

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thiago Medeiros Zacaron

O efeito da pressão de homogeneização na distribuição do tamanho de partículas durante a produção de leite em pó.

Juiz de Fora  
2022

Thiago Medeiros Zacaron

O efeito da pressão de homogeneização na distribuição do tamanho de partículas durante a produção de leite em pó.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Doutor Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Doutor Rodrigo Stephani

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Zacaron, Thiago.

Matriz láctea como sistema de encapsulamento de biomoléculas ativas na produção de nutracêuticos / Thiago Zacaron. -- 2022. 66 f.

Orientador: Ítalo Perrone

Coorientador: Rodrigo Stephani

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Nutracêuticos. 2. Biomoléculas Ativas. 3. Produtos Naturais. 4. Leite. 5. Encapsulamento. I. Perrone, Ítalo, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

## **Thiago Medeiros Zacaron**

O efeito da pressão homogeneização na distribuição do tamanho de partículas durante a produção de leite em pó.

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Ciências  
Farmacêuticas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Ciências  
Farmacêuticas. Área  
de  
concentração: Produtos  
Naturais e Sintéticos  
Ativos.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2022.

### BANCA EXAMINADORA

**Dr. Ítalo Tuler Perrone** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dr. Rodrigo Stephani** - Co-orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dr. Antônio Fernandes de Carvalho**  
Universidade Federal de Viçosa

**Dra. Juliana de Carvalho da Costa**

Juiz de Fora, 18/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Italo Tuler Perroni, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Fernandes de Carvalho, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa, Professor(a)**, em 23/02/2022, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0684804** e o código CRC **CE2322B6**.

Dedico este trabalho a todos que acreditam no conhecimento  
como forma de desenvolver a sociedade.  
Em especial, ao meu Padrinho João, um exemplo de pessoa  
que viveu para o conhecimento e que faz muito falta.

## **AGRADECIMENTOS**

Toda jornada é concluída com a ajuda das pessoas que estiveram ao nosso lado, seja nos dando força, seja nos ajudando a alcançar os resultados na rotina de trabalho. Quando se pensa em mestrado, vem a cabeça um período de muito estudo e trabalho. Às pessoas que estiveram comigo nesta jornada, muito obrigado. Porém, para decidir fazer a prova do mestrado, foi preciso muita coragem e uma pessoa em especial merece o meu agradecimento: minha esposa Isabela. Grandes decisões são difíceis e geram desconforto. Naquele dia, mais do que me apoiando, você estava tomando uma grande decisão ao meu lado. Para fazer grandes escolhas, costumo recorrer a boas conversas com pessoas mais inteligentes do que eu e, mais uma vez, minha madrinha acadêmica, Priscila de Faria Pinto, estava de ouvidos abertos para um bom papo que me ajudou a mudar minha vida.

Grandes amigos foram feitos neste percurso, que me ajudaram a pensar, obter conhecimento e fizeram os dias serem mais divertidos. A equipe do Quimtec foi muito importante neste processo. Em especial, Júlia, Igor, Álvaro e Carolina, vocês são mais que parceiros de profissão!

Quando existe luz, o caminho fica mais direcionado. Na presença de um suporte, conseguimos encontrar forças em momentos difíceis. Estes anos foram de muito crescimento e sou muito grato pela inspiração que o professor Ítalo me dava em cada conversa científica e alegria nas suas piadas inteligentes, pela dedicação incondicional do professor Rodrigo Stephani, que me dava força para querer fazer pesquisa aplicada mesmo o sistema indo contra, e pelo leveza da professora Juliana Costa, mostrando que conhecimento, sabedoria e trabalho duro geram mais que resultados, nos levam a uma vida feliz. Meus mestres, obrigado por me guiarem e fazerem parte deste caminho.

Para finalizar, ao subir um novo degrau, sempre me lembro do primeiro. Nada disso seria possível sem o amor e apoio incondicional da minha mãe, Liliam, que sempre deixou claro a importância dos estudos para mim, das minhas avós Vina e Irani, que nunca me deixaram sem suporte para caminhar, minha madrinha Marlene que sempre me ajudou, minha tia Maria Helena que abriu as oportunidades da minha vida, meu vô Pedro e tio Evandro, que me deram o primeiro livro da

faculdade, meu tio Márcio, com seus ouvidos a postos e meu tio Luís Fernando, sendo um grande exemplo e inspiração.

Fazer este trabalho durante a pandemia do COVID-19 foi um grande desafio. Enfrentá-lo só foi possível porque esta rede de pessoas me deram suporte para seguir em frente e ter resiliência.



## RESUMO

O mercado de nutracêuticos vêm crescendo mundialmente devido à demanda da sociedade em consumir produtos que além de nutrir, entreguem benefícios para o organismo. A natureza é repleta de seres vivos que servem como fonte de moléculas benéficas para o ser humano, sendo as plantas e as algas as principais fontes. Estes compostos são, principalmente, metabólitos secundários e são produzidos como forma de protegerem os seus produtores de alterações externas no ambiente, como predadores e temperatura. Estes compostos possuem instabilidade frente às intemperes do ambiente, como oxigênio, luz e calor e podem apresentar gosto desagradável para o consumidor. Com o intuito de resolver estes problemas, sistemas de encapsulamento são utilizados. Este é montado a partir de macromoléculas anfifílicas que possuem sítios de interação com o composto a ser protegido, englobando-o internamente na sua estrutura e formando uma barreira externa de proteção. Esta é chamada de matriz e a parte interna é o cerne ou núcleo da estrutura. As proteínas lácteas são macromoléculas que podem ser utilizadas no encapsulamento de metabólitos secundários. Além da estrutura da macromolécula, o processo tecnológico utilizado é um importante fator para montar o sistema encapsulante. Diversas técnicas são utilizadas, dentre elas o *spray drying* e a homogeneização são processos importantes na construção da estrutura protetora. O aumento na pressão de homogeneização gera partículas na região micrométrica, as quais podem ser utilizadas como sistemas encapsulantes das biomoléculas ativas. No presente trabalho, a alteração das pressões de homogeneização de dois ciclos 15/5 MPa e 75/5 MPa geraram leites fluidos homogeneizados com 90% das partículas com tamanho inferior a  $1,48 \pm 0,54$  e  $0,64 \pm 0,21$ , respectivamente. Esta diminuição também foi observada no leite em pó produzido a partir do leite fluido homogeneizado, gerando 90% partículas com tamanhos inferiores a  $2,58 \pm 1,96$  e  $1,00 \pm 0,21$  para as pressões de homogeneização 15/5 MPa e 75/5 MPa, demonstrando que estas operações unitárias podem ser utilizadas como ferramenta de encapsulação das biomoléculas ativas na produção de nutracêuticos.

Palavras-chave: Encapsulamento. Proteínas do leite. Nutracêuticos. *Spray drying*. Homogeneização.

## ABSTRACT

The nutraceuticals market has been growing worldwide due to society's demand to consume products that, in addition to nourishing, deliver benefits to the body. Nature is full of living beings that serve as a source of beneficial molecules for humans, with plants and algae being the main sources. These compounds are mainly secondary metabolites and are produced as a way to protect their producers from external changes in the environment, such as predators and temperature. These compounds are unstable in the face of environmental conditions, such as oxygen, light and heat, and may have an unpleasant taste for the consumer. In order to solve these problems, encapsulation systems are used. This is assembled from amphiphilic macromolecules that have sites of interaction with the compound to be protected, encompassing it internally in its structure and forming an external protective barrier. This is called the matrix, shell or wall and the inner part is the core or core of the structure. Milk proteins are macromolecules that can be used in the encapsulation of secondary metabolites. In addition to the structure of the macromolecule, the technological process used is an important factor in assembling the encapsulating system. Several techniques are used, among them spray drying and homogenization are important processes in the construction of the protective structure. The increase in homogenization pressure generates particles in the micrometric region, which can be used as encapsulating systems for active biomolecules. In the present work, the updating of the homogenization pressures of two cycles 15/5 MPa and 75/5 MPa generated homogenized fluid milks with 90% of the particles with sizes smaller than  $1.48 \pm 0.54$  and  $0.64 \pm 0.21$  , respectively. This decrease was also observed in powdered milk produced from homogenized fluid milk, generating 90% of particles with sizes smaller than  $2.58 \pm 1.96$  and  $1.00 \pm 0.21$  for homogenization pressures 15/5 MPa and 75/5 MPa, demonstrating that these unit operations can be used as a tool to encapsulate active biomolecules in the production of nutraceuticals.

Keywords: Encapsulation. Milk proteins. Nutraceuticals. Spray drying. Homogenization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Exemplos dos diferentes tipos de estruturas possíveis para os sistemas de encapsulamento.....24
- Figura 2 – Exemplos de diferentes tipos de sistemas encapsulantes que podem ser produzidos.....26
- Figura 3 – Fluxograma de produção de leite em pó homogeneizado. Nos pontos marcados acima da seta com asterisco, foram feitas análises da distribuição do tamanho das partículas .....29
- Figura 4 – Variação dos tamanhos das partículas de gordura e caseína nos leites fluidos durante o processo de fabricação e em pó reidratado após a fabricação .....37
- Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos leites homogeneizados em pó nas pressões 0/0 MPa (A), 15/5 MPa (B) e 75/5 MPa (C) nas resoluções 1000x (1), 1500X (2) e 2000x (3) .....39
- Figura 6 – Isoterma de sorção dos leites em pó homogeneizados oriundos de diferentes pressões de homogeneização .....41
- Figura 7 – Fluxo do estudo sobre como as proteínas do leite podem ser utilizadas como sistemas de encapsulamento de biomoléculas ativas.....44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Resumo dos ingredientes encapsulados comumente utilizados na produção de nutracêuticos .....	16
Tabela 2	– Exemplos de polímeros utilizados como agentes encapsulantes para nutracêuticos.....	25
Tabela 3	– Indicadores D[4;3] (diâmetro do volume médio), D[5;3] (taxa de formação do creme a partir do tamanho de partículas), Dv90 (volume em que 90% das partículas são encontradas) e partículas com tamanho maior que 1,0 µm dos leites fluidos antes e depois do aquecimento, leites fluidos homogeneizados e concentrados e leite em pó reidratado.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFIC	<i>International Food Information Council</i>
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -lactoalbumina
$\beta$ -LG	$\beta$ -lactoglobulina
BSA	albumina do soro bovino
O/A	Óleo em água
$\mu\text{m}$	Micrômetros
P	Pressão de vapor do alimento
$P_0$	Pressão de vapor de água pura na mesma temperatura
UR	Umidade Relativa
UA	Umidade Absoluta
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PDI	Índice de Polidispersividade
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
BMA	Biomolécula ativa

## LISTA DE SÍMBOLOS

$D[4;3]$  Diâmetro do volume médio

$D[5;3]$  Taxa de formação do creme a partir do tamanho de partículas

$Dv90$  Volume em que 90% das partículas são encontradas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1	Objetivos gerais .....	28
2.2	Objetivos específicos .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1	PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO .....	29
3.2	DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS EM SOLUÇÃO.....	30
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	30
3.4	ISOTERMA DE SORÇÃO.....	31
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
<b>4</b>	<b>MONITORAMENTO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DURANTE A PRODUÇÃO DE LEITE EM PÓ E DO PRODUTO REIDRATADO.....</b>	<b>32</b>
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
<b>5</b>	<b>PROTEÍNAS LÁCTEAS COMO AGENTES ENCAPSULANTES DE BIOMOLÉCULAS ATIVAS .....</b>	<b>43</b>
5.1	BIOMOLÉCULAS ATIVAS.....	44
5.2	PROTEÍNAS DO LEITE.....	45
5.3	ENCAPSULAMENTO.....	47
5.3.1	Técnicas de encapsulamento.....	47
5.3.2	Agentes encapsulantes adicionais.....	47
5.3.3	Técnicas de identificação do encapsulamento.....	48
5.3.4	Eficiência de encapsulação.....	48
5.3.5	Atividade biológica.....	49
5.4	APLICAÇÕES.....	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população tem crescido e, com ela, doenças têm aparecido. Além disso, o nível de consciência das pessoas sobre a importância de cuidarem da sua saúde tem aumentado. Conseqüentemente, os consumidores estão buscando produtos que sejam benéficos para o seu organismo, tanto para prevenir quanto para tratar os problemas de saúde. Para atingir estes objetivos, evitar os efeitos colaterais dos medicamentos e terem maior acesso, o consumo de nutracêuticos tem sido objeto de escolha destes consumidores, ainda mais com a disponibilidade em farmácias e supermercados (LOCKWOOD, 2007).

### 1.1 NUTRACÊUTICOS

De Felice, 1995, conceituou nutracêuticos como “alimentos (ou parte deles) que provêm benefícios médicos e para saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças” (DE FELICE, 1995; LOCKWOOD, 2007). O produto consumido pode ser uma planta, um alimento ou um material de ocorrência natural, podendo ser concentrado ou purificado (LOCKWOOD, 2007). Pela definição, pode-se observar que ele encontra-se na interseção entre a indústria farmacêutica e a nutrição. Entretanto, esta discussão é mais ampla, como é o caso da melatonina, que em alguns países é vendida livremente, enquanto que é comercializada como medicamento em outros (LOCKWOOD, 2007). Com uma evolução conceitual, nutracêutico pode ser um produto nutricional que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e tratamento da doença (PANDEY; VERMA; SARAF, 2010).

A conceituação também tange a discussão com suplemento dietético e alimento funcional (DA COSTA, 2017). Suplemento dietético contém nutrientes derivados de produtos alimentícios na forma concentrado, podendo ser comercializado na forma de cápsulas, pós, líquidos e comprimidos e tem como finalidade suplementar a dieta do consumidor (DA COSTA, 2017; KALRA, 2003). Enquanto que os alimentos funcionais são produtos que possuem os nutrientes necessários para a sobrevivência, incluindo as vitaminas, não agregando benefícios médicos e são comercializados na forma de alimento (KALRA, 2003). Até mesmo este conceito é discutível, de acordo com o *International Food Information Council*



(IFIC), alimentos funcionais são alimentos ou componentes dietéticos que podem promover benefícios além das demandas nutricionais (WILDMAN, 2013).

Além da discussão científica e regulatória, o termo nutracêutico é muito utilizado como estratégia de marketing para fomentar a percepção do consumidor sobre os benefícios do produto, sem precisar consumir um medicamento, uma vez que a regulamentação neste setor é precária (LOCKWOOD, 2007).

O termo também possui conceituação divergente entre os países. Zeisel, S., 1999, propôs que os nutracêuticos sejam classificados como suplementos dietéticos com a biomolécula ativa do alimento na forma concentrada presente em uma matriz não alimentícia para melhorar a saúde em dosagens superiores às disponíveis no alimento original (ZEISEL, 1999). No Canadá, nutracêuticos são considerados produtos desenvolvidos a partir de alimentos, mas vendidos em pílulas, pós, porções e outras formas medicinais desassociadas de alimentos (AARTS, 1998).

Sob a perspectiva legal brasileira, não existe legislação direcionada para estes produtos, o que impacta diretamente na segurança da população (MACHADO; FURINI PUTON; DALLAZEM BERTOL, 2019; SANTOS; ALBERT; LEANDRO, 2019). Entretanto, a RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares, e a Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018, que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares, tratam sobre as quantidades das biomoléculas ativas que podem estar presentes nos suplementos alimentares. Até mesmo nos Estados Unidos, este mercado carece de legislação, sendo comercializado sob suplementos dietéticos. Isso porque drogas não podem ser comercializadas como alimentos, os quais são definidos como produtos utilizados como comida ou bebida ou componentes usados com esta intenção (FINLEY et al., 2014).

Os nutracêuticos são classificados pelos seus constituintes químicos e/ou ingredientes ativos: compostos polifenólicos, carotenoides, antraquinonas, terpenos, alcaloides, glicosinolatos, saponinas e isotiocianatos (DA COSTA, 2017).

## 1.2 BIOMOLÉCULAS ATIVAS

As biomoléculas ativas são compostos que possuem interação com o organismo humano e geram benefícios para ele. Eles são oriundos de plantas e

algas e microrganismos, os quais as produzem como meio de se adaptarem às intemperes externas, como incidência de luz solar, calor e predadores. Esta produção sob circunstâncias secundárias é o que embasa estes compostos serem chamados de metabólitos secundários, não fazendo parte do metabolismo primário dos organismos citados (CARRATÙ; SANZINI, 2005; SILVIA M. FRANCISCATO COZZOLINO, 2012; SIMÕES et al., 2017).

Vários metabólitos secundários são estudados e, geralmente, eles estão presentes em alimentos do reino vegetal, possuem estrutura orgânica, com baixo massa molecular, não são essenciais para a sobrevivência humana e possuem ação protetora ao organismo humano quando consumido em quantidades elevadas (MANACH et al., 2004; SILVIA M. FRANCISCATO COZZOLINO, 2012).

Os metabólitos secundários são biosintetizados a partir dos metabólitos oriundos do metabolismo basal por vias complexas. A classificação destes compostos está relacionada com as vias biossintéticas e as principais classes são: policetídeos, terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides e metabólitos de síntese mista (SIMÕES et al., 2017).

Os compostos comumente utilizados como ingredientes encapsulados na indústria de nutracêuticos, o motivo do encapsulamento e seus exemplos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos ingredientes encapsulados comumente utilizados na produção de nutracêuticos

<b>Ingredientes para nutracêuticos</b>	<b>Motivo do encapsulamento</b>	<b>Exemplos</b>
Compostos fenólicos e antioxidantes	Proteção	Curcumina
Óleos de peixe e ácidos graxos essenciais	Liberção controlada	DHA e ácido linoleico
Vitaminas	Estabilização de oxidação	Hidro e lipossolúveis
Agentes antimicrobianos	Liberção controlada	Nisina
Corantes naturais	Estabilização	Antocianinas e carotenoides
Aromatizantes e óleos essenciais	Mascaramento de sabor, redução da volatilidade e liberção controlada	Terpenos e óleo de limão
Enzimas	Liberção controlada	Protease, glicose-oxidase

Outros	Estabilização e liberação controlada	Minerais, ácidos, álcalis, tampões, adoçantes, agentes de fermentação e micronutrientes
--------	--------------------------------------	---

Fonte: Adaptado de Jafari (2017).

### 1.3 LEITE: CONCEITO, CONSTITUIÇÃO E ESTRUTURA

O leite é definido como uma secreção a partir das glândulas mamárias para nutrir o filhote do mamífero. O ser humano lança mão do leite de outros mamíferos como forma de se alimentar, como é o caso dos leites de vaca, búfalo e ovelha, sendo o leite de vaca o mais consumido, tanto na forma líquida quanto como produtos derivados (WALSTRA, 2006).

O leite de vaca possui na sua constituição: 87,1% de água, 4,0% de gordura, 4,6% de lactose, 3,3% de proteína, 0,7% de minerais, 0,17% de ácidos orgânicos e 0,15% de compostos variados. A lactose é conhecida como o açúcar do leite e é um dissacarídeo composto de glicose e galactose. A maior parte da gordura do leite é formada de triglicerídeos, com ácidos graxos de 2 a 20 carbonos e insaturações de 0 a 4 ligações duplas (WALSTRA, 2006).

As proteínas são divididas em frações da caseína e proteínas do soro. As frações da caseínas são encontradas na forma de micelas. Estas são constituídas pelas  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas. As proteínas do soro são a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA), imunoglobulinas, albumina do soro bovino (BSA), lactoferrina e outras proteínas (DE CARVALHO et al., 2020).

Os compostos mencionados organizam-se em partículas e formam a estrutura coloidal do leite. Como consequência (1) os componentes estão organizados em compartimentos específicos, afetando a sua reatividade, (2) a presença das partículas afetam as propriedades físicas do sistema, como viscosidade e aparência visual, (3) as forças de interação entre as partículas determinam a estabilidade do sistema e (4) a separação dos componentes gordura e caseína é fácil. Todas as partículas apresentam movimento Browniano e carga negativa no pH 6,7 do leite (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

O leite apresenta-se, basicamente, como uma emulsão óleo em água (O/A). Entretanto, este sistema é mais complexo do que uma simples dispersão de

gotículas de gordura em água. Os glóbulos de gordura se organizam dentro de uma membrana constituída de muitos compostos, organizada em uma camada tripla que atua como emulsificante, prevenindo a coalescência dos glóbulos de gordura e a ação de lipases (DEWETTINCK et al., 2008). O tamanho dos glóbulos de gordura depende de vários fatores, como região geográfica e a lactação, impactando nos produtos lácteos (SINGH, 2006).

As micelas de caseína são formadas por água, minerais e proteínas. As frações das caseínas se encontram na forma de caseinatos, os quais se ligam aos cátions de cálcio e magnésio. Os outros sais da micela são o fosfato de cálcio, chamado de fosfato de cálcio coloidal (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

Após a retirada da gordura e das micelas de caseína, resta-se o soro do leite. No qual encontram-se as soro proteínas, carboidratos, minerais, compostos nitrogenados não proteicos e enzimas (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

O leite também é uma dispersão e possui partículas com dimensões coloidais de 10 nm a 100  $\mu$ m de diâmetro, principalmente os glóbulos de gordura e as micelas de caseína. Os glóbulos de gordura possuem tamanho de 0,1 a 20  $\mu$ m com um diâmetro médio de 3 a 4  $\mu$ m (GALLIER et al., 2017; SINGH; GALLIER, 2017; WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006) e as micelas de caseína 50 a 600 nm, com diâmetro médio de 150 nm (FOX; BRODKORB, 2008).

#### 1.4 TRATAMENTO TÉRMICO E SEUS IMPACTOS NA ESTRUTURA DO LEITE

O tratamento térmico é muito utilizado na indústria láctea. Acabar com os microrganismos presentes no leite é principal justificativa para a sua utilização. Além disso, inativação enzimática e alteração de propriedades físico-químicas também são motivos que fazem as indústrias lançarem mão desta operação unitária. O tratamento térmico é a combinação entre temperatura e tempo. Alterações em qualquer um dos fatores levam a resultados diferentes. Após o tratamento térmico, algumas alterações são reversíveis e outras irreversíveis. Consequentemente, saber o objetivo esperado da operação, é importante para a escolha do correto tratamento térmico (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

Ao aplicar o tratamento térmico, parte das proteínas do soro (especialmente a  $\beta$ -LG) liga-se covalentemente às  $\kappa$ -caseínas e às proteínas da membrana do glóbulo de gordura, gerando a agregação das micelas de caseína (o que pode levar a

coagulação). Como consequência, a composição da membrana dos glóbulos de gordura é alterada, principalmente por causa da ligação das soro proteínas (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

### 1.5 HOMOGENEIZAÇÃO E SEUS IMPACTOS NA ESTRUTURA DO LEITE

A homogeneização é feita através da aplicação de uma pressão sobre um líquido forçando-o passar por uma válvula com pequena abertura. Ao passar pela abertura, o líquido entra em uma nova cavidade, na qual a energia potencial é transformada em elevada energia cinética, de acordo com a lei de Bernoulli. A elevada velocidade do líquido forma uma intensa turbulência, transformando a energia cinética em calor. Com isso, o líquido pode começar a ferver, ou seja, ocorre a cavitação (formação súbita de bolhas de vapor causadas por flutuação de pressão). Pode-se observar que é a cavitação o fenômeno responsável pela ruptura dos glóbulos de gordura. Apenas 0,1% da energia usada para romper os glóbulos de gordura é oriundo da energia cinética (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

A homogeneização do leite causa quebra dos glóbulos de gordura em partículas menores. A nova interface entre a gordura e o plasma é feita com as proteínas do leite, principalmente as oriundas das micelas de caseína (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

A pressão de homogeneização utilizada impacta no tamanho das partículas formadas, conseqüentemente, as propriedades físico-químicas do produto final será alterado. Estudos já demonstraram como que a pressão de 20 MPa diminui o tamanho dos glóbulos de gordura (OBEID et al., 2019), como que as propriedades de fluxo de leite concentrado é alterada sob diferentes pressões de homogeneização (0 MPa, 50 MPa, 100 MPa e 150 MPa) (MERCAN; SERT; AKIN, 2018b) e como que o sabor do leite em pó é influenciado pela pressão de homogeneização presente no processo produtivo (PARK; DRAKE, 2017).

A homogeneização da gordura do leite causa um aumento na viscosidade do leite. Isso porque ocorre a formação de *clusters*, nos quais existem vários pequenos glóbulos de gordura aderidos uns aos outros por proteínas oriundas das frações da caseína. Após a homogeneização, um glóbulo de gordura parcialmente rompido pode colidir com um glóbulo de gordura totalmente rompido, conseqüentemente, eles irão formar um *cluster*, no qual frações da caseína irão fazer a ponte de

conexão entre eles. Esta estrutura pode ser rompida facilmente frente a uma turbulência. Entretanto, se a quantidade de proteína for insuficiente para cobrir toda a superfície do glóbulo de gordura, *clusters* serão formados. Conseqüentemente, a formação dos *clusters* são potencializadas sob baixa concentração proteica, elevada concentração de gordura, elevada pressão de homogeneização e um sistema de homogeneização sob as seguintes circunstâncias: baixa temperatura de homogeneização (baixa migração de frações de caseína), reaquecimento intenso (pouca proteína sérica disponível para adsorção) e posterior eleva pressão de homogeneização (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

Uma forma de evitar a formação de *clusters* é a utilização de homogeneização em dois ciclos. Neste processo, uma pressão menor é aplicada sobre o fluido que passou pelo processo de homogeneização. No segundo estágio, a intensidade da turbulência é insuficiente para quebrar os glóbulos de gordura e capaz de romper os *clusters* remanescentes (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

## 1.6 *SPRAY DRYING* E SEUS IMPACTOS NA ESTRUTURA DO LEITE

O processo de secagem por *spray drying* é muito utilizado na produção de leite em pó. Esta operação unitária gera um produto de fácil manuseio e com propriedades similares a do leite original após reconstituição em água. O produto final encontra-se no estado vítreo e na forma amorfa, além disso, o processo consome muita energia. Por isso, entre a homogeneização e a secagem, lança-se mão da concentração, técnica que consome menos energia e gera um concentrado com propriedades físico-químicas importantes para a secagem no *spray dryer* (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

A concentração é realizada sob pressão reduzida e com temperatura de aquecimento inferior à temperatura de fervura do leite, para evitar alterações indesejadas na matriz alimentícia. Retira-se a maior quantidade de água possível nesta etapa, que, na maioria das vezes, tem o seu final limitado pela alta viscosidade atingida pelo leite concentrado no processo. Esta propriedade também é muito importante para a secagem por *spray drying*, já que o tamanho da gotícula formada é dependente da viscosidade do concentrado inserido no equipamento (WALSTRA; WOUNTERS; GEURTS, 2006).

A técnica de *spray drying* envolve a desidratação de gotículas finamente atomizadas dentro de uma câmara com ar quente e seco, convertendo-as em partículas sólidas. O fluido atomizado entra na câmara de secagem e ocorrem trocas térmica e mássica. Os parâmetros utilizados na secagem possuem relação direta com as propriedades dos pós produzidos (SCHUCK, 2009).

O princípio de secagem é a exposição de uma dispersão de finas gotículas de leite pré-concentrado (criadas por um atomizador) que entram dentro da câmara de secagem, na qual também é inserido um ar quente e seco. A exposição, das gotículas do leite pré-concentrado ao ar, gera os gradientes de transferência de temperatura (devido a diferença entre a temperatura da gotícula e do ar) e de massa de água (por causa da diferença entre as pressões de vapor de água entre a gotícula e o ar seco). Isso faz com que a água da gotícula evapore, restando a parte sólida. A formação da gotícula por atomização é muito importante para aumentar a área superficial e, conseqüentemente, a área de troca térmica e mássica, favorecendo a utilização de uma temperatura inferior, o que minimiza os danos no produto final (SCHUCK, 2009).

Pode-se observar que a secagem por *spray drying* é um fenômeno de evaporação da água superficial da gotícula. Conseqüentemente, a cinética do processo depende da superfície de evaporação criada pelo diâmetro das partículas; da diferença na pressão parcial de vapor de água entre a partícula e o ar de secagem; e a taxa de migração de água do interior da gotícula para a superfície. A área superficial da gotícula possibilita que 1L de líquido atomizado em gotículas de 100  $\mu\text{m}$  gere uma área superficial de 60  $\text{m}^2$ , enquanto que uma esfera do mesmo volume teria 0,05  $\text{m}^2$ . A taxa de migração de água do interior para a superfície da gotícula, é de suma importância, para manter a temperatura da gotícula constante durante o processo (SCHUCK, 2009).

As propriedades dos leites em pó são categorizadas em físicas, funcionais, bioquímicas, microbiológicas e sensoriais. As propriedades que mais influenciam na qualidade do leite são: estrutura do pó, solubilidade, conteúdo de água, partículas queimadas, fluidez, capacidade de hidratação, mudanças oxidativas, cheiro, cor e contaminação microbiológica (SCHUCK, 2009). No presente trabalho, as características relacionadas aos resultados encontrados serão apresentadas a seguir.

A estrutura física do leite em pó é definida pela forma em que os seus constituintes químicos estão distribuídos e conectados. A estrutura física do pó é intensamente afetada pela técnica de secagem. Por exemplo, quando o pó é produzido por secagem a rolo, ele possui uma estrutura compacta, de conformação irregular e sem ar ocluso. Já as partículas dos pós oriundos do *spray drying* são esféricas, com diâmetro de 10 a 250  $\mu\text{m}$ , com ar ocluso, com vacúolos pequenos e/ou grandes no seu interior. A superfície é geralmente rugosa, porém ela é lisa quando possui uma composição elevada de proteínas. A principal causa da superfície rugosa é a elevada diferença de temperatura entre o ar de entrada e o pó (CARIC; MILOSLAV KALAB, 1987; SCHUCK, 2009).

A distribuição do tamanho das partículas do pó é uma importante característica para a aparência, reconstituição e características de escoamento do pó, os quais dependem principalmente das condições de atomização e da viscosidade do concentrado. Elevada pressão de atomização e baixa viscosidade do concentrado geram partículas menores (SCHUCK, 2009).

A reidratação do pó é um processo complexo que ocorre em quatro fases: molhabilidade, capacidade de afundamento, dispersabilidade e solubilidade. Ao entrar em contato com a água, o pó começa a absorver água na sua superfície, a qual começa a adentrar na superfície do pó, caracterizando a sua molhabilidade. Após ser molhado, o pó começa a afundar na água, esta capacidade refere-se a capacidade de afundamento. Uma vez imerso, os agregados do pó começam a se separar, liberando as partículas individuais, a velocidade com que este fenômeno acontece representa a dispersabilidade. Para finalizar, ocorre a dissolução e solubilização total do pó, que está vinculado à quantidade de material dissolvido em uma solução saturada (FRANCISQUINI et al., 2020; RICHARD et al., 2013; SCHUCK, 2009).

A atividade de água, também conhecida como pressão de vapor relativa (PVR), é definida como a razão da pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor saturada da água na mesma temperatura:

$$a_a = P/P_o$$

em que  $a_a$  = atividade de água,  $P$  (Pa) = pressão de vapor do alimento e  $P_o$  (Pa) = pressão de vapor de água pura na mesma temperatura. Este valor reflete a



quantidade de água que está disponível no alimento para exercer atividade. Conseqüentemente, ela é muito utilizada como valor de referência para avaliar a deterioração do alimento por microrganismos, enzimas e reações químicas. Esta discussão demonstra que muito mais do que a quantidade de água presente no alimento (teor de água), é importante saber como que esta água está interagindo com a matriz alimentícia (FELLOWS, 2018; PARKIN; FENNEMA; CLADERA-OLIVERA, 2010).

A  $a_a$  de produtos lácteos em pó está intrinsecamente relacionada com a quantidade de água e temperatura. A composição e o estado individual dos componentes são influenciados pelas operações unitárias utilizadas e a composição dos sólidos reflete praticamente o conteúdo proteico. Para valores de  $a_a < 0,2$ , a caseína é a principal estrutura de interação com a água, quando o valor está dentro do intervalo  $0,2 < a_a < 0,6$  a absorção de água reflete o estado físico da lactose (cristalização) e para valores de  $a_a > 0,6$  demonstra-se a absorção de água pelos sais. Para ótima preservação do produto lácteo, o valor deve ser próximo a 0,2 a 25 °C (SCHUCK, 2013; THÉO EFSTATHIOU et al., 2002).

A  $a_a$  apresenta um importante papel durante o processo de desidratação. Por isso é importante o entendimento da isoterma de sorção, a qual provem valores de referência para os processos de secagem (curvas de isoterma de dessorção) e estabilidade de armazenamento (curvas de isoterma de adsorção). Metodologicamente, os produtos finais são inseridos em ambientes com umidade relativa conhecida e são deixados neste ambiente até que o equilíbrio seja alcançado. Quando isso acontece, calcula-se a quantidade de água que o produto perdeu (dessorção) ou ganhou (adsorção) (SCHUCK, 2013).

As propriedades do pó após a secagem por *spray drying* dependem dos parâmetros utilizados durante a operação unitária. A quantidade de água do pó depende da  $a_a$ , a qual depende da umidade relativa (UR) do ar de saída, que, por sua vez, está relacionada com a umidade absoluta (UA) e temperatura do ar de saída. Estes são dependentes do fluxo de produto, temperatura de entrada e UA antes e depois de aquecimento. Além disso, o tamanho da gotícula, o tipo de atomizador e a viscosidade do concentrado afetam a quantidade de água do pó produzido. Além disso, a viscosidade do concentrado está relacionada com tratamento térmico recebido, homogeneização, sólidos totais e composição bioquímica. Diante do apresentado, pode-se observar que as propriedades do pó

produzido no *spray dryer* são intrinsicamente dependentes tanto dos parâmetros desta operação unitária, quanto das anteriores e das características bioquímicas do leite utilizado (SCHUCK, 2013; SCHUCK et al., 2008).

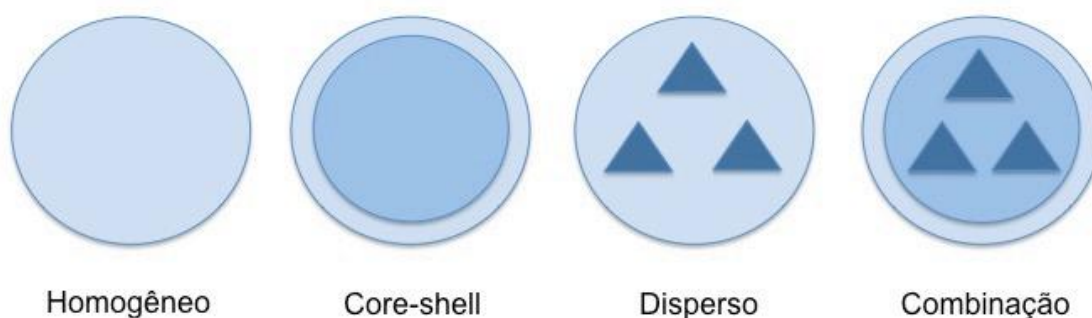
## 1.7 ENCAPSULAMENTO: CONCEITOS E TÉCNICAS

Encapsulação é o processo tecnológico de aprisionar compostos nos estados sólido, líquido ou gasoso dentro de uma matriz, na qual ele pode ser liberado de forma controlada diante de determinada circunstância (JAFARI, 2017; NEDOVI et al., 2011). O sistema de encapsulamento foi embasado no núcleo celular, em que a informação genética é protegida por uma membrana porosa que seleciona o que entra e sai do núcleo celular (JIZOMOTO et al., 1993).

Sob uma perspectiva simples, a cápsula pode ser composta por uma esfera pequena recoberta por uma barreira monolítica. Os ingredientes dentro da cápsula são chamados de material central, fase interna, encapsulado e fase carregada ou cheia, enquanto que a camada externa é nomeada como barreira, concha, revestimento, matéria de barreira, membrana de concha, material carreador, agente encapsulante, fase externa ou matriz (JAFARI et al., 2008; MAHDAVI et al., 2014).

A matriz pode ser feita por múltiplos componentes (proteínas, polissacarídeos, surfactantes, lipídeos, água, e/ou minerais) e ela pode ter uma estrutura simples (homogênea) ou complexa (heterogênea), as quais dependem dos materiais e do processo utilizados e podem ser visualizadas na Figura 1 (NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS, 2012). Alguns biopolímeros utilizados como agente encapsulante podem ser visualizadas na Tabela 2 (JAFARI, 2017).

Figura 1 - Exemplos dos diferentes tipos de estruturas possíveis para os sistemas de encapsulamento



Fonte: Adaptado de Jafari (2017).

O objetivo de encapsular biomoléculas ativas, ao produzir nutracêuticos, é reduzir os danos e mudanças indesejadas durante o processamento do produto, assim como proteger a biomolécula ativa de condições digestivas. Por isso, desenvolver um sistema carreador é fundamental (FUCHS et al., 2010; JAFARI, 2017; KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Tabela 2 - Exemplos de polímeros utilizados como agentes encapsulantes para nutracêuticos

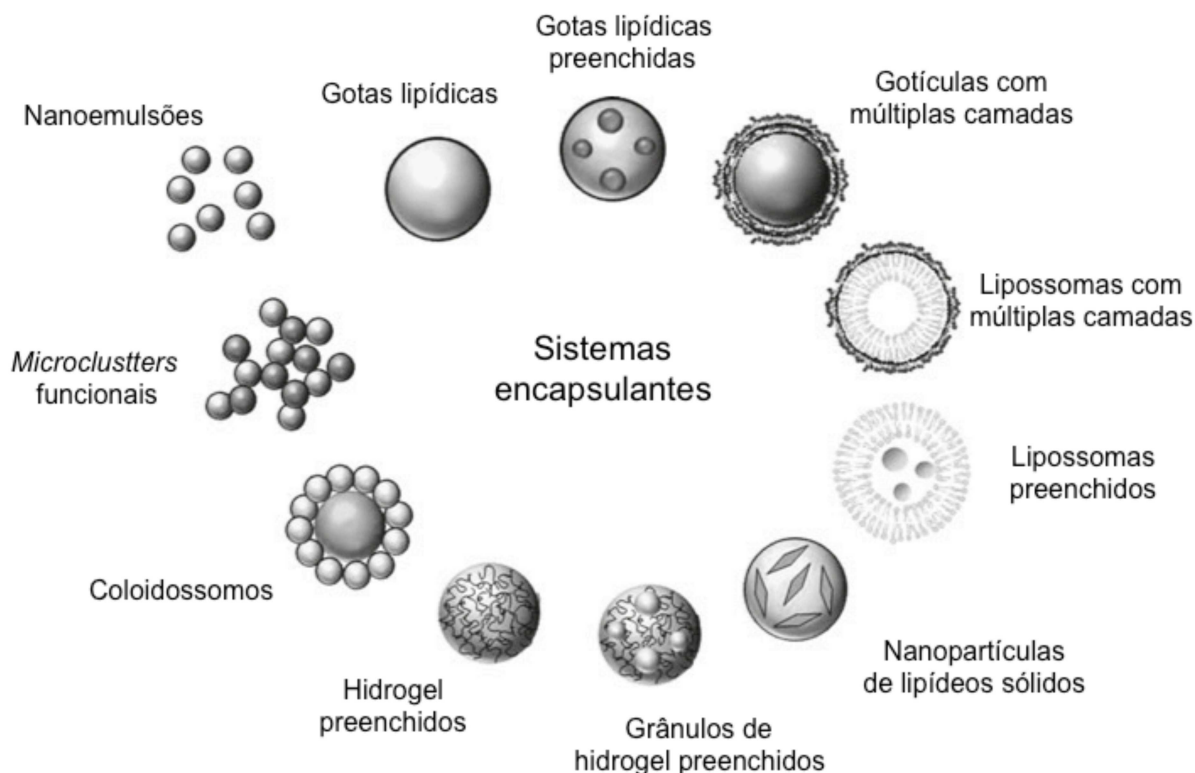
<b>Polissacarídeos</b>	<b>Gorduras e ceras</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Compostos sintéticos</b>
Goma arábica	Óleos vegetais hidrogenados	Gelatina	Paclitaxel
Amidos modificados	Cera de abelha	Proteínas do soro do leite ( <i>Whey proteins</i> )	mPEG <sub>5000</sub> -b-p
Maltodextrinas	Lecitina	Caseinato de sódio	Poliacrilonitrilo
Alginatos	Triglicérides de cadeia média	Proteínas da soja	Policaprolactona
Pectina		Glúten	Poli-ácido láctico
Carragenas		Caseínas	
Derivados de celulose		Zein	
Quitosanas		Fibroína da seda	
Ciclodextrinas			
Partículas de amido			

Fonte: Jafari (2017).

Para desenvolver um sistema de encapsulamento direcionado a uma funcionalidade específica, é necessária a combinação de elementos e técnicas adequadas. Ao elaborar um sistema encapsulante, é preciso levar em consideração aspectos chave como: propriedades físicas, reológicas e organolépticas, estabilidade química e física, local da ação biológica, ingrediente de grau alimentício, custo, compatibilidade com a matriz alimentícia, capacidade encapsulante e mecanismo de liberação (GÓMEZ-MASCARAQUE; LAGARÓN; LÓPEZ-RUBIO, 2015; JAFARI, 2017; NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS, 2012). Além disso, é importante levar em consideração as propriedades das partículas que serão incorporadas no sistema encapsulante, como digestibilidade, estrutura química, distribuição do tamanho de partícula, densidade de carga, permeabilidade, resistência ao pH, temperatura e enzimas e propriedades físico-químicas (DONSI et al., 2011; JAFARI, 2017; KHAYATA et al., 2012; MCCLEMENTS; LI, 2010; NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS, 2012).

Em princípio, os sistemas encapsulantes podem ser produzidos a partir de vários materiais usando diferentes operações unitárias. Diante destas possíveis combinações, diversos sistemas já foram produzidos (Figura 2). Se tratando da indústria alimentícia, apenas alguns destes são utilizados, sendo que os outros estão presentes nas indústrias farmacêutica e cosmética. Isso porque, no ramo alimentício, os ingredientes utilizados na construção destes sistemas precisam ser de grau alimentício e baratos, sendo a fabricação reprodutível, robusta e econômico (NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS, 2012).

Figura 2 - Exemplos de diferentes tipos de sistemas encapsulantes que podem ser produzidos



Fonte: Adaptado de Nissim Garti & Julian McClements (2012).

As operações unitárias de produção dos sistemas encapsulantes são classificadas, geralmente, como: *top-down*, *bottom-up* ou combinação de métodos. Nos métodos *top-down*, a matéria-prima é quebrada em partículas menores que formam o sistema encapsulante, como ocorre na homogeneização, na trituração e no *spray drying*. Nos métodos *bottom-up*, os sistemas são preparados por montagem, a qual pode ser espontânea (formação de micela e microemulsão) ou direcionada (deposição eletrônica) (NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS, 2012).

Como os sistemas encapsulantes são os mais diversos possíveis, para conseguir aprisionar a moléculas de variadas propriedades, diferentes tecnologias são utilizadas, dentre elas existem: *spray drying*, *spray chilling*, *spray cooling*, extrusão, leite fluidizado, extrusão por centrifugação, *freeze drying*, coacervação, polimerização interfacial e inclusão molecular (JAFARI, 2017).

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho está dividido entre objetivo geral e objetivos específicos.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Demonstrar como que as macroestruturas do leite e as operações unitárias de homogeneização e *spray drying* podem ser utilizadas na construção de sistemas encapsulantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a variação no tamanho das partículas durante o processo produtivo do leite em pó;
- Demonstrar como que a variação na pressão de homogeneização impacta no tamanho das partículas durante a produção do leite em pó;
- Demonstrar como que é possível produzir nanosistemas encapsulantes variando a pressão de homogeneização na produção do leite em pó;
- Apresentar como que as proteínas lácteas têm sido utilizadas como macromoléculas para o encapsulamento de compostos bioativos;
- Apresentar as técnicas de produção e caracterização dos sistemas encapsulados.

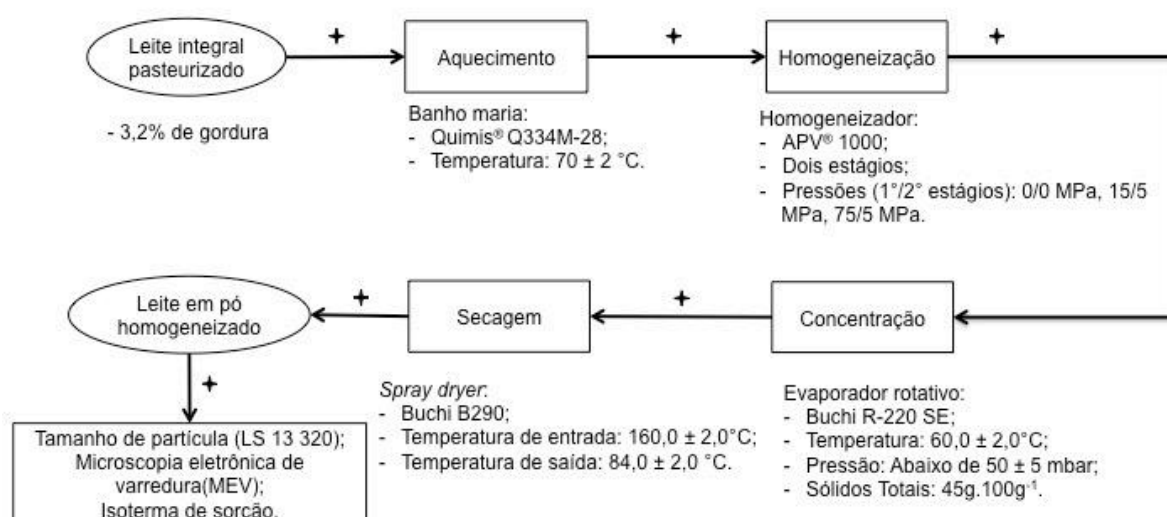
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em dois capítulos. No primeiro é apresentado o estudo de variação dos perfis de distribuição dos tamanhos de partículas durante a produção do leite em pó alterando-se a pressão de homogeneização. O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica narrativa sobre como as proteínas lácteas estão sendo utilizadas como agentes encapsulantes de biomoléculas ativas.

#### 3.1 PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO

O fluxo de processo de produção do leite em pó nanoparticulado seguiu a sequência exibida no fluxograma abaixo (Figura 3) e foi realizado em triplicata para cada uma das pressões de homogeneização.

Figura 3 – Fluxograma de produção de leite em pó homogeneizado. Nos pontos marcados acima da seta com asterisco, foram feitas análises da distribuição do tamanho das partículas



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

### 3.2 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS EM SOLUÇÃO

As amostras foram adicionadas direta e lentamente ao reservatório do analisador de Tamanho de Partículas por Difração a Laser Beckman Coulter LS 13320 com Módulo Líquido Aquoso (ALM), que continha água à temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até atingir o nível mínimo de obscurecimento. Sob recirculação, os dados foram coletados após 90 segundos até obter distribuições estáveis de tamanho de partícula. O índice de refração foi de 1,57 para região menor que  $1\text{ }\mu\text{m}$  e 1,47 para região maior que  $1\text{ }\mu\text{m}$ . Os dados foram representados pela porcentagem (%) de volume ocupado pelas partículas em função do tamanho. O software Beckman Coulter (caracterização de partículas) versão 5.03 foi aplicado para determinar a análise dos dados obtidos. Os indicadores  $D[4;3]$  (diâmetro do volume médio),  $D[5;3]$  (taxa de formação do creme a partir do tamanho de partículas),  $Dv_{90}$  (volume em que 90% das partículas são encontradas) e partículas com tamanho maior que  $1\text{ }\mu\text{m}$  foram utilizados para avaliar o perfil do tamanho de partículas.

### 3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os pós foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (modelo: TM 3000; marca: Hitachi Ltd.) usando magnitudes de 100x; 300x; 500x; 1000x; 1500x; 2000x.

Para avaliação do comprimento das partículas obtidas nas imagens (2000x) do MEV foi utilizado o software ImageJ (MARCOMINI; DE SOUZA, 2011). Com tal avaliação, obtém-se o valor de SPAN que corresponde à largura ou intervalo da distribuição de tamanho baseado no volume, sendo calculado pela Equação:  $\text{Span} = (Dv_{90} - Dv_{10}) / Dv_{50}$ . Em que:  $Dv_{90}$  significa que 90% das partículas possuem valores iguais ou inferiores ao resultado encontrado;  $Dv_{10}$  é o valor em que 10% das partículas possuem valores iguais ou inferiores ao resultado encontrado;  $Dv_{50}$  é o valor em que 50% das partículas possuem valores iguais ou inferiores ao resultado encontrado.

O valor de SPAN foi usado para calcular o valor do índice de polidispersividade (PDI) (HORIBA SCIENTIFIC, 2013), que se refere ao grau de não uniformidade da distribuição de tamanho das partículas.



### 3.4 ISOTERMA DE SORÇÃO

Para obtenção das isotermas de sorção pesaram-se alíquotas de 2,0 a 3,0 g de cada leite em pó. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas por 21 dias em ambientes com distintas umidades relativas do ar (11,1%, 33,1%, 43,2%, 54,4% e 75,5%), visando obtenção de cinco diferentes atividades de água (0,111; 0,331; 0,432; 0,544 e 0,755). Utilizou-se para controle dessas umidades e atividades de água, soluções saturadas de LiCl, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e NaCl respectivamente. Após os 21 dias, as amostras foram novamente pesadas e os resultados obtidos permitiram a elaboração do gráfico da isoterma de sorção para cada um dos tratamentos.

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente usando o software SPSS 23.0 (SPSS, versão 23, IBM Corp. Armonk, NY, USA). Diferenças significativas entre os valores de médias das replicatas de cada resultado foram analisados usando análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey *post-hoc* com 95% de nível de confiança.

#### 4 MONITORAMENTO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DURANTE A PRODUÇÃO DE LEITE EM PÓ E DO PRODUTO REIDRATADO

O conceito de produtos nanoparticulados ainda está em discussão na atualidade, os mesmos podem ser considerados substâncias que contêm partículas de pelo menos uma dimensão na região nanométrica (menor que 100  $\mu\text{m}$ ) ou ainda sistemas que exibem partículas de 10 a 100 nm ou inferiores a 0,2  $\mu\text{m}$  (LEE et al., 2011; TADROS et al., 2004).

Ao diminuir o tamanho das partículas do leite para a escala nanométrica, novas possibilidades tecnológicas são alcançadas, ganhando a atenção do setor lácteo. Dentre estas possibilidades, podem-se destacar, o melhoramento da estabilidade de emulsões, a melhora da digestibilidade dos produtos, o aumento da absorção de nutrientes e novos mecanismos de liberação de compostos ativos para o organismo (BAARS et al., 2016; CALVO-LERMA et al., 2018; SINGH; GALLIER, 2017).

O processo de homogeneização do leite é utilizado para alterar o perfil da distribuição do tamanho de partículas dos seus macronutrientes (como micelas de caseína e glóbulos de gordura) ao se aplicar uma pressão. O perfil de tamanho de partículas após o processo é dependente da pressão aplicada (FOX; BRODKORB, 2008; GALLIER et al., 2017; SANDRA; DALGLEISH, 2005; SINGH; GALLIER, 2017). Ao fazer essa operação unitária, pode-se observar o aparecimento de uma região intermediária do tamanho de partículas entre os tamanhos das micelas de caseína e dos glóbulos de gordura. Este fenômeno é explicado pela reorganização que estas estruturas sofrem ao diminuírem os tamanhos de suas macroestruturas durante a homogeneização. Ao se reorganizarem, elas formam estruturas lipídico-proteicas, em que os glóbulos de gordura são estabilizados pelas proteínas oriundas das micelas de caseína (CANO-RUIZ; RICHTER, 1997; THIEBAUD et al., 2003).

A homogeneização é um processo utilizado durante a fabricação de leite em pó. As nanopartículas, oriundas desta etapa, seguem para a concentração e a secagem por *spray drying*. Como consequência, as propriedades do leite em pó, como a reidratação, serão dependentes do tamanho das partículas geradas pela homogeneização (FRANCISQUINI et al., 2020; SCHUCK et al., 2016).

Trabalhos já foram realizados para demonstrar como a pressão de homogeneização diminui o tamanho das partículas de gordura a 20 MPa (OBEID et

al., 2019), afeta as propriedades do fluxo quando aplicadas diferentes pressões no concentrado (0 MPa, 50 MPa, 100 MPa e 150 MPa) (MERCAN; SERT; AKIN, 2018b) e como afeta a estabilidade do sabor do leite em pó diante diferentes pressões de homogeneização no processo (PARK; DRAKE, 2017). Porém, até onde sabemos, nenhuma avaliou a distribuição do tamanho das partículas ao longo processo produtivo de leite em pó integral nas pressões de homogeneização de dois ciclos de 0/0 MPa, 15/5 MPa e 75/5 MPa.

O objetivo do trabalho foi verificar a influência das pressões de homogeneização (0/0 MPa, 15/5 MPa e 75/5 MPa) na distribuição do tamanho de partículas em solução ao longo das etapas de produção do leite em pó integral e do produto reidratado.

#### 4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na Tabela 3 que existe uma alteração na distribuição do tamanho de partículas dos respectivos leites devido ao processo de homogeneização. Os indicadores  $D[4;3]$ ,  $D[5;3]$ ,  $Dv90$  e porcentagem de partículas com volume superior a  $1,0 \mu\text{m}$  foram utilizados.

Como um primeiro resultado, por meio desta tabela, pode-se verificar que ocorreu um aumento, de cerca de 2 vezes no valor de  $Dv90$ , devido ao aquecimento de  $70^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  do leite integral pasteurizado. Ou seja, o aumento da temperatura do leite levou a um aumento do tamanho das partículas possivelmente pela agregação das partículas do produto. O aumento do tamanho das partículas devido ao aquecimento de amostras de leite desnatado já foi retratado na literatura, sendo este aumento inferido à desnaturação de proteínas do soro que ocorrem com maior facilidade em temperaturas superiores à  $70^\circ\text{C}$  (ANEMA; LOWE; LEE, 2004). Em associação, também são encontrados resultados da distribuição do tamanho de partícula em misturas de proteína de soro de leite com caseína não aquecidas em que grande parte estava na faixa submicrômica (SINGH et al., 2019). No mesmo trabalho, houve um aumento no tamanho das partículas quando as amostras foram tratadas por *ultra high temperature* (UHT), assim como para aquelas amostras que foram adicionadas de maior teor de proteína de soro de leite, demonstrando exatamente que a elevação da temperatura e a maior concentração de proteínas

podem aumentar os agregados proteicos ocasionando o aumento do tamanho das partículas de produtos lácteos.

Tabela 3 – Indicadores D[4;3] (diâmetro do volume médio), D[5;3] (taxa de formação do creme a partir do tamanho de partículas), Dv90 (volume em que 90% das partículas são encontradas) e partículas com tamanho maior que 1,0  $\mu\text{m}$  dos leites fluidos antes e depois do aquecimento (LFAA e LFDA, respectivamente), leites fluidos homogeneizados e concentrados (LFH e LFC, respectivamente) e leite em pó reidratado (LPR).

Produtos	Pressão de homogeneização (1°/2° estágios) MPa	D[4;3] ( $\mu\text{m}$ )	D[5;3] ( $\mu\text{m}^2$ )	Dv90 ( $\mu\text{m}$ )	>1,0 $\mu\text{m}$ (% volume)
LFAA	X	3,391±0,066 <sup>a</sup>	3,773±0,077 <sup>a</sup>	5,384±0,165 <sup>a</sup>	87,933±0,886 <sup>a</sup>
LFDA	X	3,145±0,041 <sup>b</sup>	3,534±0,034 <sup>b</sup>	5,097±0,105 <sup>b</sup>	86,775±1,318 <sup>b</sup>
LFH	0/0	3,293±0,105 <sup>a</sup>	3,677±0,113 <sup>a</sup>	6,080±1,420 <sup>b</sup>	86,100±2,400 <sup>a</sup>
	15/5	0,804±0,139 <sup>c</sup>	1,032±0,270 <sup>b</sup>	1,480±0,540 <sup>a</sup>	29,300±1,900 <sup>b</sup>
	75/5	0,275±0,015 <sup>b</sup>	0,365±0,033 <sup>c</sup>	0,640±0,210 <sup>a</sup>	2,400±4,100 <sup>c</sup>
LFC	0	3,664±0,123 <sup>a</sup>	3,664±0,123 <sup>a</sup>	5,740±0,870 <sup>b</sup>	86,100±2,100 <sup>a</sup>
	15/5	0,872±0,007 <sup>b</sup>	0,872±0,007 <sup>b</sup>	1,360±0,070 <sup>a</sup>	26,500±5,300 <sup>b</sup>
	75/5	0,538±0,020 <sup>c</sup>	0,538±0,020 <sup>c</sup>	0,790±0,250 <sup>a</sup>	5,700±3,300 <sup>c</sup>
LPR	0/0	8,383±3,356 <sup>a</sup>	16,042±8,710 <sup>a</sup>	17,460±9,450 <sup>a</sup>	84,200±2,600 <sup>a</sup>
	15/5	0,711±0,042 <sup>b</sup>	0,873±0,033 <sup>b</sup>	2,580±1,960 <sup>b</sup>	31,800±3,000 <sup>b</sup>
	75/5	1,280±1,385 <sup>b</sup>	2,636±2,805 <sup>b</sup>	1,000±0,210 <sup>b</sup>	10,900±4,400 <sup>c</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Além deste resultado, verifica-se que tanto o leite fluido homogeneizado quanto o leite fluido concentrado exibiram, com o aumento da pressão de homogeneização, redução estatística nos valores dos parâmetros D[5;3], D[4;3] e >1,0  $\mu\text{m}$ . Isto pode nos afirmar que quanto menor a pressão de homogeneização, maior é o tamanho das partículas, ou seja, o processo de homogeneização influencia na quantidade de partículas na região inferior a 1,0  $\mu\text{m}$ . Os produtos homogeneizados demonstraram uma maior concentração de partículas na região

menor que 1,0  $\mu\text{m}$  (correspondente a região das micelas de caseína) e menor concentração na região superior a 1,0  $\mu\text{m}$  (correspondente aos glóbulos de gordura e partículas não reidratadas). A única exceção, foi encontrada para o parâmetro Dv90, que resultou em valores diferente estatisticamente entre os produtos não homogeneizados e homogeneizados enquanto que foi encontrado valor idêntico nos produtos homogeneizados (15/5 e 75/5). Pode-se inferir, portanto, que o processo de homogeneização foi capaz de diminuir o tamanho das partículas, apesar de demonstrar também, que o aumento da pressão de homogeneização de 15/5 MPa para 75/5 MPa, não exerceu influência no aumento da quantidade de partículas em valores abaixo de 1,5  $\mu\text{m}$ . Na literatura, encontra-se estudo em que o efeito do aumento da pressão de homogeneização na viscosidade, tamanho de partícula e características microbiológicas de leite desnatado e integral concentrado já foi avaliado (MERCAN; SERT; AKIN, 2018a). No mesmo artigo, os pesquisadores verificaram uma diminuição em parâmetros D[4;3] e D[3;2] com aumento da pressão de homogeneização até certo ponto. A partir da pressão de 30 MPa para leite integral concentrado e a partir de 50 MPa para leite desnatado concentrado, ocorreu um aumento do tamanho das partículas. O primeiro caso foi correlacionado ao aumento da tendência de agregação dos glóbulos de gordura do leite e diminuição do diâmetro médio dos glóbulos de gordura em pressões mais elevadas (acima de 80 MPa) o que foi relatado em trabalhos anteriores (KIELCZEWSKA; HAPONIUK; KRZYŻEWSKA, 2000). Já, no segundo caso, sugeriu o aumento do tamanho das partículas devido à formação de agregados de proteína de soro de leite desnaturados com caseína pelo aumento da pressão de homogeneização devido ao aumento da temperatura de saída do equipamento.

Em relação aos leites em pó fabricados no presente estudo, pode-se verificar, ainda na Tabela 1, que houve redução significativa dos valores dos pós homogeneizados quando comparados com os pós não homogeneizados quando se analisou os parâmetros D[4;3], D[5;3] e Dv90. Isto demonstra, mais uma vez, que ocorreu uma diminuição do tamanho de partículas dos produtos que foram homogeneizados, mostrando que a operação unitária exerceu o papel esperado de redução do tamanho das partículas do produto. Vale ressaltar, que não houve diferença estatística em relação ao parâmetro  $>1,0 \mu\text{m}$ , quando se aumentou a pressão de homogeneização de 15/5 MPa para 75/5 MPa, deixando claro que o maior gasto de energia para aumentar a pressão de homogeneização não se torna

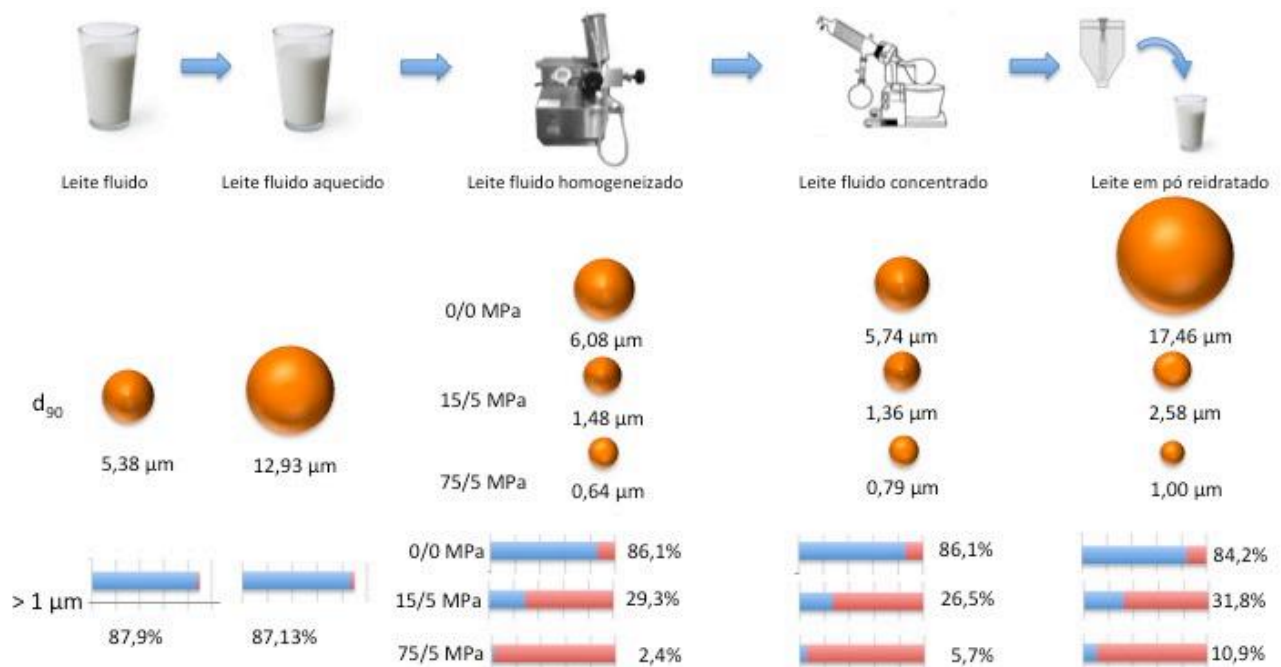
necessário, visto que para atingir o objetivo de obter partículas na região menor que  $1,0 \mu\text{m}$ , a menor pressão de homogeneização já é suficiente. Song et al. (2013) realizaram homogeneização de alta pressão para reduzir o tamanho de partículas isolado de proteína de soja, neste trabalho os autores concluíram que o tamanho médio das partículas diminuiu drasticamente e gradualmente após sucessivas passagens no homogeneizador (SONG et al., 2013). E por fim, Park & Drake (2017) fabricaram leite em pó integral por meio de leite integral pasteurizado padronizado, evaporado para 50% de sólidos (p/p), homogeneizado em 2 etapas com pressões variáveis (0/0 MPa, 5,5/1,4 MPa, 11,0/2,8 MPa ou 16,5/4,3 MPa) e seco por *spray dryer* piloto. Realizaram neste projeto a determinação do tamanho de partículas com obtenção dos parâmetros  $Dv_{90}$  e  $D[4;3]$ . Como conclusão, os autores obtiveram diminuição do tamanho de partículas do produto não homogeneizado para o produto homogeneizado a 5,5/1,4 MPa. Em contrapartida, com o aumento da pressão de homogeneização para 11,0/2,8 MPa ou 16,5/4,3 MPa não resultou em modificação no tamanho das partículas, quando comparado com o produto não homogeneizado, ou seja, aumentando a pressão de homogeneização as partículas tenderam a aumentar de tamanho (PARK; DRAKE, 2017).

Estes resultados demonstram que o aumento na pressão de homogeneização produz fluidos com diferentes distribuições de tamanhos de partícula. Entretanto, ao reidratar os leites em pó homogeneizados, não houve diferença estatisticamente significativa entre as pressões 15/5 MPa e 75/5 MPa, havendo diferença estatisticamente significativa entre os produtos homogeneizados e o que passou pelo homogeneizador a 0/0 MPa. Os dados apresentados para distribuição de tamanho de partícula do leite homogeneizado e o seu perfil de reidratação vão ao encontro da literatura (FRANCISQUINI et al., 2020; HAYES & KELLY, 2003).

Dentre os resultados apresentados, o percentual de partículas com volume superior a  $1 \mu\text{m}$  após reidratação foi o de maior relevância. As amostras homogeneizadas a 0/0 MPa, 15/5 MPa e 75/5 MPa ( $1^\circ/2^\circ$  estágios) geraram valores de  $84,20 \pm 2,60$ ,  $31,80 \pm 3,00$  e  $10,90 \pm 4,40$ , respectivamente. Isto demonstra que o processo de homogeneização é capaz de diminuir significativamente o volume das partículas após reidratação dos pós homogeneizados. Este aumento na quantidade de partículas menores que  $1,0 \mu\text{m}$ , justifica o uso das pressões de homogeneização para produzir produtos na escala manométrica com melhor digestibilidade (GARCIA, ANTONA, ROBERT, LOPEZ, & ARMAND, 2014; MICHALSKI & JANUEL, 2006; YE,

CUI, DALGLEISH, & SINGH, 2017), para aumentar a liberação de ácidos graxos (TUNICK et al., 2016), serem usados como sistemas de liberação de nutracêuticos (OPREA, 2017), no desenvolvimento de produtos com melhor fluidez (MERCAN et al., 2018b) e com melhor reidratação (Francisquini et al., 2020). A influência das operações unitárias durante o processo e os seus indicadores podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 4 - Variação dos tamanhos das partículas de gordura e caseína nos leites fluidos durante o processo de fabricação e em pó reidratado após a fabricação. As cores em azul representam o percentual de partículas maiores que 1,0  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A distribuição do tamanho de partícula pode ser utilizada para calcular o índice de reidratação (IR), baseando-se na dispersividade e solubilidade do leite em pó integral. Este IR é utilizado como uma ferramenta de classificação do leite em pó: baixa ( $\text{IR} < 5$ ), intermediário ( $5 \geq \text{IR} \leq 20$ ) e alto ( $20 > \text{IR} \leq 100$ ) (FRANCISQUINI et al., 2020). Analisando a distribuição do tamanho de partícula dos leites em pó homogeneizados, pode-se observar que para os pós referentes as pressões de homogeneização de 0/0 MPa, 15/5 MPa e 75/5 MPa (1°/2° estágios), as partículas menores que 1,0  $\mu\text{m}$  foram 15,8 %, 68,2 %, e 89,1 %, respectivamente. De acordo com IR, pode-se inferir que os pós do presente trabalho possuem boa dispersividade e solubilidade ao passo que aumentam-se as pressões de homogeneização. O leite

em pó oriundo da pressão 0/0 MPa possui uma dispersividade e solubilidade intermediária, enquanto que os pós oriundos das pressões de homogeneização de 15/5 MPa e 75/5 MPa são de alta dispersividade e solubilidade. De acordo com o mesmo trabalho, o IR pode ser utilizado como meio de direcionar a tomada de decisão sobre a utilização do pó. Leites em pó com IR maiores que 20 devem ser usados diretamente, porque eles podem atingir eficazmente a estrutura original do leite. Por outro lado, leites em pós com valores de IR menores ou igual a 20 devem ser usados como ingredientes na produção alimentícia (FRANCISQUINI et al., 2020).

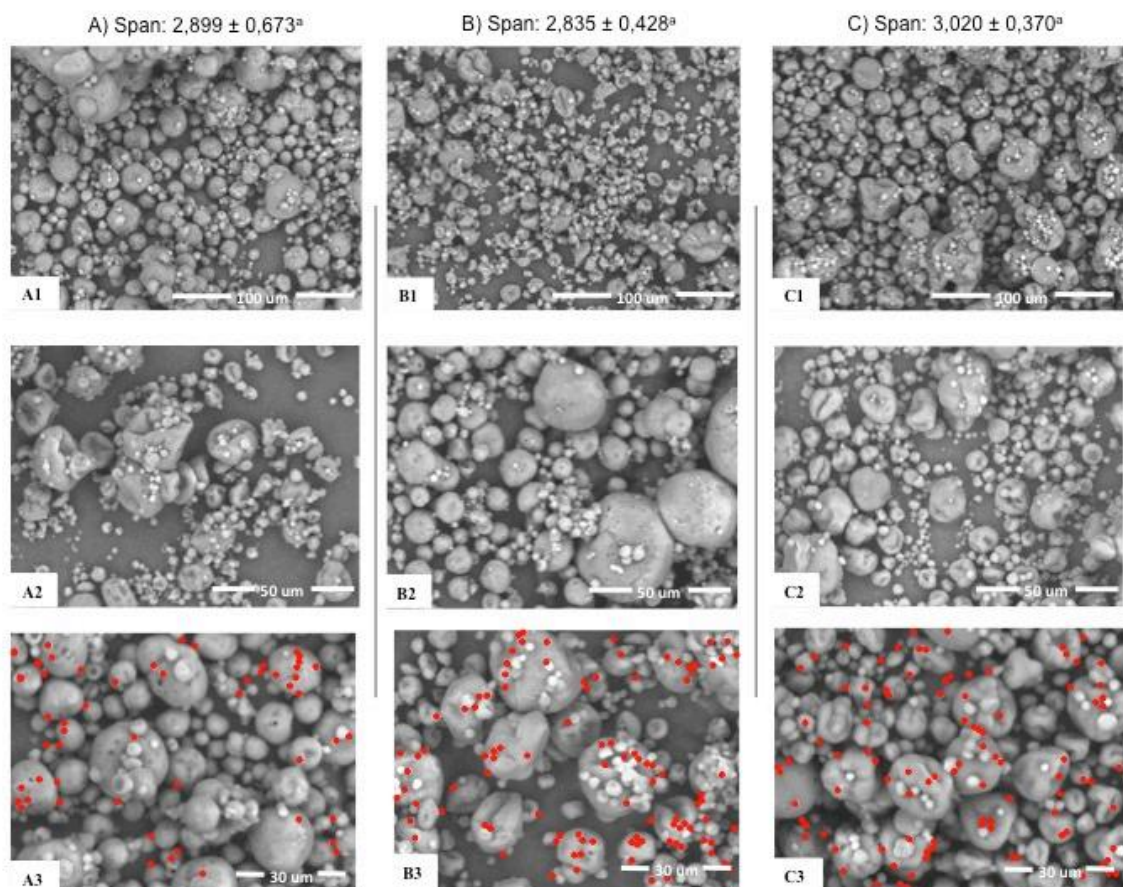
O indicador  $D[5;3]$  representa o índice de formação de creme por tamanho de partícula. Porém, para que ele seja utilizado, é preciso fazer a desproteínação, a qual não foi realizada neste trabalho. Por isso, não foi feita uma discussão sobre estes resultados (WALSTRA & OORTWIJN H., 1975).

Analisando a Figura 5 verifica-se que as amostras analisadas obtiveram estrutura típica de produtos formulados via *spray dryer*. As morfologias das partículas de pós formulados via *spray dryer*, de acordo com Walton & Mumford (1999), podem ser classificadas estruturalmente em três tipos principais: aglomeradas, *skin-forming* e estrutura cristalina. Produtos lácteos quando secos por *spray dryer*, em sua grande maioria, exibem um aspecto de *skin-forming*, sendo que tais partículas podem apresentar, de acordo com as condições da secagem e tipo de alimento, característica em sua morfologia como presença de colapso/enrugamento, bolhas/crateras, aglomeração, rachaduras/fissuras, vacuolização e arredondamento das partículas, as quais podem estar na forma oca ou sólida. Observando as amostras obtidas para os pós formulados no presente trabalho, infere-se que as partículas podem ser classificadas com estrutura típica de produtos formulados via *spray dryer*, exibindo em sua morfologia a presença de colapso/enrugamento, aglomeração e arredondamento das partículas em basicamente todas as microestruturas analisadas. Estas características também foram relatadas em café (arredondamento), iogurte (aglomeração), ovo e leite desnatado (colapso/enrugamento) secos via *spray dryer*, ainda no trabalho proposto por Walton & Mumford (1999). Este colapso/enrugamento das partículas, foi encontrado com frequências no leite em pó aqui formulado, o que pode ser correlacionado ao fato de que partículas com aparência *skin-forming* são constituídas por uma fase contínua



não líquida, que pode ser composta por proteínas desnaturadas, como caseína ou albuminas (WALTON & MUMFORD, 1999).

Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos leites homogeneizados em pó nas pressões 0/0 MPa (A), 15/5 MPa (B) e 75/5 MPa (C) nas resoluções 1000x (1), 1500X (2) e 2000x (3). \*A média dos parâmetros seguidas por letras iguais não se diferenciam estatisticamente no teste Tukey HSD no nível de 5% de estabilidade aplicados na mesma linha. Os pontos vermelhos nas figuras A3, B3 e C3 são marcações dos pós com tamanho menor que 1,0  $\mu\text{m}$ .



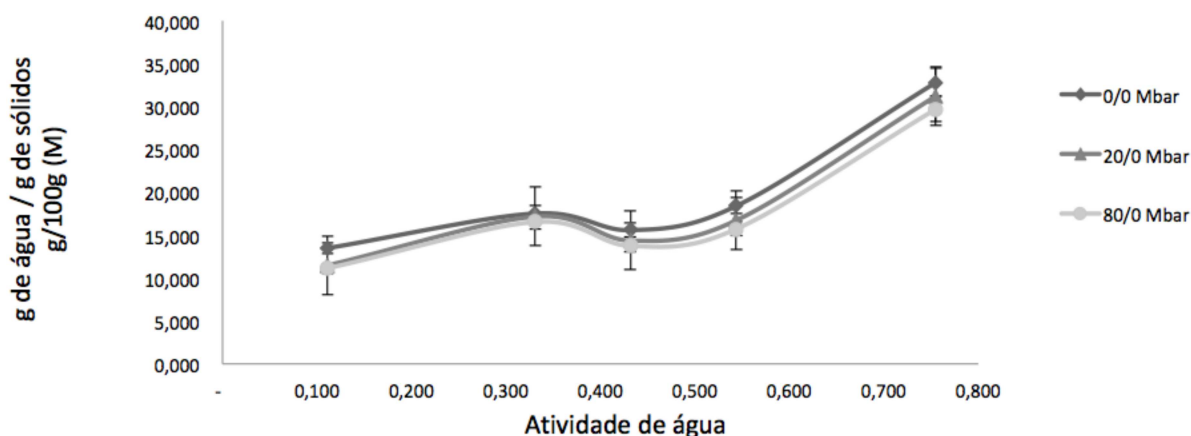
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Uma amostra monodispersa tem elevado grau de uniformidade (valor de PDI menor que 0,4), enquanto que uma amostra polidispersa tem baixo grau de uniformidade (valor de PDI maior que 0,4) (Horiba scientific, 2013). Analisando os valor de PDI (SPAN) dos leites em pó na Figura 5, pode-se observar que eles são polidispersos. Não houve diferença estatisticamente significativa na polidispersividade dos pós, demonstrando que as pressões de homogeneização

utilizadas não impactaram no PDI. Entretanto, ao marcar as partículas com valores iguais ou inferiores a 0,1  $\mu\text{m}$  (Figuras 5, A3, B3 e C3), é possível constatar uma maior quantidade de marcadores nas Figuras 5, B3 e C3, as quais correspondem aos pós oriundos das homogeneizações de 15/5 MPa e 75/5 MPa, respectivamente. Isto demonstra que mesmo não havendo diferença significativa estatisticamente, existe uma maior quantidade de partículas menores ou iguais a 0,1  $\mu\text{m}$  ao aumentar a pressão de homogeneização na produção do leite em pó. Em concordância com o presente trabalho, Cruz et al., (2007) verificaram diferenças na microestrutura de bebida vegetal a base de soja, com diminuição do tamanho das partículas do produto quando foi aplicada a pressão de homogeneização, embora não tenham sido observadas diferenças aparentes na microestrutura do produto quando se realizou o aumento da pressão de homogeneização. Já em Nguyen et al., (2015) observou-se que os glóbulos de gordura eram significativamente menores e mais numerosos em amostras homogeneizadas em comparação com leite de búfala não homogeneizado. Agregados ou aglomerados de glóbulos de gordura foram maiores e mais numerosos em amostras homogeneizadas a 160 bar do que a 80 bar o que foi correlacionado com uma maior área de superfície específica dos glóbulos de gordura do leite de búfala homogeneizado a 160 bar, o que pode levar a um maior número de aglomerados de gordura, aumentando, então, o tamanho das partículas na microscopia.

A isoterma de sorção é utilizada para determinar a higroscopicidade do pó e, a partir dela, entender como ele se relaciona frente a ambientes com diferentes atividades de água. O gráfico da Figura 6 demonstra que os leites em pó homogeneizados apresentam o mesmo comportamento independentemente da pressão de homogeneização utilizada, incluindo a cristalização da lactose que ocorre no intervalo entre 0,4 e 0,5 (TORRES et al., 2017). Este comportamento demonstra que não ocorreu alteração química constitucional e de higroscopicidade dos leites em pó homogeneizados frente as pressões utilizadas. Isso permite a produção de produtos com prazo de validade estendidos com a manutenção sensorial.

Figura 6 - Isoterma de sorção dos leites em pó homogeneizados oriundos de diferentes pressões de homogeneização



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Sabe-se que a qualidade do pó frente ao armazenamento pode ser afetada com ganho de quantidade de água por ocasionar aumento da higroscopicidade resultando em consequências como empedramento, estabilidade oxidativa, estabilidade físico-química, problemas na dissolução e molhabilidade (REH et al., 2004). Portanto, vale a ressalva de que durante a produção do leite em pó busca-se atingir a atividade de água próximo de 0,2 para evitar que tais problemas na qualidade do pó frente ao armazenamento ocorra. Corroborando, Cheng et al. (2019) encontraram valor médio de 0,2 de atividade de água em fórmula infantil em pó assim como Liu et al. (2019) relataram valor médio de 0,25 para leite em pó desnatado. Ainda por meio das isotermas de sorção (Figura 6), pode-se verificar que em todos os pós a partir da atividade de água de 0,6 houve um aumento da capacidade de absorção de água e em contrapartida a menor capacidade de absorção de água esteve na faixa de 0,1 a 0,2 de atividade de água. Em trabalho realizado por Wei et al. (2020) foi realizada a isoterma de sorção para leite em pó pasteurizado integral e desnatado e também foi encontrado valores entre 0,1 e 0,3 de atividade de água como sendo o a faixa de menor absorção de água e na faixa a partir de 0,6 como sendo a região de maior capacidade absorptiva. Por fim, Queiroz et al. (2021) também encontraram valores entre 0,1 e 0,3 como sendo atividades de água onde os pós absorvem uma menor quantidade de água enquanto a partir da

atividade de água de 0,6 ocorreu aumento da absorção de água em leites em pó de cabra com e sem hidrólise da lactose.

Produtos na escala nanométrica tem atraído o interesse da indústria alimentícia. Para entender a influência da pressão de homogeneização na produção de leite em pó, os resultados apresentados demonstram que o leite em pó homogeneizado reidratado possui partículas inversamente proporcionais a pressão de homogeneização utilizada (75/5 MPa, 15/5 MPa e 0/0 MPa, 1°/2° estágios). Com isso, pode-se concluir que o aumento na pressão de homogeneização durante a produção de leite em pó afeta o perfil de distribuição do tamanho de partícula tanto durante o processo quanto no produto final reconstituído, com uma elevada concentração de partículas na região nanométrica. Isso demonstra que o processo serve como ferramenta no desenvolvimento de produtos com diferenciais tecnológicos, como sistemas de encapsulamento e entrega de biomoléculas ativas. Além disso, os três pós desenvolvidos não apresentaram alterações no SPAN das suas partículas nem no comportamento na isoterma de sorção. Isto demonstra que não ocorreu alteração química na sua estrutura constitucional.

## **5 PROTEÍNAS LÁCTEAS COMO AGENTES ENCAPSULANTES DE BIOMOLÉCULAS ATIVAS**

O mercado de nutracêuticos vem crescendo mundialmente a cada ano, devido ao aumento na demanda por produtos que melhorem a qualidade de vida dos consumidores. Estes produtos são caracterizados por levarem ao consumidor benefícios a sua fisiologia e propriedades nutritivas, oriundos das biomoléculas ativas (BMA) e nutrientes, respectivamente (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; KIMPEL; SCHMITT, 2015; LIVNEY, 2010).

As BMAs são compostos produzidos por organismos e possuem atividade em tecidos vivos, sendo benéfica ou não. Mesmo tendo estes benefícios, a sua utilização muitas vezes é um desafio, porque muitas BMAs possuem instabilidade frente às alterações no meio externo ou possuem sabor desagradável para o consumidor. Além disso, a maioria das matrizes alimentícias é aquosa e grande parte das BMAs são hidrofóbicas, resultando na dificuldade do desenvolvimento de produtos alimentícios (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012).

Como alternativa para solucionar este problema, a montagem de sistemas que protejam as BMAs e ainda consigam melhorar o seu gosto, surge como ferramenta para levar ao consumidor as suas propriedades. As proteínas do leite possuem excelente capacidade encapsulante, devido as suas constituições de estruturas anfifílicas, que interagem com moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, e podem ter suas estruturas moldadas de acordo com alterações no meio, potencializando as interações e dando propriedades tecnológicas (LIVNEY, 2010).

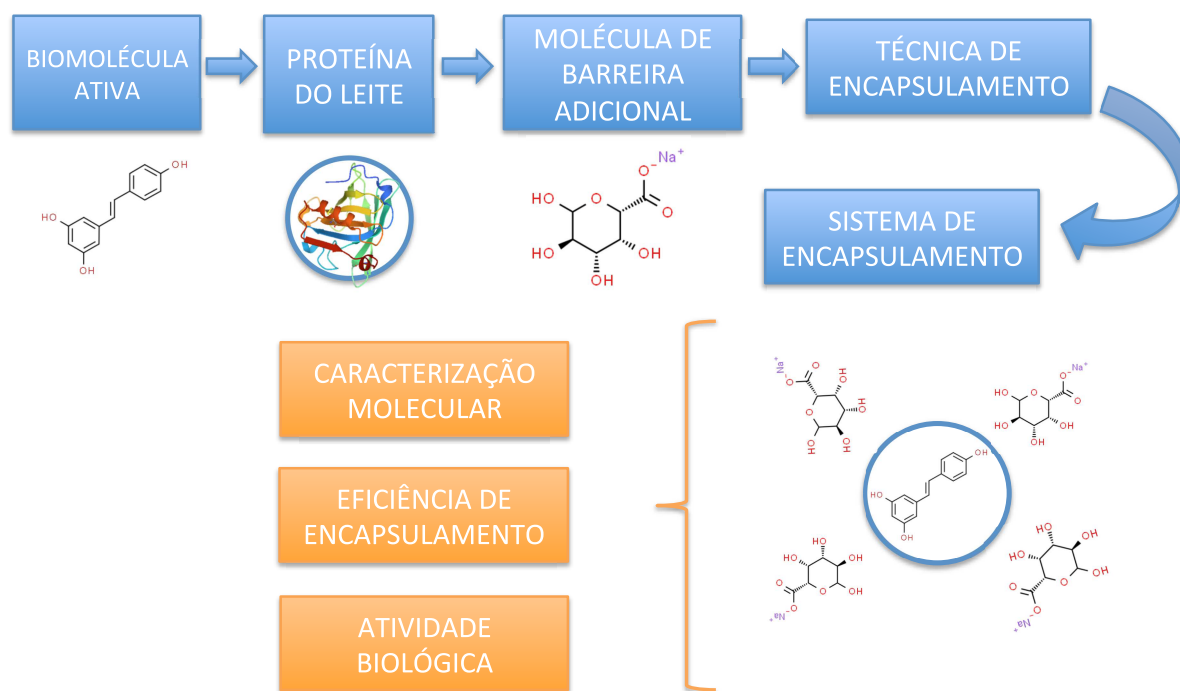
As proteínas do leite de vaca são divididas entre caseína, fração do soro e proteínas da membrana dos glóbulos de gordura. A caseína é encontrada em maior quantidade e as proteínas do soro apresentam estrutura globular e são solúveis em água (BELICIU; MORARU, 2013; TAVARES; MALCATA, 2015).

O encapsulamento é um método capaz de inserir uma substância dentro de uma macroestrutura, protegendo a primeira do ambiente externo. Estas substâncias podem ser líquidas, sólidas ou gasosas e ficam protegidas dentro de um cerne envolto por uma membrana ou matriz. Os agentes encapsulantes são os constituintes da matriz (NORI, 2011; BALASUBRAMANI, 2015; RAJABI, 2015).

Diante da crescente demanda mundial por nutracêuticos, as pesquisas científicas na área tem aumentado para entender o processo de produção e auxiliar no

desenvolvimento de novos produtos. Visto que as proteínas do leite são excelentes ferramentas para o encapsulamento das BMAs, pesquisas relacionando ambos conhecimentos têm sido realizadas. Revisões de literatura são importantes fontes de atualização no setor. Excelentes trabalhos foram feitos focadas nas proteínas do leite como carreadoras de nutracêuticos hidrofóbicos ou nas frações das proteínas do leite como nano-sistemas carreadores (LIVNEY, 2010). O objetivo desta revisão narrativa é fazer uma atualização na área, focando em como as biomoléculas ativas tem sido utilizadas. O intuito deste trabalho está resumido na Figura 7.

Figura 7 – Fluxo do estudo sobre como as proteínas do leite podem ser utilizadas como sistemas de encapsulamento de biomoléculas ativas



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

## 5.1 BIOMOLÉCULAS ATIVAS

Biomoléculas ativas são substâncias que ao interagirem com o organismo geram uma alteração nele, a qual podem entregar propriedades benéficas para o seu funcionamento. Elas possuem diversas fontes na natureza e o seu consumo *in natura* é prejudicado, devido a sensibilidade às condições do ambiente (luz, oxigênio e temperatura), ação do sistema digestivo e/ou gosto desagradável (LAU et al., 2017).

Como a natureza é repleta de diversidade, existe uma grande variedade de fontes de biomoléculas ativas, o que aumenta a possibilidade de compostos químicos naturais serem utilizadas para o benefício humano. Como exemplo das biomoléculas temos as vitaminas, polifenóis, carotenóides, óleos essenciais, ácidos graxos insaturados, retinol e colesterol. A maior fonte de pesquisa destas BMA's são os metabólitos secundários das plantas e algas. Eles são compostos produzidos como resposta destes organismos a alterações no ambiente externo do ser vivo e podem ser polifenóis, ácidos fenólicos, antocianinas, dentre outros. Estes compostos podem ser utilizadas isoladas ou na constituição de extratos (MARTINS STRIEDER et al., 2020).

Uma propriedade muito estudada das biomoléculas é a sua ação antioxidante. Os polifenóis são reconhecidos como biomoléculas que possuem esta ação ao combaterem os radicais livres presentes no organismo. Além disso, estudos demonstram que eles podem ser utilizados na prevenção de problemas cardíacos, câncer, diabetes mellitus e osteoporose (ZAM, 2016).

## 5.2 PROTEÍNAS DO LEITE

O leite de vaca é constituído de água, proteínas, gorduras e sais minerais. As proteínas nele presente são divididas em caseína (79,5%), proteínas do soro (19,3%), proteínas de membrana dos glóbulos de gordura (1,2%) e proteínas em menor quantidade (2,4%) (KIMPEL; SCHMITT, 2015; TRAVES, 2015).

As frações proteicas presentes na micela de caseína são  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseínas. A micela possui uma região central com as frações  $\alpha_{s1}$ - ,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseína ligadas ao fosfato de cálcio coloidal. A parte externa da estrutura é constituída pela  $\kappa$ -caseína, responsável por possibilitar a interação da micela com o meio aquoso e impedir a aglomeração entre as proteínas (MOELLER et al., 2017).

As micelas de caseína possuem forma esférica, com diâmetro variando de 50 a 600 nm, sendo 120 nm o valor médio e massa molecular de  $10^6$  a  $10^9$  Da, dos quais as proteínas representam 94% e os sais minerais 6%. Em cada 1 mL de leite, encontram-se  $10^{14}$  a  $10^{16}$  micelas de caseína (REHAN; AHMED; GUPTA, 2019).

As proteínas do soro do leite são encontradas na parte restante após a coagulação do leite. Elas representam 19,3% das proteínas do leite, são globulares e divididas em  $\beta$ -lactoglobulinas (35 a 65%),  $\alpha$ -lactoglobulinas (12 a 25%), albumina

do soro (5%), imunoglobulinas (8%) e lactoferrina (1%). As frações são ricas nos aminoácidos essenciais: leucina, isoleucina, valina e cisteína. Comercialmente, estas proteínas são encontradas nas formas concentrada (29 a 89% de proteína), isolada (90% de proteína) e hidrolisada (com frações proteicas menores para aumentar a digestibilidade) (PATEL, 2015).

As proteínas do leite podem ser utilizadas como carreadoras de biomoléculas ativas, porque elas apresentam a capacidade de se ligarem a substâncias hidrofóbicas e a outras moléculas polares e íons, propriedade de atividade de superfície, agregação, geleificação e interação com outros polímeros. Estas propriedades desencadeiam a capacidade das proteínas do leite serem excelentes liberadores de substâncias encapsuladas (KIMPEL; SCHMITT, 2015).

As propriedades físico-químicas das proteínas são dependentes das suas estruturas, as quais são alteradas com modificações realizadas no pH, temperatura e salinidade do meio em que estão inseridas (AGARKOVA et al., 2015; TENG; XU; WANG, 2015). Uma vez que as micelas de caseína possuem uma estrutura micelar com o cerne hidrofóbico e a parede externa hidrofílica, variações no pH, temperatura e salinidade alteram a sua configuração tridimensional. Este acontecimento pode desencadear a exposição dos grupamentos hidrofóbicos e agregação das micelas de caseína (MOELLER et al., 2017). A  $\beta$ -lactoglobulina pertence a superfamília das lipocalinas, as quais são responsáveis por transportar pequenas moléculas hidrofóbicas (FLOWER; NORTH; ATTWOOD, 1993). Ela é formada por uma estrutura de cálice que serve como sítio de conexão com estruturas hidrofóbicas. Além disso, ela também possui outros três potenciais sítios de ligação na sua estrutura, possibilitando a ligação tanto com substâncias lipofílicas quanto anfifílicas (SHAFAEI et al., 2017). Este caráter anfifílico possibilita a interação das proteínas do leite com moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas.

Diante do exposto, para que o encapsulamento ocorra, se faz necessário que os grupamentos proteicos sejam expostos para interação. Então, encontrar um sistema que leve a esta configuração se faz necessário, sendo a variação da temperatura, pH, concentração salina, razão proteína/biomolécula e tempo importantes fatores a serem avaliados (AGARKOVA et al., 2015; TENG; XU; WANG, 2015).



### 5.3 ENCAPSULAMENTO

O encapsulamento ocorre quando uma substância é inserida dentro de uma macroestrutura, protegendo-a das condições do ambiente externo. Estas substâncias podem ser líquidas, sólidas ou gasosas e ficam no cerne envolto por uma membrana ou matriz, os quais são constituídos pelos agentes encapsulantes (NORI, 2011; BALASUBRAMANI, 2015; RAJABI, 2015).

#### 5.3.1 Técnicas de encapsulamento

Diversas técnicas são utilizadas para promover o encapsulamento das BMAs nas proteínas do leite: automontagem (WANG et al., 2021), liofilização (APRODU et al., 2019), direcionamento por pH (MOELLER et al., 2017), homogeneização (SANGUANSRI et al., 2015), ultrassom (MARTINS STRIEDER et al., 2020; VICTÓRIA et al., 2017), *spray drying* (SANGUANSRI et al., 2015), coaservação (NIAZ et al., 2020), hidrogel (HANNA et al., 2020), sonicação (NIAZ et al., 2020), eletrospray (GÓMEZ-MASCARAQUE; LÓPEZ-RUBIO, 2016), emulsificação (RIKKERT BERENDSEN, CARME GÜELL, 2015), *layer-by-layer* (LAU et al., 2017) e precipitação por anti-solvente (KHAN et al., 2019a).

#### 5.3.2 Agentes encapsulantes adicionais

O encapsulamento depende tanto da técnica utilizada quanto da matriz em que a BMA será inserida. Os estudos demonstram que os experimentos são feitos variando as proteínas do leite e as combinações com outros agentes encapsulantes diante das técnicas de encapsulamento. Os agentes encapsulantes mais utilizados em combinação com as proteínas do leite são: quitosana (HANNA et al., 2020; WANG et al., 2021), carboximetilquitosana (WANG et al., 2021), alginato de sódio (NIAZ et al., 2020; WEI et al., 2021; ZHANG et al., 2019), Eudragit L100 (SINGH CHAUHAN et al., 2021), maltodextrina (AKDENIZ; SUMNU; SAHIN, 2018; PAUL et al., 2020; SUN et al., 2021; WANG et al., 2019), lactose (BAYSAN et al., 2021), goma arábica (BAYSAN et al., 2021; ESTÉVEZ et al., 2019), fitoglicogênio (CHEN; XUE; LUO, 2020), pectina (CHEN; XUE; LUO, 2020; WANG et al., 2019), quitosana

funcionalizada (DU et al., 2020), zein (YAN et al., 2019; ZHANG et al., 2019), kafirin (KHAN et al., 2019b) e carboximetilcelulose (ESTÉVEZ et al., 2019).

### **5.3.3 Técnicas de identificação do encapsulamento**

Para comprovar o encapsulamento, diversas metodologias de detecção têm sido utilizadas para analisar a ligação e a interação entre as BMAs e as proteínas do leite. Esta interação pode ser covalente ou não covalente e as técnicas utilizadas podem avaliar a interação de forma direta ou indireta. As técnicas comumente utilizadas são: distribuição do tamanho de partícula (AKDENIZ; SUMNU; SAHIN, 2018; MOELLER et al., 2018a), índice de polidispersividade (YAN et al., 2019), potencial zeta (WANG et al., 2019; WEI et al., 2021; YAN et al., 2019), dicróismo circular (TANG et al., 2020; WEI et al., 2021), análise de superfície hidrofóbica (KHAN et al., 2019b; WEI et al., 2021), eletroforese em gel (LI et al., 2021a; TANG et al., 2020), microscopia eletrônica de transmissão criogênica (SINGH CHAUHAN et al., 2021), microscopia eletrônica de varredura (NIAZ et al., 2020; WEI et al., 2021), difração de raio-X (SINGH CHAUHAN et al., 2021; WEI et al., 2021), espalhamento estático de luz (WANG et al., 2020), cromatografia líquida de alta eficiência (PURUSHOTHAMAN, B. K.; PALANISAMY, U.; BEGUM, M. S. B., 2020), ressonância de Plasmon de superfície (ESTÉVEZ et al., 2019), calorimetria diferencial de varredura (DU et al., 2020; SHAO et al., 2019; WANG et al., 2020) e as espectroscopias de massa (LI et al., 2021b), infravermelho (SINGH CHAUHAN et al., 2021; WANG et al., 2021; WEI et al., 2021), Raman (WANG et al., 2021), fluorescência (CHENG et al., 2020; LI et al., 2021a, 2021b) e UV-vis (AKDENIZ; SUMNU; SAHIN, 2018; DU et al., 2020; GUO et al., 2020; KHAN et al., 2019b).

### **5.3.4 Eficiência de encapsulação**

Com o intuito de quantificar a eficiência do encapsulamento e, com isso, saber quanto da BMA foi protegido pelo agente encapsulante, as técnicas recorrentemente utilizadas para auxiliar o cálculo são: Ultra Performance Liquid Chromatography (WANG et al., 2021), High Performance Liquid Chromatography (GHATAK; IYYASWAMI, 2019; HU et al., 2020; MOELLER et al., 2018b, 2018a) e Ultravioleta-visível (LI et al., 2021b; ZHANG et al., 2019). Além da quantidade de

extrato e/ou BMA presente no cerne da macroestrutura, a quantificação deles na superfície também pode ser feita (PAUL et al., 2020).

### 5.3.5 Atividade biológica

Os efeitos biológicos das BMAs precisam ser avaliados para comprovar a sua atividade no organismo. Estes testes podem ser *in vitro*, *in vivo* ou *in situ* dependendo da complexidade esperada no estudo. Quando se trata de avaliar a atividade de forma sistêmica, se faz necessário fazer os testes *in vivo*. Nos quais, consegue-se compreender a biodisponibilidade das BMAs.

Dentre os artigos levantados, pode-se observar uma lacuna científica no âmbito dos estudos em relação a eficácia dos produtos encapsulados para o organismo. Alguns artigos já demonstram a avaliação de testes *in vitro*, sendo a atividade de eliminação de radicais livres por ABTS ou DPPH e atividade antioxidante pelo método de Foulín-Ciocalteu as técnicas mais encontradas nos artigos (CHEN; XUE; LUO, 2020; GHATAK; IYYASWAMI, 2019; HU et al., 2020; K. PURUSHOTHAMAN; P; MEERA SHERIFFA, 2020; KHAN et al., 2019b; SUN et al., 2021; YAN et al., 2019). Os testes *in vivo* são um ponto de melhoria para as pesquisas na área. Observa-se a presença de testes para avaliar a capacidade da macroestrutura em proteger a BMA frente o trato gastrointestinal através da digestão simulada (CHEN; XUE; LUO, 2020; DU et al., 2020; SHAO et al., 2019; WANG et al., 2020; YAN et al., 2019; ZHANG et al., 2019). O teste de perfusão em intestino com volta fechada foi o único teste *in situ* encontrado (GUO et al., 2020).

## 5.4 APLICAÇÕES

Sun et al (2021) encapsulou proantocianidinas em conjugado de caseína com maltodextrina após reação de Maillard para proteger as BMA's durante armazenamento, processo e ambiental do trato gastrointestinal. Eles demonstraram que a capacidade oxidante foi mantida após 28 dias de armazenamento e sob temperaturas de 40 °C a 80 °C. Além disso, os testes *in vitro* demonstraram que o encapsulamento aumentou a biodisponibilidade das proantocianidinas, que, conseqüentemente, pode ser utilizado como produto nutracêutico (SUN et al., 2021).

Baysan et al (2021) estudaram a capacidade encapsulante das combinações entre caseinato de sódio, isolado proteico do soro, maltodextrina, lactose, gelatina e goma arábica sobre o própolis por *spray drying* e *freeze drying*. Os autores demonstraram que elevadas taxas de encapsulamento foram encontradas em todos processos (BAYSAN et al., 2021).

O trans-resveratrol tem efeitos biológicos reconhecidos, porém o seu isômero cis-resveratrol não possui efeito tão significativo e a isomerização ocorre pela incidência de luz. A  $\beta$ -caseína pode ser utilizada como estratégia de prevenir este processo e manter a configuração do trans-resveratrol durante armazenamento. Este processo possui o potencial de ser utilizado na proteção de outros polifenóis (CHENG et al., 2020)

Os  $\beta$ -carotenos possuem excelente propriedade antioxidante, porém são muito sensíveis a alterações de temperatura e pH do meio. Um simples contato com oxigênio gera a sua degradação. Para que a sua atividade seja obtida, é importante lançar mão de meios de proteção desta substância, como emulsão óleo em água. Um mecanismo testado para proteger este composto foi o encapsulamento em nanopartículas líquidas sólidas em que os cristais de ácido palmítico recobriram a superfície do óleo de milho com  $\beta$ -carotenos estabilizado com isolado proteico do soro. Este sistema demonstrou ser útil na estabilização do sistema e no aumento da estabilidade oxidativa do  $\beta$ -caroteno (MEHRAD et al., 2018).

Outro processo de encapsulamento e secagem, o *freeze drying*, foi utilizado para estudar a capacidade encapsulante das proteínas do leite com o extrato de arroz preto rico em antocianinas. O objetivo deste trabalho foi proteger as antocianinas da degradação durante o processo produtivo e fatores externos (APRODU et al., 2019).

Com o intuito de encapsular ácido graxo de óleo de peixe foram desenvolvidos dois sistemas encapsulantes: o primeiro era composto de caseinato de sódio, glicose e xarope de glicose seco e o segundo, caseinato de sódio, glicose e amido, ambos ajustados a pH 7,5 com tampão. Aos sistemas foram adicionados os óleos de peixe seguido de homogeneização de dois ciclos nas pressões de 35 MPa e 10 MPa. Na sequência, os homogeneizados foram secos por *spray drying* (SANGUANSRI et al., 2015). Esta mesma técnica foi utilizada para encapsular óleo essencial de gengibre nas matrizes de proteína do soro do leite sozinha ou

adicionada com inulina ou maltodextrina. Além disso, o processo contou com homogeneização e/ou ultrassom antes da secagem (VICTÓRIA et al., 2017).

Uma vez que o encapsulamento serve como proteção da BMA, seria possível direcionar a liberação destes compostos no organismo? Esta pergunta foi testada ao se fazer o encapsulamento pela técnica *lay by leyer*, utilizando a albumina sérica bovina como agente protetor e a  $\beta$ -imunoglobulina e imunoglobulina como camada de interação com a mucosa do intestino delgado, direcionando a liberação do ácido tanínico. Os autores demonstraram que o sistema de microcápsulas desenvolvido protege a BMA da digestão gástrica e direciona a liberação no intestino delgado. Além disso, a utilização de imunoglobulinas favoreceu a ancoragem do sistema ao epitélio intestinal. Isso demonstra que além de servir como agente encapsulante, a  $\beta$ -imunoglobulina bovina pode auxiliar na proteção contra a digestão estomacal (LAU et al., 2017).

O efeito da BMA é determinado pelo sistema em que o encapsulamento ocorre. Para entender a condição ideal de encapsulamento do  $\beta$ -caroteno nas micelas de caseína nativas, foi estudado como as variações de pH, temperatura e tempo influenciam o processo. Concluindo-se que a taxa de encapsulamento ideal foi no pH 5,5 e temperatura de 2 °C por 5 minutos. Isso demonstra que variações nas condições do processo são testes importantes para obter o melhor encapsulamento (MOELLER et al., 2017).

Para BMA's que possuem hidrofobicidade, o objetivo do encapsulamento deixa de ser a solubilização e entra em cena a necessidade de proteger as BMA's de fatores externos como temperatura, pH e oxidação e/ou mascarar o sabor indesejado. Para atingir este objetivo, extratos ricos em procianidinas foram emulsionados em um sistema  $A_1/O/A_2$  com a variação da constituição dos agentes emulsificantes WPI, WPI-goma arábica, WPI-quitosana e WPI-carboxi-metil-celulose e secos por *spray drying*. Os autores demonstraram que apenas as microcápsulas encapsuladas com WPI-carboxi-metil-celulose foram capazes de recuperar a distribuição do tamanho de partículas e levantaram a discussão que novos estudos devem ser feitos para entender o efeito das propriedades interfaciais antes e durante a secagem, objetivando a melhoria das microcápsulas (RIKKERT BERENDSEN, CARME GÜELL, 2015).

Apesar do *spray drying* ser uma técnica conhecida como meio de encapsulamento, substâncias voláteis não suportam as temperaturas deste

processo. Para sanar esta dificuldade, o *eletrospray* tem sido utilizado como mecanismo de secagem de emulsões óleo em água (O/A) com moléculas voláteis na fase oleosa que não suportam o processo de secagem por *spray drying*. O ácido  $\alpha$ -linolênico foi encapsulado por concentrado proteico do soro (WPC) e seco por *eletrospray* para proteger a BMA da degradação oxidativa ao ser exposto ao oxigênio, luz e calor. A técnica de *eletrospray* demonstrou ser uma excelente alternativa para encapsulação de ácido  $\alpha$ -linolênico e os melhores resultados foram obtidos com proteínas globulares e homogeneização simples na produção das emulsões (GÓMEZ-MASCARAQUE; LÓPEZ-RUBIO, 2016).

O ultrassom também pode ser utilizado como técnica de encapsulamento de biomoléculas com proteínas do leite. O leite ao passar por este processo foi utilizado como meio extrator de corante azul do *Genipa americana* para produzir corante natural para indústria de alimentos (MARTINS STRIEDER et al., 2020).

Pesquisas também são feitas para encapsular o extrato da planta. Para enriquecer o iogurte com benefícios para a saúde, foi adicionado óleo essencial de *Mellissa officinalis* encapsulada em isolado proteico do soro e caseinato de sódio. Sendo mais uma alternativa para levar compostos antioxidantes para prevenção de doenças através de alimentos funcionais (KARIMI SANI et al., 2020).

Os artigos demonstraram que existe uma crescente investigação das propriedades relacionadas a biomoléculas ativas. Estas pesquisas se baseiam nas propriedades que elas geram nos organismos assim como as formas de melhorar a sua absorção pelo consumidor. As proteínas do leite demonstram ser uma excelente oportunidade para aprimorar a utilização das biomoléculas ativas e o processo de encapsulamento depende das suas estruturas químicas, assim como do processo tecnológico aplicado. Muitos estudos tem sido desenvolvido para entender as interações químicas e eficácia dos processos. Entretanto, existe uma lacuna de ensaios biológicos para demonstrar que os sistemas formados conseguem entregar a propriedade ao organismo, abrindo oportunidade para novas pesquisas na área.

## 6 CONCLUSÃO

A necessidade de criar diferenciais tecnológicos têm pressionado os setores de inovação das empresas. As indústrias farmacêuticas e alimentícias têm adentrado no setor de nutracêuticos como meio de aumentarem as suas áreas de atuação, diversificando os seus portfólios. A instabilidade química das biomoléculas ativas presentes nestes produtos apresenta-se como um desafio tecnológico no desenvolvidos de produtos no setor. O presente trabalho demonstrou que as proteínas do leite têm sido estudadas como agendes encapsulantes capazes de proteger as biomoléculas ativas, protegendo-as das intemperes ambientes. Os pesquisadores têm desenvolvido vastamente as caracterizações físicas e químicas, entretanto, carecem-se ensaios que comprovem as atividades biológicas das estruturas supramoleculares.

O processo de homogeneização é bem conhecido e utilizado na indústria láctea. Esta operação unitária é capaz de produzir macroestruturas na escala nanométrica, utilizando-se pressões de 15/5 e 75/5 MPa (1º/2º estágios), as quais encontram-se presentes no leite em pó reidratado manufaturados com estas homogeneização no processo produtivo. Estes resultados demonstram o potencial desta sequência de operações unitárias como meio de produção de sistemas encapsulantes de biomoléculas ativas para estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- AARTS, T. D. How long will the “medical food” window of opportunity remain open? **Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods**, v. 1, n. 3, p. 45–57, 1998.
- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 13–21, 2012.
- AGARKOVA, E. Y. et al. Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. **Food Research International**, v. 19, n. 11, p. 108738, 2015.
- AKDENIZ, B.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 7, 2018.
- ANEMA, S. G.; LOWE, E. K.; LEE, S. K. Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 779–787, 2004.
- APRODU, I. et al. New Functional Ingredients Based on Microencapsulation of Aqueous Anthocyanin-Rich Extracts Derived from Black Rice (*Oryza sativa* L.). **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–14, 2019.
- BAARS, A. et al. Milk fat globule membrane coating of large lipid droplets in the diet of young mice prevents body fat accumulation in adulthood. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 11, p. 1930–1937, 2016.
- BALASUBRAMANI, P.; Palaniswamy, P. T.; Visvanathan, R.; Thirupathic, V.; Subbarayand, A.; Prakash, J. Microencapsulation of garlic oleoresin using maltodextrin as wall material by spray drying technology. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 210-217, 2015.
- BAYSAN, U. et al. The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties. **Powder Technology**, v. 384, p. 332–341, 2021.
- BELICIU, C. M.; MORARU, C. I. Physico-chemical changes in heat treated micellar casein - Soy protein mixtures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 469–476, 2013.
- CALVO-LERMA, J. et al. In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 10, p. 2629–2637, 2018.
- CANO-RUIZ, M. E.; RICHTER, R. L. Effect of Homogenization Pressure on the Milk



Fat Globule Membrane Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2732–2739, 1997.

CARIC, M.; MILOSLAV KALAB. Effects of Drying Techniques on Milk Powders Quality and Microstructure : A Review. **Food Structure**, v. 6, n. 2, p. 9, 1987.

CARRATÙ, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 41, n. 1, p. 7–16, 2005.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. **Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems***Trends in Food Science and Technology*Elsevier, , 1 maio 2006.

CHEN, Y.; XUE, J.; LUO, Y. Encapsulation of Phloretin in a Ternary Nanocomplex Prepared with Phytoglycogen-Caseinate-Pectin via Electrostatic Interactions and Chemical Cross-Linking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 13221–13230, 2020.

CHENG, H.; ERICHSEN, H.; SOERENSEN, J.; PETERSEN, M.; SKIBSTED, L. Optimising water activity for storage of high lipid and high protein infant formula milk powder using multivariate analysis. **International Dairy Journal**, v. 93, p. 92-98, 2019.

CHENG, H. et al. A comparison of  $\beta$ -casein complexes and micelles as vehicles for trans-/cis-resveratrol. **Food Chemistry**, v. 330, n. May, p. 127209, 2020.

CRUZ, N.; CAPELLAS, M.; HERNÁNDEZ, M.; TRUJILLO, A.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. **Food Research International**, v. 40, p. 725-732, 2007.

DA COSTA, J. P. A current look at nutraceuticals – Key concepts and future prospects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 68–78, 2017.

DE CARVALHO, A. F. et al. **Química e tecnologia do soro de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Innóvite, 2020.

De FELICE, S. L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 59–61, 1995.

DEWETTINCK, K. et al. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 436–457, 2008.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908–1914, 2011.

DU, Z. et al. L-Arginine/l-lysine functionalized chitosan-casein core-shell and pH-responsive nanoparticles: Fabrication, characterization and bioavailability

enhancement of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds. **Food and Function**, v. 11, n. 5, p. 4638–4647, 2020.

ESTÉVEZ, M.; CARME, G.; De LAMO-CASTELLVÍ, S.; FERRANDO, M. Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: Evaluation of their stability and release. **Food Chemistry**, v. 272, n. July 2018, p. 478–487, 2019.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos - 4.ed.: Princípios e Prática**. [s.l.] Artmed Editora, 2018.

FINLEY, J. W. et al. Launching a new food product or dietary supplement in the United States: Industrial, regulatory, and nutritional considerations. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, p. 421–447, 2014.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C. T.; ATTWOOD, T. K. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. **Protein Science**, p. 753–761, 1993.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677–684, 2008.

FRANCISQUINI, J. et al. Particle size distribution applied to milk powder rehydration. **Quimica Nova**, v. 43, n. 2, p. 226–230, 2020.

FUCHS, S. et al. Transglutaminase: New insights into gelatin nanoparticle cross-linking. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 8, p. 747–754, 2010.

GALLIER, S. et al. Natural and processed milk and oil body emulsions: Bioavailability, bioaccessibility and functionality. **Food Structure**, v. 13, p. 13–23, 2017.

Garcia, C.; Antona, C.; Robert, B.; Lopez, C.; Armand, M. The size and interfacial composition of milk fat globules are key factors controlling triglycerides bioavailability in simulated human gastro-duodenal digestion. **Food Hydrocolloids**, v.35, p. 494–504, 2014

GHATAK, D.; IYYASWAMI, R. Selective encapsulation of quercetin from dry onion peel crude extract in reassembled casein particles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 100–109, 2019.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LAGARÓN, J. M.; LÓPEZ-RUBIO, A. Electrospayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 42–52, 2015.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Protein-based emulsion electrospayed micro- and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 465, p. 259–270, 2016.

GUO, H. et al. Method for enhancing bioavailability of myricetin based on self-assembly of casein-myricetin nanomicelles. **IET Nanobiotechnology**, v. 14, n. 3, p. 239–244, 2020.

HANNA, D. H. et al. Comparative evaluation for controlling release of niacin from protein- and cellulose-chitosan based hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 228–237, 2020.

HAYES, Maurice G.; KELLY, Alan L. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 3, p. 297-305, 2003

HORIBA SCIENTIFIC. a Guidebook To Particle Size Analysis. **Horiba**, v. 9755 Resea, 2013.

HU, Q. et al. Chitosan-caseinate-dextran ternary complex nanoparticles for potential oral delivery of astaxanthin with significantly improved bioactivity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 747–756, 2020.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2017.

JIZOMOTO, H. et al. **Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract** **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**. [s.l.] Plenum Publishing Corporation, 1993. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1023/A:1018951814939.pdf>>.

KALRA, E. K. Nutraceutical - Definition and introduction. **AAPS Journal**, v. 5, n. 3, p. 1–2, 2003.

KARIMI SANI, I. et al. Physico-chemical, organoleptic, antioxidative and release characteristics of flavoured yoghurt enriched with microencapsulated *Melissa officinalis* essential oil. **International Journal of Dairy Technology**, p. 1–10, 2020.

KATOUZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, p. 34–48, 2016.

KHAN, M. A. et al. Encapsulation and protection of resveratrol in kafirin and milk protein nanoparticles. p. 2998–3007, 2019a.

KHAN, M. A. et al. Encapsulation and protection of resveratrol in kafirin and milk protein nanoparticles. **International Journal of Food Science and Technology**, v.

54, n. 11, p. 2998–3007, 2019b.

KHAYATA, N. et al. Preparation of vitamin e loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 419–427, 2012.

KIELCZEWSKA, K.; HAPONIUK, E.; KRZYŻEWSKA, A. **Effect of high pressure homogenization on some physicochemical properties of milk** Mededelingen-Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, 2000.

KIMPEL, F.; SCHMITT, J. J. Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. R2361–R2366, 2015.

LAU, H. H. et al. Protein-tannic acid multilayer films: A multifunctional material for microencapsulation of food-derived bioactives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 332–340, 2017.

LEE, S. J. et al. Protein-Stabilized Nanoemulsions and Emulsions: Comparison of Physicochemical Stability, Lipid Oxidation, and Lipase Digestibility. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 415, 2011.

LI, M. et al. Effect of enzymatic cross-linking of naringenin-loaded  $\beta$ -casein micelles on their release properties and fate in in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 352, n. 17, 2021a.

LI, Y. et al. Enhanced oral absorption and anti-inflammatory activity of ellagic acid via a novel type of casein nanosheets constructed by simple coacervation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 594, n. July 2020, p. 120131, 2021b.

Liu, S.; Xu, J.; Xie, L.; Zhu, M.; Tang, J. Dry inoculation methods for nonfat milk powder. **Journal of dairy science**, v. 102, p. 77-86, 2019.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 2010.

LOCKWOOD, B. **Nutraceutical**. Second ed. Grayslake: [s.n.].

MACHADO, G.; FURINI PUTON, B.; DALLAZEM BERTOL, C. Nutracêuticos: Aspectos Legais E Científicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 16, p. 1–9, 2019.

MAHDAVI, S. A. et al. Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 509–518, 2014.

MANACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARCOMINI, R. F.; DE SOUZA, D. M. P. F. Caracterização microestrutural de materiais cerâmicos utilizando o programa de processamento digital de imagens Image J. **Cerâmica**, v. 57, n. 341, p. 100–105, 2011.

MARTINS STRIEDER, M. et al. Low-frequency and high-power ultrasound-assisted production of natural blue colorant from the milk and unripe *Genipa americana* L. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, n. March, p. 105068, 2020.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. **Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components** **Advances in Colloid and Interface Science**, 2010.

MEHRAD, B. et al. Enhancing the physicochemical stability of  $\beta$ -carotene solid lipid nanoparticle (SLNP) using whey protein isolate. **Food Research International**, v. 105, n. September 2017, p. 962–969, 2018.

MERCAN, E.; SERT, D.; AKIN, N. Effect of high-pressure homogenisation on viscosity, particle size and microbiological characteristics of skim and whole milk concentrates. **International Dairy Journal**, v. 87, p. 93–99, 2018a.

MERCAN, E.; SERT, D.; AKIN, N. Determination of powder flow properties of skim milk powder produced from high-pressure homogenization treated milk concentrates during storage. **LWT**, v. 97, p. 279–288, 1 nov. 2018b.

MICHALSKI, M. & JANUEL, C. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p. 423–437, 2006.

MOELLER, H. et al. Native casein micelles as nanocarriers for  $\beta$ -carotene: pH-and temperature-induced opening of the micellar structure. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1122–1130, 2017.

MOELLER, H. et al. Spray- or freeze-drying of casein micelles loaded with Vitamin D2: Studies on storage stability and in vitro digestibility. **Lwt**, v. 97, n. April, p. 87–93, 2018a.

MOELLER, H. et al. Comparative studies of loading lipophilic substances into casein micelles and investigating the influence of whey proteins and heat treatment on loading stability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 4, p. 954–965, 2018b.

NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NIAZ, T. et al. Alginate-caseinate based pH-responsive nano-coacervates to combat resistant bacterial biofilms in oral cavity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 1366–1380, 2020.

NISSIM GARTI; JULIAN MCCLEMENTS. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. 1. ed. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2012.

Nguyen, H.; Ong, L.; Kentish, S.; Gras, S. Homogenisation improves the microstructure, syneresis and rheological properties of buffalo yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 46, p. 78-87, 2015.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C.; Microencapsulation of propolis extract by complex coaservation. **LWT**, v. 44, p. 429-435, 2011.

OBEID, S. et al. The surface properties of milk fat globules govern their interactions with the caseins: Role of homogenization and pH probed by AFM force spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. March, p. 110363, 2019.

Oprea, A. Nanotechnology Applications in Food: Flavor, Stability, Nutrition and Safety In Indian Food Industry, 2017

PANDEY, M.; VERMA, R. K.; SARAF, S. A. Nutraceuticals: New era of medicine and health. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 3, n. 1, p. 11–15, 2010.

PARK, C. W.; DRAKE, M. A. The effect of homogenization pressure on the flavor and flavor stability of whole milk powder. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5195–5205, 2017.

PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R.; CLADERA-OLIVERA, F. **Alimentos de Fennema**. [s.l: s.n.].

PATEL, S. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6847–6858, 2015.

PAUL, V. et al. Effect of coating materials for microencapsulation of basil oil using spray drying. **Medicinal Plants**, v. 12, n. 2, p. 251–257, 2020.

PURUSHOTHAMAN, B. K.; PALANISAMY, U.; BEGUM, M. S.B. Magnetic casein-CaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanohybrid carrier conjugated with progesterone for enhanced cytotoxicity of citrus peel derived hesperidin drug towards breast and ovarian cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 293–304, 2020.

QUEIROZ, E.; REZENDE, A.; PERRONE, I.; FRANCISQUINI, J.; DE CARVALHO, A.; ALVES, N.; CAPP, A.; STEPHANI, R.; Spray drying and characterization of lactose-free goat milk. **LWT**, v. 147, p. 111516, 2021

RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; ALIREZA, S. M.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food hydrocolloids**, v. 51, p. 327-337, 2015.

Reh, C., Bhat, S.; Berrut, S. Determination of water content in powdered milk. **Food chemistry**, v. 86, p. 457-464, 2004.

REHAN, F.; AHMED, N.; GUPTA, M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial—A comprehensive review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, n. April 2018, p. 280–292, 2019.

RICHARD, B. et al. Towards a better control of dairy powder rehydration processes. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 31, p. 18–28, 2013.

RIKKERT BERENDSEN, CARME GÜELL, M. F. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification : Effect of interfacial composition. **FOOD CHEMISTRY**, v. 178, p. 251–258, 2015.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 11, p. 1095–1104, 2005.

SANGUANSRI, L. et al. Bioequivalence of n-3 fatty acids from microencapsulated fish oil formulations in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 5, p. 822–831, 2015.

SANTOS, J. R. M. P. DOS; ALBERT, A. L. M.; LEANDRO, K. C. Importância de uma regulamentação específica com as definições e classificações dos produtos comercializados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 19, n. 3, p. 54–67, 2019.

SCHUCK, P. et al. **Relative humidity of outlet air: The key parameter to optimize moisture content and water activity of dairy powders** *Dairy Science and Technology*, 2008.

SCHUCK, P. **Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behavior**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2009.

SCHUCK, P. Dairy powders. In: **Handbook of Food Powders: Processes and Properties**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2013. p. 437–464.

SCHUCK, P. et al. Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. **Drying Technology**, v. 34, n. 15, p. 1773–1790, 2016.

SHAF AEI, Z. et al.  $\beta$ -Lactoglobulin: An efficient nanocarrier for advanced delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1685–1692, 2017.

SHAO, P. et al. Encapsulation efficiency and controlled release of *Ganoderma lucidum* polysaccharide microcapsules by spray drying using different combinations of wall materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 962–969, 2019.

SILVIA M. FRANCISCATO COZZOLINO. Biodisponibilidade de Compostos Bioativos de Alimentos. In: MANOLE (Ed.). . **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 4. ed. Barueri: [s.n.]. p. 879–914.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. [s.l: s.n.].

SINGH CHAUHAN, P. et al. Multidomain drug delivery systems of  $\beta$ -casein micelles for the local oral co-administration of antiretroviral combinations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 592, p. 156–166, 2021.

SINGH, H. The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 11, n. 2–3, p. 154–163, 2006.

SINGH, H.; GALLIER, S. Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 81–89, 2017.

SINGH, J. et al. Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. **Food Research International**, v. 116, n. October 2018, p. 103–113, 2019.

SONG, X. et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 538–544, 2013.

SUN, X. et al. Casein-maltodextrin Maillard conjugates encapsulation enhances the antioxidative potential of proanthocyanidins: An in vitro and in vivo evaluation. **Food Chemistry**, v. 346, n. September 2020, p. 128952, 2021.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TANG, C. C. HE et al. Effects of carriers on spray-dried flavors and their functional characteristics. **Food Chemistry**, v. 151, n. September 2020, p. 1–7, 1 jun. 2020.

TAVARES, T.; MALCATA, F. X. **Whey and Whey Powders: Protein Concentrates and Fractions**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

TENG, Z.; XU, R.; WANG, Q. Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: A review. **RSC Advances**, v. 5, n. 44, p. 35138–35154, 2015.

THÉO EFSTATHIOU et al. The use of carbonyl analysis to follow the main reactions involved in the process of deterioration of dehydrated dairy products: prediction of most favourable degree of dehydration. **Lait**, v. 82, n. 4, p. 423–439, 2002.

THIEBAUD, M. et al. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 427–439, 2003.



TORRES, J. K. F. et al. Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder. **Food Research International**, v. 101, n. February, p. 45–53, 2017.

TRAVES, D. Understanding infant formula. **Paediatrics and Child Health (United Kingdom)**, v. 25, n. 9, p. 413–417, 2015.

Tunick, M.; Ren, D.; Van Hekken, D.; Bonnaille, L.; Paul, M.; Kwoczak, R.; Tomasula, P. Effect of heat and homogenization on in vitro digestion of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 6, p. 4124–4139, 2016.

VICTÓRIA, R. et al. Proposing Novel Encapsulating Matrices for Spray-Dried Ginger Essential Oil from the Whey Protein Isolate-Inulin / Maltodextrin Blends. **Food and Bioprocess Technology**, p. 115–130, 2017.

WALSTRA, P.; WOUNTERS, J.; GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**, Second ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

WALSTRA, P.; OORTWIJN, H. Effect of globule size and concentration on creaming in pasteurized milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 29, p. 263-278, 1975.

Walton, D.; Mumford, C. Spray dried products—characterization of particle morphology. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 77, p. 21-38, 1999.

WANG, A. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded in Skim Milk Microcapsules: Physicochemical Properties and Enhanced in Vitro Bioaccessibility and Bioactivity against Colon Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 50, p. 14978–14987, 2020.

WANG, J. et al. Effect of drying and interfacial membrane composition on the antimicrobial activity of emulsified citral. **Food Chemistry**, v. 298, n. March, p. 1–7, 2019.

WANG, S. et al. Nanocomplexes derived from chitosan and whey protein isolate enhance the thermal stability and slow the release of anthocyanins in simulated digestion and prepared instant coffee. **Food Chemistry**, v. 336, n. August 2020, 2021.

WEI, X. et al. Caffeic acid phenethyl ester loaded in nano-targeted delivery system with casein: Physicochemical characterization, in vitro release, and binding mechanisms. **Lwt**, v. 150, n. June, p. 111938, 2021.

WILDMAN, R. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Second ed. [s.l.] CRC Press, 2013.

YAN, X. et al. Co-encapsulation of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Curcumin by Two Proteins-Based Nanoparticles: Role of EGCG. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13228–13236, 2019.

Ye A.; Cui, J.; Dalgleish, D.; Singh, H. Effect of homogenization and heat treatment on the behavior of protein and fat globules during gastric digestion of milk. **Journal of Dairy Science**, v.1, p. 36–47, 2017.

ZAM, W. Fortification of bovine milk with natural polyphenols extracted from pomegranate peels. **Progress in Nutrition**, v. 18, n. 2, p. 135–139, 2016.

ZEISEL, S. H. Regulation of “nutraceuticals”. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1853–1855, 1999.

ZHANG, H. et al. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 635–645, 2019.