 min) após a homogeneização, e diluídos em 10,0 mL de solução SDS 0,1% (m/v). Finalmente, a absorbância da emulsão diluída foi medida a 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology (São Paulo, Brasil) e o IAE calculado de acordo com a Equação 3.

$$IAE(m^2 g^{-1}) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times FD}{c \times (1 - \theta) \times 1000} \quad (3)$$

Onde A_0 é a absorbância da emulsão diluída no tempo igual a zero, FD é o fator de diluição, c é a concentração inicial da proteína (g/mL) e θ é a fração de óleo para formar a emulsão (0,25).

A estabilidade da emulsão foi analisada em termos do índice de estabilidade da emulsão (ESI), definida pela Equação 4.

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_t} \times t \quad (4)$$

Onde A_0 e A_t são as absorbâncias das emulsão diluídas a 0 e t min (30, 60 e 120 min), respectivamente.

4.2.4 Encapsulação

4.2.4.1 Encapsulação de Quercetina

A encapsulação da quercetina utilizando a β -lg nanoestruturada foi realizado em duplicata através do nanossistema de nanopartículas poliméricas. Solução estoque de quercetina em 3 concentrações diferentes ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram preparadas em etanol 98%. Em microtubos, previamente pesados, foram adicionadas a solução estoque de quercetina, o solvente e a dispersão de nanoestrutura de proteína em acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Preparação de diferentes concentrações de quercetina em nanopartícula para determinar a eficiência de encapsulação EE (%).

Amostra	[Q]* na dispersão de NPs em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Sol.estoque Q($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em μL	Dispersão de NPs em μL	Sol. NaCl em μL
1	25,0	37,5	1000	462,5
2	50,0	75,0	1000	425
3	100	150	1000	350
4	150	225	1000	275
5	300	450	1000	50,0
6	600	800	1000	200
7	900	900	1000	100

*[Q] – concentração de quercetina

As amostras foram agitadas manualmente por 5 minutos e levadas à centrifugação a 13500 rpm, 20°C por 30 minutos. Após a centrifugação, diluiu-se o sobrenadante para a leitura no espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology (São Paulo, Brasil) a 373 nm e os

valores obtidos foram usados para o cálculo da concentração de quercetina do sobrenadante, via curva analítica, e a eficiência de encapsulação EE (%) pela equação 5.

$$EE(\%) = (W_{total} - W_{livre}) 100 / W_{total} \quad (5)$$

Onde EE (%) é a eficiência de encapsulação, W_{total} é o total de quercetina adicionado nas NPs e W_{livre} é o total de quercetina livre encontrado no sobrenadante.

Todo o sobrenadante restante nos microtubos foram retirados cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta e o decantado foi posteriormente levado à estufa a 50°C para secagem durante 48 horas. Após este tempo os eppendorfs foram novamente pesados para obtenção da massa final. Subtraindo-se a massa final da massa inicial do microtubo obteve-se o valor de W_{np} na equação 6. Em seguida foi calculado o valor da capacidade de ligação (LC) da quercetina na nanoestrutura pela Equação 6.

$$LC(\%) = (W_{total} - W_{livre}) 100 / W_{np} \quad (6)$$

Onde o LC (%) corresponde ao *loading*, W_{total} é o total de quercetina adicionado nas NPs, W_{livre} é o total de quercetina livre encontrado no sobrenadante e W_{np} é o valor da quercetina ligada às NPs.

4.2.4.2 Encapsulação de Vitamina B2

A encapsulação da vitamina B2 é semelhante ao da quercetina sendo diferentes apenas em alguns pontos. Solução estoque de vitamina B2 na concentração de 0,3 mg.mL⁻¹ foi preparada em água destilada. Então, em microtubos foram adicionados a solução estoque de vitamina B2, a solução de NaCl e a dispersão de nanoestrutura em acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Preparação de diferentes concentrações de vitamina B2 em nanopartícula para determinar a eficiência de encapsulação EE (%).

Amostra	[V] na dispersão de NPs em mg.mL ⁻¹	Sol.estoque V(0,3mg.mL ⁻¹) em µL	Dispersão de NPs em µL	Sol. NaCl em µL
1	0,015	75,0	1000	425
2	0,030	150	1000	350
3	0,060	300	1000	200
4	0,075	375	1000	125
5	0,090	450	1000	50,0

*[V] – concentração de vitamina

As amostras foram agitadas manualmente por 5 minutos e levadas à centrifugação a 13500 rpm (1000g), 20°C por 30 minutos. Após a centrifugação, diluiu-se 10 vezes o sobrenadante obtido com água destilada. O conteúdo diluído foi lido no espectrofotômetro Global Trade Technology (São Paulo, Brasil) a 445 nm e os valores obtidos foram usados para o cálculo da concentração de quercetina do sobrenadante através da equação obtida da curva analítica e a eficiência de encapsulação EE (%) em percentagem obtida pela equação 5 apresentada no item 4.2.4.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Delineamento experimental

A Tabela 4 mostra o tamanho das estruturas de β -lg obtido com o tratamento térmico. USKOKOVIĆ (2007) afirma que nanoestruturas são materiais cujo tamanho varia de 10 a 300 nm, portanto, o tratamento 15 foi o que apresentou o melhor resultado. Este tratamento obteve um tamanho médio de 109,95 nm e PDI (Polidispersividade) de 0,4062. Este valor de PDI encontrado ficou próximo do considerado eficiente pela literatura, $\pm 0,4$ (MADALENA et al., 2016), indicando que as nanoestruturas tiveram uma boa polidispersividade.

Tabela 4: Valores de Tamanho (nm) e PDI (Polidispersividade) das amostras preparadas no delineamento experimental e analisadas no equipamento Nanozeta Sizer Malvern (Inglaterra, Reino Unido).

NP's	Tamanho (nm)	PDI
	Média $\pm$ Sd	
1	356,62 $\pm$ 58,07	0,4315 $\pm$ 0,0319
2	285,13 $\pm$ 63,35	0,5745 $\pm$ 0,1889
3	581,70 $\pm$ 180,12	0,6203 $\pm$ 0,1261
4	416,37 $\pm$ 71,42	0,4750 $\pm$ 0,0733
5	204,40 $\pm$ 80,80	0,3422 $\pm$ 0,0451
6	105,00 $\pm$ 13,71	0,4328 $\pm$ 0,0484
7	142,52 $\pm$ 22,31	0,4308 $\pm$ 0,0542
8	159,73 $\pm$ 41,37	0,3982 $\pm$ 0,0449
9	178,78 $\pm$ 69,43	0,3412 $\pm$ 0,0488
10	274,16 $\pm$ 174,14	0,4353 $\pm$ 0,1853
11	147,24 $\pm$ 59,38	0,3093 $\pm$ 0,0353
12	363,83 $\pm$ 224,38	0,4235 $\pm$ 0,1404
13	349,47 $\pm$ 106,88	0,5662 $\pm$ 0,2079
14	177,66 $\pm$ 96,06	0,2970 $\pm$ 0,0590
15	109,95 $\pm$ 0,68	0,4062 $\pm$ 0,0539

Os valores obtidos do tamanho de cada nanopartícula e suas respectivas condições de preparação (T, t e concentração de NaCl - [NaCl]) foram agrupados conforme a Tabela 5 para

a obtenção dos gráficos de superfície de resposta em 3D. Onde os valores de 0, 1 e -1 entre parênteses correspondem à nomenclatura utilizada pelo software para a leitura dos dados.

Tabela 5: Valores de tamanho (nm), tempo(min), temperatura(°C) e concentração de NaCl (mmol.L⁻¹) de cada NP.

NP	Tamanho (nm)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	[NaCl] (mmol.L ⁻¹)
1	356,62	120(1)	62,5(0)	0(-1)
2	285,13	60(0)	25(-1)	0(-1)
3	581,7	60(0)	100(1)	0(-1)
4	416,37	120(1)	62,5(0)	50(1)
5	204,4	60(0)	62,5(0)	25(0)
6	105	120(1)	100(1)	25(0)
7	142,52	60(0)	25(-1)	50(1)
8	159,73	10(-1)	100(1)	25(0)
9	178,78	120(1)	25(-1)	25(0)
10	274,16	10(-1)	62,5(0)	50(1)
11	147,24	60(0)	62,5(0)	25(0)
12	363,83	10(-1)	25(-1)	25(0)
13	349,47	10(-1)	62,5(0)	0(-1)
14	177,66	60(0)	62,5(0)	25(0)
15	109,95	60(0)	100(1)	50(1)

A partir destes dados construiu-se os gráficos de superfície 3D bem como gerou-se a ANOVA (Tabela 6) utilizando-se o software Statistica a fim de avaliar as regiões de melhor resposta para a melhor nanoestrutura. As superfícies obtidas podem ser melhor analisadas nas Figuras 5, 6 e 7.

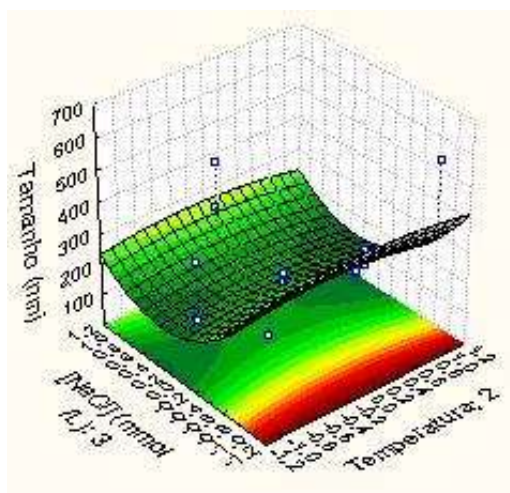


Figura 5: Superfície de resposta 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x [NaCl] (mmol.L⁻¹) x Temperatura (°C). Fonte: Próprio autor, 2016.

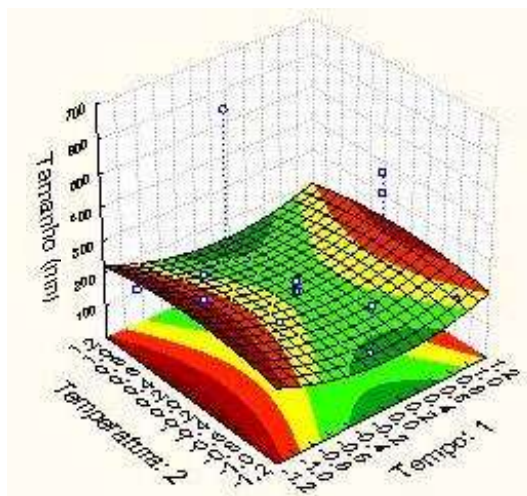


Figura 6: Superfície de resposta 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x Temperatura (°C) x Tempo(min). Fonte: Próprio autor, 2016.

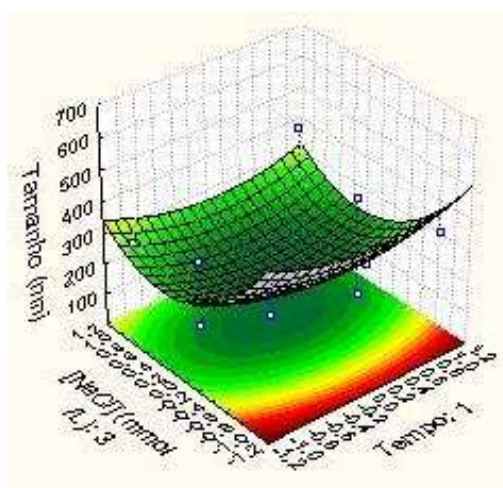


Figura 7: Superfície de resposta 3D obtida através dos valores de Tamanho(nm) x [NaCl] (mmol.L⁻¹) x Tempo(min). Fonte: Próprio autor, 2016.

Observa-se nas Figuras 5 e 7 que a região de obtenção de menores nanopartículas foi a região verde central, e não a região vermelha nas extremidades, uma vez que esta indica valores altos de tamanho. Portanto, a região de interesse nos três gráficos em questão é a região verde central uma vez que o objetivo foi à obtenção de nanoestruturas de menor tamanho (± 100 nm) e não maiores (valores dos eixos podem ser melhor analisados nos gráficos 2D no ANEXO I). O melhor perfil alcançado pode ser observado na Figura 5 onde encontra-se uma

região côncava bastante nítida que engloba os valores de Tamanho (nm), [NaCl] e tempo (min) possibilitando a identificação do ponto ótimo entre eles.

Tabela 6: ANOVA dos dados obtidos no software Statistica.

Fator	SS	df	MS	F	p
Tempo(L)	1022,0	1	1021,97	0,059254	0,813805
Tempo(Q)	8283,8	1	8283,77	0,480294	0,507906
Temperatura(L)	24,1	1	24,08	0,001396	0,971108
Temperatura(Q)	1781,3	1	1781,26	0,103278	0,756167
[NaCl](mmol/L)(L)	49599,9	1	49599,90	2,87505	0,128362
[NaCl](mmol/L)(Q)	58021,2	1	58021,24	336,075	0,103975
Erro	137978,5	8	17247,31		
Total SS	256323,8	14			

L:Linear; Q:Quadrática

A ANOVA (*Analysis of Variance*) testa a importância de um ou mais fatores comparando as médias das variáveis de resposta em diferentes níveis dos fatores. Os modelos utilizados para descrever o fenômeno do experimento foram o linear e quadrático, escolhidos de acordo com as linhas de tendências que melhor representam o sistema. A ANOVA nos oferece o valor de *Sum of Squares* (SS) para ambos modelos, assim como o grau de liberdade (df) e consequentemente o valor de *Mean Square* ($MS=SS/df$). A partir desses valores obtém-se os valores de F e p. Logo, analisando a Tabela 6 percebe-se que os maiores valores de F foram para o NaCl. O F é calculado pela variância entre os grupos/variância dentro dos grupos, sendo assim quanto maior esse valor (F) maior a diferença entre os grupos, e, portanto, este parâmetro (NaCl) é o grande influenciador na obtenção do tamanho da nanopartícula, sendo altos valores destes prejudiciais para o processo. Já o valor de p mostra a confiabilidade do teste, quanto menor este valor menor a probabilidade dos resultados serem algo ao acaso, por exemplo o valor 0,10 indica que há 10% de chance do resultado ser uma casualidade. Apesar do teste ter apresentado parâmetros com valores elevados de p, é a relação entre o $F_{\text{calculado}}$ (obtido pelo software Statistica) e F_{tabelado} (obtido na literatura) que possibilita concluir se os dados são estatisticamente significativos. Sendo assim obteve-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ igual a 11,15 e F_{tabelado} igual a 4,60, como $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, pôde-se concluir que os dados são estatisticamente significativos.

Logo, a partir das análises feitas no software Statistica, as melhores condições escolhidas na região de ótimo para posteriores análises foram de 25 mmol.L⁻¹, 62,5 °C por 120 min (Tabela 4).

5.2 Teste de espuma

As espumas, são em outras palavras, dispersões de gases em líquidos que apresentam propriedades reológicas interessantes dependendo das situações em que estão expostas. Quando é aplicada certas tensões sobre as mesmas, elas agem como um sólido viscoelástico, enquanto que para tensões mais altas elas tornam-se mais finas, e portanto possuem maior fluidez (ENGELHARDT et al., 2013). Essas propriedades aderidas à grande área de superfície que pode ser adquirida pelas nanoestruturas são o que dão às proteínas do leite grande aplicabilidade.

A Tabela 7 mostra a estabilidade da espuma para as proteínas nativas em solução e nanoestruturadas.

Tabela 7: Valores de VI e FS obtidos para cada amostra. Onde FS₃₀, FS₆₀ e FS₁₂₀ são os valores de FS nos intervalos 30, 60 e 120 min, respectivamente.

	Proteína Pura	Nanoestrutura
VI	16,98±0,71	21,43±1,41
FS₃₀	22,22±0	66,67±0
FS₆₀	7,78±0,21	50,00±0
FS₁₂₀	0,00±0	33,33±0

A partir dos dados da Tabela 6 pode-se observar que a espuma da nanoestrutura apresentou maior estabilidade quando comparada a da proteína pura. Analisando os valores de VI e FS_t percebe-se que a proteína pura possui um valor menor que a nanoestrutura, apesar de ambas terem iniciado com o mesmo volume total. Percebe-se também que ao final do experimento, em FS₁₂₀, a proteína pura já não apresentava nenhuma espuma, enquanto a nanoestrutura possuía o valor de FS₁₂₀ igual a 33,33. Dessa forma, a nanoestrutura mostrou maior capacidade de formação e estabilização da espuma do que a proteína nativa.

LEMAN; DOGA (2003) concluíram que o tratamento térmico da β -lactoglobulina, não nanoestruturada, provoca a diminuição da capacidade de formação de espuma. Porém, o que se observou é que quando a proteína está nanoestruturada a sua capacidade de formação de espuma é aumentada. Este resultado, sugere, portanto, que a nanoestruturação da proteína provoca maior estabilização térmica da mesma, intensificando sua atividade interfacial pela mudança conformacional da proteína ao se ligar uma a outra para a formação da nanoestrutura. Fato este que será verificado futuramente com medidas de discoísmo circular e fluorescência que permite a análise da estrutura quaternária e terciária da proteína, respectivamente.

Portanto, pode-se concluir que vários fatores podem afetar a estabilidade da espuma formada, sendo assim uma questão alarmante quanto à preparação e formulação de produtos alimentícios e cosméticos. Dessa forma, a nanoestruturação da β -lactoglobulina, de acordo com os resultados alcançados, é uma maneira de manter a espuma mais estável e, portanto, produzir alimentos com propriedades técnico-funcionais direcionadas.

5.4 Teste de emulsão

Os valores de absorvância medidos foram aplicados nas equações 3 e 4, apresentadas no item 4.2.3, a fim de obter os valores de Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e Estabilidade da Emulsão (ESI) para cada emulsão. Na Tabela 8 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 8: Valores de IAE(m^2g^{-1}) e ESI para a nanoestrutura e proteína pura.

	Nanoestrutura	Proteína Pura
IAE (m^2g^{-1})	118	152,91
ESI	192	124,5

Apesar de o IAE da nanoestrutura ter sido menor que da proteína pura, o valor de ESI para a nanoestrutura foi maior que da proteína pura. O valor de ESI é de maior interesse, uma vez que a característica desejada da nanoestrutura é a sua capacidade de estabilizar a emulsão de uma formulação alimentícia, de forma que esta permaneça homogênea sem separação de fases.

A nanoestrutura e a proteína nativa foram obtidas a partir da mesma concentração de proteína inicial. Porém, esta ao se nanoestruturar diminui o número de partículas que podem interagir na interface água-óleo na formação da emulsão. Portanto, sugere-se que é por este motivo que a proteína pura apresenta maior IAE do que a proteína nanoestruturada. Todavia, esta última apresenta maior ESI do que a proteína pura, uma vez que a nanoestrutura apresenta maior atividade interfacial do que a proteína não-nanoestruturada, corroborando, assim, com os resultados da estabilidade da espuma.

Em trabalho realizado por LOSSO; NAKAI (2002) o aumento do IAE e ESI foram induzidos de maneiras diferentes. Neste analisou-se se a adição de polietilenoglicol (PEG) à β -lg aumentaria o valor do IAE, e o resultado foi negativo. Observou-se que a estabilidade da emulsão foi maior quando submeteu-se a β -lg ao processo de sulfitólise. No mesmo estudo concluiu-se que a estabilização da β -lg através da sulfitólise foi possível pois as gotículas

individuais da emulsão estavam protegidas de maneira mais eficiente contra a ponte de proteínas, pela camada de proteína PEG adsorvida. Por outro lado, essa pode não ser uma maneira eficiente de melhorar a estabilidade da emulsão formada pela β -lg, uma vez que esses aditivos podem não ser aceitáveis e compatíveis com os compostos presentes em produtos alimentícios, assim como pela sua absorção no organismo.

5.5 Encapsulação

5.5.1 Encapsulação das moléculas bioativas: Quercetina e Vitamina B2

A Figura 8 mostra a eficiência de encapsulação (EE%) em função da concentração de Quercetina e Vitamina B2 na dispersão de nanopartículas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

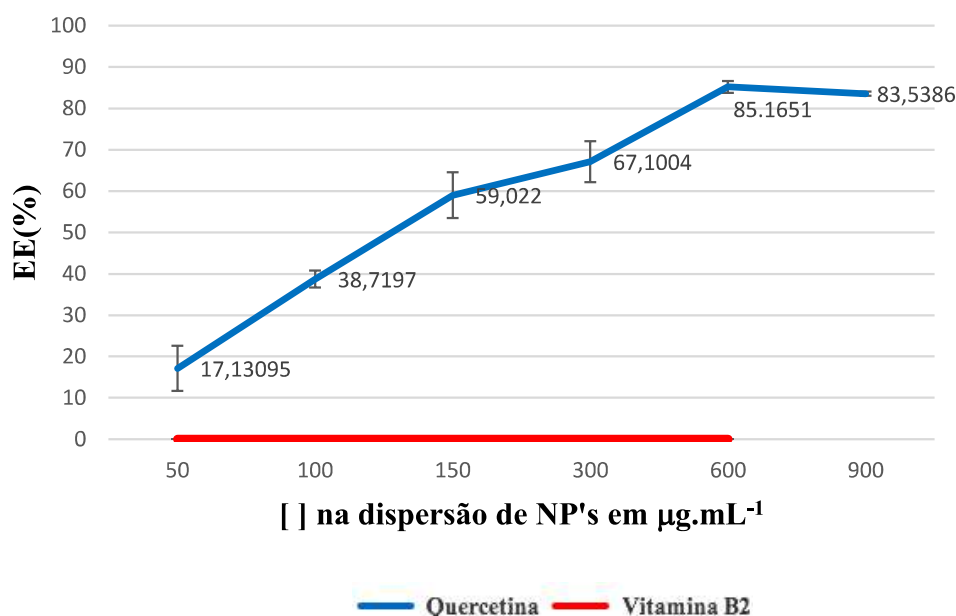


Figura 8: Eficiência de encapsulação EE(%) em função da concentração [] de Quercetina e Vitamina B2 na dispersão de β -lg, e seu respectivo desvio padrão. NP's – nanopartículas.

A quercetina apresentou uma eficiência de encapsulação máxima de 85,16%, mostrando, portanto, o potencial dessa nanoestrutura em encapsular moléculas hidrofóbicas como a quercetina. Por outro lado, a vitamina B2 não foi encapsulada, o que sugere que a β -lg nanoestruturada apresenta uma superfície hidrofóbica, já que a quercetina é mais hidrofóbica e a vitamina mais hidrofílica. Diante dos resultados de não encapsulação de vitamina B2 não calculou-se o seu LC(%) como foi feito para a quercetina. A Figura 9 mostra, então, os valores de LC para a quercetina.

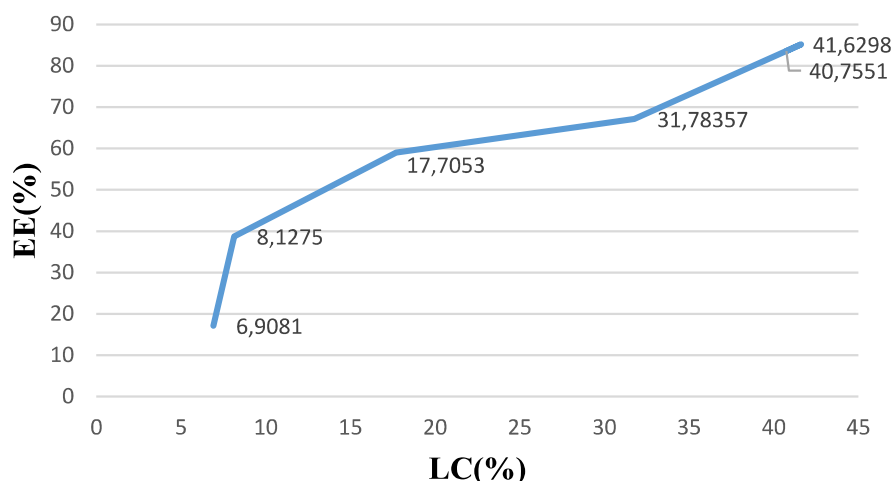


Figura 9: Relação entre eficiência de encapsulação EE(%) e capacidade de ligação (LC%) para a Quercetina. Onde os valores na linha azul são os valores de LC(%).

Pode-se observar que o valor de LC foi aumentando de acordo com o EE(%), isso acontece pois se a β -lg foi capaz de encapsular a quercetina é esperado que sua capacidade de ligação à mesma seja também eficiente e portanto espera-se uma massa final de moléculas bioativas encapsuladas significativa. Ainda não há disponível na literatura trabalhos que testaram o LC(%) em quercetinas encapsuladas por nanoestruturas de β -lg.

Sobre a eficiência na encapsulação de quercetina utilizando nanoestruturas de β -lg observa-se que concentrações baixas de quercetina não promoveram eficiência significativa na encapsulação. Portanto, maiores eficiências foram obtidas para maiores concentrações. Por outro lado, também não foi possível comparar os resultados obtidos com dados disponíveis na literatura, uma vez que nenhum trabalho foi publicado até o momento. No entanto, SOUZA et al. (2014) obteve-se eficiência maior que 95% para a encapsulação de quercetina, porém utilizando nanopartículas de lecitina/quitosana. Essa alta eficiência foi alcançada para todas as concentrações de quercetina utilizadas (50, 70 e 100 μ g/mL), comprovando o sucesso do experimento. Apesar de no presente trabalho o dispositivo encapsulador ter sido diferente (nanopartículas de β -lg), ambos resultados foram obtidos com sucesso.

Já para a vitamina B2, resultados diferentes foram obtidos por MADALENA et al. (2016) que mostrou que a vitamina B2 possui alta habilidade de se associar à riboflavina e liberá-la eficientemente. No entanto, é importante ressaltar que a técnica de nanoestruturação da proteína utilizada por estes autores foi diferente, o que ocasiona diferentes tipos de nanoestrutura com características distintas. Em seu trabalho, a formação das nanopartículas foi realizada através da adição de HCl ou NaOH para o ajuste do pH e não através do uso de NaCl.

O interessante deste trabalho é que MADALENA et al. (2016) mostrou que a riboflavina no organismo foi gradativamente liberada, e no sétimo dia de análise já havia sido totalmente liberada, o que justifica ainda mais a necessidade de mais estudos nessa área, pois até o presente momento somente este trabalho com nanoestrutura de β -Ig foi relatado na literatura.

6. CONCLUSÃO

Sob determinadas condições de temperatura, tempo e força iônica foi possível a obtenção de nanoestruturas de β -lactoglobulina, fato este ainda pouco relatado na literatura científica com somente um artigo publicado até o presente momento. As melhores condições para a obtenção de nanoestrutura em acordo com o tratamento Box-Behnken foram 100 °C durante 60 min e NaCl a 50 mmol.L⁻¹ com um tamanho de 109,95 nm.

A quercetina foi eficientemente encapsulada pelas nanopartículas de β -Ig, sugerindo, então, que a superfície da nanoestrutura é hidrofóbica. Os experimentos mostraram ainda, que as nanopartículas de β -Ig possuem significativa estabilidade de espuma e emulsão.

Os resultados sugerem que a encapsulação de quercetina por nanopartículas de β -Ig pode ser utilizado como uma alternativa pertinente na adição de nutracêuticos aos alimentos, como também uma maneira de proteger a molécula bioativa contra condições adversas no processamento industrial e tornar mais eficiente a sua liberação e absorção no organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. **Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review.** International Journal of Dairy Technology, Dairy Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt, v. 65, n. 1, 2012.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino.** 1. ed. 1. Barueri: Manole, p. 142, 2003.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHU, M. L. P. **Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.** Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 15, n.3, p. 285-292, 2004.

BHASKARAN, K. **Nutraceuticals.** Head of Department of Pharmacology, Pariyaram Medical College, Kannur, Kerala, v. 20, p. 76-77, 210.

BOTREL, N.; OLIVEIRA, V. R. **Cultivares de cebola e alho para processamento.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 52. Horticultura Brasileira 30. Salvador: ABH. S8420-S8434, 2012.

CAMERON, D. R.; WEBER, M.E.; IDZIAK, E.S.; NEUFELD, R.J.; COOPER, D.G. **Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v.39, n.4, p.655-659, Apr. 1991.

CENCIC, A.; GHINGWARU, W. **The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health.** Nutrients, Slovenia, v. 2, p. 611-625, 2010.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SILVA, H. D.; RAMOS, P. E.; AZEVEDO, M. A.; FLORES - Lopez, M. L., et al. **Design of bio-nanosystems for oral delivery of functional compounds.** Food Engineering Reviews, v. 6, p. 1-19.

CHAVES, K. F.; CALLEGARO, E. D.; SILVA, V. R. O. **Utilização do soro de leite nas indústrias de laticínios da região de Rio Pomba-MG.** In: Congresso Nacional de Laticínios, 27., 2010, Juiz de Fora. Anais do Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2010.

CRESPI, V.; MORAND, C.; MANACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. **Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen.** American Journal of Physiology, v. 277, p. 120-126, 1999.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Effects of industrial foods processing on vitamins stability.** Alim. Nutr., Araraquara, v.19, n.1, p. 83-95, jan./mar. 2008.

DAGUER, H.; ASSIS, M. T. Q. M.; BERSOT, L. S. **Controle da utilização de ingredientes não cárneos para injeção e marinação de carnes.** Ciência Rural, v.40, n.9, p.2037-2046, 2010.

DA SILVA, D. J. O. **Resíduos na indústria de laticínios.** Departamento de Tecnologia de

alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 19 f., 2011.

ENGELHARDT, K.; LEXIS, M.; GOACHEV, G.; KONNERTH, C.; MILLER, R.; WILLENBACHER, N.; PEUKERT, W.; BRAUNSCHWEIG, B. **pH Effects on the Molecular Structure of β -Lactoglobulin Modified Air–Water Interfaces and Its Impact on Foam Rheology**. American Chemical Society, *Lagmuir*, v. 29, n. 36, p. 11646–11655, 2013.

FLANAGAN, J.; KORTEGAARD, K.; PINDER, D.N.; RADES, T.; SINGH, H. **Solubilisation of soybean oil in microemulsions using various surfactants**. *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 253-260, 2006.

GRAVELAND-BIKKER, J. F.; KRUIF, C. G. **Unique protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet**. *Trends in food science and technology*, Holanda, v. 17, p. 196-203, 2006.

KO, S.; GUNASEKARAN, S. **Preparation of sub-100-nm β -lactoglobulin (BLG) nanoparticles**. *Journal of Microencapsulation*, Estados Unidos, v. 23, n.8, p. 887-898, 2006.

LACERDA, F. V.; ALCÂNTARA, J. P.; FERREIRA, I. G. G.; RICACHENVSKY, C.; OLIVEIRA, H. P. M.; MAGINI, M. R. R. **O uso da Riboflavina como terapia coadjuvante no tratamento de doenças contemporâneas**. In: XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2007, Vale do Paraíba, *Resumos...* Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São Paulo, 2007.

LEMAN, J.; DOGA, T. **Effect of temperatura and high pressure on the foaming properties of beta-lactoglobulin salted out at pH 2**. *Commun Agric Appl Biol Sci*, v. 68, n. 2, pt. B, p. 489-492, 2003.

LOSSO, J. N.; NAKAI, S. **Stabilization of oil-in-water emulsions by beta-lactoglobulin-polyethylene glycol conjugates** *J Agric Food Chem*, v. 50, n.5, p. 1207-1212, 2002.

MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; XAVIER MALCATA, F.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. **In vitro digestion and stability assessment of β -lactoglobulin/riboflavin nanostructures**. *Food Hydrocolloids*, Portugal, v. 58, p. 89-97, 2016.

MILKPOINT. **As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil**. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>> Acesso em: 18 de julho de 2016.

MILKPOINT. **IBGE: produção de leite cresceu 2,7% em 2014; Sul tornou-se a maior região produtora**. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-de-leite-cresceu-27-em-2014-sul-tornouse-a-maior-regiao-produtora-97326n.aspx>> Acesso em: 18 de julho de 2016.

MINETTO, C. N. **Flavonóides na doença cardiovascular**. *Alimentação Humana*, Brasil, v. 15, n. 3, 2009.

MÜLLER, R.H., RADTKE, M.; WISSING, S.A. **Solid lipid nano-particles (SLN) and**

nanstructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. Adv Drug Deliv Rev, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MURARI, C. S.; MORAES, D. C.; BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. **Avaliação da redução na poluição dos laticínios a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *kluveromyces marxianus* 229.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 42-50, jul./ago., 2013.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. **Soro de leite: um subproduto valioso.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Paraná, v. 67, n. 385, p. 64-71, mar./abr., 2012.

PRESTES, M. J.; PAYES, M. A. M. **Crescimento da indústria de laticínios no Brasil.** Sorocaba, SP, 2012. 19p.

ROBBINS, C. W.; HANSEN, C. L.; ROGINSKE, M. F.; SORENSEN, D. L. **Extractable potassium and soluble calcium, magnesium and potassium in two whey-treated calcareous soils.** Journal of Environmental Quality, Madison, v.25, p. 791-795, 1996.

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, v. 9, p. 2905- 2912, 2008.

SEHKON, B. S.; **Food nanotechnology - an overview.** Nanotechnology, Science and Applications, India, v. 3, p. 1-15, 2010.

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

SINGH, H. **Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges.** Preventive Nutrition and Food Science, Nova Zelândia, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2016.

SOUZA, M. P.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. **Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan nanoparticles for functional food applications.** Food Bioprocess Technol, Nova York, v. 7, p. 1149-1179, 2014.

SRINIVAS, P. R.; PHILBET, M.; VU, T. Q.; HUANG, Q.; KOKINI, J. L.; SAOS, E.; CHEN, H.; PETERSON, M. C.; FRIEDL, K. E.; MCDADE-NGUTTER, C.; HUBBARD, V.; STARKEE-REED, P.; MILLER, N.; BETZ, J. M.; DWYER, J.; MILNER, J.; ROSS, S. A. **Nanotechnology Research: Applications in Nutritional Sciences.** The Journal of Nutrition, v. 140, p. 119-124, 2010.

TAVARES, G. M.; CROGUENNEC, T.; CARVALHO, A. F.; BOUHALLAB, S. **Milk protein as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends.** Trends in Food Science & Technology, Rennes, France, v. 37, p. 5-20, 2014.

THOMPSON, A. K.; COUCHOUD, A.; SINGH, H. **Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived**

phospholipids and soya phospholipids. Dairy Sci Technol, v. 89, p. 99-113, 2009.

TOLOCHKO, N. K. History of Nanotechnology. Nanoscience and Nanotechnologies, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), 2008.

USKOKOVIĆ, V. **Nanotechnologies: What we do not know.** Technology in Society v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.

ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS- MELLADO, M. M. **Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, n.1, p.102-106, 2010.

ANEXO A

Superfícies de resposta 2D do delineamento realizado para a nanoestrutura de β -lg.

