

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**BYANCA PEREIRA MOREIRA DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DO CONCENTRADO  
PROTEICO DO SORO DE LEITE (WPC)**

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

**BYANCA PEREIRA MOREIRA DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DO CONCENTRADO  
PROTEICO DO SORO DE LEITE (WPC)**

**Production and characterization of nanoparticles of whey protein concentrate  
(WPC)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Dr. Odinei Hess Gonçalves

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**BYANCA PEREIRA MOREIRA DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DO CONCENTRADO  
PROTEICO DO SORO DE LEITE (WPC)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Engenharia química da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR).

Data de aprovação: 29/novembro/2022

---

Odinei Hess Gonçalves  
Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Ângela Maria Gozzo  
Doutorado em Engenharia de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

---

Fernanda Vitória Leimann  
Doutorado em Engenharia Química  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, pois sem Ele eu nada seria, e aos meus pais, Solange e Isaias, que sempre acreditaram em meus sonhos e nunca mediram esforços para torná-los realidade.

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus por estar comigo em todos os momentos, e me fortalecer nesses anos de estudo longe de casa, sem Ele eu não estaria aqui.

Minha gratidão eterna aos meus pais, os alicerces da minha vida, por todo o esforço e incentivo para o término da minha graduação, e aos meus avós, Maria e Manoel, por sempre me ajudarem com tudo que estava no alcance, e principalmente por intercederem muito por mim.

Ao professor Dr. Odinei Hess Gonçalves, por ter sido meu orientador por anos e compreender minhas dificuldades me incentivando sempre a melhorar, e a professora Dr. Fernanda Vitória Leimann, que abriu as portas da pesquisa para mim logo no primeiro período da minha graduação.

Agradeço também ao meu parceiro da vida, Fabiano, por toda paciência e incentivo fornecido em todos os aspectos da minha vida, principalmente nessa reta final.

Gratidão por minhas amigas da graduação, sem toda a parceria, apoio, momentos de conversa e ajuda mútua tudo seria mais difícil.

Ao laboratório Multiusuário (Central Analítica Multiusuário da UTFPR - Campo Mourão - CAMulti - CM), e aos professores responsáveis pelos laboratórios multiusuários das UTFPR campus Medianeira e Curitiba, por todo tempo e disposição dedicado às caracterizações das nanopartículas.

Aos professores da banca, pela disponibilidade em participar da mesma e pelas contribuições a este trabalho.

A todos os meus professores da graduação, pelos ensinamentos ao longo dos anos.

Enfim, a todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

## RESUMO

Nanotecnologia relaciona-se com uma tecnologia implementada em nanoescala com aplicações no mundo real, basicamente, é a compreensão e controle da matéria em dimensões físicas abaixo de 1000nm, ela representa atualmente uma importante área de interesse e desenvolvimento da ciência moderna. O uso da nanotecnologia tornou-se base para aplicações industriais, além disso, atualmente demonstra um crescimento exponencial dentro de indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, entre outros inúmeros ramos. A aplicação desses nanomateriais demonstram melhora nas linhas de produção, embalagem, prazo de validade e biodisponibilidade. O presente estudo trata-se da produção de nanopartículas do concentrado proteico do soro de leite por meio da técnica de reticulação com dois ácidos orgânicos, cítrico e tânico. As nanopartículas sintetizadas e as soluções de WPC sem ácido foram caracterizadas por meio de avaliações térmicas, espectroscópicas e microscópicas. Diante disso, verificou-se que a adição dos ácidos orgânicos como agentes reticuladores promoveu uma melhora na estabilidade das nanopartículas, onde foi possível concluir que nanopartículas obtidas com whey protein reticulado com ácido tânico apresentaram um melhor desempenho, pois foi observado nas análises de DLS e AFM um menor tamanho de nanopartícula para a amostra Tan-2, além disso os espectros de FTIR da amostra foram os que mais diferiram dos espectros das amostras sem ácido, confirmando a incorporação do ácido das nanopartículas. Sendo assim, as nanopartículas sintetizadas poderão ser usadas como matrizes para encapsulação de compostos bioativos por meio da técnica de emulsões de Pickering, onde as nanopartículas de WPC poderão agir como substitutas dos tensoativos e estabilizantes convencionais.

Palavras-chave: emulsões; nanopartículas; Pickering; proteínas do leite.

## ABSTRACT

Nanotechnology relates to a technology implemented at the nanoscale with applications in the real world, basically, it is the understanding and control of matter in physical dimensions below 1000nm, it currently represents an important area of interest and development of modern science. The use of nanotechnology has become the basis for industrial applications, in addition, it currently demonstrates exponential growth within the pharmaceutical, food, cosmetics industries, among many other branches. The application of these nanomaterials demonstrate improvement in production lines, packaging, shelf life and bioavailability. The present study deals with the production of nanoparticles from whey protein concentrate through the crosslinking technique with two organic acids, citric and tannic. The synthesized nanoparticles and acid-free WPC solutions were characterized by means of thermal, spectroscopic, and microscopic evaluations. In view of this, it was verified that the addition of organic acids as crosslinking agents promoted an improvement in the stability of the nanoparticles, where it was possible to conclude that nanoparticles obtained with whey protein crosslinked with tannic acid presented a better performance, as it was observed in the DLS and AFM a smaller nanoparticle size for the Tan-2 sample, in addition the FTIR spectra of the sample were the ones that most differed from the spectra of the samples without acid, confirming the incorporation of the acid of the nanoparticles. Therefore, the synthesized nanoparticles can be used as matrices for encapsulation of bioactive compounds through the Pickering emulsion technique, where WPC nanoparticles can act as substitutes for conventional surfactants and stabilizers.

Keywords: emulsions; nanoparticles; Pickering; milk proteins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do ácido cítrico .....	17
Figura 2 - Estrutura química do ácido tânico .....	17
Figura 3 - Gotas de óleo estabilizadas por emulsificantes convencionais e partículas sólidas .....	19
Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção das NPs .....	21
Figura 5 - Curvas de DSC para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro .....	24
Figura 6 - Espectros de FTIR para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro .....	25
Figura 7 - Espectros comparativos de FTIR para as amostras de WPC-1, Tan-2 e Cit-1 .....	26
Figura 8 - Termogramas das nanopartículas de WPC e soluções de WPC sem ácido .....	30
Figura 9 – Termograma derivado das nanopartículas de WPC e soluções de WPC sem ácido .....	31
Figura 10 - Micrografias obtidas a partir de força atômica para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro .....	31
Figura 11 – Representação tridimensional das amostras obtidas das amostras obtidas a partir de microscopia de força atômica .....	32



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras de WPC para realização das caracterizações .....	21
Tabela 2 – Tamanho de partículas, índice de polidispersidade (PDI) e potencial Zeta das soluções de WPC e NPs reticuladas com ácidos cítrico e tânico .....	28
Tabela 3 – Tamanho das nanopartículas obtido por meio da microscopia de força atômica .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês, <i>atomic force microscopy</i> )
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (do inglês, <i>dynamic light scattering</i> )
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura (do inglês, <i>differential scan calorimetry</i> )
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, <i>fourier transform infrared spectroscopy</i> )
NPs	Nanopartículas
PDI	Índice de polidispersidade (do inglês, <i>polydispersity index</i> )
RIISPOA	Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>thermogravimetric analysis</i> )
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WPC	Concentrado proteico do soro de leite (do inglês, <i>whey protein concentrate</i> )
WPI	Isolado proteico do soro de leite (do inglês, <i>whey protein isolate</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>14</b>
3.1 Leite	14
3.2 Concentrado de proteína de soro de leite (WPC)	14
3.3 Nanopartículas	15
3.4 Reticulação química	15
3.4.1 Ácido tânico e cítrico como agentes reticuladores	17
3.5 Emulsões de Pickering e nanopartículas de WPC como estabilizante	18
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>20</b>
4.1 Materiais	20
4.2 Produção das nanopartículas	20
4.3 Caracterização das nanopartículas	21
4.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)	22
4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	22
4.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	22
4.3.4 Potencial Zeta	23
4.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Caracterização das nanopartículas</b>	<b>24</b>
5.1.1 Calorimetria Diferencial de Varredura	24
5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	25
5.1.3 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz	28
5.1.4 Análise Termogravimétrica	30
5.1.5 Microscopia de força atômica	31
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>35</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão formando uma emulsão natural, além de ser um produto de secreção das glândulas mamárias (SGARBIERI, 1996). De acordo com o artigo 475 do RIISPOA "entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda." O leite possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie, é fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas, o leite torna-se também um excelente meio para o crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis (SOUZA *et al.*, 1995).

As frações de soro podem ser classificadas em sete categorias básicas, dependendo das características determinadas pelo tipo e grau de processamento. Estes são: soro doce em pó, soro ácido em pó, soro redutor de lactose, soro desmineralizado, concentrado de proteína de soro de leite (CPS), isolado de proteína de soro de leite (IPS) e lactose. Cada um destes produtos de soro de leite é utilizado de acordo com as características funcionais específicas que apresentam (SILVA, 2021).

A proteína de soro do leite tem sido uma escolha benéfica para a construção de partículas coloidais de qualidade alimentar, o isolado da proteína do soro do leite contém mais de 90% de proteína (LV *et al.*, 2020), por essa razão são muito utilizadas como emulsificantes pois além de possuírem alto valor nutricional (MANTOVANI, 2016), as proteínas são formadas predominantemente por  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la) e albumina bovina sérica (BSA), porém, dessas a proteína que está mais presente no soro do leite é a  $\beta$ -lactoglobulina (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2005). No concentrado da proteína do soro do leite os principais componentes também são a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la), albumina bovina sérica (BSA) e a imunoglobina, sendo que  $\beta$ -lactoglobulina representa 50% da fração de soro (MOLLEA *et al.*, 2013). Ademais, como a proteína do soro do leite possui um alto valor nutricional e propriedades funcionais benéficas, inclusive

solubilidade, propriedades estruturais e gelificação (FRYDENBERG *et al.*, 2016), ela exerce um papel importante como ingrediente funcional em alimentos.

A reticulação é uma forma efetiva de otimizar as propriedades funcionais das proteínas, ela pode ocorrer por meio de métodos físicos, químicos ou enzimático. Uma variedade de reagentes químicos já fora utilizada para execução da técnica, como glutaraldeído, ácido 1,2,3,4 butano tetracarboxílico, formaldeído, entre outros (CARVALHO, R. A. de.; GROSSO, 2004; MONTAZER; PAKDEL; MOGHADAM, 2011) mas, embora sejam eficazes para modificação das proteínas, os reagentes glutaraldeído e formaldeído, por exemplo, são considerados tóxicos (GOUGH; SCOTCHFORD; SANDRA, 2010; ZIMMER; MCKINLEY, 2007).

Uma consequência da reticulação de proteínas é a possibilidade de formação de nanopartículas sólidas, e essas nanopartículas podem ser usadas como estabilizantes em emulsões substituindo os tensoativos convencionais. As emulsões estabilizadas dessa forma são conhecidas como emulsões de Pickering, que vem ganhando destaque porque apresentam toxicidade reduzida, menor custo e propriedades simples de recuperação em comparação aos surfactantes tradicionais (FRELICHOWSKA *et al.*, 2009). As emulsões de Pickering têm aplicação potencial em campos variados, como em alimentos, cosméticos, recuperações de óleos, entrega de medicamentos e outros (LI *et al.*, 2014), contudo é necessário o contínuo desenvolvimento de nanopartículas que possam atuar de forma efetiva nesses sistemas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do trabalho consistiu em produzir e caracterizar nanopartículas da proteína concentrada do soro de leite por meio da técnica de reticulação utilizando ácido cítrico e ácido tânico como agentes reticulantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

São objetivos específicos do trabalho:

- Produzir as nanopartículas utilizando ácido cítrico e ácido tânico como agentes promotores de reticulação;
- Caracterizar as propriedades térmicas das nanopartículas por meio da Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA);
- Caracterizar a formação de reticulação das nanopartículas por meio da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Caracterizar o tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas por meio do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
- Caracterizar a estabilidade coloidal das nanopartículas por meio do Potencial Zeta (Z);
- Caracterizar as nanopartículas microscopicamente por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM).

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Leite

O leite possui uma classificação de acordo com o modo que foi produzido, pode ser classificado como A, B ou C, além de possuir classificações de acordo com questões físico-químicas e biológicas. O leite tipo A passa por um controle rigoroso de higienização e produção do leite, portanto possui uma menor carga de microrganismos, principalmente por ser embalado e pasteurizado na própria fazenda, já o leite tipo B e tipo C possuem uma maior carga de microrganismos, por serem pasteurizados e embalados em indústria (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

O leite é composto por água, proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais, enzimas e vitaminas, na porção de água encontram-se dispersos os componentes sólidos, denominados sólidos totais (ST). Os sólidos totais são constituídos de proteínas, gordura, lipídios, lactose e sais. Os sólidos totais são divididos em lipídeos (gorduras) e sólidos não gordurosos (proteínas, lactoses e cinzas) (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

#### 3.2 Concentrado de proteína de soro de leite (WPC)

As proteínas concentradas do soro de leite, normalmente, possuem cerca de 80% de proteína e apresentam inúmeras propriedades fisiológicas e funcionais como atividade imunomoduladora (imunoglobulinas), atividade antimicrobiana e antiviral (lactoferrina, lactoperoxidase,  $\alpha$ -lactalbumina e as imunoglobulinas), atividade anticâncer, atividade antiúlcera, proteção ao sistema cardiovascular, entre outras (SGARBIERI, 2004). A estrutura química básica das proteínas é formada por aminoácidos, os quais possuem um grupamento carboxila e um grupo amino.

A proteína do soro do leite separada se apresenta em quatro formas principais: concentrado proteico do soro de leite (WPC - *Whey protein concentrate*), isolado proteico do soro de leite (WPI - *Whey protein isolate*), hidrolisado proteico do soro de leite (WPH - *Whey protein hydrolysate*) e proteínas do soro de leite nativas (NWP - *Native whey proteins*). Porém o concentrado e isolado proteico do soro de leite já são muito utilizados em processamento de alimentos, proporcionando diferentes propriedades funcionais. Sabe-se que WPI apresenta maior teor de proteína que o WPC, o WPC contém em torno de 29-89% de proteína (MORR; HA, 1993), mas o teor

de carboidratos e compostos bioativos no WPC é maior que em WPI, por exemplo o percentual de lactose (LI *et al.*, 2018).

O soro do leite, seja ele isolado ou concentrado proteico, está sendo um aditivo amplamente utilizado na fabricação de alimentos industrializados (YOSHIDA; ANTUNES, 2009), principalmente, por conta de suas propriedades de gelificação, capacidade de emulsificação e formação de espuma (FOEGEDING *et al.*, 2002), além disso, o concentrado proteico é conhecido por conta de sua variável funcionalidade e aroma (BANAVARA; ANUPAMA; RANKIN, 2003).

Existem estudos que comprovam que a utilização do concentrado proteico do soro de leite oferece propriedades de superfícies ativas necessárias para estabilizar emulsões (HOGAN *et al.*, 2001).

### **3.3 Nanopartículas**

Nanopartículas são conhecidas como dispersões de partículas ou partículas sólidas com um tamanho na faixa de 10-1000 nm. Existem muitas formas de obter as nanopartículas, e dependendo da metodologia a ser utilizada pode-se obter nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Nanoesferas são grupamentos de matriz nas quais o composto está espalhado física e uniformemente (RAVI; BAKOWSKY; LEHR, 2004), entretanto, nas nanocápsulas o composto está aprisionado a uma cova coberta por uma membrana polimérica única (COUVREUR *et al.*, 2002). Para a formação das nanopartículas, o composto deve ser solubilizado, confinado, encapsulado ou ligado a uma matriz de nanopartículas (KREUTER, 1994).

As nanopartículas podem ser sintetizadas por meio de uma infinidade de materiais, e a seleção dos materiais depende do objetivo de utilização das partículas, como o tamanho das nanopartículas necessárias, solubilidade, estabilidade, características da superfície, biocompatibilidade, toxicidade, entre outras (KREUTER, 1994).

### **3.4 Reticulação química**

Existem técnicas de reticulação fundamentadas em fenômenos físicos, químicos e enzimáticos. A reticulação química é indicada para a modificação de propriedades físicas e mecânicas de materiais como a rigidez estrutural, estabilidade



química e térmica, e permeabilidade (GONSALVES *et al.*, 2011). Apesar de serem utilizados, em maior parte, aldeídos para que ocorra a reticulação, eles são considerados tóxicos, e, portanto, não são permitidos em fármacos e alimentos, ou para quaisquer outros fins alimentares, em vista disso, faz-se necessário a busca por reagentes alternativos (AZEREDO; WALDRON, 2016; WEI *et al.*, 2019).

A reticulação de nanopartículas de proteína é capaz de articular sua ação de espalhamento na interface, e, conseqüentemente seu progresso como estabilizante, levando ao melhoramento das propriedades mecânicas (GONSALVES *et al.*, 2011). Nanopartículas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanhos entre 10 e 1000 nm, representando um sistema coloidal (ALLÉMAN; GURNY; DOELKER, 1993), que podem ser sintetizadas por meio de inúmeras técnicas, mas no trabalho em questão, por meio da formação prévia de uma emulsão (DONBROW, 1992), onde ocorre a solidificação das nanogotas por meio de uma técnica de reticulação química.

A utilização de ácidos orgânicos para que ocorra a reticulação tem apresentado resultados positivos com nanopartículas, apresentando estruturas mais densas e tamanho menor quando comparada com as regiões não reticuladas (TAVASSOLI-KAFRANI; GOLI; FATI, 2017; MURPHY; FARKAS; JONES, 2017).

A metodologia de reticulação para formulação de nanopartículas do concentrado da proteína do soro de leite foi aplicada (SILVA, 2021) com a finalidade de obter uma rede polimérica compacta com estrutura interna homogênea e tamanho das partículas, alcançando resultados positivos poderá ocorrer melhora no comportamento de espalhamento das nanopartículas na interface óleo-água, impulsionando a organização de uma cobertura homogênea em sua totalidade, espelhando positivamente nas características de emulsões de Pickering estabilizadas com as nanopartículas de WPC.

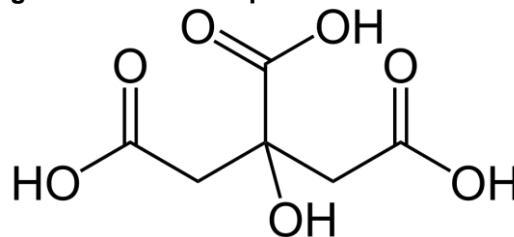
A reticulação química pode promover a obtenção de microesferas, microcápsulas e nanocápsulas (ARSHADY, 1990; BURGESS; HICKEY, 1994), para a formação das nanocápsulas ocorre a reticulação covalente por conta da adição de um agente de reticulação químico ou por ação do calor (BURGESS; HICKEY, 1994). Existem estudos que utilizaram a técnica de reticulação para formação de nanocápsulas de fibrinogênio, albumina, gelatina e polissacarídeos (ARSHADY, 1990).

### 3.4.1 Ácido tânico e cítrico como agentes reticuladores

Os ácidos orgânicos, cítrico e tânico, podem ser utilizados na reticulação pois não considerados tóxicos. O ácido cítrico, ou ácido tricarbóxico, tem sido muito utilizado como acidificante na indústria alimentícia pois possui um baixo custo e alta disponibilidade (FRANKLIN; GUHANATHAN, 2014), além de ser uma substância natural, portanto considerada como ecológica e segura. O ácido tânico possui a presença de grupos fenólicos múltiplos, além de possuir fortes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas, ansiolíticas e neuroprotetoras (GÜLÇİN *et al.*, 2010), além de também não ser considerado tóxico.

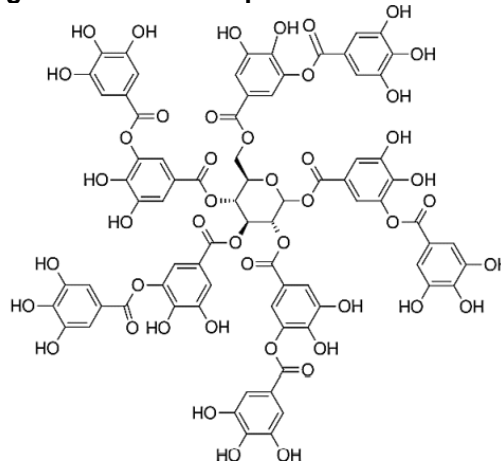
A figura 1 apresenta a estrutura química do ácido cítrico e a figura 2 do ácido tânico.

**Figura 1 - Estrutura química do ácido cítrico**



Fonte: ATKINS (2001, p. 441).

**Figura 2 - Estrutura química do ácido tânico**



Fonte: PIOVESAN (2018, p. 35)

O ácido cítrico é um ácido policarbóxico de baixo custo produzido principalmente pelo processo de fermentação de carboidratos como glicose ou amido, é considerado um ácido orgânico fraco encontrado em frutas cítricas. O mecanismo do ácido cítrico envolve a reação do grupo carboxila do ácido cítrico com o grupo

amino livre da proteína por meio de uma reação de substituição nucleofílica, proporcionando assim a reticulação da proteína, portanto o ácido cítrico passa a fazer parte da rede proteica formada e assim colaborando com o equilíbrio da hidrofobicidade (SHI *et al.*, 2008; GALVÃO *et al.*, 2018).

O ácido tânico é um exemplo de composto fenólico utilizado como agente de reticulação, pertence à família dos taninos e é encontrado em muitas fontes vegetais, principalmente nos frutos e cascas de muitas plantas, como sorgo, banana, uva e chá verde. É reconhecido, maioritariamente, por conta de suas propriedades antioxidantes, além de ser aditivo em produtos alimentícios (AEWSIRI *et al.*, 2010), o ácido tânico reage com aminoácidos, doando prótons, por meio do seu grupo fenólico, formando fortes ligações de hidrogênio com o grupamento carboxila presente na estrutura da proteína (MULAUDZI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2019). Em geral, os taninos são compostos de elevada massa molar, que contêm muitos grupamentos fenólicos que permitem a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (MUELLER-HARVEY, 2001).

De acordo com o Código de Regulamentos Federais, Título 21, §184.1033, o ácido cítrico pode ser utilizado em alimentos sem limitações, já o ácido tânico, de acordo com a seção §184.1097, possui níveis máximos de uso em alimentos que vai até 0,04%, variando de acordo com a categoria do alimento. Existem estudos que demonstram que a ação dos ácidos orgânicos, tânico e cítrico, causam o melhoramento de propriedades tecnológicas na estrutura das proteínas (WANG *et al.*, 2016; ABAEE; MADADLOU; SABOURY, 2017)

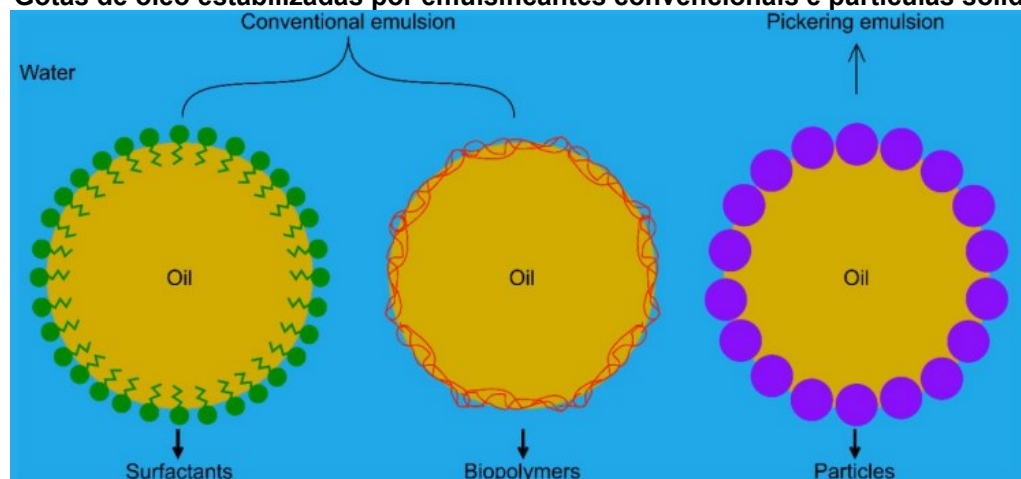
### **3.5 Emulsões de Pickering e nanopartículas de WPC como estabilizantes**

Atualmente, as emulsões de Pickering vem sendo amplamente estudada, e por conta disso surgiu também partículas estabilizadoras diversas, como exemplo, as nanopartículas de WPC, que possuem a proteína do leite considerada uma fonte de proteína abundante, além disso, as moléculas da proteína apresentam uma alta atividade superficial, portanto relacionam a alta energia de dessorção das partículas de Pickering com a capacidade das moléculas da proteína para adsorver em qualquer área de interação (LI *et al.*, 2018; MURRAY, 2019). Conclui-se, portanto, que as nanopartículas do concentrado da proteína do soro do leite apresentam-se como uma opção promissora em emulsões de Pickering como partículas estabilizantes.

As emulsões de Pickering, ou também conhecida como emulsões onde partículas sólidas atuam como estabilizadoras, são destacadas por conta de sua alta estabilidade contra coalescência, (PICKERING, 1907), considera-se o fenômeno uma desvantagem no uso de emulsões, pois a coalescência é o processo onde, quando uma mistura multifásica, ocorre a união de duas ou mais unidades de uma fase a favor da formação de uma única, ademais as emulsões apresentam vantagens em aplicações alimentícias, por serem livres de surfactantes, concedendo uma configuração de rótulos limpos, o que atualmente vem sendo cada vez mais apreciado pelos consumidores ao redor do mundo (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; BERTON-CARABIN; SCHROËN, 2019;).

As metodologias de estabilização das emulsões de Pickering são baseadas na formação de obstáculos esféricos ocasionados pela adsorção de partículas sólidas na interface das gotas (SILVA, 2021). Devido às forças capilares, as partículas formam um filme denso de partículas simples ou multicamadas nas gotas de óleo. Este filme de partículas torna-se uma barreira física que impede que as gotículas próximas se encostem e se aglomerem, impedindo a coalescência (CHEN *et al.*, 2020). A Figura 3 ilustra a diferença das emulsões convencionais e da emulsão de Pickering, sabendo que as emulsões de Pickering fazem parte do grupo em que partículas sólidas atuam como estabilizadoras.

**Figura 3 - Gotas de óleo estabilizadas por emulsificantes convencionais e partículas sólidas**



Fonte: SILVA (2021, p. 24)

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

Concentrado da proteína do soro de leite (WPC 80, GSG Nutrição LTDA) foi fabricado pela GSG Nutrição LTDA com pureza de 88%, e foi utilizado para o preparo das nanopartículas de WPC. Ácido tânico (Sigma Aldrich) e ácido cítrico (Alphatec) foram utilizados como agentes reticuladores. Azida de sódio 0,1% foi utilizada para prevenir o crescimento microbiano. Soluções de Hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol. L<sup>-1</sup> e Ácido clorídrico (HCl) 1 mol. L<sup>-1</sup> foram utilizadas para o ajuste do pH. Brometo de potássio (KBr, Sigma-Aldrich, grau espectroscópico) fora utilizado nas análises de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR). Todos os outros compostos químicos usados eram de grau analítico.

### 4.2 Produção das nanopartículas

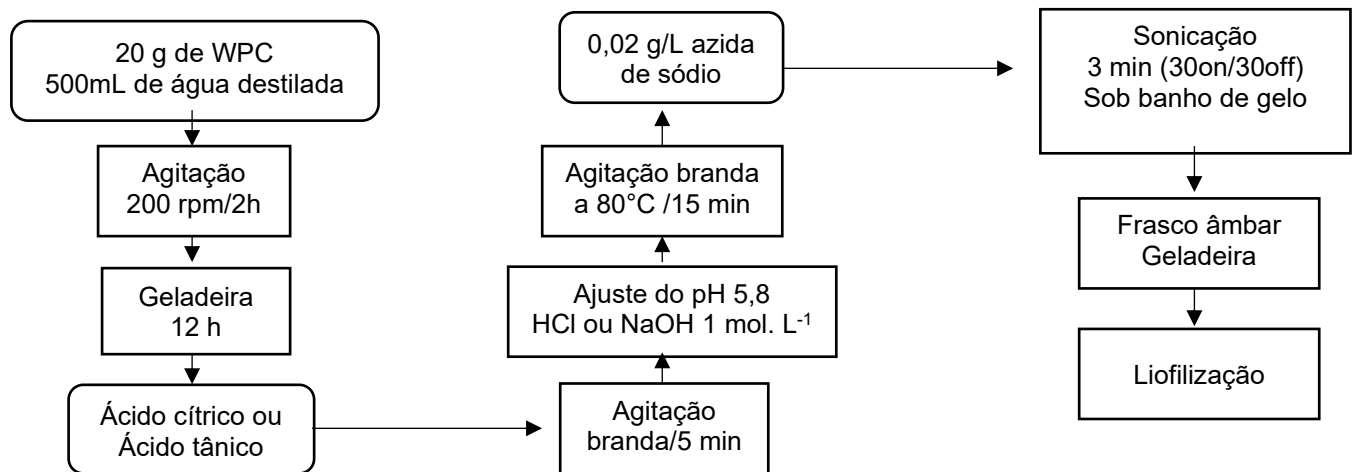
A produção das nanopartículas foi realizada de acordo com o método de Farjami *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2021) com pequenas modificações. Inicialmente, foi preparada uma solução com 20 g de concentrado de proteína do soro de leite (WPC 80) em água destilada (500 mL), o béquer com a solução foi colocado sob agitação a 200 rpm por 2 h. Em seguida, armazenou-se a solução na geladeira por 12 horas para garantir a hidratação da proteína. Após as 12 horas, adicionou-se ácido tânico ou ácido cítrico à solução de WPC, para a adição dos ácidos utilizou-se a razão molar de 3:1 (reticulador: proteína) com base no teor da proteína utilizada (considerou-se a pureza do WPI e, a massa molar do constituinte principal,  $\beta$ - lactoglobulina, foi utilizada como o do material proteico), após a adição agitou-se a solução suavemente durante 5 minutos. Posteriormente, realizou-se o ajuste de pH para 5,8 usando uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol. L<sup>-1</sup> ou hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol. L<sup>-1</sup>. Após a estabilização do pH, essas soluções foram aquecidas a 80 °C com agitação branda por 15 min para formar nanopartículas. Após o arrefecimento, adicionou-se 0,02 g.L<sup>-1</sup> de azida de sódio como agente antimicrobiano e as amostras foram armazenadas em geladeira.

As amostras de WPC sem ácido após o tempo de hidratação da proteína foram aquecidas a 80 °C com agitação branda por 15 min e após o resfriamento armazenadas em geladeira.

As misturas com adição de ácido foram então sonicadas (Fischer Scientific, Sonic desembrator - 117 V, 50-60 Hz, 4 amperes e 400 W) por 3 minutos (30 segundos ligado/30 segundos desligados) sob banho de gelo para evitar superaquecimento. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar e colocadas sob refrigeração. Estas soluções, com ácido e sem ácido, foram, subsequentemente, alimentadas no liofilizador para obter as partículas de pó.

A Figura 4 apresenta o fluxograma do processo de obtenção das nanopartículas com adição dos ácidos orgânicos.

**Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção das NPs**



Fonte: Autoria própria (2022)

### 4.3 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram produzidas em duplicata e identificadas conforme o ácido que foi utilizado como reticulador, além de serem caracterizadas também as soluções de WPC sem ácido, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1 – Identificação das amostras de WPC para realização das caracterizações**

AMOSTRA	COMPOSIÇÃO
Cit-1	Nanopartículas com ácido cítrico 1
Cit-2	Nanopartículas com ácido cítrico 2
Tan-1	Nanopartículas com ácido tânico 1
Tan-2	Nanopartículas com ácido tânico 2
WPC-1	Solução WPC sem ácido 1
WPC-2	Solução WPC sem ácido 2

Fonte: Autoria própria (2022)

#### 4.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA)

Calorimetria Diferencial de Varredura e as análises termogravimétricas foram realizadas utilizando analisador térmico simultâneo (STA 6000/Perkin Elmer), alocado no laboratório Multiusuário (Central Analítica Multiusuário de Medianeira - CeanMed) da UTFPR Campus Medianeira, objetivando a avaliação do estado físico das nanopartículas e das soluções de WPC. Nas análises de DSC utilizou-se cerca de 10 mg do analito colocados em porta-amostras de alumínio fechados e aquecidos de 25 a 500°C com taxa de 10°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 20 mL.min<sup>-1</sup>. As análises de TGA foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) utilizando taxa de aquecimento de 10 °C/min de 25°C até 500 °C. A massa utilizada em cada experimento foi de cerca de 10 mg.

#### 4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu-IRAffinity<sup>1</sup>) foram realizadas no laboratório Multiusuário (Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão – CAMulti-CM) da UTFPR Campus Campo Mourão a fim de observar a existência de possíveis interações químicas entre os grupos funcionais do concentrado da proteína do soro de leite devido ao processo de reticulação. Para as análises, utilizou-se cerca de 3 mg de composto para produção de pastilhas de brometo de potássio (100 mg). As pastilhas foram então analisadas com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> entre 4000 e 600 cm<sup>-1</sup> com 32 scans cumulativos. Os picos foram normalizados para possibilitar a comparação entre as amostras.

#### 4.3.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi realizada no laboratório multiusuário (Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais - CMCM) da UTFPR Campus Curitiba, foi utilizado para medição da distribuição do tamanho das partículas utilizando um equipamento NANO DLS da BrookHaven Instruments (Holtsville, New York, EUA) operando a 90° e comprimento de onda de 632,8 nm, fornecida por um laser He-Ne de estado sólido de 35 mW.

O DLS é uma técnica não invasiva e bem estabelecida para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região dos submicrométricos e com a tecnologia mais recente, menores do que 1 nm. O

movimento browniano, que se refere ao deslocamento errático de pequenas partículas que se encontram imersas em alguma substância, das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula usando a relação Stokes-Einstein.

#### 4.3.4 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi determinado no Equipamento de marca Particle Metrix – Stabino® e modelo PMX 400, projetado para realizar a titulação automática de amostras e medições do potencial de dispersão, pH e condutividade. O potencial zeta é o potencial elétrico resultante da distribuição de cargas que indiretamente determinam a estabilidade das nanopartículas em suspensão coloidal. A análise foi realizada no laboratório multiusuário (Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais - CMCM) da UTFPR Campus Curitiba.

#### 4.3.5 Microscopia de força atômica (AFM)

Para realização das análises em microscópio de força atômica utilizou-se o laboratório multiusuário (Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ)) da UTFPR Campus Curitiba, as amostras foram diluídas (1:50) em água purificada (MilliQ), uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi depositado em substrato de mica V-1 (Electron Microscopy Science, EUA), previamente clivada. Após 5 minutos, as amostras foram secas em fluxo de nitrogênio durante 5 minutos e armazenadas em estufa a 30 °C, durante 10 minutos antes da análise. As imagens foram obtidas através do microscópio de força atômica (Agilent SPM 5500, EUA) em modo de contato intermitente (tapping), utilizando alavanca NSC35 ( $\mu\text{masch}$ , Estônia) com constante de força de 7,5  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$  e frequência de 190 kHz. Foram escaneadas três regiões distintas (A, B e C) com áreas de 8x8, 4x4, 2x2 e 1x1  $\mu\text{m}$ , com velocidade de 1,44  $\text{In s}^{-1}$  e resolução de 512 p. O tratamento das imagens foi realizado através do software Gwyddion (v 2.50).



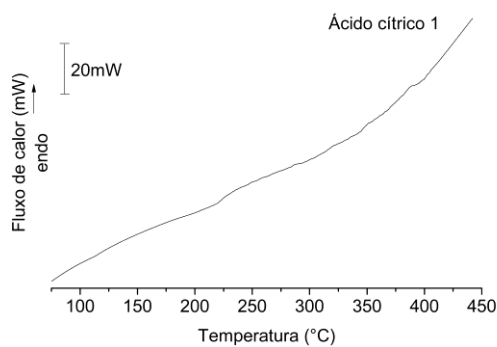
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização das nanopartículas

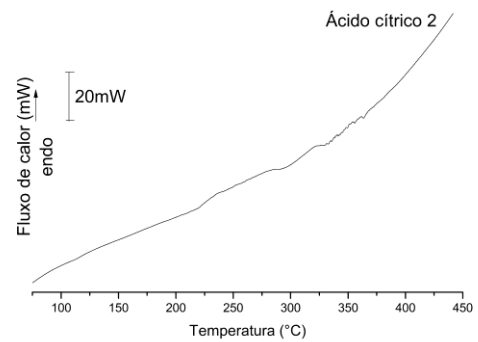
#### 5.1.1 Calorimetria Diferencial de Varredura

Na Figura 5 estão apresentados os termogramas obtidos na análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das nanopartículas de WPC com ácido cítrico e tânico como agentes reticuladores, ambos foram analisados em duplicata, e da solução de água destilada com o concentrado da proteína de soro de leite, sem ácido, analisado em duplicata também.

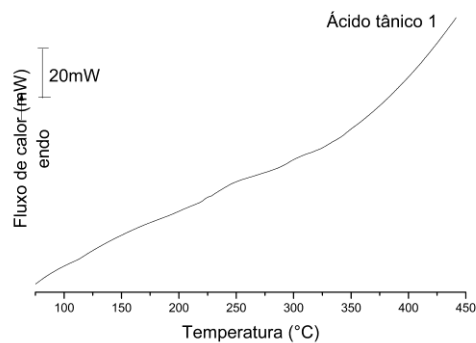
**Figura 5 - Curvas de DSC para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro**



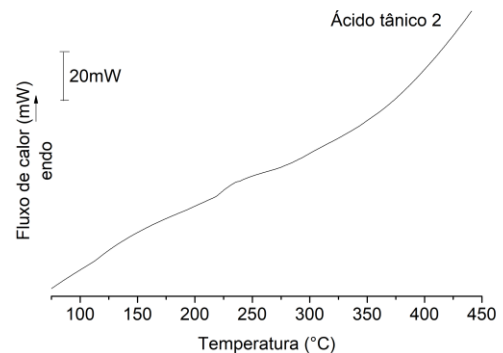
(a) NPs com ácido cítrico 1



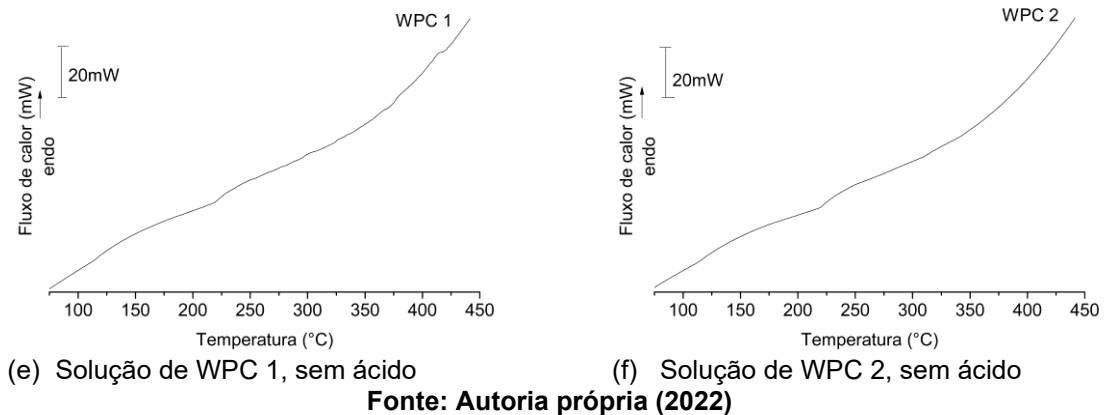
(b) NPs com ácido cítrico 2



(c) NPs com ácido tânico 1



(d) NPs com ácido tânico 2

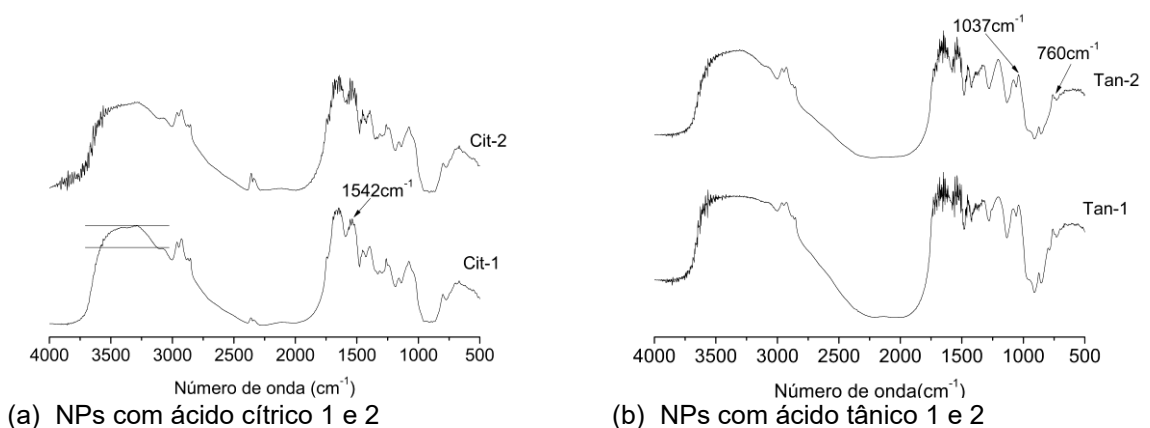


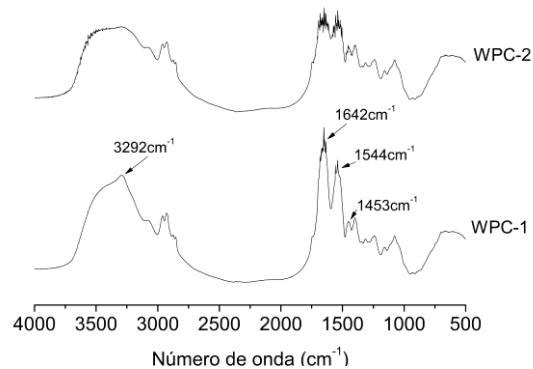
A partir dos termogramas apresentados foi possível investigar o efeito da reticulação no comportamento térmico das nanopartículas, caracterizando a estabilidade do WPC. Foi medida a alteração de calor associada à desnaturação térmica das moléculas. A partir dos resultados obtidos no DSC, concluiu-se que não houve influência dos agentes reticuladores nas propriedades do WPC.

### 5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A Figura 6 mostra os espectros obtidos na Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).

**Figura 6 - Espectros de FTIR para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro**

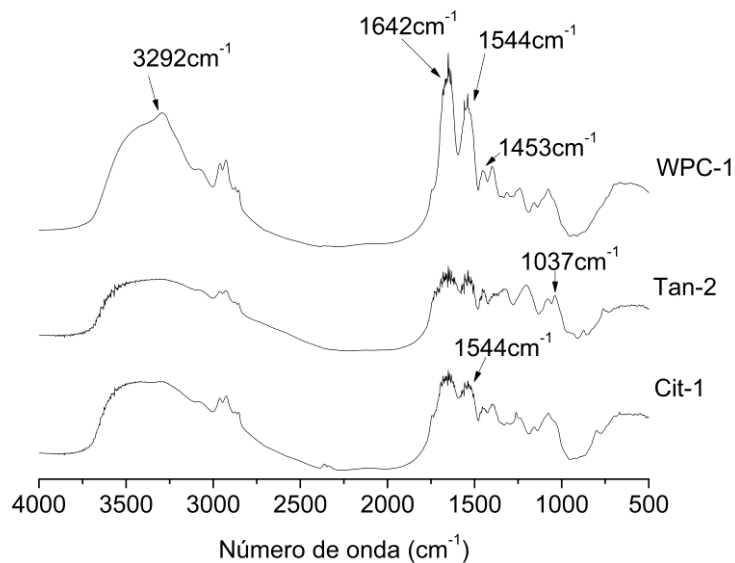




(c) Solução de WPC 1 e 2, sem ácido  
**Fonte: Autoria própria (2022)**

A Figura 7 mostra os espectros comparativos entre as amostras de WPC sem ácido 1, nanopartículas com ácido tânico 2 como agente reticulador e nanopartículas com ácido cítrico 1 como agente reticulador.

**Figura 7 - Espectros comparativos de FTIR para as amostras de WPC-1, Tan-2 e Cit-1**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Os espectros de FTIR mostram as alterações ocorridas nos grupos funcionais das proteínas do soro de leite devido ao processo de reticulação, observando, inicialmente, as curvas das amostras de WPC sem adição de ácido, observa-se picos característicos em  $1642\text{ cm}^{-1}$  e  $1544\text{ cm}^{-1}$ , essas bandas estão associadas às ligações peptídicas dos grupamentos amida I e amida II, respectivamente, o grupo amida I está relacionado ao alongamento  $\text{C}=\text{O}$  e o grupo amida II relacionado ao dobramento  $\text{N-H}$  e alongamento  $\text{C-N}$ , ambos são picos característicos de estruturas proteicas. O grupo

amida III também está presente nos espectros das amostras de WPC sem adição de ácido no pico em  $1453\text{ cm}^{-1}$ , porém com menor intensidade em relação aos outros grupamentos, o grupo amida III está relacionado ao alongamento C-N e dobramento N-H (KARBASI; ASKARI; MADADLOU, 2019).

O grupamento amida I ( $1642\text{ cm}^{-1}$ ) apresenta dados sobre a estrutura secundária do WPC, bandas em torno de  $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$  representam as estruturas da  $\alpha$ -hélice, e as bandas no intervalo de  $1610\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  se relacionam com as estruturas  $\beta$ -folha (JIANG *et al.*, 2019).

As nanopartículas com adição de ácido foram submetidas a sonicação, esse método promove uma vibração ultrassônica, pela cavitação, produzindo pressão e energia a fim de romper as ligações responsáveis pela agregação das partículas (MITTON *et al.*, 2017), causando uma maior movimentação das moléculas, conseqüentemente, gerando um aquecimento pontual superior ao das nanopartículas de WPC sem ácido, ocasionando a modificação parcial da estrutura secundária, a banda em  $1642\text{ cm}^{-1}$  sofreu uma redução de intensidade após o tratamento térmico nas nanopartículas com adição dos agentes reticuladores, apontando um desdobramento parcial ou perda de configuração da hélice original da proteína (NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

Comparando os espectros das nanopartículas com adição dos ácidos, nota-se o efeito da reticulação, principalmente, quando o agente reticulador foi o ácido tânico. Na curva das amostras de Tan-1 e Tan-2 destaca-se uma nova banda em  $1037\text{ cm}^{-1}$ , essa banda está relacionada com absorções mais expressivas e estão ligadas à vibração de estiramento C-O na região amida III, essa banda não foi observada na amostra WPC-1, portanto a presença da banda aponta a incorporação do ácido tânico na formação das nanopartículas (AZEREDO; WALDRON, 2016).

Os espectros das nanopartículas utilizando o ácido cítrico como agente reticulador não tiveram praticamente nenhuma alteração, sinalizando que a estrutura geral das proteínas seja preservada, porém, notou-se um aumento de intensidade na região da amida II ( $1544\text{ cm}^{-1}$ ), indicando, provavelmente, a ocorrência de interações entre os grupos C-N. Farjami *et al.* (2015) relata uma ligação química entre os grupos carbonila do ácido cítrico e o grupamento amino da proteína, corroborando com o resultando obtido. Nota-se também o alargamento da banda em  $3292\text{ cm}^{-1}$  por conta da provável formação de ligações de hidrogênio pelos grupos OH das moléculas de

ácido cítrico, corroborando com Miller (2003), que menciona que as ligações de hidrogênio ampliam as bandas O-H.

Conclui-se, portanto, que os espectros das NPs reticuladas com ácido tânico apresentaram uma estrutura mais distinta dos espectros das soluções de WPC sem ácido, pois apresentou dois picos intensos em  $1037\text{ cm}^{-1}$  e  $760\text{ cm}^{-1}$ , o primeiro pico referente a absorvância intensa do alongamento C-O e a deformação N-H nos grupos amida III. O segundo pico apresentou-se com menos intensidade, mas pode estar relacionado às vibrações da cadeia lateral do WPC (WEN-QIONG; YI-HONG; YING, 2013; AZEREDO; WALDRON, 2016).

### 5.1.3 Potencial Zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise de potencial zeta para as amostras de WPC e identifica os tamanhos das nanopartículas por meio da análise de DLS, que permitiu determinar o diâmetro hidrodinâmico das partículas que estão suspensas através do espalhamento de luz.

**Tabela 2 – Tamanho de partículas, índice de polidispersidade (PDI) e potencial Zeta das soluções de WPC e NPs reticuladas com ácidos cítrico e tânico**

	Cit-1	Cit-2	Tan-1	Tan-2	WPC-1	WPC-2
<b>Tamanho médio das partículas em número (nm)</b>	172	9803	2475	99	124	123
<b>Tamanho médio das partículas em intensidade (nm)</b>	434	10076	47529	363	285	433
<b>PDI (-)</b>	0,31	-	-	0,28	0,18	0,28
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	$-8,5 \pm 2,5$	$-6,8 \pm 1,9$	$-6,4 \pm 0,9$	$-18,5 \pm 0,7$	$-7,1 \pm 1,1$	$-9,4 \pm 1,3$

**Fonte: Autoria própria (2022)**

A partir da Tabela 2, nota-se que as amostras nomeadas Cit-2 e Tan-1 apresentaram tamanho médio maior do que o equipamento poderia fornecer, portanto ficaram fora da faixa de confiabilidade e serão descartadas para fins de comparação de resultados, indicando que, provavelmente, essas amostras apresentaram formação de agregados.

Nota-se que as NPs que foram produzidas com ácido tânico como agente reticulador apresentaram partículas menores que as produzidas por meio de reticulação com ácido cítrico, mas ambas apresentaram valor de PDI baixo, sabe-se

que o PDI indica quanto o tamanho de partículas desviou da média, portanto PDI baixos resultam em suspensões mais uniformes.

Segundo Farjami *et al.* (2015), a adição de agente reticulador aumenta a estabilidade estrutural das proteínas durante o tratamento térmico, evitando a aglomeração. A reticulação com o ácido tânico formou nanopartículas menores e PDI menor que o das nanopartículas reticuladas com ácido cítrico.

Em relação as amostras de WPC sem adição de ácido, embora elas também tenham formado nanopartículas, pois foram submetidas ao aquecimento, seria importante analisar qual a taxa de conversão de whey solúvel nas nanopartículas.

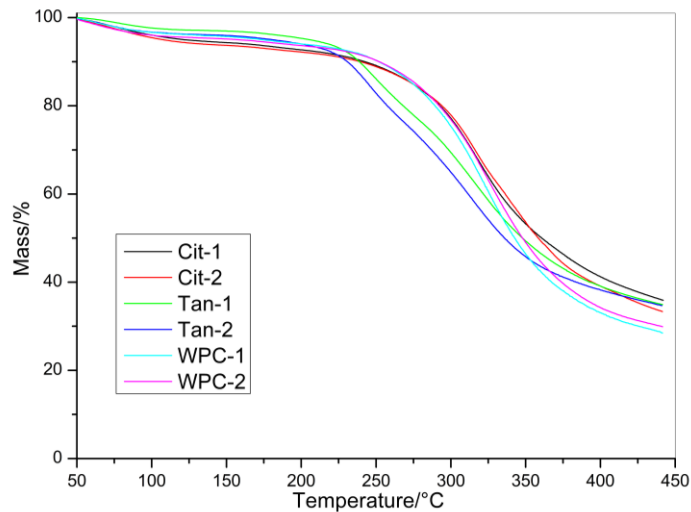
Os valores de potencial zeta para todas as amostras foram negativos, porém é comumente encontrado na literatura valores acima de -30, ou +30 como valores que oferecem maiores estabilidades para as nanopartículas (TERCINIER *et al.*, 2013). A Tabela 2 nos mostra que não obtivemos nenhum valor próximo a fim de obter a estabilidade desejável, os valores encontrados foram abaixo de 30, ou seja, as partículas apresentam uma estabilidade razoável (WANG *et al.*, 2015), e o valor mais próximo a uma melhor estabilidade foi as nanopartículas reticuladas com ácido tânico.

A proteína do soro de leite possui um ponto isoelétrico, valor de pH onde uma molécula, como exemplo, o WPC, apresenta carga elétrica líquida igual a zero, indicado como pH 5,0, as nanopartículas com adição de agente reticulador foram preparadas com pH 5,8, portanto a dissociação dos grupos COOH fez as partículas conduzissem carga negativa, corroborando os resultados com a literatura (WU *et al.*, 2015).

#### 5.1.4 Análise Termogravimétrica

Os termogramas de TGA e espectros de massa obtidos para as nanopartículas de WPC e soluções de WPC sem ácido estão apresentados na Figura 8.

**Figura 8 – Termograma das nanopartículas de WPC e soluções de WPC sem ácido**

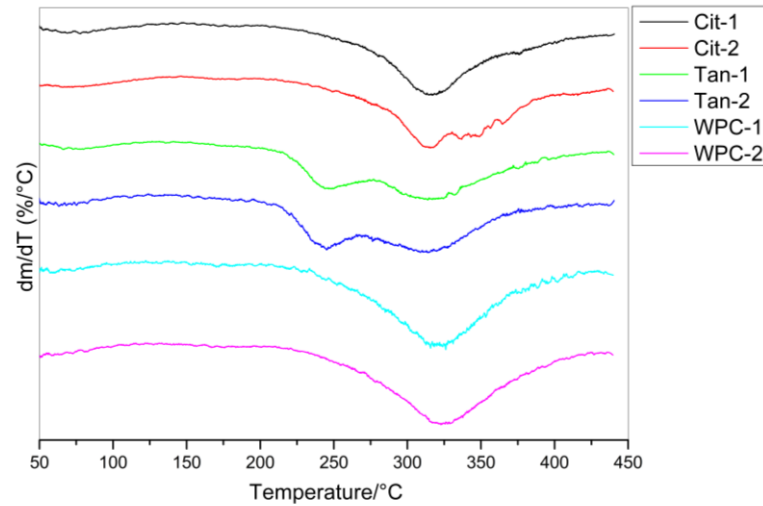


**Fonte: Autoria própria (2022)**

A partir dos Figura 8 nota-se que os processos de decomposição das nanopartículas reticuladas com os ácidos orgânicos e das soluções de WPC sem ácido são semelhantes. Porém, nota-se que as nanopartículas reticuladas com os ácidos orgânicos obtiveram um aumento da temperatura de decomposição térmica, principalmente a amostra Cit-1, pois o ácido cítrico pode formar ligações de hidrogênio mais fortes. Portanto a adição dos agentes reticuladores proporcionou a melhora da estabilidade térmica.

A Figura 9 apresenta a primeira derivada do termograma de TGA .

**Figura 9 – Termograma derivado das nanopartículas de WPC e soluções de WPC sem ácido**

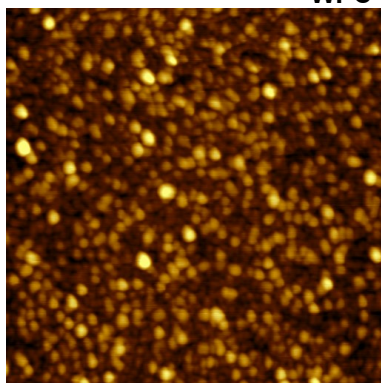


**Fonte: Autoria própria (2022)**

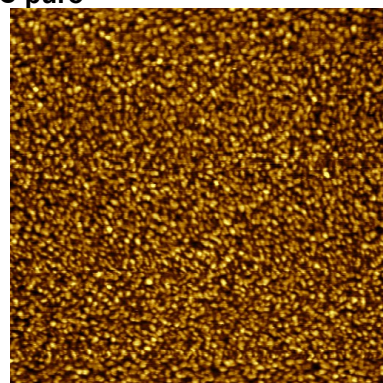
### 5.1.5 Microscopia de força atômica

A Figura 10 apresenta as micrografias obtidas a partir da análise AFM para as NPs com adição de ácido cítrico, ácido tânico e solução de WPC sem adição de ácido e a Figura 11 as representações tridimensionais das amostras.

**Figura 10 - Micrografias obtidas a partir de força atômica para as nanopartículas de WPC com ácidos e WPC puro**

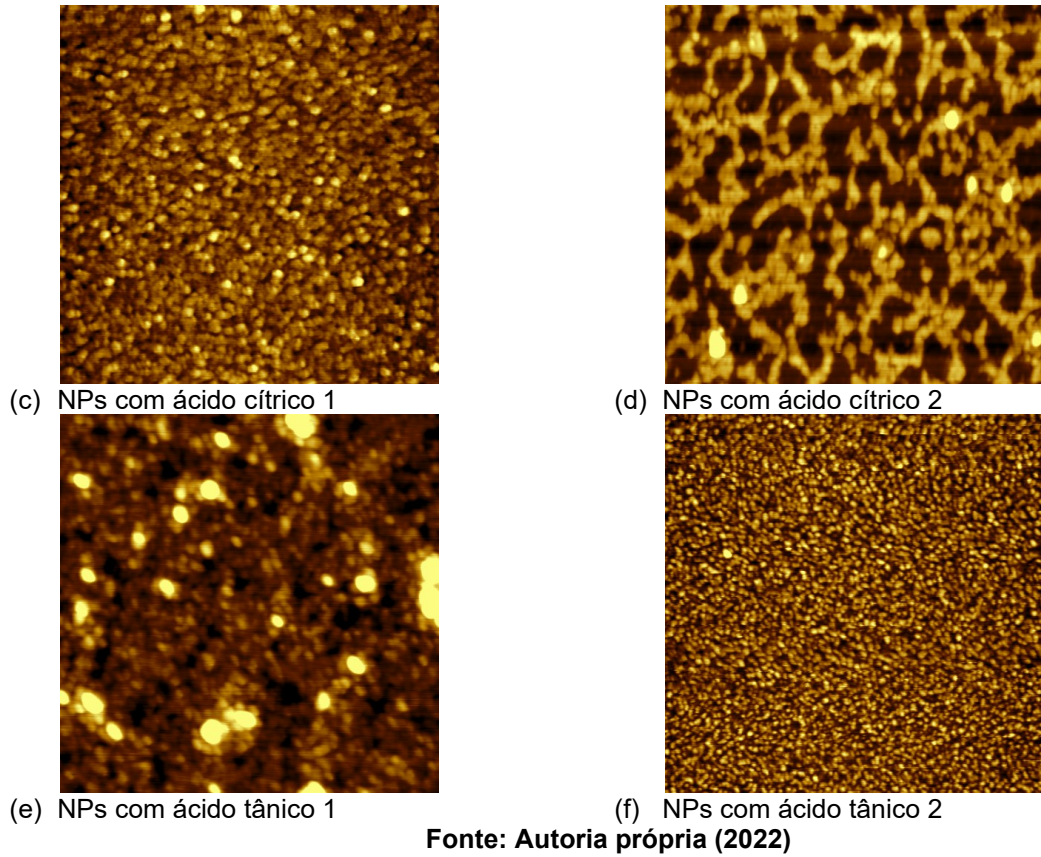


(a) Solução de WPC 1, sem ácido

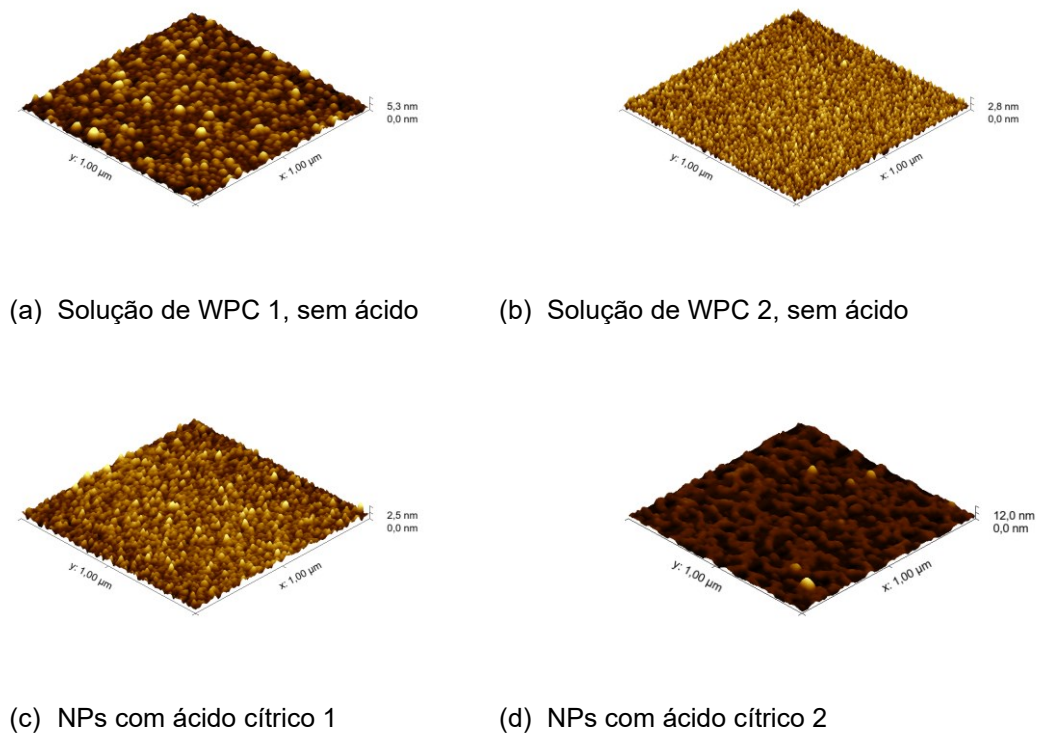


(b) Solução de WPC 2, sem ácido





**Figura 11 - Representação tridimensional das amostras obtidas a partir de microscopia de força atômica**





(e) NPs com ácido tânico 1

(f) NPs com ácido tânico 2

Fonte: Autoria própria (2022)

A partir das micrografias, observa-se que todas as amostras apresentaram perfil semelhante em relação à morfologia, as quais evidenciam a morfologia esférica. As partículas observadas na amostra de NPs de WPC com ácido cítrico 2 (Fig. 10d) indicam a formação de aglomerados, bem como na amostra NPs de WPC com ácido tânico 1 (Fig. 10e), o que corrobora com o que foi analisado nas caracterizações no DLS, onde notou-se que os tamanhos das NPs com ácido cítrico 2 e ácido tânico 1 apresentaram tamanho maiores do que o equipamento poderia fornecer, e as micrografias comprovam a presença de aglomerados.

A Figura 10f, que apresenta a amostra de ácido tânico 2, apresenta pequenas nanopartículas e com formato quase esférico, possibilitando uma menor tendência à formação de agregados, além de apresentar um formato mais homogêneo em toda distribuição, a Figura 10c ilustra as nanopartículas da amostra com agente reticulador ácido cítrico 1, nota-se nanopartículas pequenas, porém com formatos mais irregulares, corroborando também com as análises anteriores, pois o PDI da amostra é maior que o das nanopartículas reticuladas com ácido tânico 2.

A Tabela 3 apresenta o tamanho das nanopartículas obtido pela análise de AFM.

**Tabela 3 – Tamanho das nanopartículas obtidos por meio da microscopia de força atômica**

Amostras	Cit-1	Cit-2	Tan-1	Tan-2	WPC-1	WPC-2
Tamanho médio (nm)	27	28	29	21	30	21

Fonte: Autoria própria (2022)

Realizando um comparativo entre os valores de tamanho obtidos no DLS com os obtidos por AFM, nota-se uma diferença significativa. Essa diferença ocorre por conta da metodologia utilizada em cada análise, é comum observar que os tamanhos

médios para partículas dispersas em DLS são relativamente maiores que os valores obtidos pela metodologia utilizada para medição na análise por microscopia de força atômica (HOO *et al.*, 2008). Nas análises de DLS as nanopartículas são analisadas em solução aquosa, portanto apresentam maior tamanho, enquanto nas análises de AFM as nanopartículas são analisadas secas, portanto o menor tamanho. Apesar da diferença, a amostra Tan-2 apresentou menores tamanhos de NPs que as amostras reticuladas com ácido cítrico.

Berton-Carabin e Schroën (2015) apontam que as partículas de grau alimentício são muito complexas e podem apresentar formatos irregulares. Para estudos posteriores o formato das nanopartículas será muito importante para garantir a estabilidade das emulsões, determinando como as partículas se empacotariam na interface (LOW *et al.*, 2020).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concentrado proteico do soro de leite (WPC) foi utilizado para obtenção de nanopartículas por meio da técnica de reticulação química e as interações da reticulação com as soluções de WPC sem ácido foram avaliadas por meio de caracterizações térmicas, espectroscópicas e microscópicas, os resultados foram comparados de acordo com estudos estabelecidos na literatura científica. As análises das nanopartículas contendo WPC por meio Espectroscopia no Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR) indica que houve a incorporação dos ácidos das nanopartículas, e evidencia que a curva da amostra Tan-2 apresentou uma maior distinção das soluções de WPC sem ácido.

Os resultados de AFM, TGA, DLS e potencial Zeta corroboram com o encontrado nas análises de FTIR. As micrografias obtidas em AFM para a amostra Tan-2 apresentaram as menores nanopartículas e formato quase esférico, possibilitando uma menor tendência à formação de agregados, além de apresentar um formato mais homogêneo em toda distribuição. Os termogramas de TGA indicaram que a adição dos agentes reticuladores proporcionou a melhora da estabilidade térmica. A Tabela 2 apresentou dados resultantes das análises de DLS e potencial Zeta e indicaram que a menor partícula formada foi a amostra Tan-2 e com PDI abaixo de 0,1. Os resultados mostraram que as soluções de WPC sem ácido também formaram nanopartículas, porém precisaria de uma análise que demonstrasse do grau de conversão de WPC em nanopartículas para comprovar que apresentaria resultados superiores a amostra Tan-2.

Nota-se, portanto, que as nanopartículas formadas na amostra Tan-2 apresentaram maior desempenho como partículas estabilizadoras. As NPs com agente reticulador ácido cítrico apresentaram maior tamanho de partícula e se formaram menos homogêneas que as produzidas com ácido tânico. Sendo assim, conclui-se que agente reticulador que apresentou melhores resultados foi o ácido tânico, esses resultados podem promover o uso das nanopartículas em estudos posteriores como estabilizantes, substituindo os tensoativos convencionais, na técnica de emulsões de Pickering.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para trabalhos futuros, sugere-se utilizar como agente reticulador o ácido tânico em diferentes proporções para avaliar sua influência sobre as propriedades finais das nanopartículas. Sugere-se também realizar análises para avaliar a taxa de conversão da proteína solúvel em nanopartículas.

## REFERÊNCIAS

- ABAE, A.; MADADLOU, A.; SABOURY, A.A. The formation of non-heat-treated whey protein cold-set hydrogels via non-toxic chemical cross-linking. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 43–49, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16303630?via%3Di> hub. Acesso em: 04 out. 2022.
- AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; WIERENGA, P.A.; GRUPPEN, H. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin-tannic acid complex as influenced by types of interaction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, p. 712–720, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856410000391>. Acesso em 12 out. 2022.
- ALLÉMAN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 39, p. 173- 191, 1993. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Drug-loaded-nanoparticles-%3A-preparation-methodsandAll%3%A9mannGurny/e3e5c1ea7baf4a694a1615f929c0f41be6b2c18c#citing-papers>. Acesso em 02 nov. 2022.
- ARSHADY, R. Albumin microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing techniques. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 14, p. 111-131, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016836599090149N>. Acesso em: 05 ago. 2022.
- ATKINS, P. **Princípios da química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- AZEREDO, H.M.C.; WALDRON, K.W. Crosslinking em filmes e revestimentos de polissacarídeos e proteínas para contato com alimentos - Uma revisão. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 109-122, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/trends-in-food-science-and-technology/vol/52/suppl/C> 10.1016/j.tifs.2016.04.008. Acesso em 10 nov. 2022.
- BANAVARA, D.S.; ANUPAMA, D.; RANKIN, S.A. Studies on physicochemical and functional properties of commercial sweet whey powders. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3866-3875, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030203739940>. Acesso em 02 nov. 2022.
- BERTON-CARABIN, C.; SCHROËN, K. Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. **Current Opinion in Food Science**, v. 27, p. 74–81, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221479931930013X>. Acesso em: 12 set. 2022.

BERTON-CARABIN, C.C.; SCHROËN, K. Pickering Emulsions for Food Applications: Background, Trends, and Challenges. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, p. 263–297, 2015. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-food-081114-110822>. Acesso em 14 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). **TÍTULO VIII, ARTIGO Nº 475**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa\\_titulo8a.pdf](http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo8a.pdf). Acesso em: 28 ago. 2022.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. *In*: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1081/E-EPT4-120050305/microsphere-technology-applications-hongkee-sah-himanshu-bhattacharjee>. Acesso em: 04 out. 2022.

CARVALHO, R. A. de.; GROSSO, C.R.F. Caracterização de filmes à base de gelatina modificados com transglutaminase, glioxal e formaldeído. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/food-hydrocolloids>. Acesso em: 12 set. 2022.

CHEN, L. *et al.* Food-grade pickering emulsions: Preparation, stabilization and applications. **Molecules**, v. 25, n. 14, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674301/>. Acesso em: 04 out. 2022.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092777571300157X>. Acesso em: 12 set. 2022.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Tecnologia de nanocápsulas: uma revisão. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, n. 19, p. 99-134, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12197610/>. Acesso em: 12 set. 2022.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

DONBROW, M. Introduction and overview. *In*: DONBROW, M., ed. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and Pharmacy**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 1-14.

FARJAMI, T.; MADADLOU, A.; LABBAFI, M. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159-165, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X15001617>. Acesso em: 02 ago. 2022.

FOEGEDING, E. A. *et al.* Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 5, p. 151-159, 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224402001115>. Acesso em: 24 out. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) CRF - **Código de Regulamentos Federais, Título 21, §184.1033**. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-184/subpart-B/section-184.1033>. Acesso em: 24 out. 22.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) CRF - **Código de Regulamentos Federais, Título 21, §184.1097**. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-184/subpart-B/section-184.1097>. Acesso em: 24 out. 22.

FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M. A.; PELLETIER, J.; VALOUR, J. P.; CHEVALIER, Y. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 56–63, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19135516/>. Acesso em: 14 set. 2022.

FRYDENBERG, RP.; HAMMERSHOJ, M.; ANDERSEN, U.; GREVE, MT.; WIKING, L. Desnaturação proteica de isolados de proteína de soro de leite (WPIs) induzida por ultra-som de alta intensidade durante a gelificação por calor. **Food Chemistry**, v. 192, p. 415-423, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.037>. Acesso em 02 nov. 2022.

GALVÃO, A.C.; ROBAZZA, W.S.; ARCE, P.F.; CAPELLO, C.; HAGEMANN, D.H. Experimental study and modeling of citric acid solubility in alcohol mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 237, p. 96–102, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877418302358>. Acesso em 02 nov. 2022.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/k3GqvpJJx4jqmNzNQZQV3Mw/>. Acesso em: 04 out. 2022.

GÜLÇİN, Y.; HUYUT, Z.; ELMASTAY, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Eliminação de radicais e atividade antioxidante do ácido tânico. **Arabian Journal of Chemistry**, v.3, p.43–53, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853520900046X>. Acesso em: 12 out. 2022.

HOGAN, S. A.; CNAMEE, B. F. M.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, E. M. Propriedades de microencapsulação do concentrado de proteína de soro de leite 75.



**Journal of food Science**, v. 66, 2001. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/227659585\\_Microencapsulating\\_Properties\\_of\\_Whey\\_Protein\\_Concentrate\\_75](https://www.researchgate.net/publication/227659585_Microencapsulating_Properties_of_Whey_Protein_Concentrate_75). Acesso em: 04 out. 2022.

HOO, C. M.; STAROSTIN, N.; WEST, P.; MECARTNEY, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal Nanoparticle Research**, v.10, p. 89-96, 2008. Disponível em: 10.1007/s11051-008-9435-7. Acesso em 05 dez. 2022.

JIANG, Z.; WANG, C.; ACESO.; SOL, D.; GAO, H.; GAO, Z.; MU, Z. Efeito do ultrassom na estrutura e propriedades funcionais do isolado de proteína de soro de leite reticulado com transglutaminase exposto a tratamento térmico prévio. **International Dairy Journal**, v. 88, p. 79-88, 2019. Disponível em: 10.1016/j.idairyj.2018.08.007. Acesso em 01 nov. 2022.

KARBASI, M.; ASKARI, G.; MADADLOU, A. Surface decoration of whey protein microgels through the Maillard conjugation with maltodextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 190–197, 2019. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.003>. Acesso em 08 de nov.22.

KREUTER, J. **Nanopartículas**. Em sistemas de entrega de medicamentos coloidais. Marcel Dekker: Nova York, p. 219-342, 1994.

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. Inovação de produto com concentrados de proteína de soro de leite dos USA. **Journal of Food Science**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 1997. Acesso em 02 nov. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25757895/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

LI, D.; CHEN, E.; CHEN, H.; ZHOU, H.; LI, B.; LI, Y. Impact of whey protein isolates and concentrates on the formation of protein nanoparticles-stabilised Pickering emulsions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 644–653, 2018. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.13578>. Acesso em: 04 out. 2022.

LI, J.; HUGHES, A. D.; KALANTAR, T. H.; DRAKE, I. J.; TUCKER, C. J.; MOORE, J. S. Pickering-emulsion-templated encapsulation of a hydrophilic amine and its enhanced stability using poly (allyl amine). **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 10, p. 976–980, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mz500455j>. Acesso em: 28 out. 2022.

LOW, L. E.; SIVA, S. P.; HO, Y. K.; CHAN, E. S.; TEY, B. T. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties, and stability of Pickering emulsion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 277, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001868619304336>. Acesso em 02 nov. 2022.

LV, P.; WANG, D.; DAI, L.; WU, X.; GAO, Y.; YUAN, F. Pickering emulsion gels stabilized by high hydrostatic pressure-induced whey protein isolate gel particles:

Characterization and encapsulation of curcumin. **Food Research International**, v. 132, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32331631/>. Acesso em: 05 nov. 2022.

MANTOVANI, R. A. **Produção de nanofibrilas de proteínas do soro do leite bovino para estabilização de emulsões alimentícias**. 2016. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/975391>. Acesso em: 15 out. 2022.

MILLER, F. A. Spectra of X-H systems (with emphasis on O-H and N-H groups). *In*: D. MAYO W.; MILLER F. A.; HANNAH R. W. **Course notes on the interpretation of infrared and raman spectra**. p. 163-178. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471690082>. Acesso em: 04 out. 2022.

MITTON, R. V.; COBOS, J. Y.G.; BARBOSA, L. R.; BORGIO, J. D. H. Fracionamento físico da matéria orgânica de um latossolo vermelho distrófico típico pelo método de sonicação. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, p. 22-29, 2017. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6111909>. Acesso em: 01 dez. 2022.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, E, Y. Nanopartículas – Uma revisão. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr06007>. Acesso em: 04 out. 2022.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorização do Soro de Queijo, um subproduto da indústria leiteira. **Food Industry**, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5772/53159>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/42000>. Acesso em: 02 nov. 2022.

MONTAZER, M.; PAKDEL, E.; MOGHADAM, M, B. The role of nano colloid of TiO and butane tetra carboxylic acid on the alkali solubility and hydrophilicity of proteinous fibers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 1–11, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775710006576>. Acesso em: 04 nov. 2022.

MORR, C.V.; HA, E.Y. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 431–476, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8216810/>. Acesso em: 12 out. 2022.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 3–20, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840101002279>. Acesso em: 04 out. 2022.

MULAUDZI, R.B.; NDHLALA, A.R.; KULKARNI, M.G.; VAN STADEN, J. Propriedades farmacológicas e capacidade de ligação proteica de extratos fenólicos de algumas plantas medicinais Venda usadas contra tosse e febre. **Journal**

**Etnofarmacol**, v. 143, p. 185-193, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22732728/>. Acesso em: 25 set. 2022.

MURPHY, R. W.; FARKAS, B. E.; JONES, O. G. Effect of crosslinking on the physical and chemical properties of b - lactoglobulin (Blg) microgels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 736–744, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28662476/>. Acesso em: 04 out. 2022.

NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C.  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1945–1962, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X11000415>. Acesso em 08 nov.2022.

PICKERING, S. U. Emulsions. **Journal of the Chemical Society**, v. 91, 1907.

PIOVESAN, J. V. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de novos eletrodos quimicamente modificados para determinação eletroanalítica de taninos**. 2018. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018. Disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Estrutura-quimica-do-acido-tanico-um-tanino-hidrolisavel\\_fig37\\_327043578](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Estrutura-quimica-do-acido-tanico-um-tanino-hidrolisavel_fig37_327043578). Acesso em: 04 out. 2022.

RAVI, M. N.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M. Preparation and characterization of PLGA cationic nanospheres as DNA carriers. **Biomateriais**, n. 25, p. 1771-1777, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14738840/>. Acesso em: 10 out. 2022.

SGARBIERI, V. C. Physiological-functional properties of whey proteins Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, p. 397-409, 2004. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/26456427\\_Nutritional\\_and\\_functional\\_properties\\_of\\_whey\\_proteins\\_concentrate\\_and\\_isolate#:~:text=In%20the%20most%20cases%2C%20whey%20proteins%20are%20used,as%20gelling%2C%20water%20binding%2C%20emulsification%20and%20foaming%20ability](https://www.researchgate.net/publication/26456427_Nutritional_and_functional_properties_of_whey_proteins_concentrate_and_isolate#:~:text=In%20the%20most%20cases%2C%20whey%20proteins%20are%20used,as%20gelling%2C%20water%20binding%2C%20emulsification%20and%20foaming%20ability). Acesso em: 04 out. 2022.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SHI, R.; BI, J.; ZHANG, Z.; ZHU, A.; CHEN, D.; ZHOU, X.; ZHANG, L.; TIAN, W. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 763–770, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861708002208>. Acesso em: 02 nov. 2022.

SILVA, J. T. P. **Exploring tannic acid-whey protein isolate microgels as Pickering stabilizers: From microscale studies to conventional homogenization techniques**. 2021. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) -

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Jose do Rio Preto, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/214491?show=full>. Acesso em: 04 out. 2022.

SILVA, J.T.P.; BENETTI, J. V. M.; ALEXANDRINO, T. T. B.; ASSIS, O. B. G.; RUITER, J.; SCHROEN, J.; NICOLETTI, V. N. Whey Protein Isolate Microgel Properties Tuned by Crosslinking with Organic Acids to Achieve Stabilization of Pickering Emulsions. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1296, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34199941/>. Acesso em: 18 out. 2022.

SOUZA, M. R.; RODRIGUES, R.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, n. 13, p.85-93, 1995. Disponível em: [https://vet.ufmg.br/editora/cadernos\\_tecnicos/1\\_20090120153045/](https://vet.ufmg.br/editora/cadernos_tecnicos/1_20090120153045/). Acesso em: 04 set. 2022.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; GOLI, S. A. H.; FATHI, M. Fabrication and characterization of electrospun gelatin nanofibers crosslinked with oxidized phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1062–1068, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017313594>. Acesso em: 06 out. 2022.

TERCINIER, L.; YE, A.; ANEMA, S.; SINGH, A.; SINGH, H. Adsorption of milk proteins on to calcium phosphate particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 458–466, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23273673/>. Acesso em: 04 out. 2022.

VILA, A.; SANCHEZ, A.; TOBIO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J.; Projeto de partículas biodegradáveis para entrega de proteínas. **Journal Control Release**, n. 78, p.15-24, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11772445/>. Acesso em: 14 ago. 2022.

WANG, S.; CHEN, X.; SHI, M.; ZHAO, L.; LI, W.; CHEN, Y.; LU, M.; WU, J.; YUAN, Q.; LI, Y. Absorption of whey protein isolated (WPI)-stabilized  $\beta$ -Carotene emulsions by oppositely charged oxidized starch microgels. **Food Research International**, v. 67, p. 315– 322, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996914007558>. Acesso em 02 nov. 2022.

WANG, T.; FERNANDEZ, M.L.; LUO, Y.; HU, S.; WANG, T.; FERNANDEZ, M.L.; LUO, Y. Development of tannic acid cross-linked hollow zein nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 821–831, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X16302946>. Acesso em: 04 out. 2022.

WEI, J.; CHENG, Y.; ZHU, J.; HUANG, Q. Genipin-crosslinked ovotransferrin particle-stabilized Pickering emulsions as delivery vehicles for hesperidin. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 561– 573, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X19303133>. Acesso em: 24 ago. 2022.

WEN-QIONG, W.; YI-HONG, B.; YING, C. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. **Food Chemistry**, v. 139, p. 355–361, 2013. Disponível em: 10.1016/j.foodchem.2013.01.072. Acesso em 28 ago.2022.

WU, J.; LIÃO, W.; ZHANG, J.; CHEN, W. Comportamento térmico do colágeno reticulado com ácido tânico sob aquecimento por micro-ondas. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 135, p. 2329-2335, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-018-7341-5>. Acesso em: 04 out. 2022.

WU, J.; SHI, M.; LI, W.; ZHAO, L.; WANG, Z.; YAN, X.; NORDE, W.; LI, Y. Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 127, p. 96–104, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25660092/#:~:text=A%20Pickering%20%28o%2Fw%29%20emulsion%20was%20formed%20and%20stabilized,w%2Fo%20emulsion%20droplets%20at%2080%C2%B0C%20for%2015%20min>. Acesso em: 04 out. 2022.