(11) Número de Publicação: **PT 107059 B**(51) Classificação Internacional:  
**A61K 47/42 (2006.01)****(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**(22) Data de pedido: **2013.07.12**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2015.01.12**(45) Data e BPI da concessão: **2015.11.04**  
**219/2015**

(73) Titular(es):

**UNIVERSIDADE DO MINHO****LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA PT**

(72) Inventor(es):

**ANA ISABEL JUNÇA SOTTOMAYOR LISBOA DE BOURBON****MIGUEL ÂNGELO PARENTE RIBEIRO CERQUEIRA PT****ANTÓNIO AUGUSTO MARTINS OLIVEIRA SOARES VICENTE****PT**

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **PARTÍCULAS DE GEL BIOPOLIMÉRICAS PARA APLICAÇÕES ALIMENTARES E FARMACÉUTICAS.**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE NUM MICRO OU NANOGEL QUE PODE SER UTILIZADO NA INDÚSTRIA ALIMENTAR OU FARMACÉUTICA. MAIS ESPECIFICAMENTE, CONSISTE NUM MICRO OU NANOGEL, DEPENDENDO DAS DIMENSÕES PRETENDIDAS, COMPOSTO POR LACTOFERRINA (1) E GLICOMACROPÉPTIDO (2). ESTE GEL POSSUI ELEVADA RETENÇÃO DE ÁGUA E É COMPOSTO POR PARTÍCULAS ESFÉRICAS COM DIMENSÃO CONTROLADA E MONODISPERSAS, POSSUINDO UMA CAPACIDADE DE ENCAPSULAR COMPOSTOS HIDROFÓBICOS E HIDROFÍLICOS, E DE LIBERTAR ESTES COMPOSTOS DE UMA FORMA CONTROLADA DE ACORDO COM A ALTERAÇÃO A ESTÍMULOS EXTERIORES, COMO POR EXEMPLO DIFERENTES PHS, FORÇA IÓNICA E TEMPERATURA.

## RESUMO

"Partículas de gel biopoliméricas para aplicações alimentares e farmacêuticas"

A presente invenção consiste num micro ou nanogel que pode ser utilizado na indústria alimentar ou farmacêutica. Mais especificamente, consiste num micro ou nanogel, dependendo das dimensões pretendidas, composto por lactoferrina (1) e glicomacropéptido (2). Este gel possui elevada retenção de água e é composto por partículas esféricas com dimensão controlada e monodispersas, possuindo uma capacidade de encapsular compostos hidrofóbicos e hidrofílicos, e de libertar estes compostos de uma forma controlada de acordo com a alteração a estímulos exteriores, como por exemplo diferentes pHs, força iónica e temperatura.

## DESCRIÇÃO

"Partículas de gel biopoliméricas para aplicações alimentares e farmacêuticas"

### **Domínio da Invenção**

A presente invenção diz respeito a géis produzidos com biopolímeros, de base proteica, formulados a partir da interação de uma proteína e um péptido linear glicosilado. Mais especificamente consiste em micro ou nanogéis compostos por lactoferrina e glicomacropéptido. Esta invenção insere-se nas áreas da indústria alimentar e farmacêutica.

### **Antecedentes da Invenção**

Os géis são constituídos por cadeias poliméricas, hidrofílicas e tridimensionais que têm a elevada capacidade de reter água, mantendo intacta a sua estrutura devido às ligações covalentes, pontes de hidrogénio e interações Van der Waals.

Estes podem ser preparados a partir de uma variedade de materiais tais como proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos. As proteínas são componentes cuja função básica é fornecer as quantidades de aminoácidos essenciais da dieta necessária à sobrevivência de animais e humanos. Dentre os diferentes tipos existentes, as proteínas do soro de leite destacam-se por suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais. Entre outras aplicações, estas proteínas podem ser utilizadas em produtos nutracêuticos e fórmulas alimentícias infantis. Assim, são compostos que, em forma concentrada ou purificada, beneficiam a saúde além de fornecer características funcionais específicas para diferentes produtos alimentares.

A sinergia entre biopolímeros tem permitido desenvolver produtos com propriedades inovadoras e únicas. Anema and Kruif (2012) analisaram a interação entre a lactoferrina e a caseína ( $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína), proteínas do soro do queijo, e avaliaram a formação de co-acervatos em determinadas condições. Estes autores verificaram que a mistura destes dois compostos, quando apresentam cargas electroestáticas opostas resultava na formação de co-acervatos e cujo tamanho era influenciado pela força da interação destas moléculas. Estes autores demonstraram que a interação destes dois biopolímeros permitem formar co-acervatos, no entanto estes são estruturas que apresentam interações fracas e quando sujeitos a condições exteriores extremas (variando o pH ou temperatura) ocorre a sua destruição e perda de atividade das propriedades inerentes a cada um dos compostos utilizados. Além de que, os co-acervatos são caracterizados por não se distribuírem de forma homogénea numa solução aquosa (existência de duas fases), o que é claramente uma desvantagem para a sua utilização em produtos alimentares. Em comparação, a presente invenção refere-se a um gel que pode ser micro ou nano, de estrutura esférica, estável, sem separação de fases em solução e com interações fortes, ou seja interações electroestáticas e ligações covalentes, que permite a inclusão de compostos bioativos.

Por sua vez, o documento de patente EP1932855 apresenta a capacidade da lactoferrina interagir com uma molécula não peptídica e hidrofílica, e a possibilidade dessa interação resultar num complexo cujas propriedades são inovadoras face às moléculas individuais, nomeadamente o aumento de tempo *in vivo* e a sua aplicação trazer um valor acrescentado para aplicações clínicas. Este documento refere que a interação de uma proteína globular, como é o caso da lactoferrina com outra

molécula pode resultar na formação de um complexo com propriedades inovadoras. Tem-se verificado que a procura de partículas provenientes de compostos naturais e cujas propriedades trazem benefícios para a saúde humana, é cada vez mais um objeto de pesquisa e procura quer pela indústria farmacêutica quer pela indústria alimentar. O desenvolvimento de partículas biopoliméricas que sejam homogêneas, de rápida produção e que permitam servir de transporte a compostos bioativos para solucionar carências nutricionais ou para o tratamento de determinadas doenças, surge como um verdadeiro desafio. Até ao momento, vários autores utilizam esta tecnologia para produção de complexos, no entanto não utilizam materiais biopoliméricos, de grau alimentar (*food grade*) e reconhecidos como seguros (*GRAS - generally recognized as safe*) e que além disso, tenham a capacidade de incorporar e libertar - face a alterações externas, como por exemplo pH, compostos com propriedades funcionais, nomeadamente compostos com características hidrofílicas e hidrofóbicas garantindo a sua estabilidade durante o armazenamento.

A presente invenção destaca-se dos documentos já apresentados, uma vez que utiliza simultaneamente a interação electrostática e hidrofóbica entre uma proteína globular e um péptido glicosilado e hidrofílico para formação de géis com dimensões à escala micro ( $10^{-6}$ ) e nano ( $10^{-9}$ ), monodispersos, com elevada retenção de água, estáveis, que permitem uma elevada capacidade de incorporação de compostos bioativos (hidrofílicos e hidrofóbicos) e a libertação controlada destes, face a determinadas condições ambientais.

## Sumário da invenção

É objeto da presente invenção géis de base proteica constituídos por partículas esféricas que compreendem lactoferrina e glicomacropéptido.

Noutra realização, os géis são micro ou nanogéis.

Numa outra realização preferencial, concentração do glicomacropéptido está compreendida entre 0.01 e 0.2% (m/v).

Numa outra realização preferencial, concentração da lactoferrina está compreendida entre 0.01 e 0.02 % (m/m).

Numa outra realização preferencial, a dimensão do micro ou nanogel está compreendida entre 170 nm a 5 µm.

Numa outra realização preferencial, a podispersividade do gel está compreendida entre 0.1 a 0.4.

Numa outra realização preferencial, o gel permite a incorporação de compostos bioativos.

Numa outra realização preferencial, o método de produção compreende os passos de misturar uma solução de lactoferrina com uma solução de glicomacropéptido numa razão de 2:1 a um pH entre 2 a 10 ; agitar constantemente, por um período de 20 min e aquecer a solução a uma temperatura entre 20 a 90°C, por um período de tempo compreendido entre 10 a 60 minutos.

## Descrição Geral

O soro do queijo é um sub produto da indústria alimentar que cada vez mais tem vindo a ser alvo de estudo para reaproveitamento em diferentes áreas tendo em vista a sua valorização. Este é constituído por um elevado teor de proteínas que apresenta inúmeras propriedades funcionais e com possível aplicação em produtos de valor acrescentado. Entre as várias proteínas presentes no soro do queijo pode-se citar a lactoferrina e o glicomacropéptido, obtido da caseína bovina. A lactoferrina possui ação antimicrobiana e antioxidante; permite aumentar a resistência do sistema imunológico; é anti-carcinogênica; atua na prevenção de tumores e de trombozes; é resistente à desnaturação por calor, por agentes químicos e por ação enzimática. Por sua vez, o glicomacropéptido atua na regulação de respostas imunológicas; na diminuição da secreção gástrica; é anti-hipertensivo, apresentando uma ação protetora contra agentes condicionadores de distúrbios cardiovasculares; atua na diminuição do apetite; atua na inibição da adesão de microrganismos em polímeros, sugerindo-se o uso do glicomacropéptido como inibidor da formação de placas bacterianas e de cáries dentárias; é estável ao calor, e solúvel em condições ácidas.

Uma das desvantagens da utilização de proteínas é a sua elevada sensibilidade quando exposta a condições extremas (pH e temperatura), refletindo-se a sua perda de atividade e rápida deterioração. Neste sentido surge a possibilidade de através de sinergias entre compostos, aumentar a sua resistência a factores extremos, bem como potenciar novas propriedades e o desenvolvimento de novas estruturas.

O desenvolvimento de partículas biopoliméricas de forma rápida e homogénea, com capacidade de resistir a condições extremas e libertar compostos em determinadas condições, surge assim como

uma oportunidade de produção de produtos que podem ser incorporados em alimentos ou produtos farmacêuticos.

A presente invenção consiste num micro ou nanogel criado a partir da sinergia entre os dois biopolímeros: lactoferrina e o glicomacropéptido. Enquanto que, por um lado se potencia a capacidade de interação da lactoferrina com outras moléculas, aumenta a estabilidade a condições ambientais extremas e forma veículos de transporte de compostos bioativos, por outro, através do péptido proveniente da caseína que se encontra a uma concentração compreendida entre 0.01 a 0.2 % (m/v) - o glicomacropéptido - com a sua extremidade glicosídica permite que se criem interações com as células humanas e dessa forma potenciar a aplicação do produto a nível celular. Salienta-se que o glicomacropéptido é um composto que a determinadas condições diminui ou perde as suas funcionalidades.

Assim, o gel, que pode ser micro ou nano, que se apresenta na presente invenção, é resultante da interação electroestática e hidrofóbica do glicomacropéptido e da lactoferrina que após gelificação térmica dá origem a um gel com elevada retenção de água e com:

**a)** partículas esféricas com dimensão controlada (de acordo com o método de produção) e monodispersas, isto é conjunto de partículas com uma única dimensão e forma;

**b)** capacidade de encapsular compostos hidrofóbicos e hidrofílicos, através de interações hidrofóbicas entre as proteínas (lactoferrina e glicomacropéptido) e o composto bioativo resultantes do processo de gelificação térmica, e

**c)** capacidade de libertar compostos hidrofóbicos e hidrofílicos de forma controlada de acordo com a alteração a estímulos exteriores, como por exemplo diferentes pHs, força iónica e temperatura.

Além disto, a presente invenção permite que o glicomacropéptido, que apresenta uma estrutura linear e sem capacidade de auto formação de partícula se organize. Ou seja, a gelificação térmica permite que a proteína globular, a lactoferrina, desnature e estabeleça interações hidrofóbicas com o péptido, que face a uma reorganização estrutural dos dois biopolímeros, se forme uma partícula esférica e com as características descritas em a), b) e c).

Conforme referido anteriormente, os micro ou nanogeis resultantes da interação destes dois biopolímeros poderão ser utilizados como uma estrutura para aplicação em produtos alimentares cujo objectivo é aumentar as suas propriedades nutricionais. Podem ainda incorporar compostos bioativos com capacidade nutricional específicas, como por exemplo compostos bioativos lipofílicos ou hidrofílicos tais como, vitaminas. Estas estruturas poderão ainda ser aplicadas em alimentos para diminuir a sua oxidação ou deterioração, uma vez que estes micro ou nanogeis podem ainda incorporar antimicrobianos e antioxidantes, permitindo diminuir as alterações físico-químicas e microbiológicas durante o seu armazenamento. Estas partículas têm ainda a capacidade de responder a estímulos exteriores como o pH e temperatura, possibilitando a libertação dos compostos bioativos incorporados em meios alimentares específicos e/ou quando estes sofrem alguma alteração, como por exemplo a variação de pH, ou sujeitos a diferenças de temperatura isto é, oscilações durante o armazenamento.

O gel pode ser incorporado em preparações secas, líquidas ou viscosas, de forma a se obter o resultado pretendido quer a nível alimentar quer a nível farmacêutico.

### Breve descrição das figuras

Figura 1 - Representação gráfica salientando o Potencial zeta da lactoferrina (●) e do GMP (●) para diferentes valores de pH salientando o produto do potencial zeta (razão mássica de 1:1) para um pH entre 1.5 e 10.0.

Figura 2 - Representação gráfica da interação electroestática entre a lactoferrina (1) e o GMP (2) a pH5.

Figura 3 - Representação gráfica do efeito da temperatura na transparência das soluções de lactoferrina (◆), GMP (■) e mistura lactoferrina-GMP (▲).

Figura 4 - Imagens de microscopia eletrónica de transmissão da lactoferrina (a), do GMP (b), dos nanogeis de lactoferrina-GMP (c), e a ampliação da imagem dos nanogeis de lactoferrina-GMP (d), numa escala de: (a) 0.5  $\mu\text{m}$ , (b) 0.5  $\mu\text{m}$ , (c) 1  $\mu\text{m}$  e (d) 100 nm.

Figura 5 - Representação gráfica da eficiência de encapsulação de curcumina (a) e cafeína (b) no nanogel para várias concentrações de composto bioativo.

Figura 6 - Libertação da curcumina (a) e cafeína (b) através do nanogel a pH 2 (○) e pH 7 (●).

### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção resulta da mistura entre uma proteína globular e um peptídeo hidrofílico e glicosilado, entre os

quais há uma interação electrostática e a formação de ligações covalentes, nomeadamente ligações hidrofóbicas. Durante o desenvolvimento da tecnologia, foram: **a)** o efeito da razão mássica de cada biopolímero a utilizar na mistura; **b)** o efeito da concentração de cada um dos biopolímeros; **c)** o efeito do pH das soluções de biopolímero; **d)** o efeito da temperatura após a mistura dos dois biopolímeros; **e)** o efeito do tempo ao qual as misturas foram sujeitas às temperaturas testadas em **d)**. Estes parâmetros foram analisados com base no tamanho e polidispersividade das partículas obtidas. Os parâmetros avaliados em a) e c) influenciam a interação electrostática entre os biopolímeros; os parâmetros avaliados em a), b), d) e e) influenciam o processo de gelificação da mistura e consequente rearranjo estrutural das moléculas e interação hidrofóbica entre biopolímeros. A combinação destes parâmetros permite obter, dentro dos limites apresentados nas etapas abaixo descritas, micro-nanogeis.

**Etapa 1:** Uma solução de proteína globular (lactoferrina) e uma solução de glicomacropéptido, com pHs compreendidos entre 4 e 5, e com uma gama de concentrações que podem variar entre 0.02 e 0.2 %(m/v) são misturados na razão de 2:1;

**Etapa 2:** As soluções utilizadas após mistura são mantidas em agitação constante (60 rpm) durante 15 min, após a qual são submetidas a um aquecimento de 20 a 90°C, preferencialmente, entre 60 a 80 °C durante um período entre os 10 a 60 minutos, preferencialmente entre 10 a 20 min;

**Etapa 3:** A encapsulação de compostos é realizada através da adição do composto bioativo pretendido durante a Etapa 1 ao qual se segue a Etapa 2 e no qual acontece o encapsulamento do composto bioativo no gel.

A interação de lactoferrina e glicomacropéptido através do ajuste de diferentes valores de pH, permite uma interação máxima entre o lactoferrina e o glicomacropéptido, como apresentado na Figura 1. Devido às suas características, a lactoferrina apresenta um valor de carga positiva (+7.09 mV) a pH 5 apresentando o GMP um valor máximo de carga negativa (-25.4 mV) a pH 5.

Observou-se que na gama de pH entre 4 e 5, estes biopolímeros apresentavam uma interação máxima que permite que estes interajam de forma mais eficaz. Este efeito foi claramente analisado através da Figura 2, na qual é possível observar a capacidade de interação destes dois biopolímeros através da diminuição da frequência emitida pela balança de cristal quartzo, que é proporcional à quantidade de massa de lactoferrina que se liga ao glicomacropéptido. Nesta figura, verifica-se que ocorre uma interação electrostática elevada, que vai diminuindo devido ao facto que a carga positiva se começa a igualar à carga negativa.

Posteriormente, a aplicação de um processo térmico, usualmente designado por gelificação térmica permitiu que a lactoferrina que apresenta uma estrutura globular, se desdobrasse e à medida que é aplicado diferentes valores de temperatura (25 a 90 °C), diferentes morfologias de partículas são obtidas, podendo a proteína apresentar uma estrutura linear quando é totalmente desnaturada, ou uma estrutura ramificada quando a desnaturação não é total, com a consecutiva quebra de ligações beta e formação de ligações alfa que se traduzem numa estrutura mais heterogénea. Durante esta mudança as proteínas expõem os seus grupos não polares que normalmente se encontram na parte interna da estrutura proteica que após o seu desdobramento, permite que interações hidrofóbicas sejam

estabelecidas. Desta forma, ocorre a formação de uma partícula tridimensional com forma esférica, aqui designada por micro-nanogel.

Na Figura 3, é possível analisar o efeito da temperatura nos biopolímeros sozinhos e após a mistura destes. E observa-se que à medida que a temperatura aumenta, a mistura dos dois biopolímeros sofre alterações que se refletem na diminuição de transparência da solução Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da temperatura no diâmetro (D) e polidispersividade (PdI) das partículas de gel com uma concentração de 0.02% de lactoferrina e 0.02 % de GMP, durante 20 minutos de aquecimento.

Temperatura (°C)	D (nm)	PdI
20	16367 ± 6117	0.5 ± 0.3
30	13333 ± 4670	0.3 ± 0.1
40	7963 ± 4207	0.7 ± 0.3
50	2517 ± 2142	0.8 ± 0.2
60	705 ± 35	0.3 ± 0.2
70	521 ± 41	0.4 ± 0.1
80	320 ± 109	0.1 ± 0.0
90	486 ± 39	0.3 ± 0.0

Exemplo1: Prepararam-se soluções aquosas de lactoferrina com uma concentração de 0.02 % (m/v) e o glicomacropéptido com uma concentração de 0.02 % (m/v) e ajustou-se o pH de cada uma destas soluções para um pH 5 (adição de HCl 0.1M). Após mistura destas duas soluções numa razão de 1:1 (lactoferrina:GMP, v/v) esta foi sujeita a uma temperatura de 80 °C durante 20 minutos. Os nanogeis de forma esférica foram obtidos com um tamanho de 320 nm e uma polidispersividade de 0.12 (considerados monodispersos). Para as mesmas condições e

com uma temperatura de 60 °C observou-se um microgel com um tamanho de cerca de 705 nm e uma polidispersividade de 0.3. Estes resultados demonstram que é possível obter géis com diferentes tamanhos, variando a temperatura e tempo de gelificação.

Avaliou-se, diferentes valores de concentração de cada um dos biopolímeros e observou-se que aumentando a concentração de cada um dos biopolímeros, aumenta o tamanho da partícula, bem como a polidispersividade destes micro ou nanogéis na solução. Analisou-se ainda o efeito da razão mássica de cada biopolímero a utilizar na mistura, antes da aplicação de uma temperatura de gelificação. Verificou-se que quando se utiliza o dobro da massa de glicomacropéptido face à lactoferrina, na mistura, o nanogel formado apresenta um tamanho mínimo (cerca de 170 nm) e uma polidispersividade reduzida (0.032).

Exemplo 2: A interação da lactoferrina e do glicomacropéptido com uma concentração de 0.02% (m/v) a pH 5, aquecida a 80 °C durante 20 minutos com uma razão mássica de cada um dos biopolímeros de 1:1 (lactoferrina: glicomacropéptido), permitiu obter géis com um tamanho de 320 nm e polidispersividade de 0.12. Quando utilizadas estas mesmas condições com uma concentração de 0.2 % (m/v), foram obtidos géis com um tamanho de 5.4 µm e com polidispersividade de 0.13. Tais resultados permitem verificar que são obtidas partículas homogéneas e o efeito concentração permite manipular o seu tamanho, permitindo alterar este parâmetro dependendo da aplicação pretendida dos géis.

Analisando ainda o efeito da razão mássica de cada biopolímero a utilizar na mistura, antes da aplicação de uma temperatura de gelificação, verifica-se que quando se utiliza o dobro da

massa de glicomacropéptido face à lactoferrina, o nanogel formado adquire o tamanho mínimo (cerca de 170 nm) e uma polidispersividade reduzida (0.032). Tal acontece porque quando estamos perante uma solução cuja estequiometria das proteínas é de 1:2 (glicomacropéptido:lactoferrina) as propriedades hidrofílicas e a parte glicosídica do péptido é evidenciado, apresentando um efeito superior na carga electrostática (adquire valor máximo de -30 mV). Observa-se uma maior atração electrostática destes dois biopolímeros e um aumento de interações hidrofóbicas após a gelificação térmica, refletindo-se numa partícula menor e mais estável.

A morfologia destes géis foi analisada recorrendo a microscopia eletrónica de transmissão, de forma a corroborar todas as restantes técnicas utilizadas (Figura 4). Como é possível verificar, foram testadas as mesmas condições aplicadas na formação do gel desenvolvido, às soluções de cada um dos biopolímeros e somente quando ocorre a mistura da lactoferrina com o glicomacropéptido é que se obtém partículas esféricas e homogéneas.

Remetendo novamente para a Figura 4 verifica-se que quer a lactoferrina, quer o glicomacropéptido quando sujeitas a condições para formação de partículas não apresentam qualquer estrutura esférica, mas sim, uma estrutura ramificada, sendo que apenas com a mistura destes dois biopolímeros em condições específicas obtém-se a formação de micro ou nanogéis esféricos e estáveis.

Foi ainda avaliado a capacidade de retenção de dois compostos modelo de diferente natureza, nomeadamente composto bioativo 1\_ curcumina (natureza hidrofóbica) e composto bioativo 2\_ cafeína (natureza hidrofílica). Após a interação

electroestática entre dois biopolímeros que permitiram a formação do micro-nanogel foram adicionadas diferentes concentrações de cada um dos compostos, individualmente. Sendo posteriormente aplicada uma temperatura e um tempo de aquecimento para a formação do micro-nanogel com a retenção do composto bioativo em questão. Desta forma, durante o aquecimento no qual ocorrem as interações hidrofóbicas entre os biopolímeros, estas também são estabelecidas com o composto bioativo, permitindo a sua retenção e estabilidade. Foi testada a curcumina, como composto bioativo hidrofóbico. Este composto apresenta uma elevada instabilidade quando utilizado em solução aquosa, daí a importância de encontrar sistemas que o permitam reter e libertar em determinadas condições. Verificou-se que o micro ou nanogel consegue encapsular cerca de 90 % de curcumina para uma concentração de 0.08 mg/mL (Figura 5). Foi analisado o efeito do pH na libertação deste composto através do micro-nanogel.

Na Figura 5, demonstra-se a quantidade máxima de composto bioativo capaz de ser encapsulado nos diferentes géis formados. Na Figura 5 A) apresenta a percentagem de encapsulação da curcumina (composto lipofílico) nos micro ou nanogéis e na Figura 5 B) apresenta-se a percentagem de encapsulação da cafeína (composto hidrofílico) nos micro ou nanogéis.

Exemplo: O composto bioativo 1\_ curcumina após ser encapsulado no nanogel foi submetido a condições de pH ácido (pH 2), nomeadamente numa solução tamponada de Tris HCl e apresentou uma libertação controlada através do micro-nanogel e quando submetido a pH básico (pH 7.4), solução tamponada de fosfato, não houve libertação do composto do micro-nanogel (Figura 6). Tal comportamento indica que o conjunto nanogel-composto

bioativo têm um diferente comportamento que varia dependendo da força iônica da solução e da qual resulta um inchamento do gel em condições ácidas e conseqüentemente uma libertação do composto bioativo. Como composto hidrofílico, utilizou-se a cafeína e verificou-se que o gel consegue reter cerca de 90% para uma concentração de cafeína de 0.002 mg/ml. Quando testado o efeito do pH, verificou-se que independentemente do pH testado, a cafeína teve uma libertação controlada através do gel (Figura 6).

Mais especificamente, na Figura 6, apresenta-se o perfil de libertação dos compostos bioativos encapsulados em diferentes valores de pH (2 e 7) a uma temperatura de 37°C. Na Figura 6 A) apresenta o perfil de libertação da curcumina através dos micro-nanogeis (composto lipofílicos) e na Figura 5 B) apresenta o perfil de libertação da cafeína (composto hidrofílico) através dos micro-nanogeis.

Braga, 09 de dezembro de 2014

## REIVINDICAÇÕES

1. Gel proteico para alimentos ou fármacos caracterizado por ser constituído por partículas esféricas que compreendem lactoferrina e glicomacropéptido.

2. Gel, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a concentração do glicomacropéptido presente estar compreendida entre 0.01 e 0.2% (m/v).

3. Gel, de acordo com as reivindicações 1 a 2, caracterizado por a concentração da lactoferrina estar compreendida entre 0.01 a 0.2% (m/v).

4. Gel proteico, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por compreender uma dimensão entre 170 nm-5  $\mu$ m.

5. Gel proteico, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a polidispersividade estar compreendida entre 0.1 e 0.5.

6. Gel proteico, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por compreender adicionalmente compostos bioativos.

7. Gel, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por os compostos bioativos serem hidrofílicos ou hidrofóbicos.

8. Gel, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por os compostos bioativos serem cafeína ou curcumina, entre outros.

9. Método de elaboração do micro-nanogel descrito nas reivindicações 1 a 9 caracterizado por compreender os seguintes passos:

a) misturar uma solução de lactoferrina com uma solução de glicomacropéptido numa razão de 2:1 a um pH entre 2 a 10 ;

b) agitar constantemente, por um período de 15 min

c) aquecer a solução a uma temperatura entre 20 a 90°C, por um período de tempo estar compreendido entre 10 a 60 minutos.

10. Método, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a temperatura e período de tempo variar consoante se pretenda obter um micro ou nanogel.

11. Método, de acordo com as reivindicações 9 a 10, caracterizado por o pH variar, preferencialmente, entre 4 a 5.

12. Método, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a temperatura de aquecimento ser, preferencialmente 80°C.

13. Método, de acordo com as reivindicações 9 a 12, compreender adicionalmente o passo de adição do composto bioativo.

FIGURAS

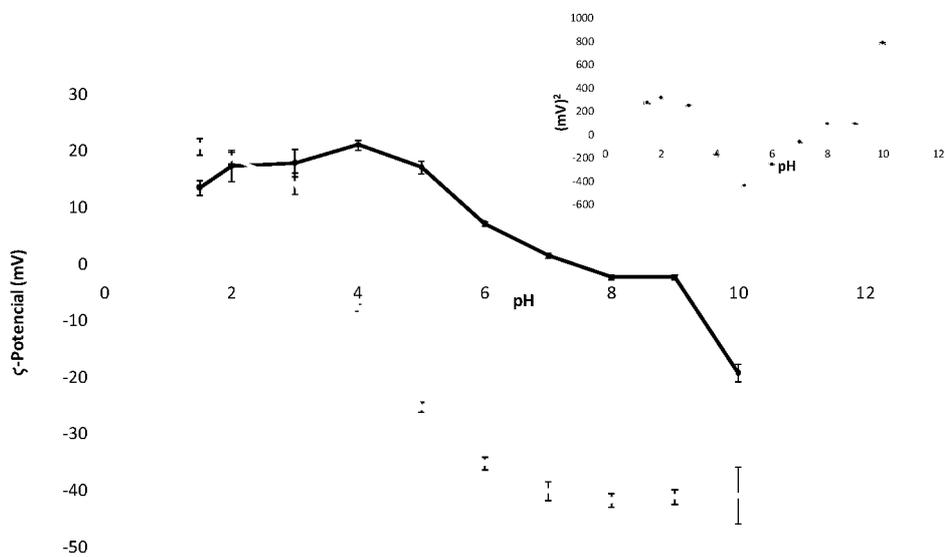


Figura 1

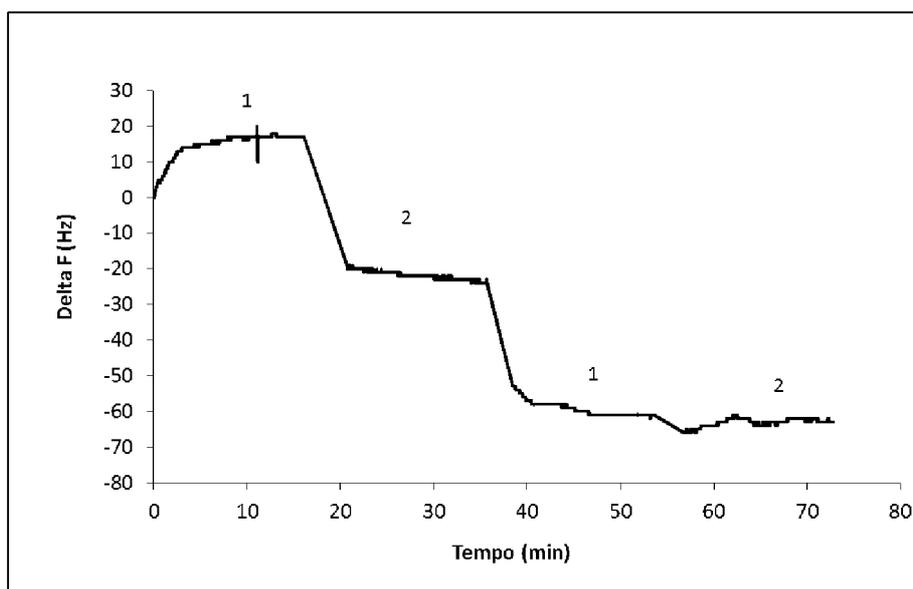


Figura 2

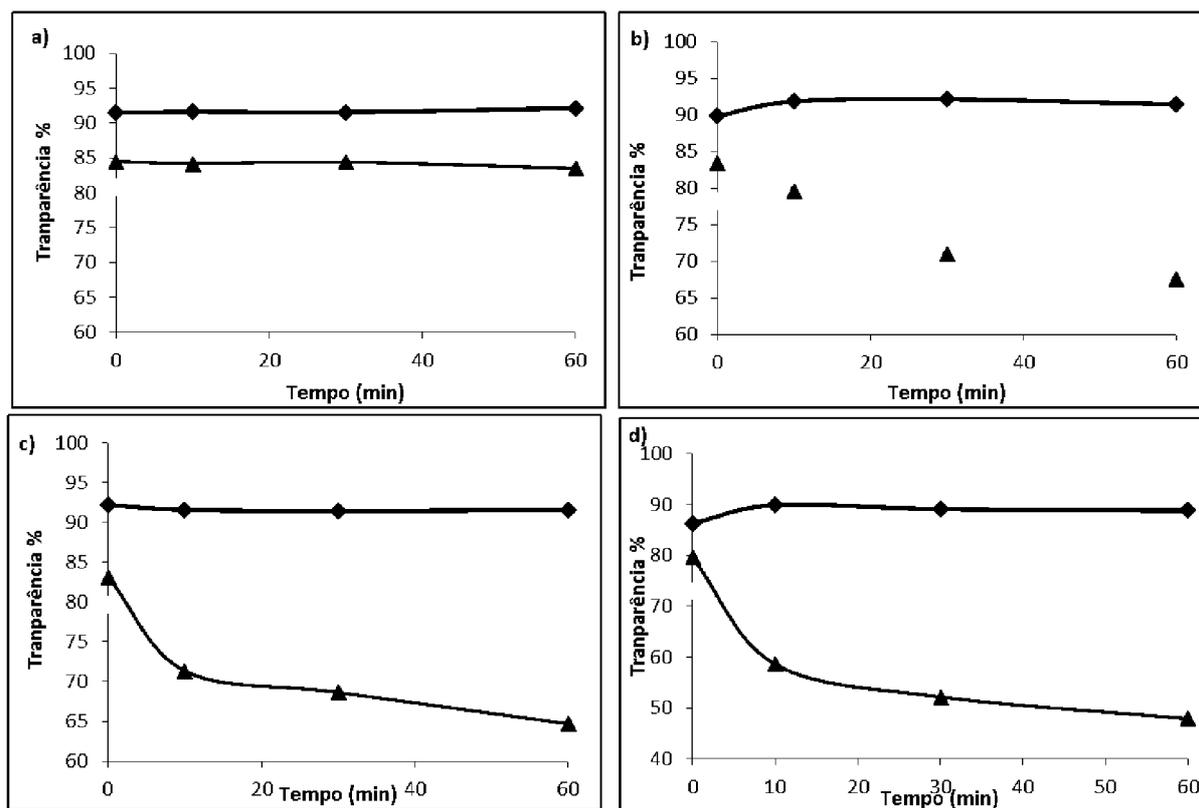


Figura 3

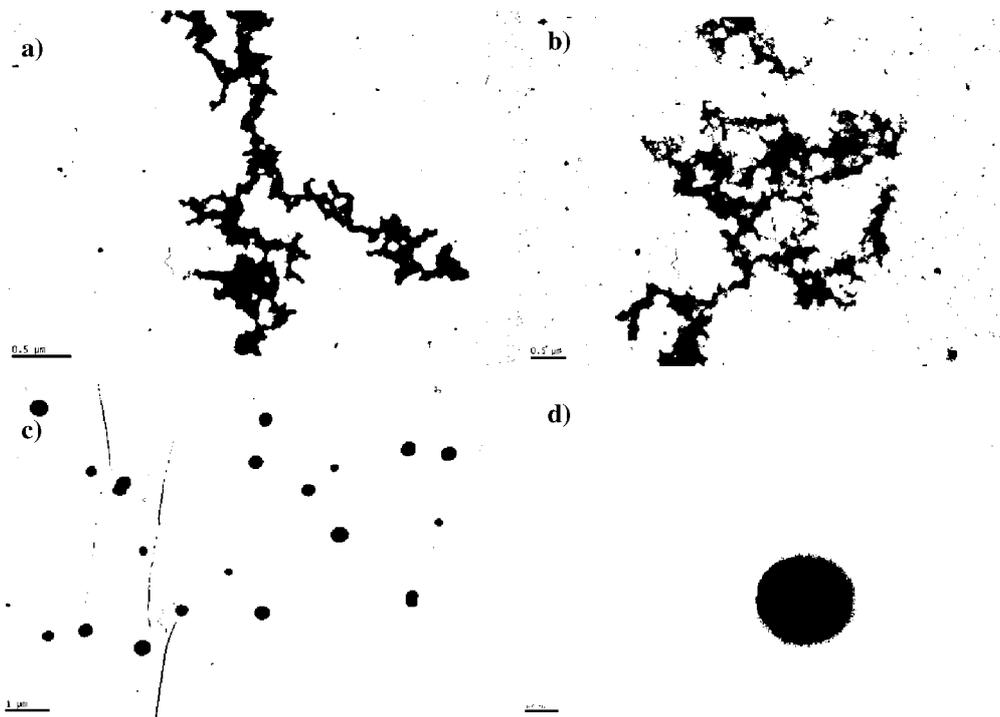


Figura 4

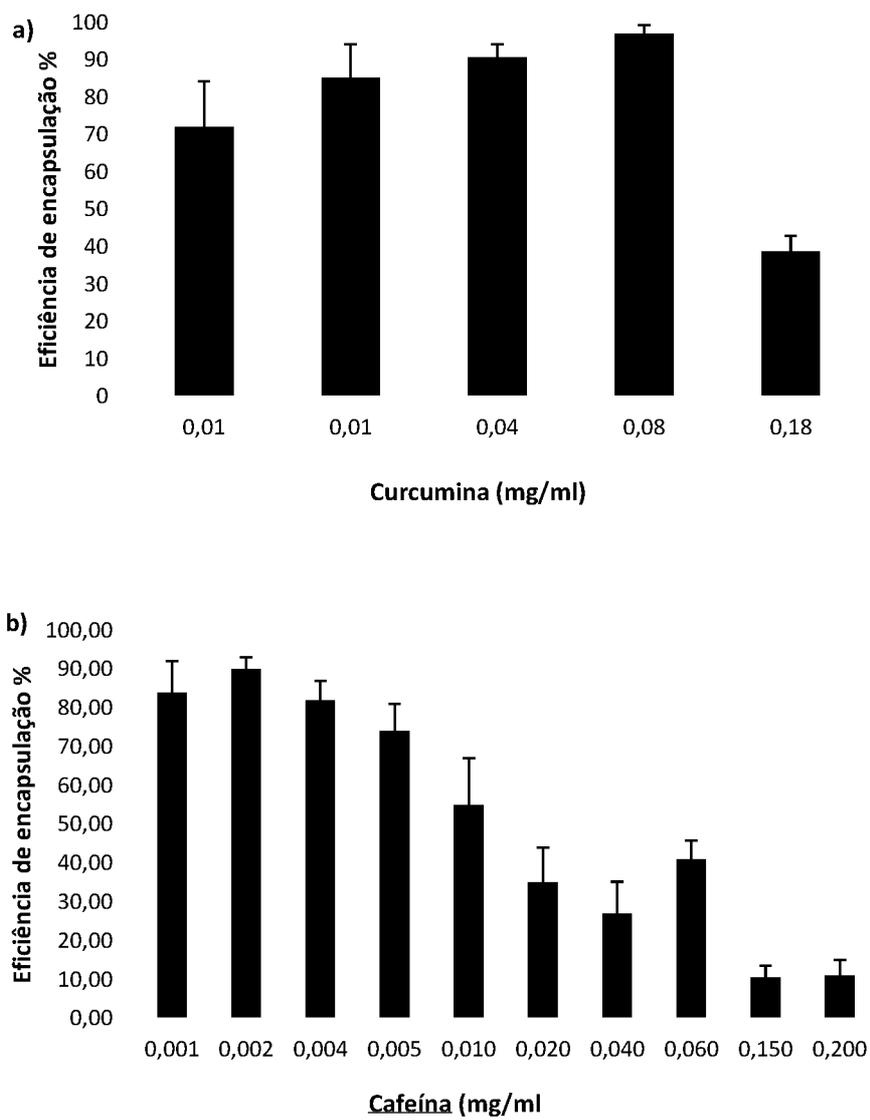


Figura 5

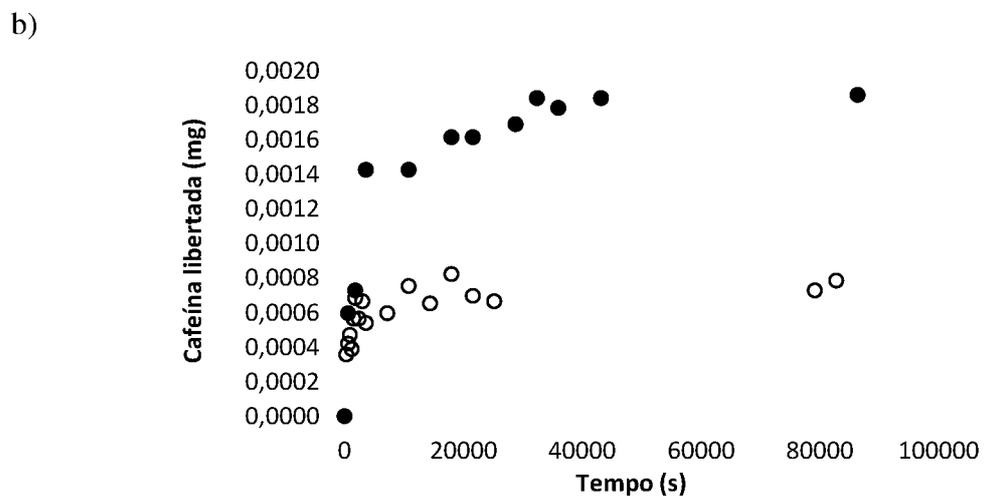
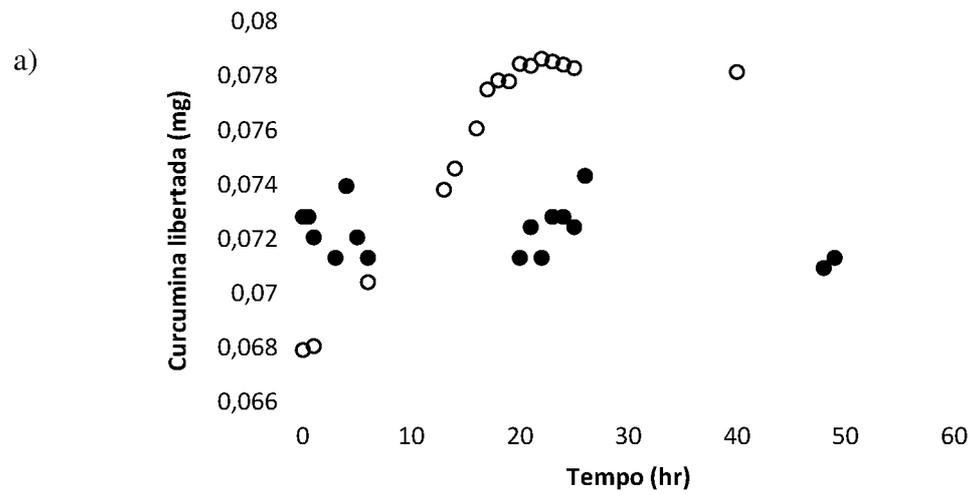


Figura 6