



AValiação DA ESTABILIDADE DE MICROPARTÍCULAS COM MULTICAMADAS DE ALGINATO E PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE FRENTE À TEMPERATURA, PH E FORÇA IÔNICA

Gislaine F. Nogueira^{1*} (D), Viviane S. Souza¹ (M), Luiz Gabriel P. Martin¹ (D), Farayde M. Fakhouri², Rafael A. de Oliveira¹ e Carlos R. F. Grosso³

1 – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Faculdade de Engenharia Agrícola –FEAGRI, Campinas– SP, gislaine.nogueira@feagri.unicamp.br

2 - Universidade Federal da Grande Dourados– UFGD, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Dourados– MS

3-Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos–FEA, Campinas– SP

Resumo: A formação de multicamadas sobre a superfície de partículas pode ser utilizada para melhorar sua estabilidade e controlar a liberação do material encapsulado. Para o desenvolvimento de partículas com multicamadas como sistema de entrega de compostos ativos a compreensão dos principais fatores que influenciam a estabilidade das camadas é importante. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade de micropartículas com multicamadas de alginato e proteínas do soro do leite frente à temperatura de esterilização, pH e força iônica. Alterações na morfologia, tamanho e solubilidade proteica foram avaliadas. A temperatura de esterilização influenciou na estabilidade das partículas com multicamadas úmidas e liofilizadas. As partículas foram estáveis em pHs 4, 6 e 8, mas foram sensíveis ao pH2 levando um aumento da solubilidade proteica. O aumento na concentração de sal em solução aquosa levou ao aumento da solubilidade proteica, mas não alterou o tamanho médio da partícula.

Palavras-chave: esterilização, pH, força iônica

Assessment of the stability of microparticles with multilayer of alginate and whey protein in facing the temperature, pH and ionic strength.

Abstract: The multilayer formation on the particle surface can be used to improve their stability and control the release of encapsulated material. For the development of multilayer particles to serve as a delivery system for active compounds understanding of the main factors that influence the stability of the layers are important. Therefore, the objective of this study was to evaluate the stability of microparticles with multilayer of alginate and whey proteins across the sterilization temperature, pH and ionic strength. Changes in morphology, size, and protein solubility were evaluated. The sterilization temperature influence on the stability of particles with multilayered lyophilized and humid. The particles were stable at pH 4, 6 and 8, but were sensitive to pH 2 causing an increase in protein solubility. Increasing the salt concentration in aqueous solution has led to increased protein solubility but did not alter the average particle size.

Keywords: *sterilization, pH, ionic strength*

Introdução

A abordagem, “*layer by layer*” tem se mostrado uma técnica útil para a produção de partículas com multicamadas [1]. Esta técnica baseia-se na deposição eletrostática de polímeros com carga opostas, de forma alternada, sobre superfícies carregadas eletricamente, como as micropartículas [2, 3]. Desde que, cada etapa de adsorção de polímero, leve a inversão de cargas na superfície, a deposição subsequente com polímero de carga oposta ao primeiro depositado, resulta na formação de multicamadas, estabilizadas por fortes forças eletrostáticas [4]. Recentemente, a formação de complexos eletrostáticos entre géis de alginato e proteínas do soro de leite tem sido proposta para concepção de sistemas com estabilidade e resistência desejáveis ao meio gástrico para aplicações entéricas [5]. A eficácia das multicamadas depende fortemente da sua capacidade em liberar os materiais encapsulados de forma controlada e no local desejado. Assim, a permeabilidade

das camadas desempenha um papel fundamental neste processo, uma vez que as multicamadas poliméricas atuam como uma barreira de membrana obstrutiva para os materiais encapsulados [6]. A permeabilidade e a desintegração das camadas podem ocorrer em resultado a estímulos externos tais como, mudança de pH, da força iônica e temperatura [1,3,6,7]. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade das multicamadas de alginato e proteínas do soro do leite formadas sobre a superfície de micropartículas frente à temperatura de esterilização (121 °C), variações de pH (2,4,6 e 8) e força iônica (0,50, 150, 200 e 250 mM de NaCl).

Experimental

Material

Foram utilizados: alginato de sódio (alta viscosidade, 70/30 G/M, Manugel DMB, lote G470021, FMC Biopolymer, Campinas, Brazil), concentrado proteico do soro do leite- WPC (lote 80 4U17601, Lacprodan - Arla Foods Ingredients, Porteña, Province of Córdoba, Argentina) contendo 80,5% ± 0,30 de proteína [8], óleo de girassol comercial (Mazola, Mairinque – SP, Brasil), cloreto de cálcio P.A (lote 36308, Dinâmica, Diadema – SP, Brasil) e água destilada e deionizada. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Métodos

Produção da Micropartícula com multicamadas

Primeiramente partículas de alginato (2% p/p) contendo óleo de girassol (2% p/p) como material do núcleo, foram produzidas utilizando cloreto de cálcio como solução iônica (2% p/v, pH 3,75) pelo método de gelificação iônica externa de acordo com Souza [5]. Em seguida, para formação da primeira camada proteica na superfície das partículas, 100g dessas partículas de gelificação iônica foram transferidas para a solução WPC à concentração de 4% de proteínas em solução (pH 3,75), onde foram mantidas por 30 min em agitação constante. Após este tempo, as partículas foram separadas em peneira (53 µm) e lavadas com água deionizada (pH 3,75) para a remoção das proteínas que não foram adsorvidas sobre as partículas. Subsequentemente a segunda camada em polissacarídeo foi produzida imergindo 50g dessas partículas em solução de alginato à concentração de 0,125 % de polissacarídeo em solução em seu pH natural (pH ~6,5), por 1 hora, em agitação constante. Em seguida, as partículas foram lavadas com água deionizada (pH~4,5) e 50 g dessas partículas foram imersas em solução de WPC (2,5% p/p, pH 3,75) onde foram mantidas por 1 hora sob agitação constante, para a formação da terceira camada em proteínas. Após separação e lavagem, uma parte das partículas úmidas foi congelada e liofilizada (Mod. 501, Edwards Pirani, Crawley, West Sussex, UK) a - 40 °C e 0,1 mmHg, com um tempo total do ciclo de 48h; as partículas secas foram embaladas em frascos com tampas e refrigeradas. O conteúdo de proteínas adsorvidas nas camadas formadas sobre as partículas úmidas foi determinado por Kjeldahl utilizando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,38 [8]. Essa análise foi realizada a partir de três lotes independentes de partículas úmidas, em triplicata.

Avaliação da estabilidade das partículas com multicamadas

Estabilidade da partícula em temperatura

O efeito da temperatura na aparência visual, na morfologia e no tamanho das partículas foi avaliado, utilizando duas abordagens: (i) avaliação das partículas úmidas, onde 1 g de partículas multicamadas foi suspenso em 10 mL de água deionizada em pH 3,75, estas foram submetidas a 121 °C por 15 minutos em uma autoclave e, em seguida foi determinado seu tamanho e sua morfologia. Para comparação como controle, foram utilizadas a morfologia e o tamanho médio de partículas úmidas na mesma condição sem submeter à temperatura. O tamanho médio (d 0,5) foi determinado em triplicata para cada amostra, utilizando-se um medidor de tamanho Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, UK). A morfologia das partículas foi observada em microscópio ótico JENVAL, utilizando-se objetivas de 12,5 e 25 X, e optovar de 0,8 a 1,25 x. A captação das

imagens foi realizada, utilizando o software EDN-2 – Microscopy Image Processing System. (ii) avaliação das partículas secas por liofilização, aproximadamente 1 g de pó foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e em seguida sua microestrutura foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JMS model – T300 Jeol, Tokyo, Japan). Para comparação foi utilizada a morfologia das partículas liofilizadas sem submeter à temperatura. As amostras foram fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face de cobre e recobertas com uma fina camada de ouro (180 s e corrente de 40 mA) por meio de um evaporador Baltzer (Baltec SCD50, Liechtensten). Aceleração de voltagem de 20 KV foi utilizada.

Estabilidade frente ao pH

Partículas úmidas (1g) foram suspensas em 10 mL de água deionizada com pH ajustado para 2, 4, 6 e 8, onde permaneceram em agitação constante em homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas antes da determinação do tamanho. As leituras de tamanho e a observação da morfologia foram realizadas em seus respectivos pHs conforme citado acima. Adicionalmente amostras foram retiradas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, quantificando-se o teor de proteína do sobrenadante, que se despreendeu das partículas pelo método de Kjeldahl [8]. A solubilidade proteica foi calculada pela quantidade determinada no sobrenadante, em relação ao valor de proteína inicial presente na massa da partícula, em base seca e expressa em porcentagem. Para esta avaliação foram produzidos três lotes independentes de partícula com determinações feitas em triplicata para cada lote em cada condição avaliada.

Estabilidade frente à força iônica

Foi adicionado 1 g de partículas úmidas em 10 mL de solução de NaCl com pH ajustado para 3,75, em diferentes concentrações, a saber: 0 mM (0%); 50 mM (0,3%), 100 mM (0,6%), 150 mM (0,9%) e 200 mM (1,2%). As partículas foram mantidas na solução de NaCl sob agitação constante em homogeneizador rotativo (Modelo AP 22, Phoenix, Araraquara, Brasil) por 12 horas. As leituras de tamanho foram realizadas em seguida, e em pH 3,75. Amostras foram retiradas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, quantificando-se o teor de proteína do sobrenadante. A solubilidade proteica foi determinada conforme o procedimento citado acima, em triplicata para cada concentração de NaCl avaliada.

Análise estatística

O cálculo da análise de variância ANOVA foi realizado pelo programa estatístico SAS 9 e o teste Tukey foi realizado para determinar diferenças entre médias no intervalo de 95% de confiança.

Resultados e Discussão

Para a produção da partícula com multicamadas foi preciso alternar a formação das camadas entre polissacarídeo, carregado negativamente e proteína carregada positivamente para que existissem cargas opostas disponíveis em cada etapa da formação das camadas favorecendo a interação eletrostática. A partícula com multicamadas obtida apresentou um alto conteúdo de proteínas total, $64,9\% \pm 0,8$, sendo que $33,2\% \pm 2,7$ dessa proteína corresponderam à primeira camada e $31,7\% \pm 0,8$ à terceira camada formada sobre a partícula de gelificação iônica.

Como pode ser observado na Fig. 1 C e D, as partículas multicamadas úmidas esterilizadas apresentaram uma aparência visual ligeiramente amarelada em comparação com as partículas não esterilizadas (Fig. 1 A e B). Além disso, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de tamanho médio das partículas úmidas de $171,9 \pm 7,9 \mu\text{m}$ para $136,4 \pm 14,9 \mu\text{m}$ após serem submetidas à esterilização foi observada. A mesma tendência à mudança de cor observada para as partículas úmidas após a esterilização foi verificada para as partículas liofilizadas. Com o aquecimento (121 °C), a coloração clara do pó das partículas liofilizadas alterou-se para marrom (Fig. 1 G versus E). Acredita-se que este comportamento de mudança de cor possa estar relacionado com a reação de Maillard (escurecimento não enzimático), que se refere a um conjunto complexo de reações, iniciado por

reação entre aminas e açúcares redutores, os quais juntos em alta temperatura decompõem-se e, finalmente, condensam-se em um produto marrom insolúvel conhecido como melanoidinas [9].

Acredita-se também que a temperatura de 121 °C utilizada na esterilização das partículas possa ter causado uma reestruturação da cadeia dos biopolímeros na partícula, o que pode ter refletido na alteração da morfologia das partículas liofilizadas (Fig. 1 H versus F). Supõe-se que a proteína da partícula tenha sido desnaturada durante o processo de esterilização. Quando uma proteína globular, como a β -lactoglobulina é aquecida acima de cerca de 60 °C, sua estrutura é modificada e, a mesma se torna desnaturada, suas interações químicas e físicas mudam sensivelmente de tal forma que os grupos apolares e os grupos contendo enxofre que estavam originalmente no interior compacto da proteína globular se tornam expostos [9, 10].

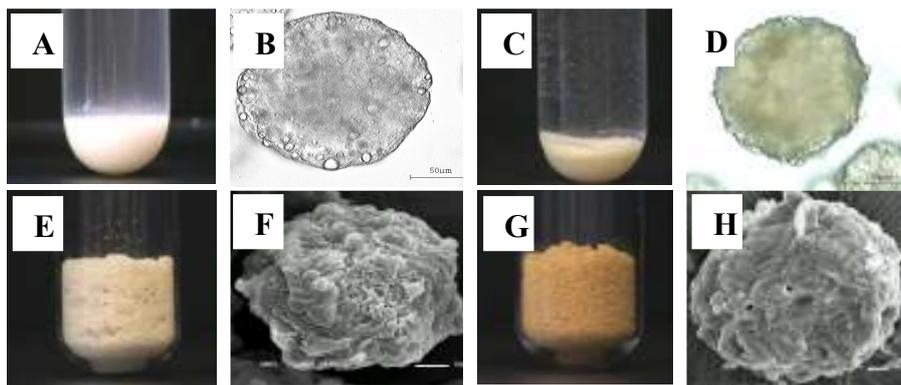


Figura 1 Aparência e morfologia das partículas com multicamadas úmidas e liofilizadas sem esterilizar e esterilizadas: A) aparência das partículas úmidas não esterilizadas; B) morfologia das partículas úmidas não esterilizadas (Barra 50 μ m); C) aparência das partículas úmidas esterilizadas; D) morfologia das partículas úmidas esterilizadas (Barra 50 μ m); E) aparência das partículas liofilizadas; F) MEV das partículas liofilizadas (Barra 10 μ m); G) aparência das partículas liofilizadas e esterilizadas; H) MEV das partículas liofilizadas e esterilizadas (Barra 10 μ m).

Quanto ao pH, a partícula apresentou-se bastante estável em pHs acima de 4, sem alterações nos diâmetros e com baixa proteína solúvel em solução (inferior a 3%). No entanto, elas foram muito suscetíveis à degradação em pH extremamente ácido, como é o caso do pH gástrico. Neste pH, o seu tamanho médio original diminuiu significativamente ($p < 0,05$) de $164,7 \pm 8,9 \mu$ m (tamanho em pH 3,75 de produção) para $121,4 \pm 12,5 \mu$ m, o que corresponde a uma diminuição de 26% (Fig. 2). Além disso, ocorreu uma perda de 22,05% da quantidade de proteína inicial na partícula, o que pode ter colaborado para a diminuição do seu tamanho. Souza et al. [5] reportaram em estudo anterior, uma pequena diminuição no tamanho médio de partículas de pectina revestidas com WPC, após 1 hora de imersão em pH fortemente ácido (1,2), em relação ao pH 4.

A Fig 3. apresenta a variação de diâmetro e solubilidade proteica para as partículas, após 12 horas de imersão em soluções de NaCl com concentrações variando de 0 a 200 mM. Apesar de não ter sido observada variação significativa ($p > 0,05$) nos tamanhos médios das partículas, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da solubilidade da camada proteica com o aumento da força iônica. Na ausência de NaCl, a perda de proteína da partícula para a solução é muito baixa ($2,5 \pm 0,1\%$). O aumento na solubilidade proteica observado foi proporcional à quantidade de NaCl em solução, verificando-se uma perda inicial de 7,4% em 50 mM, atingindo-se 19,5% de solubilidade em 200mM. A adição de sal ao meio circundante pode influenciar a permeabilidade de macromoléculas da partícula, devido à quebra de ligações entre os polieletrólitos de cargas opostas [6]. As imagens de microscopia ótica destas partículas indicou que elas se mantiveram íntegras, mesmo na condição de maior força iônica, após 12 horas de imersão, este comportamento também foi observado nas imagens das partículas em variados pHs.

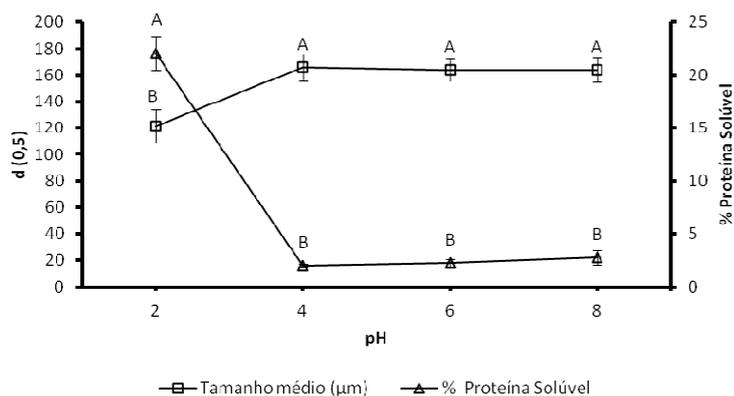


Figura 2. Tamanho médio (μm) e teor de proteína solúvel das partículas suspensas em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Médias seguidas de letras diferentes diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$).

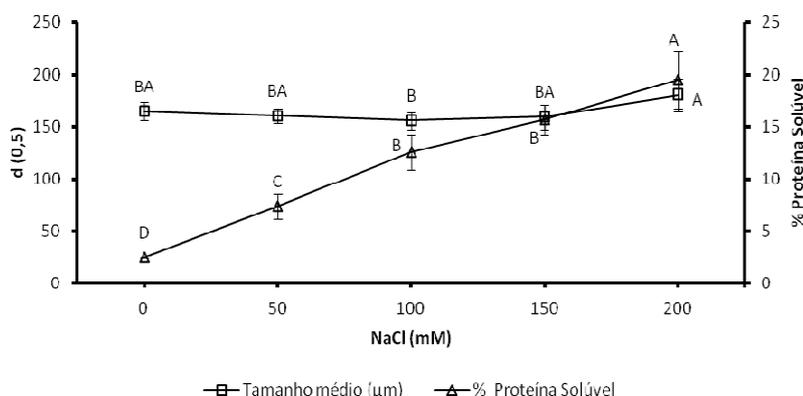


Figura 3. Tamanho médio (μm) e teor de proteína solúvel das partículas multicamadas suspensas em soluções aquosas de NaCl em diferentes concentrações. Médias seguidas de letras diferentes diferiram de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conclusões

Conclui-se que a temperatura de esterilização influenciou na estabilidade das partículas com multicamadas liofilizadas, tendo um efeito muito menor nas partículas úmidas com multicamadas. O pH e o NaCl influenciaram a solubilidade da camada proteica das micropartículas com multicamadas, aumentando a solubilidade com a redução do pH para condições extremamente drásticas (pH 2) e com o aumento na concentração de sal em solução aquosa.

Referências Bibliográficas

1. C. J. Ochs; G.K. Such; Y. Yan; M. P. Koevenden; F. Caruso. *ACSNano*, 2010, 4,1663.
2. G. Decher. *Science*, 1997, 277, 1237.
3. S. Ye; C. Wang; X. Liu; Z. Tong; B. Ren; F. Zeng. *J. of Controlled Release*, 2006, 112, 87.
4. M. Schönhoff. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2003, 8, 95.
5. F. N. Souza; C. G. M. S. Cordeiro; M. C. E. Ribeiro; K. S. Chaves; M. L. Gigante; C. R. F. Grosso. *Food Research International*, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.041
6. Z. She; M. N. Antipina; J. Li; G. B. Sukhorukov. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 1247.
7. B. Mu; C. Lu; P. Liu. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011,82, 390.
8. AOAC. *Association of official analytical chemist's official methods of analysis*. 16th Ed. Washington, 2006.
9. S. Damodaran; K. L. Parklin; O. R. Fennema. *Química de alimentos de Fennema*, 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010. p. 900.
10. O.G. Jones; D. J. McClements. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2010.