

Samira Jamil Fayad

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICRO E NANOPARTÍCULAS A BASE DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Florianópolis
2010

Samira Jamil Fayad

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICRO E NANOPARTÍCULAS A BASE DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Minatti

Florianópolis
2010

Samira Jamil Fayad

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E
NANOPARTÍCULAS A BASE DE PROTEÍNA ISOLADA
DE SOJA**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador

Prof. Dr. Pedro Luiz M. Barreto
UFSC

Prof. Dr. Edson Minatti
Co-orientador

Prof. Dr. Josiel B. Domingos
UFSC

Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher
UFSC

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi, pela oportunidade, confiança e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Minatti pela co-orientação, apoio e pelo grande tempo dedicado à este trabalho.

À Dra. Betina G. Z. Ramos, por toda a ajuda e dedicação, que foram essenciais para o sucesso da realização deste trabalho.

À Marly pelo constante auxílio e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Luiz A. Kanis pela gentileza em doar o óleo de copaíba.

Ao Prof. Dr. Pedro M. Barreto e à Vanessa Webber pela colaboração e auxílio no uso do Spray Dryer.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrona (LNLS), ao Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV – Grenoble/FR) e ao Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC pela possibilidade da realização dos estudos de SAXS, SLS/DLS e microscopias, respectivamente.

À Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. pela doação das amostras de Proteína Isolada de Soja.

Ao meu namorado Edson pelo amor, companheirismo e respaldo em todos os momentos.

À minha família pelo carinho, respeito e por terem lançado as sementes que contribuíram para minha formação política e social.

Aos membros do POLISSOL e POLIMAT.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de símbolos e abreviaturas	4
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas.....	9
Resumo.....	10
Abstract	11
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	12
1.1. Introdução e Justificativa	12
1.2. Objetivos Gerais.....	12
1.3. Objetivos Específicos.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Biopolímeros	14
2.1.1. Proteína Isolada de Soja.....	17
2.2. Óleo de Copaíba.....	21
2.3. Micro e Nanopartículas	22
2.3.1. Micropartículas poliméricas.....	23
2.3.2. Nanopartículas poliméricas.....	24
2.4. Técnicas de Preparação de Micro e Nanopartículas.....	25
2.4.1. Emulsificação/evaporação do solvente	25
2.4.2. Spray drying.....	27
2.4.3. Coacervação.....	28
2.5. Reticulação Polimérica.....	29
2.5.1. Reticulação física	29
2.5.2. Reticulação química	30
2.6. Surfactantes.....	33
2.7. Mecanismos de Proteção de Dispersões Coloidais	35
2.7.1. Redução da Energia interfacial	35
2.7.1.1. Estabilização Eletrostática	35
2.7.1.2. Estabilização Estérica	36
2.8. Considerações sobre espalhamento de luz	38
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	40
3.1. Materiais e Reagentes	40
3.2. SISTEMA A: Micropartículas de SPI.....	40
3.2.1. Estudo da estabilidade cinética das emulsões o/a	40
3.2.1.1. Determinação da distribuição de tamanho das gotículas de óleo.....	41
3.2.1.2. Determinação do potencial Zeta das gotículas de óleo	41
3.2.1.3. Condutivimetria e pH.....	41
3.2.2. Micropartículas preparadas pela técnica de spray drying ...	41

3.2.3. Análise morfológica.....	42
3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
3.2.3.2. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	43
3.2.4. Análise térmica.....	43
3.2.4.1. Análise termogravimétrica (TGA).....	43
3.2.4.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	43
3.2.5. Espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada total (FTIR-ATR).....	43
3.2.6. Espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS).....	43
3.3. SISTEMA B: Nanopartículas de SPI.....	44
3.3.1. Nanopartículas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente.....	44
3.3.2. Nanopartículas preparadas pela técnica de coacervação.....	45
3.3.3. Determinação de distribuição de tamanho das partículas ...	46
3.3.4. Determinação do potencial Zeta das partículas.....	46
3.3.5. Estudo da estabilidade das partículas.....	46
3.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	46
3.3.7. Espalhamento de luz Dinâmico e Estático (DLS/SLS).....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
4.1. SISTEMA A: Micropartículas de SPI.....	48
4.1.1. Estudo da estabilidade cinética das emulsões.....	48
4.1.1.1. Distribuição de tamanho das gotículas de óleo.....	48
4.1.1.2. Potencial Zeta das gotículas de óleo.....	50
4.1.1.3. Condutivimetria e pH.....	52
4.1.2. Análise morfológica.....	54
4.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	56
4.1.3. Análise térmica.....	57
4.1.3.1. Análise termogravimétrica (TGA).....	57
4.1.3.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	61
4.1.4. Espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada total (FTIR-ATR).....	64
4.1.5. SPI na região interfacial: um estudo por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	68
4.2. SISTEMA B: Nanopartículas de SPI.....	73
4.2.1. Nanopartículas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente.....	73
4.2.2. Nanopartículas preparadas pela técnica de coacervação.....	73

4.2.2.1. Distribuição de tamanho das partículas	73
4.2.2.1.1. Efeito da força iônica da solução tampão hostil	73
4.2.2.1.2. Efeito da concentração de surfactante na solução tampão hostil.....	75
4.2.2.1.3. Efeito do surfactante na solução tampão hostil.....	77
4.2.2.2. Potencial Zeta das partículas.....	79
4.2.2.2.1. Efeito da força iônica da solução tampão hostil	79
4.2.2.2.2. Efeito da concentração de surfactante na solução tampão hostil.....	80
4.2.2.2.3. Efeito do surfactante na solução tampão hostil.....	81
4.2.2.3. Análise morfológica via microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	82
4.2.2.4. Estudo da estabilidade cinética das suspensões coloidais	84
4.2.2.4.1. Distribuição de tamanho das partículas	84
4.2.2.4.2. Potencial Zeta das partículas.....	85
4.2.2.4.3. Condutivimetria	86
4.2.2.5. Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)	87
5. CONCLUSÕES.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

Lista de símbolos e abreviaturas

Γ_{app}	Frequência de relaxação média
γ	Tensão interfacial
$\Delta_c H$	Variação da entalpia de cristalização
$\Delta_m H$	Variação da entalpia de fusão
ζ	Potencial Zeta
η	Viscosidade
κ^{-1}	Comprimento de Debye
λ	Comprimento de onda
σ	Área interfacial
Ψ_0	Potencial elétrico na superfície da partícula
$\langle x \rangle$	Valor médio de x
C_p	Variação da capacidade calorífica
d_f	Dimensão fractal
D_0	Coefficiente de difusão translacional
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DLVO	Teoria de Deryaguin–Landau–Verwey–Overbeek
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTG	Derivada da curva termogravimétrica
EDC	Hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por reflectância atenuada total
G	Energia de Gibbs
I	Força iônica
k_B	Constante de Boltzmann
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo
o/a	Óleo em água
PDI	Polidispersidade
PEO	Poli(óxido etileno)
PPO	Poli(óxido propileno)
\vec{q}	Vetor de onda
R_g	Raio de giração

R_H	Raio hidrodinâmico
SAXS	Espalhamento de raios-x a baixos ângulos
SLS	Espalhamento de luz estático
SPI	Proteína isolada de soja
T_c	Temperatura de cristalização
T_b	Temperatura de ebulição
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
T_m	Temperatura de fusão
T_{max}	Temperatura de máxima velocidade de degradação
v/v	Volume/volume
V_A	Potencial de atração
V_R	Potencial de repulsão
V_T	Potencial total
V_{osm}	Potencial de repulsão osmótica

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.....	16
Figura 2. Diagrama de solubilidade da SPI em função do pH.	18
Figura 3. Estrutura química do (a) α -humuleno, (b) β -selineno, (c) β -bisaboleno e (d) β -cariofileno.	22
Figura 4. Representação de (A) esfera e (B) cápsula.	23
Figura 5. Esquema representativo da reticulação física de resíduos protéicos.....	30
Figura 6. Estrutura química do EDC.....	31
Figura 7. Reação de reticulação de uma proteína com EDC em meio aquoso.	32
Figura 8. Ilustração da barreira osmótica de aproximação de duas partículas em uma dispersão.	37
Figura 9. Ilustração do potencial de repulsão entrópico, V_s	37
Figura 10. Estrutura química do surfactante (a) Pluronic F-68 e (b) Tween 80.....	40
Figura 11. Ilustração da preparação das micropartículas.	42
Figura 12. Ilustração do método de emulsificação/evaporação do solvente.	44
Figura 13. Ilustração do método de coacervação.	45
Figura 14. Diâmetro médio das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a. Medidas realizadas no primeiro dia.	49
Figura 15. (A) Diâmetro médio e (B) polidispersidade das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a e do tempo de estocagem.....	50
Figura 16. Potencial Zeta das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a e do tempo de estocagem.....	52
Figura 17. Condutividade específica em função do tempo de estocagem das emulsões o/a. Linhas somente como guia para os olhos.....	53
Figura 18. Micrografias obtidas por MEV das microcápsulas com formulação (A e A') A1, (B e B') A2, (C e C') A3 e (D e D') A4.	55
Figura 19. Micrografias obtidas por MEV-FEG das microcápsulas com formulação (A) A1, (B) A2, (C e C') A3 e (D e D') A4.	57
Figura 20. Curvas termogravimétricas para o pó de SPI, o óleo e as microcápsulas na taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min^{-1}).	60

Figura 21. DTG para (a) o pó de SPI e as microcápsulas e (b) óleo de copaíba na taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min^{-1}).	61
Figura 22. Curva de DSC obtida a partir da SPI.	62
Figura 23. Curvas de DSC obtidas a partir do (A) óleo de copaíba e da (B) microcápsula sem EDC.	63
Figura 24. Curvas de DSC obtidas a partir da (A) SPI,	64
Figura 25. Espectro de infravermelho da SPI.	65
Figura 26. Espectro de infravermelho do óleo de copaíba.	66
Figura 27. Espectros de infravermelho das microcápsulas (—) sem e (—) com EDC.	67
Figura 28. Espectros de infravermelho da (—) SPI, (—) óleo de copaíba e das (—) microcápsulas sem EDC (---) com ampliação de 10x.	68
Figura 29. Intensidade de SAXS para as emulsões com formulação A1, A2, A3 e A4. A figura inserida apresenta o efeito da diluição (adição de água) na intensidade de SAXS da emulsão com formulação A2.	69
Figura 30. Gráfico de Porod da SPI em suspensão aquosa (0,5%), na emulsão A2 e nas microcápsulas obtidas após secagem da A2. Os coeficientes angulares das regiões lineares estão indicados.	70
Figura 31. Gráfico de Guinier para curvas de SAXS de suspensão, emulsão e microcápsulas de SPI, referente à composição A2. Os valores de Raio de Giração explícitos foram calculados de acordo com Equação 6 no limite $q \rightarrow 0$	71
Figura 32. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80.	74
Figura 33. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da concentração de SPI na presença de diferentes concentrações de Tween 80 na solução tampão hostil.	76
Figura 34. Curvas de distribuição de tamanho das partículas com 0,2% de SPI e (—) 0,5% e (—) 1,0% de Tween 80.	77
Figura 35. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da concentração de SPI na presença de diferentes surfactantes na solução tampão hostil.	78
Figura 36. Potencial Zeta das nanopartículas em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80.	80
Figura 37. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI na	81
Figura 38. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI	82

Figura 39. Micrografias obtidas por TEM das nanopartículas com formulação (A e A') F3,.....	83
Figura 40. (A) Diâmetro médio e (B) polidispersidade das nanopartículas em	85
Figura 41. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI.....	86
Figura 42. Condutividade específica em função do tempo de estocagem das nanopartículas preparadas com diferentes concentrações de SPI. Linhas somente como guia para os olhos.....	87
Figura 43. Gráfico de Guinier para os dados de espalhamento de luz estático (SLS) da suspensão F5. O valor de raio de giração médio inserido foi calculado com base no coeficiente angular da curva de linearização dos pontos experimentais.....	88
Figura 44. Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do espalhamento de luz dinâmico (DLS) da suspensão F5. O valor de raio hidrodinâmico médio foi calculado através da equação de Stokes-Einstein, usando o coeficiente angular das curvas como D_0	89
Figura 45. Dependência angular das curvas g_2 de autocorrelação de DLS da suspensão F5 (para clareza, somente as curvas de 3 diferentes ângulos de espalhamento são exibidas).....	90
Figura 46. Histograma de distribuição de tamanho dado pelo ajuste CONTIN da curva de autocorrelação.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais aminoácidos presentes na SPI.....	19
Tabela 2. Composição das emulsões o/a.	41
Tabela 3. Composição das formulações utilizadas na coacervação.....	46
Tabela 4. Valores de diâmetro médio das gotículas nas emulsões o/a.	48
Tabela 5. Valores de pH das emulsões o/a.	53
Tabela 6. Parâmetros termogravimétricos dos materiais estudados.	59
Tabela 7. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para a SPI.	64
Tabela 8. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para o óleo de copaíba.....	65
Tabela 9. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para as microcápsulas.....	66
Tabela 10. Dimensões fractais de algumas topologias. Adaptado da referência 92.....	70
Tabela 11. Valores de diâmetro médio das nanopartículas de SPI.....	84
Tabela 12. Relação entre a razão ρ e a morfologia das partículas. Adaptado da referência 92.....	90

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar microcápsulas e nanopartículas formadas a partir da proteína isolada de soja (SPI), para futura utilização como dispositivos de encapsulação e liberação de agentes ativos. O efeito da concentração de SPI, surfactantes, agentes reticulantes e força iônica do meio na morfologia e distribuição de tamanho das partículas foram avaliados. A substância encapsulada foi o óleo de Copaíba, um inseticida natural.

Para a formação das microcápsulas, prepararam-se emulsões o/a utilizando a SPI como emulsificante. Foi realizado o estudo da estabilidade cinética das emulsões o/a durante o armazenamento (4 meses). Devido à grande variação na distribuição de tamanho das gotas de óleo das emulsões com o tempo de estocagem, optou-se pela preparação das emulsões *in situ* e imediata secagem da fase aquosa para obtenção das microcápsulas. Após secagem das emulsões, foram obtidas microcápsulas de dimensões variadas, superfícies lisas e com ausência de poros, como verificada após visualização das microesferas por MEV e MEV-FEG. A encapsulação do óleo foi confirmada por medidas de TGA, DSC e FTIR-ATR. Os resultados de SAXS indicaram uma organização fractal das proteínas SPI na região interfacial da emulsão e, após secagem, nas paredes das microcápsulas. A superfície das microcápsulas possui estrutura fractal formada por repetições de agregados entre proteínas da SPI.

As nanopartículas de SPI foram obtidas através do método de coacervação em uma solução aquosa hostil. Imagens de TEM indicam que as nanopartículas são esferas compactas, massivas e com tamanho entre 200 a 400 nm. Investigou-se o efeito de diversas variáveis, como concentração de SPI, tipo e concentração de surfactante e força iônica do meio nas propriedades – tamanho médio, polidispersidade e potencial Zeta – das nanopartículas obtidas. Acompanhou-se a evolução destas propriedades durante o tempo de estocagem das suspensões (4 meses), com a identificação dos processos degradativos das suspensões. Medidas de SLS /DLS simultâneas confirmaram a morfologia e tamanho observados por microscopia, além de indicar que a superfície das nanopartículas é formada por cadeias protéicas hidratadas protuberantes.

Abstract

The main goal of this work was to obtain microcapsules and nanoparticles made from a biopolymer, namely Soy Protein Isolate (SPI), for use as drug encapsulation and controlled release devices. We evaluated the effects of SPI concentration, addition of surfactants and crosslinkers, ionic strength on the particles morphology and suspension kinetic stability. The encapsulated substance was the Copaiba oil, a natural insecticide.

The microcapsules were made from the spray drying of o/w emulsions stabilized with SPI. The kinetic stabilities of all the emulsions were tracked for a period of four months. Due to the large shift on size and polydispersity of the emulsions with their aging we decided to prepare the emulsion *in situ* followed by immediate drying to obtain the SPI microcapsules. The encapsulation of the oil was confirmed through calorimetric and spectroscopic techniques. Image techniques show the microcapsules as hollow spheres with a smooth and pore free surface. SAXS results showed that the proteins indeed rest at the oil drops interface in the emulsions, through a fractal organization; after drying, the proteins constitute the microcapsules walls producing a surface with fractal structure.

In the second part of this work we obtained nanoparticles made from coaservation of SPI in a hostile buffer solution. Image techniques showed the nanoparticles as compact spherical objects with diameter ranging from 200 up to 400 nm. We monitored the effect of several variables, as SPI concentration, surfactants and ionic strength on the size, polydispersity and Zeta potential of the nanoparticles suspensions. The kinetic stability was measured by following the evolution of these properties during 4 months. Simultaneous SLS/DLS data confirmed the size and shape observed by microscopy and indicated that the particles surface is made from hydrated polymeric chains.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução e Justificativa

São diversas as razões que estão direcionando os estudos das propriedades físico-químicas de polímeros de origem natural (biopolímeros) em laboratórios acadêmicos e industriais. O Brasil é privilegiado devido a enorme biodiversidade de fauna e flora, além do grande potencial de cultivo agrícola. Neste último aspecto, destaca-se a soja, da qual o País é o segundo maior produtor mundial, perdendo somente para os Estados Unidos. Os materiais obtidos a partir da proteína extraída da soja encontram aplicação nos mais diversos setores de atividade, tais como: adesivos, plásticos, revestimentos, emulsificantes na química de alimentos, terapêuticos, equipamentos para agricultura e engenharia civil.¹ A utilização de biopolímeros extraídos da soja possibilita agregar valor ao agronegócio, tornando os dispositivos nanotecnológicos mais baratos e acessíveis à população brasileira.

O uso de sistemas poliméricos para a micro e nanoencapsulação de agentes ativos oferece muitas vantagens em comparação aos sistemas convencionais, pois não há a necessidade de administrações repetidas; aumenta a estabilidade do princípio ativo; possibilita o direcionamento a alvos específicos e também a encapsulação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas.²

Encontram-se na literatura vários estudos envolvendo a proteína isolada de soja, principalmente na aplicação como biofilmes. Porém, não são encontrados estudos explorando a utilização desta proteína na formação de nanopartículas dirigidas para a liberação controlada de princípios ativos. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho é a preparação e a caracterização de micro e nanopartículas de proteína isolada de soja (SPI) a fim de testar sua viabilidade como novos carreadores de diferentes princípios ativos.

1.2. Objetivos Gerais

Obter e caracterizar micro e nanopartículas formadas por proteína isolada de soja (SPI) para posterior bio-encapsulação do óleo de copaíba e estudar a influência de variáveis na metodologia de preparação e do processo de reticulação na morfologia e nas propriedades físico-químicas do material obtido.

1.3. Objetivos Específicos

- Desenvolver estratégias experimentais para a obtenção de micro e nanopartículas de SPI;
- Preparar diferentes sistemas variando as concentrações relativas dos componentes para obtenção de micropartículas;
- Estudar a estabilidade cinética das emulsões o/a estabilizadas por SPI através de medidas de pH, condutimetria, distribuição de tamanho e potencial Zeta;
- Avaliar a morfologia da SPI em três diferentes ambientes: em suspensão aquosa, na interface o/a e, reticulada, na interface o/ar das microcápsulas, através de medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS);
- Determinar a morfologia e distribuição de tamanho das micropartículas através de técnicas de imagem direta – microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Analisar a presença da substância encapsulada nas micropartículas por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada total (FTIR-ATR), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a influência das concentrações relativas e força iônica nas nanopartículas.
- Estudar a estabilidade cinética das nanopartículas por meio de medidas de pH, condutimetria, distribuição de tamanho e potencial Zeta;
- Determinar a morfologia das nanopartículas através DLS/SLS e TEM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biopolímeros

Diferentemente das moléculas pequenas, onde o interesse está principalmente associado às suas propriedades químicas, as macromoléculas são importantes, devido suas propriedades físicas: são as características físico-químicas particulares dos polímeros que os fazem onipresentes em nosso dia-a-dia. Em relação à sua forma de obtenção, os polímeros podem ser divididos em dois grandes grupos: polímeros de ocorrência natural (biopolímeros) e polímeros sintéticos. Uma vez que os três tipos de polímeros predominantes na natureza são os ácidos nucleicos, as proteínas e os polissacarídeos,³ podemos citar como exemplos de biopolímeros o DNA (um polinucleotídeo, a molécula que guarda a informação genética), as enzimas (polipeptídeos catalisadores de reações químicas que ocorrem no organismo dos seres vivos) e o amido (polissacarídeo, que é uma das fontes de energia para os seres humanos).

Geralmente, os biopolímeros apresentam maior complexidade em sua estrutura química quando comparados com os polímeros sintéticos. Também possuem menor estabilidade à elevação de temperatura e são mais biodegradáveis que os sintéticos.⁴ A rapidez da deterioração confere aos polímeros naturais caráter mais ecológico, tornando-os significativamente mais importantes quando o objetivo é a diminuição do impacto ambiental provocado pelos polímeros sintéticos. Entretanto algumas características dos polímeros naturais tais como seu caráter hidrofílico, rápida velocidade de degradação e, em alguns casos, propriedades mecânicas insatisfatórias sob ambientes com alta umidade relativa, podem representar desvantagens para muitas aplicações.⁴

Embora originalmente os biopolímeros fossem utilizados quase que da mesma forma que se encontravam na natureza, atualmente sofrem modificações físicas e químicas

para lhes conferir propriedades desejadas, como maior resistência, menor solubilidade, maior viscosidade, entre outros. Estas modificações intensificam o uso destes materiais na obtenção de agregados e partículas de dimensão nanométrica – estendendo sua aplicação também à nanotecnologia.⁵

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas e são construídas por um conjunto de 22 aminoácidos unidos por ligações peptídicas – ligação química que ocorre entre duas moléculas quando o grupo carboxila de uma molécula reage com o grupo amino de outra, liberando uma molécula de água. Desta forma, o polipeptídeo

(polímero de aminoácidos que contém um elevado número de monômeros) é um heteropolímero linear, onde as unidades que se repetem (monômeros) são denominadas resíduos de aminoácidos. Os polipeptídeos de ocorrência natural são formados por 40 até 4000 resíduos de aminoácidos.³ Como cada aminoácido contém uma cadeia lateral diferente que lhe confere individualidade química, as proteínas possuem uma grande versatilidade funcional devido às diversas seqüências na qual os aminoácidos podem estar dispostos ao longo da cadeia.

Devido ao grande número de ligações intramoleculares entre os resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo, a descrição estrutural de uma proteína envolve quatro etapas: a descrição de sua estrutura primária, da secundária, da terciária e da quaternária. A estrutura primária de uma proteína consiste na seqüência de aminoácidos da sua cadeia peptídica e a posição de todas as ligações dissulfeto cruzada entre resíduos da cadeia. A estrutura secundária é o arranjo espacial de pequenos segmentos da cadeia do esqueleto protéico. A fim de minimizar a energia, a cadeia protéica tende a se dobrar em uma geometria repetitiva, como uma α -hélice ou uma folha β pregueada. Nas α -hélices a conformação da cadeia peptídica é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o grupo amino de um aminoácido e um grupo carboxila situado quatro resíduos adiante, na mesma cadeia polipeptídica. Na estrutura em folha β pregueada os aminoácidos assumem a configuração de uma folha de papel pregueada e a estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos amino e carboxila de diferentes cadeias polipeptídicas. Devido, em parte, ao fato de certos aminoácidos, como a prolina, destruírem a estrutura helicoidal, há segmentos da cadeia que não apresentam ligações transversais e assumem, por sua vez, uma configuração ao acaso.

A estrutura terciária de uma proteína descreve a estrutura tridimensional de todo o polipeptídeo. Caso uma proteína tenha mais de uma cadeia polipeptídica, há a estrutura quaternária, que é o modo como as subunidades protéicas estão arranjasdas umas em relação às outras e, no caso de proteínas complexas, com os grupos químicos não protéicos, tal como o grupo heme na hemoglobina⁶ (Figura 1). Ainda, as estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas podem ser modificadas por agentes químicos e físicos, como aquecimento, tratamento mecânico, ácidos ou bases e irradiação.⁷

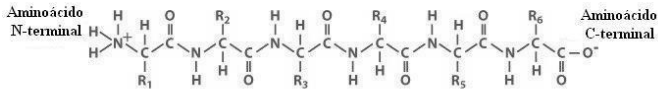
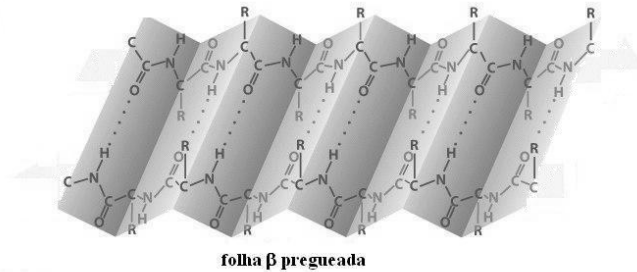
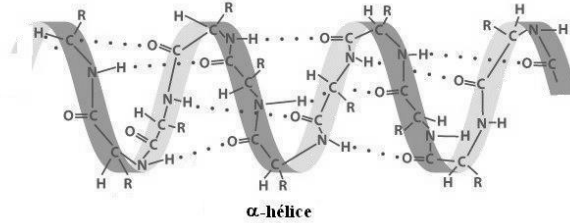
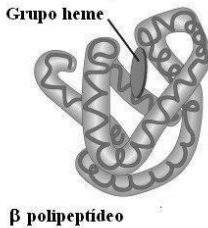
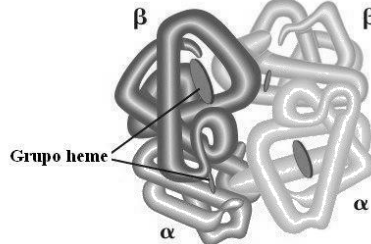
ESTRUTURA PRIMÁRIA**ESTRUTURA SECUNDÁRIA****ESTRUTURA TERCIÁRIA****ESTRUTURA QUATERNÁRIA**

Figura 1. Ilustração das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.⁸

A autoassociação de cadeias protéicas leva à formação de agregados com diferentes formas; as proteínas podem ser classificadas em virtude da morfologia destes agregados, como proteínas fibrosas ou globulares. As fibrosas consistem em cadeias polipeptídicas ordenadas lado a lado em longos filamentos e se apresentam de forma rígida e insolúvel em água. A elastina, presente nos ligamentos e artérias elásticas, e a queratina, presente na pele e pêlos, são exemplos de proteínas fibrosas. As proteínas globulares são comumente enoveladas e

compactas, tendo uma estrutura quase esférica e normalmente são solúveis em água.⁹ Possuem mobilidade dentro das células e como exemplo clássico desse fenômeno tem-se a hemoglobina, molécula que transporta o oxigênio do pulmão para as células.

As proteínas exercem muitos papéis cruciais nos processos biológicos: determinam a forma e a estrutura de uma célula, são os principais instrumentos de reconhecimento molecular, são catalisadores da maioria das reações biológicas, são recipientes de armazenamento e transporte de outras substâncias pelo corpo, são protagonistas de processos de defesa biológica e coagulação sanguínea.^{6, 10}

2.1.1. Proteína Isolada de Soja

A soja é a única leguminosa que contém os nove aminoácidos essenciais na proporção correta para a saúde humana. A proteína de soja é, portanto, classificada como uma proteína completa e de alta qualidade. É uma proteína de base vegetal que contém uma qualidade protéica igual à da carne, leite e ovos. Seus benefícios nutricionais incluem uma boa fonte de fósforo, potássio, vitamina B, zinco, ferro e a vitamina antioxidante E; além de proporcionar redução do colesterol, aumentar a densidade óssea, prevenir contra o câncer de mama, próstata e tireóide e aliviar os sintomas da menopausa (redução das ondas de calor).¹¹ Entretanto, o forte sabor das proteínas de soja limita suas aplicações nas indústrias alimentícias.¹²

Uma boa alternativa para o uso de proteínas de soja em produtos alimentícios é o extrato conhecido como proteína isolada de soja (SPI), que se encontra na forma de um pó de coloração creme e sabor suave. Com mais de 90% de proteínas em peso seco,¹³ a SPI é a forma mais refinada entre os derivados protéicos mais comuns e comparada com as demais proteínas (do trigo, do leite, dos ovos e da carne), contém maiores quantidades dos aminoácidos anabólicos, como a arginina e a glutamina. É produzida a partir dos flocos de soja, através de um processo que utiliza extração aquosa e aquecimento mínimo¹¹ e separada dos demais componentes não-protéicos através de um processo de purificação em etapas baseado em sua solubilidade.^{14, 15} Em geral, uma farinha desengordurada é preparada através de uma solução alcalina (pH 8.0) após a remoção da casca e do óleo dos grãos de soja. A partir da farinha se obtém a SPI por meio de um processo de extração em fase aquosa que usufrui da variação da solubilidade da proteína em função do pH, como exibido na Figura 2.^{16, 17}

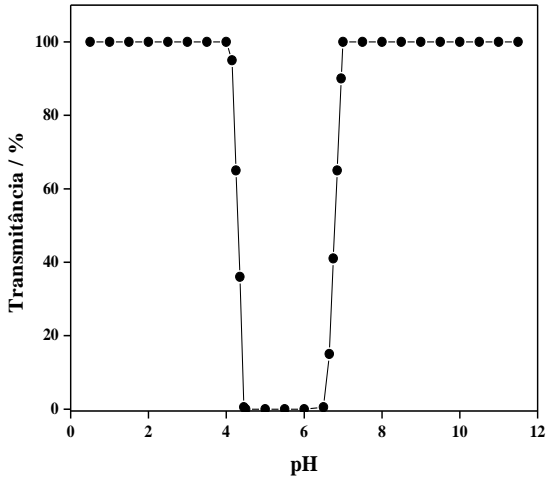


Figura 2. Diagrama de solubilidade da SPI em função do pH.¹⁷

Produto praticamente livre de carboidratos e de gordura, a SPI é constituída pelas proteínas de armazenamento da soja e compreende um conjunto de macromoléculas de tamanhos e estruturas variadas compostas a partir de 18 resíduos de aminoácidos distintos (Tabela 1). Com base na velocidade de sedimentação, soluções aquosas de SPI submetidas à ultra-centrifugação exibem aproximadamente 15 frações distintas. Todavia, a proteína pode ser fracionada em quatro frações principais identificadas como 2S (20-22%), 7S (37%), 11S (31-40%) e 15S (10-11%)¹⁷ As proteínas mais abundantes encontradas na soja são as globulinas ($\approx 70\%$), que são em sua maioria glicinina (11S) e β -conglucina (parcela 7S da globulina).^{16, 18}

Tabela 1. Principais aminoácidos presentes na SPI.¹⁷

Aminoácidos	Composição (g/16g de nitrogênio)
Metionina	1,26
Triptofano	1,28
Cisteína	1,33
Histidina	2,53
Tirosina	3,14
Treonina	3,86
Glicina	4,18
Alanina	4,26
Isoleucina	4,54
Valina	4,80
Fenilalanina	4,94
Serina	5,12
Prolina	5,49
Lisina	6,38
Arginina	7,23
Leucina	7,78
Ácido Aspártico	11,70
Ácido Glutâmico	18,70

Estruturalmente, a SPI é uma mistura predominantemente formada por proteínas globulares e, em água, apresenta agregados multiprotéicos na forma de esferas.¹⁹ As propriedades funcionais da SPI são determinadas por sua estrutura química e suas interações com outros componentes. Contudo, essas propriedades são limitadas por sua baixa solubilidade, particularmente se o pH está próximo do ponto isoelétrico da proteína.¹⁶

A SPI tem sido alvo de muitos estudos devido sua excelente biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades, como a capacidade de formar filmes, gelificação, emulsificação, propriedades de absorção de água e é um estabilizante de espumas.²⁰ É utilizada como alternativa nutricional, funcional ou econômica em substituição a outros tipos de proteínas tradicionais em alimentos como bebidas, produtos de panificação, pães, cereais, carne de frango, carne de gado e produtos de pescado.¹¹ A vasta gama de aplicações inclui a formação de filmes,^{21, 22}

estabilizante de emulsões,²³ revestimentos, infra-estrutura marinha e engenharia civil.^{1, 24}

Apesar da ausência de trabalhos que estudam a preparação e caracterização de nanopartículas de SPI, na literatura são encontrados trabalhos que descrevem a obtenção de micropartículas formadas por essa proteína. Um exemplo é o trabalho de Gan e colaboradores;²⁵ os autores prepararam, através do método de coacervação seguido de reticulação, microcápsulas de SPI contendo em seu interior óleo de peixe. O rendimento foi de 98% de conversão da SPI em microcápsulas com diâmetro médio entre 260 e 280 µm. Em seguida, a reticulação de Maillard foi realizada com ribose ou sucrose e as microcápsulas reticuladas foram menos solúveis em água quando comparadas ao controle. A liberação do óleo de peixe foi mais lenta nas cápsulas com ribose e estas foram mais estáveis cineticamente em comparação às microcápsulas reticuladas com sucrose. Os autores correlacionaram tais resultados à liberação de produtos antioxidantes durante a reação de Maillard, que geram uma taxa menor de permeabilidade de gás através das cápsulas.

Em outro trabalho recente, microcápsulas de SPI com pectina para encapsulação de caseína hidrolisada foram preparadas através do método de coacervação complexa, por Mendanha e colaboradores.²⁶ A morfologia, a hidrofobicidade, a tensão superficial, a eficiência de encapsulação e testes sensoriais foram avaliados em todas as amostras. Segundo os autores, a estabilidade das amostras foi maior em água gelada e a hidrofobicidade diminuiu inversamente com a quantidade de caseína hidrolisada nas microcápsulas. A eficiência de encapsulação variou de 91,6 a 78,8% e a tensão superficial das microcápsulas foi maior quando comparada a caseína não encapsulada. Os resultados do teste sensorial nas cápsulas evidenciaram a diminuição do gosto amargo da caseína hidrolisada mostrando que o método de coacervação complexa, usando a SPI e a pectina como material de revestimento, foi não só eficiente na microencapsulação mas também na atenuação do sabor da caseína hidrolisada. De maneira semelhante, Favaro-Trindade e colaboradores²⁷ prepararam microcápsulas de SPI com gelatina, pela técnica de spray drying, para a encapsulação de caseína hidrolisada. As partículas obtidas foram esféricas e apresentaram concavidades e poros. Segundo os autores, os resultados sensoriais evidenciaram a atenuação do gosto amargo da substância encapsulada, indicando que a mistura SPI/gelatina pode ser usada para a encapsulação de caseína para fins alimentícios.

2.2. Óleo de Copaíba

Nativas da região tropical da América Latina, as copaíbas são árvores encontradas na região que se estende do México ao norte da Argentina. Das 72 espécies existentes do gênero *Copaifera*, 16 são encontradas no Brasil.²⁸ Popularmente conhecidas como mari-mari, copaíba-roxa, pau-d'óleo ou simplesmente copaíba²⁹ essas árvores são facilmente encontradas na região Amazônica e Centro-Oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes presentes no território nacional destacam-se *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. Multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. Langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart., *C. cearensis* Huber ex Ducke²⁸ Pertencente à família Leguminosae-Caesalpinioideae, a copaibeira é usada com frequência pela população tradicional da região amazônica.³⁰

O óleo de copaíba é comumente conhecido como bálsamo de copaíba, entretanto, a designação correta é óleo-resina, por ser um líquido constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis.²⁸ Esse óleo é um líquido transparente de coloração que varia de amarelo a marrom.³¹ Sua coleta é realizada de forma sustentável por incisão com trado no tronco, a mais de um metro de altura do solo. Esse óleo é utilizado pelas indústrias de cosméticos e de vernizes resistente a alta temperatura e também para fins medicinais da qual se atribuem propriedades antiinflamatórias, anti-sépticas, analgésica,³⁰ sendo ainda utilizado no tratamento de doenças venéreas e lesões dérmicas.³² O óleo de copaíba ainda é utilizado em diversos outros usos medicinais, embora muitas aplicações necessitem de pesquisas para comprovar a eficácia e determinar a dosagem recomendada. Em reportagem publicada na revista Galileu (2002),³³ pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) resumiram as diversas aplicações farmacêuticas do óleo frisando que "*o óleo de copaíba é uma verdadeira farmácia natural*". Além das aplicações medicinais, o óleo possui reconhecido potencial para ser utilizado como fixador de perfumes, tintas e vernizes,²⁹ além do possível uso como combustível em substituição do óleo diesel, uma vez que sua composição molecular é compatível.³⁴

O óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.³⁵ Uma mesma árvore, quando explorada em períodos diferentes, poderá produzir óleos de qualidade diferente, inclusive de intensidade de cor, densidade e componentes químicos.^{36, 37} O óleo apresenta certa variedade na porcentagem de seus componentes, parecendo essa ser mais sensível a fatores abióticos (como insetos e fungos) do que à

luminosidade e nutrientes. Além disso, dependendo do tipo de óleo, também podem ser notadas diferenças em sua composição química devido à eventual mistura dos óleos de espécies botânicas variadas, ou ainda de espécimes de idades e locais distintos. Há uma carência de estudos químicos visando à caracterização do óleo de copaíba, entretanto, no que se refere à composição química dos óleos-resinas das espécies de *Copaifera*, observa-se a predominância de diterpenos e sesquiterpenos, como o α -humuleno, α e β -selineno, β -bisaboleno e β -cariofileno (Figura 3).^{38, 39}

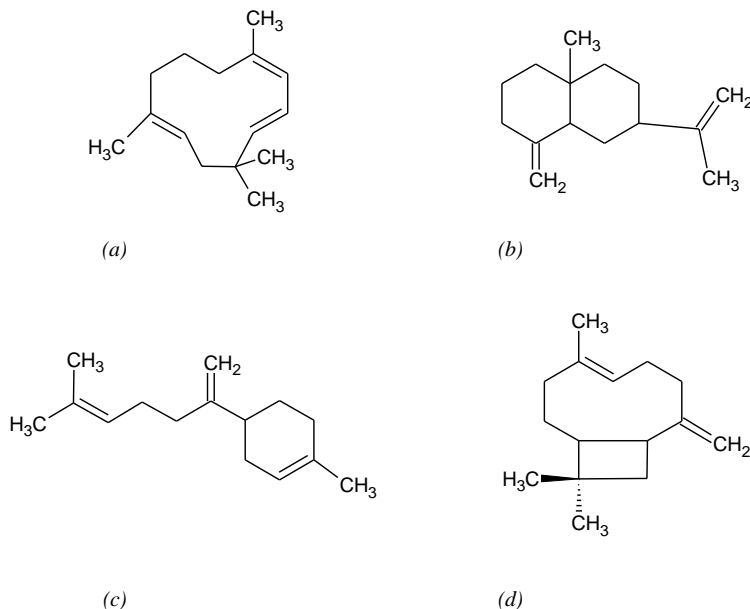


Figura 3. Estrutura química do (a) α -humuleno, (b) β -selineno, (c) β -bisaboleno e (d) β -cariofileno.

2.3. Micro e Nanopartículas

Micro e nanopartículas podem ser obtidas por vários materiais, incluindo polímeros, compósitos cerâmicos, metais e sais inorgânicos. Devido a sua baixa densidade, grande área superficial, estabilidade e permeabilidade superficial, essas partículas são de grande interesse científico e tecnológico em diversos setores industriais. São largamente usadas na encapsulação e na liberação controlada de várias substâncias, desde pigmentos, aromas e pesticidas a fármacos e nutrientes.⁴⁰ O

processo de encapsulação pode ocorrer por mecanismos diferentes; por esta razão, estes sistemas podem ser matriciais ou tipo reservatórios, sendo denominados de esferas ou cápsulas, respectivamente. As esferas (Figura 4A) são sistemas matriciais homogêneos constituídos por uma rede polimérica em que o princípio ativo encontra-se dissolvido, distribuído na forma de cristais ou adsorvido na superfície das partículas. As cápsulas (Figura 4B) são sistemas vesiculares heterogêneos em que o fármaco encontra-se confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa, o qual se encontra envolvido por uma única membrana polimérica de espessura variável.⁴¹

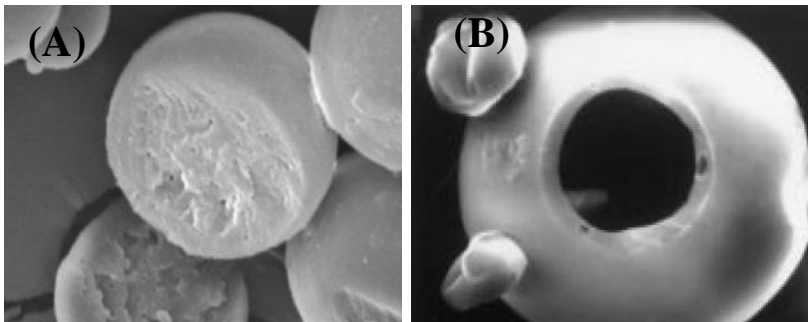


Figura 4. Representação de (A) esfera⁴² e (B) cápsula.⁴³

A maior vantagem das cápsulas sobre esferas reside na sua capacidade de encapsular maiores quantidades de princípios ativos hidrofóbicos. Além disso, em virtude do confinamento do princípio ativo na cavidade, o efeito de liberação inicial (ou efeito burst) pode ser reduzido consideravelmente.⁴⁴

2.3.1. Micropartículas poliméricas

As micropartículas poliméricas encontram muitas aplicações industriais. São de extrema importância na indústria farmacêutica por permitirem o desenvolvimento de fármacos com capacidade de liberar princípios ativos somente nas doses desejadas e nos locais específicos nos quais devem agir. Definidas como partículas esféricas com tamanhos que variam de 1 a 250 μm , as micropartículas apresentam como características o tamanho e volume pequenos, grande área superficial, alta difusibilidade, uniformidade e formam dispersões cineticamente estáveis.⁴⁵

As características de encapsulamento e liberação das micropartículas obtidas estão intimamente correlacionadas com as

propriedades dos polímeros utilizados. A liberação do princípio ativo pode ser modulada através do ajuste de diversos parâmetros, como o emprego de polímeros com diferentes massas molares, uso de copolímeros ou blendas poliméricas, ação de aditivos, reticulação da matriz polimérica, entre outros. Os princípios ativos podem ser encapsulados por diferentes métodos, dependendo do tipo do material, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para sua ação. A diferença entre os métodos está na forma de aprisionamento do princípio ativo pelo material encapsulante, sendo que a combinação entre os dois pode ser de natureza física, química ou físico-química.⁴⁶

A microencapsulação oferece diversas vantagens frente aos sistemas unitários convencionais, uma vez que possibilita modular os perfis de liberação de diversas maneiras. A substância encapsulada pode ser liberada por meio de estímulos mecânicos (rompimento das microcápsulas através de pressão), através de difusão a partir do carregador ou ainda pode ter sua liberação modulada pela decomposição do sistema.⁴⁷ A microencapsulação evita a reatividade elevada e a oxidação de vários minerais que alteram a cor e/gosto do material quando são incorporados. Nesses casos, o sabor dos minerais nos produtos enriquecidos é mascarado, a reatividade com outros componentes é reduzida e a liberação é controlada, permitindo uma melhor absorção.⁴⁸ Além disso, as micropartículas viabilizam a proteção do princípio ativo, melhoram a eficiência do tratamento e permitem o uso de menores quantidades do princípio ativo a ser encapsulado.⁴⁷

Apesar do crescente interesse da indústria, a falta de conhecimentos básicos sobre mecanismos de formação de partículas e sobre as possibilidades de aplicação dos vários processos de microencapsulação conhecidos ainda limita o uso dos produtos microencapsulados. Os produtos microencapsulados postos à venda no Brasil (fármacos anti-inflamatórios, vitaminas e suplementos minerais, cosméticos e fertilizantes) são, em sua maioria, importados, pois poucas empresas dominam esta tecnologia.⁴⁹

2.3.2. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais que têm recebido considerável atenção nos últimos anos, particularmente aquelas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis.⁵⁰

As partículas obtidas podem ser na forma de agregados sólidos, como nanoesferas, ou de materiais compartimentalizados, como vesículas ou nanocápsulas. O tamanho das nanopartículas obtidas pela

auto-associação de polímeros varia de algumas dezenas até 500 nanômetros.^{41, 51}

Em função da distinta composição interna, os sistemas coloidais poliméricos permitem a inclusão, em sua estrutura, de princípios ativos com características físico-químicas bem diferenciadas: desde moléculas altamente hidrofóbicas a princípios ativos hidrofílicos e polares. Nas nanopartículas, o princípio ativo encontra-se associado, encapsulado ou adsorvido. A principal vantagem da nanoencapsulação é a obtenção de ação prolongada, ou controlada, do princípio ativo incorporado ou encapsulado.⁵² Outras vantagens na utilização de sistemas poliméricos para a nanoencapsulação de princípios ativos incluem a proteção frente à degradação, a diminuição dos efeitos tóxicos e redução do número de administrações.⁵³

A versatilidade destes sistemas poliméricos permite que o tamanho e as características da superfície das partículas obtidas possam ser modulados para atender às necessidades da aplicação: adequação a uma determinada via de administração, liberação seletiva apenas no tecido alvo ou ajuste da cinética de degradação da matriz e liberação do princípio ativo.⁵⁴

2.4. Técnicas de Preparação de Micro e Nanopartículas

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de micro e nanopartículas. Entretanto, o método de obtenção de partículas representa um fator crucial para as suas características físico-químicas como distribuição de tamanho e morfologia, o que, em contrapartida, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação de princípios ativos.⁵⁵

As partículas poliméricas podem ser preparadas por meio de métodos físico-químicos, tais como difusão do solvente, inchamento osmótico, secagem em torre de aspersão (spray drying), emulsão seguida da evaporação do solvente, miniemulsão, coacervação, poliadição ou policondensação.⁵⁶

Partículas de biopolímeros, como caseína,⁵⁷ gelatina,⁵⁸ glúten de trigo,⁴² gliadina⁵⁹ e quitosana⁶⁰ têm sido largamente preparadas através de métodos físico-químicos.

2.4.1. Emulsificação/evaporação do solvente

Para a obtenção de partículas, o método de emulsificação/evaporação do solvente tem sido frequentemente empregado frente à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à

possibilidade de otimização das características físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação.⁶¹

Nesse método, uma solução polimérica em um solvente orgânico volátil é emulsificada em uma fase aquosa, contendo um agente estabilizante. O solvente orgânico é removido da fase interna pela aplicação de calor, vácuo⁶² ou ainda, pela sua evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela adição de um solvente extrator.⁶³ As partículas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente adequado e secas sob condições apropriadas ou liofilizadas.⁶⁴

Apesar da simplicidade dos procedimentos envolvidos, a formação das partículas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se a agitação e natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de dissolução do polímero é uma característica desejável do solvente da fase interna. Além dessas características, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixo ponto de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar elevada taxa de encapsulação, o princípio ativo e o polímero também devem ser insolúveis na fase externa.⁶²

Estudos relacionados à preparação de partículas de proteína através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente tem sido a escolha de muitos pesquisadores em trabalhos na literatura científica devido a sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos. Andreani e colaboradores⁴² preparam micropartículas de glúten de trigo, através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, para uso como dispositivos de liberação controlada, e avaliaram o efeito da adição de polietileno glicol (PEG). Foram obtidas partículas em torno de 18 μm e com a porosidade variando com a presença de PEG. A eficiência de encapsulação do fármaco modelo aumentou com a presença de PEG e os resultados de DSC e de FTIR indicaram a existência de interações intermoleculares entre as macromoléculas.

Em outro trabalho, Chen e Subirade⁶⁵ obtiveram microesferas de proteína do soro do leite e alginato de sódio para utilização como matrizes biocompatíveis na administração oral de compostos bioativos sensíveis. As microesferas mostraram a habilidade de retardar a liberação de compostos no estômago, porém permitindo a completa liberação no intestino delgado.

2.4.2. *Spray drying*

A aspersão em torre de secagem, também chamada de nebulização ou *spray drying* é um processo de pulverização e secagem de partículas líquidas e sólidas, muito usado, por exemplo, na obtenção de leite em pó. É ainda, a técnica de encapsulamento mais econômica, tendo um vasto uso na indústria de aromas, onde seu custo de produção é baixo, quando comparado com outros métodos.⁶⁶ O procedimento de encapsulação se baseia na pulverização de uma solução ou suspensão polimérica contendo o princípio ativo em uma câmara de secagem. O princípio ativo é dissolvido ou disperso na solução polimérica e a mistura líquida é dividida sob a forma de finíssimas gotículas para dentro da câmara de secagem cujo interior circula ar aquecido. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto. Sendo assim, a técnica de *spray drying* é capaz de diminuir a temperatura de vaporização necessária para a eliminação do solvente, obtendo-se então o produto encapsulado.⁶⁷ Os parâmetros fundamentais de controle de secagem para as características do produto obtido são: temperatura de entrada e saída do ar, fluxo do ar de secagem, distribuição de temperatura e umidade, tempo de resistência da amostra, parâmetros de injeção da amostra e geometria da câmara.⁶⁸

Wang e Langrish⁶⁹ desenvolveram um modelo de secagem de partículas para descrever as composições e as temperaturas de partículas preparadas por *spray drying* usando diferentes cinéticas de secagem. O modelo simula a cinética de secagem dentro de um *spray dryer* e também esclarece os efeitos da solubilidade de sólidos, assim como a atividade de superfície dos componentes. As cinéticas de secagem das partículas foram examinadas sob condições isotérmicas com baixas concentrações de sólidos obtendo sucesso na comparação dos resultados da cinética com os analíticos. O calor interno e externo e os processos de transferência de massa encontrados concordam com a literatura.

A técnica de *spray drying* é amplamente utilizada em sistemas que visam a encapsulação de princípios ativos que possuem odor e/ou gosto forte. A fim de atenuar o gosto amargo da caseína hidrolisada, Ortiz e colaboradores⁷⁰ utilizaram a técnica de *spray drying* para encapsular esse produto usando a proteína isolada de soja como material de revestimento. As microcápsulas formadas apresentaram tamanho entre 9,2 e 11,3 μm e ausência de porosidade. Houve aumento da hidrofobicidade do material encapsulado após a formação das cápsulas e os resultados de teste sensorial consideraram as amostras encapsuladas

menos amargas quando comparadas à caseína hidrolisada pura, mostrando assim, que a técnica de spray drying com SPI é um método eficiente para a microencapsulação e atenuação do gosto amargo da caseína hidrolisada.

2.4.3. Coacervação

De acordo com a definição da IUPAC (“*IUPAC Compendium of Chemical Terminology, eletronic version*”), a coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais. A fase mais concentrada no componente coloidal é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio. A separação de fases ou coacervação simples e complexa transforma substâncias inicialmente solúveis, tais como polímeros e ceras, em materiais insolúveis no mesmo meio.⁴⁶

Sob o termo de coacervação, estão agrupadas uma série de técnicas de encapsulação baseadas na desolvatação do polímero induzida por algum procedimento que conduz a alteração das características do meio. Quando apenas uma única macromolécula está presente, o processo é designado por coacervação simples. Entre os procedimentos capazes de induzir a precipitação do polímero sob a forma de esferas destacam-se a mudança de temperatura, a modificação do pH e a adição de um não solvente, sal ou de outro polímero incompatível,⁶³ que promovem as interações macromolécula-macromolécula em detrimento das interações macromolécula-solvente.

A coacervação complexa é o processo de separação de fases baseado na desolvatação simultânea de dois ou mais polieletrólitos carregados opostamente induzida por modificações no meio. Esta separação de fases é dependente do pH, força iônica do meio e concentração do poliíon.⁷¹

A estrutura final e a composição das nanoestruturas obtidas são resultantes de uma complexa contribuição das características físico-químicas do polímero, da substância a ser encapsulada, solventes e agentes emulsificantes. Estes últimos têm como função estabilizar a dispersão dos glóbulos na forma de suspensão, prevenindo a agregação e a coalescência das partículas.⁷²

Lazko e colaboradores⁷³ utilizaram glicina de soja como material de revestimento na encapsulação do hexadecano utilizando o método de coacervação. Através da investigação das condições apropriadas da emulsificação e coacervação, chegou-se à conclusão que aquecimento (55 °C) e pH ácido durante a etapa da emulsificação realçam significativamente o depósito de glicina de soja em volta das gotas de

óleo. A etapa de coacervação foi responsável pela morfologia e estabilidade das microcápsulas e seu controle inicial, pelo reajuste do pH, permitiu uma precipitação homogênea da glicina de soja em torno das gotas de óleo assim como a ausência de fenômenos de agregação.

2.5. Reticulação Polimérica

Quando comparados aos materiais sintéticos, os biopolímeros, tais como proteínas e polissacarídeos, são geralmente uma alternativa ecologicamente importante. Todavia, dependendo da aplicação a qual se destina o material, sua solubilidade em água pode ser uma desvantagem. O processo de reticulação, responsável pela formação das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, pode contornar esse problema, além de ser uma forma de alterar a resistência química, as propriedades adesivas, a estabilidade térmica e mecânica e a taxa de degradação do material.⁷⁴

A reticulação consiste na formação de ligações covalentes estáveis entre segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da proteína (ligações intramoleculares) ou entre cadeias poliméricas vizinhas (ligações intermoleculares)⁷⁵ formando uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado. O processo dificulta o empacotamento das cadeias poliméricas impedindo a formação de regiões cristalinas.⁷⁶ As ligações cruzadas são vitais para manter a conformação de determinadas proteínas, e podem controlar o grau de flexibilidade das cadeias polipeptídicas. Atualmente, dois métodos principais de reticulação vêm sendo descritos para as proteínas: a reticulação física e a reticulação química.

Mesmo não permitindo um total controle do grau de reticulação da matriz polimérica, os métodos físicos mais utilizados são o tratamento térmico do material e a radiação UV. Os métodos químicos utilizam agentes reticulantes que atuam na ligação covalente de resíduos de diferentes grupos funcionais das proteínas, como NH₂, COOH, SH, etc.⁷⁶

2.5.1. Reticulação física

Quando submetidas a tratamento térmico, as proteínas possuem a habilidade de formar ligações dissulfeto,⁷⁷ que são os tipos mais comuns e melhor caracterizados de ligações covalentes nas proteínas. As ligações dissulfeto são formadas pelo acoplamento oxidativo de dois resíduos do cisteína adjacentes dentro da matriz protéica. Um agente oxidante aceita os átomos de hidrogênio dos grupos tióis dos resíduos de

cisteína, formando assim as ligações de dissulfeto,⁰³ como mostrado no esquema da Figura 5.

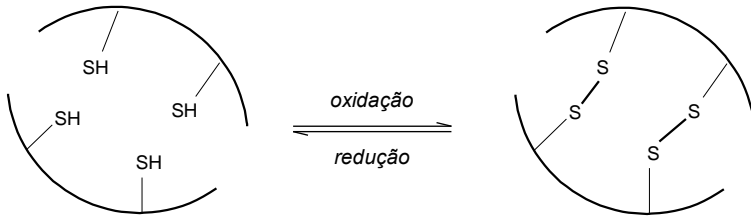


Figura 5. Esquema representativo da reticulação física de resíduos protéicos.

Stuchell e Krochta⁷⁸ relataram que as estruturas quaternárias das proteínas 7 e 11S da SPI podiam ser destruídas pelo tratamento térmico. O calor também desnatura as estruturas secundárias e terciárias das proteínas e possibilitam intercâmbio do dissulfeto entre as moléculas de proteína.

Cao e Chang⁷⁹ descreveram que durante o tratamento térmico, partes da estrutura tridimensional da 11S é desnovelada e uma porção de resíduos hidrofóbicos (grupos -SH e ligações S-S) ficam expostos para a água. Quando a distância entre as moléculas é pequena o suficiente, ocorre polimerização intermolecular através de forças moleculares dos grupos tióis, ligações dissulfeto e/ou ligações hidrofóbicas, resultando em uma rede intermolecular.

As ligações dissulfeto são importantes porque conferem estabilidade térmica as proteínas. Masaki e colaboradores⁸⁰ conseguiram, por meio dessas ligações covalentes, explicar a estabilidade da lisozima da clara do ovo, que possui quatro ligações intermoleculares de dissulfeto em sua conformação. Esta estabilidade térmica influencia muitas das propriedades da clara de ovos observadas durante o cozimento. Ainda na área de alimentos, Lindsay e Skerritt⁸¹ relatam que as ligações dissulfeto são importantes na formação de massa de pão, uma vez que estas ligações são formadas durante a mistura da farinha de trigo com a água resultando na produção de uma rede protéica com propriedades viscoelásticas exigidas para a sua produção.

2.5.2. Reticulação química

A toxicidade do agente reticulante empregado para a reticulação do polímero é um fator importante a ser considerado. A efetiva reticulação de polissacarídeos e proteínas pode ser realizada com o uso de

carbodiimidas, como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Figura 6). Seu uso é vantajoso porque não é incorporado à estrutura da proteína reticulada, tendo como subproduto da reação somente um derivado de uréia solúvel em água, que pode ser removido por sucessivas lavagens. Além disso, não é tóxico, quando comparado a reticulantes como formaldeído e glutaraldeído.⁸²

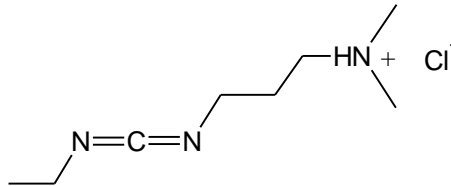


Figura 6. Estrutura química do EDC.

O EDC promove a formação de ligações amida entre grupos carboxílicos dos resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico e grupos amino, mais frequentemente grupo ϵ -NH₂ de um resíduo de lisina, das proteínas. Existe ainda a possibilidade de formação de ligação éster entre grupos carboxílicos e grupos hidroxilas dos polipeptídeos. Na Figura 7 é exibido o mecanismo de reticulação de uma proteína com a carbodiimida em meio aquoso, proposto por Nakajima e colaboradores.⁸³

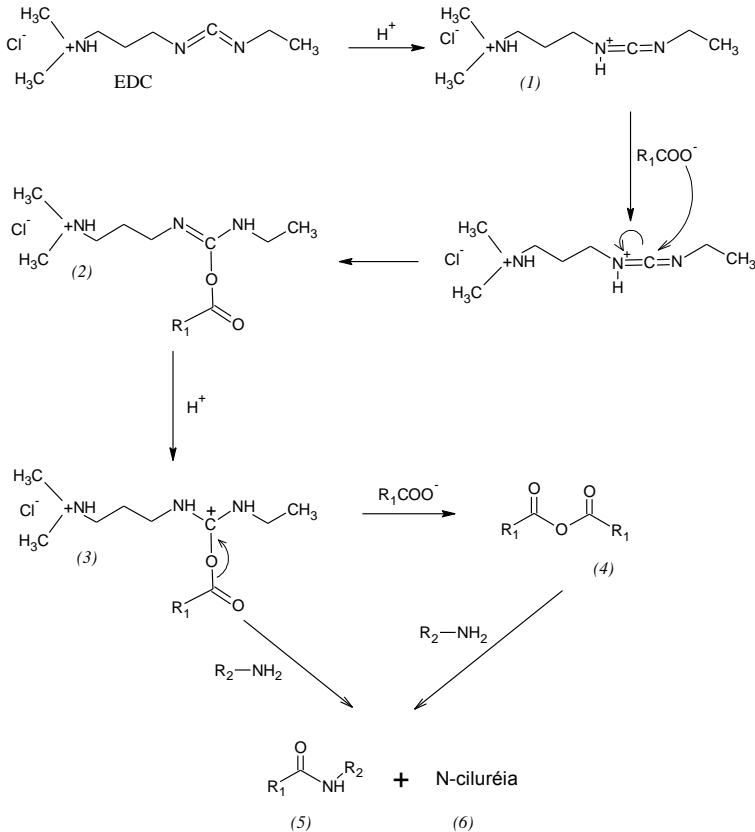


Figura 7. Reação de reticulação de uma proteína com EDC em meio aquoso.⁸³

No processo de reticulação, o EDC é protonado (1) e reage com o grupo carboxila ionizado da proteína para formar a o-isoaciluréia (2) que logo é protonada, formando um carbocátion (3). Por ser uma base forte, o grupo carboxila ionizado reage com o carbocátion (3) produzindo um anidrido carboxílico (4), que em presença de grupo amino rapidamente forma uma ligação amida (5), por ataque nucleofílico, promovendo assim a reticulação da molécula em questão. Alguns grupos amino também podem reagir diretamente com o carbocátion (3) para promover a reticulação (5) sem a formação do anidrido. Com excesso de EDC, a reação com o carbocátion (3) pode formar como subproduto a n-aciluréia (6).⁸³

De acordo com o esquema da Figura 7, considerando o presente trabalho, o EDC reage com os grupos carboxílicos da SPI para formar

um derivado que reagirá com os grupos amino livres da proteína, formando ligações amida. Não se conhece, até o momento, nenhuma descrição da reticulação de SPI com carbodiimidas. Todavia, o uso da carbodiimida EDC como agente reticulante é bastante sugerido nos estudos de outras proteínas. Tropini e colaboradores⁷⁶ estudaram filmes de glúten de trigo reticulados com EDC e plastificados com glicerol e constataram um grande aumento da resistência dos filmes à água e pequenas mudanças nas propriedades mecânicas e no intumescimento dos filmes.

Liang e colaboradores⁸⁴ estudaram hidrogéis de gelatina reticulados com EDC e genipin e observaram que a carbodiimida pode formar ligações intramoleculares na gelatina, assim como ligações intermoleculares curtas entre moléculas adjacentes desta proteína. Outro reagente químico também bastante usado para reticulação de proteínas é o formaldeído.

Com o intuito de investigar o potencial de filmes de SPI como sistemas de liberação controlada de princípios ativos, Chen e colaboradores⁸⁵ utilizaram formaldeído para o processo de reticulação dos filmes. A densidade de reticulação forneceu meios eficazes de regular a taxa de liberação de compostos presentes nos filmes de SPI.

A reticulação química da SPI também pode ser feita por meio de tratamento enzimático ou microbiano. Tang e colaboradores⁸⁶ investigaram o efeito da transglutaminase nas propriedades de filmes de SPI e constataram que a reticulação aumentou a tensão de ruptura e a hidrofobicidade da superfície e deixou os filmes mais homogêneos e compactos.

Jiang e colaboradores⁸⁷ demonstraram que há um aumento significativo nos valores de tensão de ruptura dos filmes de SPI com baixa concentração de transglutaminase e com o aumento da concentração da enzima há o efeito contrário. O alongamento dos filmes diminuiu e os valores de ângulo de contato aumentaram gradualmente com a concentração de enzima presente no meio.

2.6. Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfífilas cujas estruturas moleculares caracterizam-se por apresentar, no mínimo, duas regiões com propriedades físico-químicas distintas: uma região líofílica e outra líofóbica. Quando o solvente for a água, a molécula de um surfactante deve ter uma região hidrofílica (polar ou iônica) e uma região hidrofóbica (hidrocarboneto apolar). Popularmente conhecidos como

sabões e detergentes, os surfactantes são moléculas que agem na superfície (tensoativos) e que tendem a se adsorverem nas regiões interfaciais de sistemas heterogêneos, na superfície de líquidos e sólidos e em macromoléculas produzindo estruturas ordenadas. São capazes de formar filmes moleculares ordenados nas interfaces, o que reduz a tensão interfacial e superficial. Este aspecto faz de seu uso importante e amplo nas aplicações industriais em decorrência de propriedades como detergência, estabilização de espumas, aumento da molhabilidade, controle da lubrificação, solubilização de moléculas hidrofóbicas e estabilização de dispersões coloidais.⁸⁸

Os tensoativos podem ser classificados conforme a natureza do grupo hidrofílico em: surfactantes iônicos, que possuem um grupo hidrofílico iônico (catiônico ou aniônico) ligado a uma cauda hidrofóbica; surfactantes zwitteriônicos que contêm ambas as cargas, positiva e negativa, na parte hidrofílica; surfactantes anfóteros que podem ser catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos, dependendo do pH e, ainda, surfactantes não iônicos, cujo grupo hidrofílico é geralmente uma cadeia poliéter, podendo ser também uma cadeia poli-hidroxílica.⁸⁹

Os surfactantes são amplamente utilizados no estudo de estabilização de emulsões e partículas. A estabilização deve-se ao fato de que as moléculas se adsorvem na interface das gotículas, diminuindo a tensão interfacial e dificultando a coalescência, através do aumento da repulsão estérica e, no caso de surfactantes iônicos, elétrica. O excesso de surfactante, entretanto, pode levar à desestabilização de uma dispersão. Através de medidas de DLS, Wulff-Pérez e colaboradores⁹⁰ estudaram a estabilidade da nanoemulsões o/a usando como surfactante o copolímero Pluronic F-68. Em baixas concentrações de surfactante as emulsões foram estáveis e o tamanho das gotas de óleo menores que 500 nm. Houve desestabilização do sistema quando este se encontrava com altas concentrações de pluronic; com surfactante em excesso, as micelas não adsorvidas podem levar a um processo associativo de floculação causado pela depleção do solvente.

Hou e Papadopoulos⁹¹ avaliaram o efeito do pH, força iônica e concentração dos surfactantes Tween 80 e Span 80 na estabilidade de gotas em emulsões múltiplas ($a_1/o/a_2$ e $o_1/a/o_2$) através de microscopia ótica. O tipo e a concentração de surfactante foram os fatores principais no controle da estabilidade dos glóbulos e o Span 80 possuiu maior habilidade de estabilidade dos glóbulos quando comparado ao Tween 80.

Devido às características anfífilas, biopolímeros como proteínas também podem ser utilizados na emulsificação. Uma das proteínas que podem ser usadas para este fim é o SPI. As propriedades físico-químicas, em diferentes temperaturas, de emulsões o/a estabilizadas por SPI, foram estudadas por Keerati-u-rai e Corredig.¹⁸ O aquecimento induziu um aumento do tamanho das partículas e da viscosidade das emulsões, indicando agregação das gotas de óleo e tal efeito foi maior em temperaturas mais altas. Através de medidas de TEM observou-se que o aquecimento induz a formação de grandes agregados de proteína na interface óleo-água.

2.7. Mecanismos de Proteção de Dispersões Coloidais

2.7.1. Redução da Energia Interfacial

O estado termodinâmico de um sistema com mais de uma fase é bastante influenciado pelo número de átomos ou moléculas que estão na região de fronteira entre as fases. A energia de Gibbs do sistema aumenta com a área interfacial σ (Equação 1). Como resultado, o equilíbrio termodinâmico de um sistema disperso é o da completa segregação de fases, levando a uma área interfacial mínima. Em outras palavras, as dispersões são termodinamicamente instáveis.⁹²

$$\left(\frac{\partial G}{\partial \sigma} \right)_{p,T,n'} = \gamma \quad (\text{Eq. 1})$$

Como em uma dispersão coloidal a área interfacial é grande em relação ao volume do sistema, a redução da tensão interfacial é necessária para o aumento da estabilidade termodinâmica da dispersão, pois leva a uma redução da energia interfacial do sistema. A redução da tensão interfacial pode ser obtida através do uso de um surfactante (tal como visto em tópico anterior). Devido à natureza anfífila das moléculas tensoativas, elas tendem a serem adsorvidas na interface, promovendo a redução da tensão interfacial.

Neste trabalho, tanto os surfactantes utilizados como a SPI possuem características anfífilas e atuam na redução da tensão interfacial e, portanto, contribuem para o aumento da estabilidade das dispersões coloidais obtidas.

2.7.1.1. Estabilização Eletrostática

A degradação de uma dispersão envolve a agregação, coagulação ou coalescência das partículas da fase dispersa. Quando uma proteína é usada como agente estabilizante, a ionização dos resíduos de

aminoácidos (em função do pH do meio) leva à presença de cargas na interface. A existência de cargas elétricas na região interfacial de uma gotícula numa emulsão ou de uma partícula em uma suspensão pode oferecer uma barreira energética contra a coalescência destas e é a origem da estabilização por repulsão eletrostática.

O mecanismo da repulsão elétrica pode ser descrito pelo modelo DLVO que diz que o potencial total de interação entre duas partículas coloidais é dado pela soma do potencial de atração (V_A), que vem de forças atrativas de van der Waals e do potencial de repulsão (V_R) que resulta da presença de cargas elétricas na interface (Equação 2).⁹³

$$V_T = V_A + V_R \quad (\text{Eq. 2})$$

O valor do V_R é determinante na estabilidade de uma dispersão. Este potencial pode ser descrito como uma função do raio da partícula, a , do potencial elétrico na superfície da partícula, Ψ_0 (que depende da quantidade de carga na interface) e diminui com a distância H da superfície da partícula. Este decaimento é exponencial, tal como visto na Equação 3. O coeficiente κ é o recíproco do comprimento de Debye κ^{-1} , que pode ser compreendido como a largura da atmosfera iônica (dupla camada elétrica) que envolve a partícula.⁹³

$$V_R = \frac{\epsilon_r a^2 \Psi_0^2}{R} e^{-\kappa H} \quad (\text{Eq. 3})$$

O comprimento de Debye, tal como mostra a Equação 4, diminui com o aumento da força iônica I : a adição de sal leva à contração da dupla camada elétrica e a atenuação do potencial de repulsão V_R .⁹⁴

$$\frac{1}{\kappa} = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0}{2\pi F^2 I} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Por esta razão a variável força iônica na estabilidade cinética das dispersões foi investigada neste trabalho.

2.7.1.2. Estabilização Estérica

Quando polieletrólitos (tal como proteínas) são utilizados com agentes estabilizantes de dispersões outro mecanismo de proteção da dispersão também surge: a molécula não somente diminui a tensão interfacial e aumenta a repulsão eletrostática, mas também cria a chamada proteção estérica.

O mecanismo desta proteção é baseado em duas contribuições termodinâmicas diferentes: a pressão osmótica e a entropia configuracional.

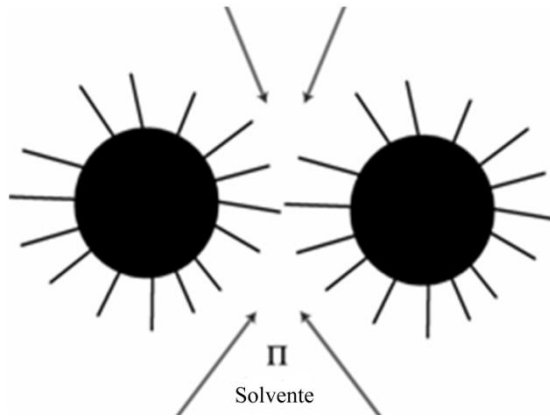


Figura 8. Ilustração da barreira osmótica de aproximação de duas partículas em uma dispersão.

O potencial de repulsão osmótica V_{osm} se origina da diferença de concentração (e conseqüentemente pressão osmótica) que surge quando duas partículas com polímeros adsorvidos na interface se aproximam: a concentração local de polímero no espaço entre as partículas fica maior do que na vizinhança, levando a um fluxo osmótico espontâneo de moléculas de solvente para a região de sobreposição, tal como ilustrado na Figura 8.

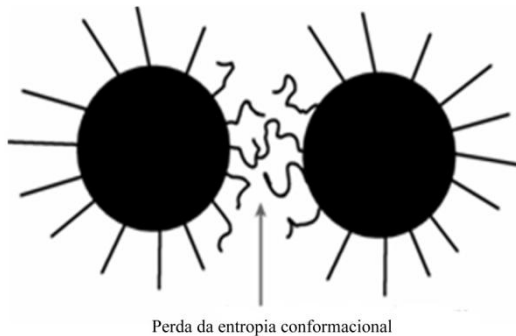


Figura 9. Ilustração do potencial de repulsão entrópico, V_s .

Outro efeito surge na aproximação de partículas com cadeias poliméricas adsorvidas na interface: quando as partículas estão a uma

distância próxima ao dobro do tamanho da cadeia polimérica algumas moléculas são forçadas a uma compressão elástica, tal como ilustrado na Figura 9. Esta compressão tem um efeito termodinâmico: a diminuição da entropia configuracional das cadeias, isto é, a redução no número de configurações espaciais possíveis para a cadeia do polímero. A redução da entropia leva a um aumento da energia de Gibbs do sistema, tornando a aproximação termodinamicamente desfavorecida: o afastamento das partículas devolve a entropia configuracional das cadeias e diminui a energia do sistema.

2.8. Considerações sobre espalhamento de luz

Quando um feixe de luz incide sobre uma solução ou suspensão aquosa observa-se o espalhamento de fótons deste feixe para direções (ângulos θ) diferente da direção do feixe incidente ($\theta=0$). A intensidade de luz espalhada I tem dependência angular e é uma função do número de espécies espalhadoras presentes na amostra, da morfologia destas espécies, da concentração e da natureza química das mesmas, além da dependência com a viscosidade, índice de refração e polaridade do solvente. Com isso, é possível se obter informações importantes sobre o sistema apenas medindo $I(q)$ e $I(q, t)$. A variável q é o vetor de onda que expressa a dependência angular como:

$$|\vec{q}| = q = \frac{4\pi \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (\text{Eq. 5})$$

No SLS mede-se apenas a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz, $I(q)$, sem levar em conta as flutuações da intensidade. Na prática, conta-se o número de fótons que chegam a um detector posicionado em cada ângulo θ em um determinado intervalo de tempo e obtém-se, então, $I(q)$ para a amostra.

A curva $I(q)$ pode fornecer diversas informações sobre o sistema, de acordo com o formalismo teórico ou aproximação utilizada para interpretação desta. Neste trabalho as curvas foram interpretadas com a aproximação de Guinier,⁹⁵ onde a intensidade da curva é expressa em função da Equação 6.

$$\ln I = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{Rg^2}{3} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

De acordo com a aproximação, é possível se obter o raio de giração R_g a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas no limite ($q \rightarrow 0$).

O espalhamento de luz dinâmico DLS acessa o movimento Browniano e o relaciona com o tamanho das partículas. Isso é realizado através da incidência de um laser sobre a amostra e análise da flutuação da intensidade de luz espalhada.

Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. A relação entre a intensidade I de luz espalhada no ângulo q , no tempo t e no tempo $(t + \tau)$ é expressa em uma curva de autocorrelação g_2 , tal como a da Equação 7:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t)^2 \rangle} \quad (\text{Eq. 7})$$

Para sistemas monodispersos, a função $g(q, \tau)$ tem um único decaimento exponencial com taxa $\Gamma = D_0 q^2$, onde D_0 é o coeficiente de difusão translacional no limite ($q \rightarrow 0$).

O estudo da dependência angular do DLS de uma amostra pode fornecer a frequência de relaxação média Γ_{app} para cada ângulo; o coeficiente angular do gráfico de Γ_{app} vs. q^2 fornece, então, o coeficiente de difusão translacional D_0 . A relação entre o raio hidrodinâmico (R_H) de uma partícula e D_0 é definida pela equação de Stokes-Einstein (Equação 8)⁹⁵:

$$R_H = \frac{k_B T}{6 \pi \eta D_0} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Reagentes

A proteína isolada de soja (SPI - Supro 500E) utilizada foi doada pela Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. O óleo de copaíba foi extraído de plantas da região Amazônica e gentilmente doado pelo prof. Dr. Luiz Alberto Kanis - UNISUL. O ácido acético glacial e o acetato de sódio usados para preparar a solução tampão, assim como o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico usados para ajustar o pH das soluções, foram adquiridos da empresa Nuclear. O surfactante Tween 80 (Figura 10a) e o óleo mineral foram adquiridos da VETEC Química Fina LTDA. O surfactante Pluronic F-68 (Figura 10b) e o agente reticulante hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

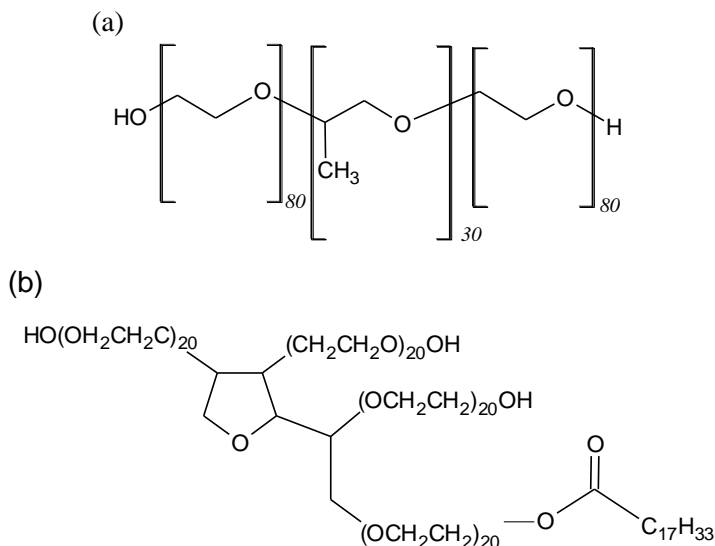


Figura 10. Estrutura química do surfactante (a) Pluronic F-68 e (b) Tween 80.

3.2. SISTEMA A: Micropartículas de SPI

3.2.1. Estudo da estabilidade cinética das emulsões o/a

O estudo da estabilidade das partículas foi realizado em um intervalo de até 122 dias, acompanhando-se a evolução da distribuição de tamanho das partículas e o valor do potencial Zeta médio, condutividade e pH a 25°C. As amostras ficaram armazenadas em geladeira a uma temperatura de $4 \pm 0,5$ °C.

3.2.1.1. *Determinação da distribuição de tamanho das gotículas de óleo*

A determinação da distribuição de tamanho das gotas de óleo dispersas na solução aquosa de SPI foi realizada a 25°C, através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para esta determinação foi utilizado um equipamento Zetasizer Nano da Malvern do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas do Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde da UFSC. O instrumento opera com laser de He-Ne, $\lambda = 633\text{nm}$ e a detecção é feita em um único ângulo de 173°.

3.2.1.2. *Determinação do potencial Zeta das gotículas de óleo*

As medidas do potencial Zeta médio da região interfacial óleo-água foram realizadas a 25°C, pela técnica de microeletroforese associada à anemometria Doppler de laser, através da submissão da amostra a um campo elétrico no equipamento Zetasizer Nano da Malvern. O instrumento opera com laser de He-Ne, $\lambda = 633\text{nm}$ e a detecção é feita em um único ângulo de 173°.

3.2.1.3. *Condutivimetria e pH*

As medidas de condutividade específica foram realizadas utilizando um condutímetro modelo 170 da ATI-ORION. O pH das amostras foi determinado por meio de um pHmetro modelo PHS-3B da Phtek. Ambas as medidas através da inserção direta do eletrodo.

3.2.2. *Micropartículas preparadas pela técnica de spray drying*

O desenvolvimento das micropartículas pela técnica de spray drying foi realizado em duas etapas: uma primeira etapa onde foram desenvolvidas diferentes emulsões o/a (formulações apresentadas na Tabela 2), seguida pela etapa de nebulização dessas emulsões em um spray dryer B-290 da Büchi, Suíça.

Tabela 2. Composição das emulsões o/a.

Amostras	A1	A2	A3	A4
$c_{\text{SPI}} / \%$ (m/v)	3,0	3,0	4,0	4,0
$c_{\text{EDC}} / \%$ (m/m)	-	5,0	-	5,0

c concentração

Inicialmente foram preparadas soluções aquosas de SPI (fase externa), com diferentes concentrações, com o pH ajustado a 10 pela

adição de NaOH(aq) $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Depois do ajuste do pH, a solução permaneceu 24 horas sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após este intervalo a solução foi acidificada a pH 7 através da adição de HCL(aq) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente foi adicionado à solução, quando necessário, 5% (m/m) do agente reticulante EDC e esta ficou sob agitação a temperatura ambiente por mais 10 minutos. A solução aquosa de SPI foi submetida a um dispersor (Quimis) sob uma velocidade de agitação de 12000 rpm.

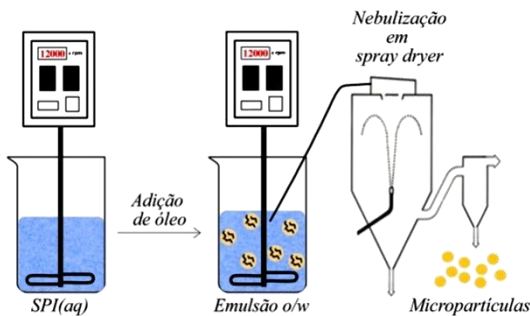


Figura 11. Ilustração da preparação das micropartículas.

Conforme mostrado na Figura 11, a formação de emulsão o/a ocorreu através do gotejamento do óleo de copaíba (fase interna) na fase externa com uma relação fase interna:fase externa de 0,04:1 (v/v). A emulsão resultante permaneceu sob agitação durante sua nebulização no spray dryer sob as seguintes condições: temperatura do ar de entrada e saída $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente, pump de 25% (fluxo de alimentação de 8 mL min^{-1} e fluxo de ar de entrada de $35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) e aspiração a 100%.

3.2.3. Análise morfológica

3.2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de se analisar a morfologia das micropartículas formadas e suas propriedades de superfície, amostras foram fixadas em um suporte metálico e metalizadas com uma fina camada de ouro. Imagens das amostras, com ampliação máxima de 2000 x, foram obtidas em um microscópio Philips XL-30 com fonte de elétrons de tungstênio e detector de elétrons secundários e retroespalhados pertencente ao Laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia Mecânica – Centro Tecnológico da UFSC. A camada de ouro foi depositada nas amostras com um aparelho a vácuo Polaron E 5000.

3.2.3.2. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Com o intuito de analisar a morfologia das paredes da matriz de SPI das micropartículas formadas, amostras foram fixadas em um suporte metálico com uma cola de prata e metalizadas com uma fina camada de ouro. Imagens das amostras, com ampliação máxima de 37000 x, foram obtidas em um microscópio JEOL JSM-6701F com fonte de elétrons de tungstênio pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.2.4. Análise térmica

3.2.4.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica do pó de SPI e das micropartículas formadas foi realizada em um analisador termogravimétrico modelo TGA-50 Shimadzu. As medidas foram conduzidas da temperatura ambiente até 600 °C, em uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (fluxo = 50 mL min⁻¹).

3.2.4.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A temperatura de transição vítrea (T_g) do pó de SPI e das micropartículas formadas foi determinada utilizando-se um equipamento modelo DSC-50 Shimadzu. As amostras foram inicialmente resfriadas até -50°C com nitrogênio líquido e em seguida foi realizada a varredura na velocidade de 5°C min⁻¹ até 150°C sob atmosfera de nitrogênio (fluxo = 50 mL min⁻¹). A temperatura de transição vítrea foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico da amostra.

3.2.5. Espectroscopia de infravermelho por reflectância atenuada total (FTIR-ATR)

A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância atenuada total (FTIR-ATR) foi realizada no pó de SPI, nas micropartículas sem e com EDC e no óleo de copaíba. O espectro de infravermelho foi obtido em um instrumento Shimadzu IR Prestige-21 com transformada de Fourier, resolução de 4 cm⁻¹ na faixa situada entre 4000 a 400 cm⁻¹.

3.2.6. Espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de espalhamento de raio-X a baixos ângulos foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNL, S

Campinas. Os experimentos foram feitos selecionando o comprimento de onda dos fótons $\lambda = 1,76 \text{ \AA}$ e a distância do detector $d = 2,5079 \text{ m}$ da amostra. Estas condições impõem um limite angular de $0,05 < \vec{q} < 1,15$. A detecção foi feita com uma câmera CCD. As amostras eram termostatizadas durante todas as medidas, a 25°C . A aquisição era sempre feita com dois quadros (difratogramas) de 150s cada, exceto quando o tempo foi ajustado em função do espalhamento da amostra.

As amostras líquidas (emulsões) foram injetadas em um porta-amostra com janela de mica. As amostras sólidas foram presas a um conjunto de aros metálicos por fita Kapton e estes aros foram então inseridos no lugar da janela de mica do porta-amostra anterior e vedados com aros de PTFE.

3.3. SISTEMA B: Nanopartículas de SPI

3.3.1. Nanopartículas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente

Primeiramente foi preparada uma solução aquosa de SPI 5% (m/v) (fase interna) cujo pH foi ajustado a 10 pela adição de NaOH(aq) $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Posterior ao ajuste de pH, a solução permaneceu 24 horas sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após este intervalo, foi adicionado à solução o surfactante Tween 80 (1% v/v) e esta ficou sob agitação a temperatura ambiente por mais 1 hora.

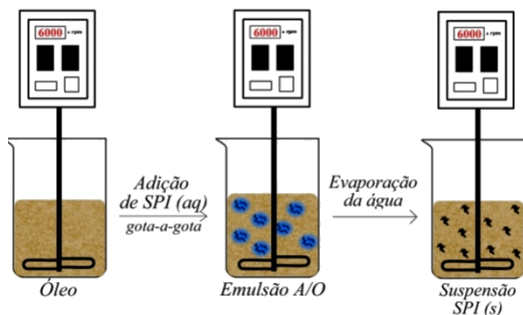


Figura 12. Ilustração do método de emulsificação/evaporação do solvente.

Como ilustrado na Figura 12, a formação de emulsão a/o ocorreu através do gotejamento da solução de SPI (fase interna) em uma solução de óleo mineral (fase externa) com uma velocidade de agitação de aproximadamente 400 rpm e relação fase interna/fase externa de 0,14:1 (v/v). Para a solidificação do polímero contido nas gotículas da fase interna e conseqüente formação das partículas, a solução resultante foi

aquecida a 105 ± 2 °C sob agitação constante, durante 1 hora (até a total evaporação da fase interna). Por fim, as partículas resultantes foram filtradas, lavadas com etanol e secas em estufa a 40°C por 24 horas.

3.3.2. Nanopartículas preparadas pela técnica de coacervação

Inicialmente foram preparadas soluções aquosas de SPI (solução 1) em diferentes concentrações – 0,1% a 0,5% (m/v) – com pH ajustado para 10 através da adição de NaOH(aq) $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Posterior ao ajuste de pH, as soluções permaneceram 24 horas sob agitação magnética a temperatura ambiente. Paralelamente, seguiu-se a preparação da solução tampão hostile, i.e., a solução com pH onde ocorre precipitação da SPI usada para o processo de coacervação, conforme mostrado na Figura 13. Esta é uma solução tampão ácido acético/acetato de sódio e foi preparada com o pH ajustado para 5 pela adição de NaOH(aq) $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Com esta solução tampão, soluções com diferentes concentrações de surfactante foram preparadas.

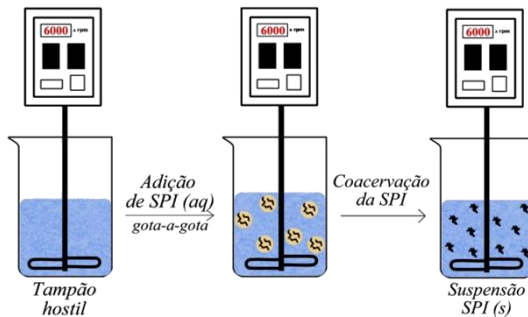


Figura 13. Ilustração do método de coacervação.

Depois de prontas as soluções, 85 mL da solução tampão hostile foram submetidos a um dispersor (Quimis) sob uma velocidade de agitação de 6000 rpm e 3mL de cada formulação da solução 1, conforme listado na Tabela 3, foram então adicionados por gotejamento. A mistura final permaneceu sob agitação por 1 minuto.

Tabela 3. Composição das formulações utilizadas na coacervação.

Formulações	F1	F2	F3	F4	F5	F50
c_{SPI} / %(m/v)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	5,0
I_{tampão} / mM	1, 2 ou 20	1, 2 ou 20	1, 2 ou 20	1, 2 ou 20	1, 2 ou 20	1, 2 ou 20
c_{tween 80} / %(m/m)	0,5 ou 1,0	0,5 ou 1,0	0,5 ou 1,0	0,5 ou 1,0	0,5 ou 1,0	0,5 ou 1,0
c_{pluronic} / %(m/m)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

3.3.3. Determinação de distribuição de tamanho das partículas

As medidas de distribuição de tamanho das partículas foram feitas com um equipamento Zetasizer Nano da Malvern, nas mesmas condições apresentadas no item 3.2.1.1.

3.3.4. Determinação do potencial Zeta das partículas

As medidas do potencial Zeta médio das partículas foram realizadas por meio da aplicação de um campo elétrico através da amostra com um equipamento Zetasizer Nano da Malvern, nas mesmas condições apresentadas no item 3.2.1.2.

3.3.5. Estudo da estabilidade das partículas

O estudo da estabilidade das partículas foi realizado em um intervalo de 122 dias. As amostras ficaram condicionadas em geladeira a uma temperatura de $4 \pm 0,5$ °C.

As medidas de distribuição de tamanho e potencial Zeta das emulsões foram feitas com um equipamento Zetasizer Nano da Malvern. A condutividade específica foi determinada com um conditivímetro modelo 170 da ATI-ORION. Todas as medidas foram realizadas nas mesmas condições apresentadas no item 3.2.2.

3.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para a realização das medidas de microscopia eletrônica de transmissão, 5 µL de amostra foram depositados em grades de 2 mm (recobertas com uma camada de Formvar/carbono) e secas por 24 horas, a temperatura ambiente, em uma estufa a vácuo. As imagens das amostras foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 da JEOL, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

3.3.7. Espalhamento de luz Dinâmico e Estático (DLS/SLS)

A dependência angular do espalhamento de luz dinâmico $I=I(q,t)$ e do espalhamento de luz estático $I=I(q)$ da amostra de formulação F5 ($c_{\text{SPI}}= 0,5\%$, $I=1 \text{ mM}$, $c_{\text{tween80}}= 0,5\%$) foi investigada pelo uso de um Goniômetro ALV-7002 multicorrelador, com faixa de detecção de 32° a 150° e operando com laser de $22 \text{ mV Ne/Ar } 638,2 \text{ nm}$, através de colaboração com o *Centre de Recherche sur les Macromolecules Vegetales* (CERMAV), em Grenoble-FR. As amostras eram colocadas em uma cubeta cilíndrica de 5 mL sem diluição e as medidas eram feitas entre 40° a 140° , em intervalos de 10° , durante 300s . Todas as medidas foram feitas em temperatura controlada de $25,0^\circ\text{C}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SISTEMA A: Micropartículas de SPI

4.1.1. Estudo da estabilidade cinética das emulsões

As fontes de instabilidades das emulsões são comuns a todos os sistemas dispersos, tais como a cremagem, floculação e coalescência das gotículas.⁹⁶ Além da agregação das partículas, levando à formação de precipitados, durante o armazenamento de emulsões podem ocorrer problemas de estabilidade química das matérias-primas presentes no meio. Conseqüentemente, o estudo da estabilidade físico-química em função do tempo torna-se relevante para as aplicações industriais das emulsões

4.1.1.1. Distribuição de tamanho das gotículas de óleo

Na Tabela 4 são apresentados os valores de distribuição de tamanho médio das emulsões o/a em diferentes intervalos de tempo durante o armazenamento das mesmas. Os índices de polidispersidade (PDI) associados à medida estão entre parêntesis. As medidas de DLS por Zetasizer mostram que as emulsões o/a preparadas com SPI e óleo de copaíba apresentaram partículas altamente polidispersas em tamanho com diâmetro médio de aproximadamente 1,1 μm .

Tabela 4. Valores de diâmetro médio das gotículas nas emulsões o/a.

Dia	D / nm			
	A1	A2	A3	A4
1	1191 (0,9)	1120 (0,8)	1605 (1,0)	885,2 (0,7)
14	2203 (1,0)	1625 (0,9)	1691 (0,9)	987,7 (0,7)
71	1711 (1,0)	1174 (0,9)	810,1 (0,6)	772,5 (0,7)
120	1176 (0,8)	2054 (1,0)	1604 (1,0)	531,0 (0,5)

Foi possível observar uma distribuição de tamanho monomodal das gotículas de óleo, embora larga, em todas as emulsões. Nas formulações com mesma concentração de SPI observou-se uma diminuição do tamanho médio nas emulsões que contêm agente reticulante (Figura 14). Como o processo de reticulação da proteína era prévio à emulsificação do óleo, acredita-se que a formação de ligações cruzadas aumentou a hidrofobicidade e conseqüentemente a característica anfifílica das cadeias protéicas, melhorando a ação emulsificante da SPI devido a uma maior tendência de migração da SPI para as regiões interfaciais óleo-água. Isto levou à estabilização de gotículas de óleo menores e mais uniformes.

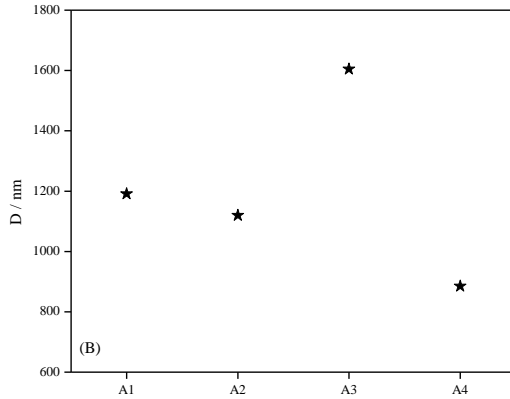


Figura 14. Diâmetro médio das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a. Medidas realizadas no primeiro dia.

As medidas realizadas no 14º dia de armazenamento isotérmico a $4 \pm 0,5$ °C mostram que houve um deslocamento para valores maiores no tamanho das gotas de óleo em todas as emulsões (Figura 15(A)) que pode ser atribuído à coalêscencia das gotículas de óleo. A coalêscência é um processo energeticamente favorável de junção de duas ou mais gotículas para formar uma única gota de volume maior, porém com área interfacial total menor. Apesar de este processo produzir mudanças microscópicas significativas na fase dispersa, como alteração no tamanho e na distribuição média das gotículas, não conduz a uma alteração macroscópica no sistema.⁹³ Houve também aumento na polidispersidade das gotículas nas emulsões devido ao fato de a coalêscencia não ocorrer em todas as gotículas de óleo, como visto na Figura 15(B).

As emulsões apresentaram, a partir das medidas realizadas no 74º dia de armazenamento, diminuição gradual na amplitude de distribuição de tamanho médio das gotas de óleo, provavelmente devido a outro processo de desestabilização da emulsão: a cremagem, que é resultado da diferença de densidades das fases, onde a fase oleosa acumula-se na superfície. Com a cremagem das gotas maiores (aquelas que sofreram coalêscencia) há uma separação de fases sobrando na fase heterogênea somente as gotículas menores; conseqüentemente, observou-se uma diminuição no tamanho médio e na polidispersidade das partículas. No entanto, nas formulações A2 e A3 ocorreu novamente um aumento nos valores de distribuição de tamanho e PDI das gotas de óleo após 122 dias da preparação dessas emulsões, o que provavelmente é resultado da

agitação dessas emulsões durante seu manuseio. Sabe-se que a cremagem é um processo parcialmente reversível diretamente relacionado à floculação, onde não há perda das identidades individuais das gotículas.⁹³

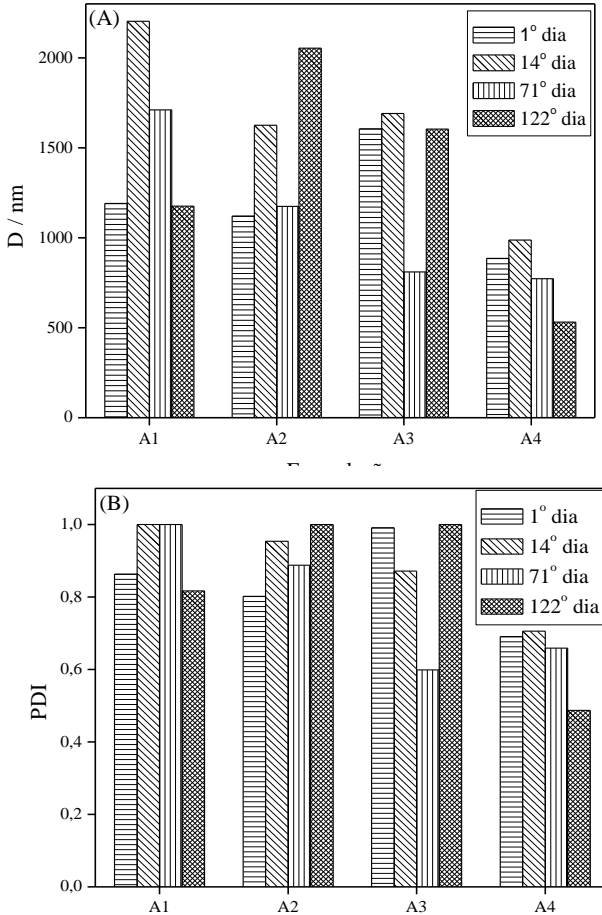


Figura 15. (A) Diâmetro médio e (B) polidispersidade das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a e do tempo de estocagem.

4.1.1.2. Potencial Zeta das gotículas de óleo

Uma partícula carregada atrai uma camada compacta de íons de carga oposta que são adsorvidos na superfície. Esta camada de íons é

conhecida como camada de Stern e seu potencial elétrico como potencial de Stern (Ψ_0). A ação deste campo elétrico atrai uma camada difusa de íons ao redor da partícula, até a dissipação do potencial em distâncias maiores. Esta é chamada de dupla camada elétrica difusa, ou camada de Guy-Chapmann. A interação entre partículas carregadas é governada predominantemente pela sobreposição das duplas camadas elétricas difusas e, portanto, do potencial de Stern. Este potencial se dissipa ao se afastar da superfície da partícula e pode ser descrito pelo modelo de Poisson–Boltzmann, que dá o potencial a uma distância H do plano de Stern.⁹⁷

$$\Psi_H = \Psi_0 e^{(-\kappa H)} \quad (\text{Eq. 9})$$

Entretanto, não há método experimental para a medida direta do potencial de Stern. O que se mede é o potencial elétrico na unidade eletrocinética, *i.e.*, da partícula, dos íons e moléculas do solvente incluídos no plano de cisalhamento quando submetidos a um potencial elétrico. Este potencial eletrocinético é conhecido como potencial Zeta, ζ . Em geral, dispersões com partículas de potencial Zeta alto são consideradas estáveis, enquanto que partículas com valor menor tendem a coalescência e coagulação.

Como exibido na Figura 16, houve um decréscimo gradual no valor de potencial Zeta das partículas em função do tempo de armazenamento. Apesar disso, observou-se que o valor do potencial Zeta foi negativo para todas as gotículas, indicando que mesmo com o armazenamento a carga residual das cadeias de SPI presentes na interface óleo-água é negativa. A coalescência das gotículas de óleo levou a um aumento de seu tamanho, produzindo partículas com menor potencial eletrocinético. Conforme a equação de Hückel (Equação 10), o potencial eletrocinético é diretamente proporcional à carga Q_E da unidade eletrocinética e decresce com o aumento do raio a das partículas⁹⁷ justificando, assim, a diminuição do potencial Zeta observado no sistema.

$$\zeta = \frac{Q_E}{4\pi\epsilon a(1 + \kappa a)} \quad (\text{Eq. 10})$$

onde Q_E é a carga da unidade eletrocinética, ϵ é a permissibilidade do meio, a é o raio da partícula e κ é.

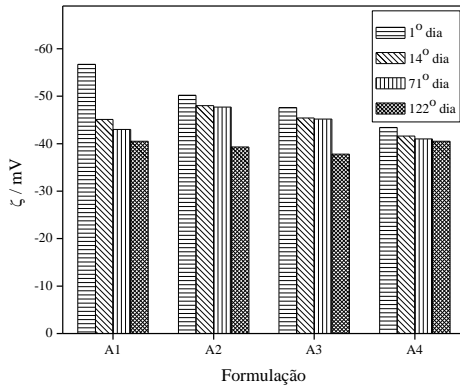


Figura 16. Potencial Zeta das gotículas de óleo em função das formulações das emulsões o/a e do tempo de estocagem.

4.1.1.3. Condutimetria e pH

Alterações na condutividade elétrica de sistemas dispersos podem ser indicativas de instabilidades. Essas modificações nos valores da condutividade permitem a detecção de cremagem, coalescência, sedimentação ou inversão de fase. Medidas de condutividade são ainda usadas para monitorar a estabilidade durante o período de estocagem, pois é um método sensível a pequenas mudanças na estrutura das emulsões.⁹⁸

Na Figura 17 são apresentados os valores de condutividade específica das emulsões o/a em função do tempo. Até o 42º dia de armazenamento os valores de condutividade não apresentaram variações significativas, indicando que não ocorreram modificações físicas ou químicas relevantes nas emulsões. Entretanto, após esse período houve um aumento gradual nos valores de condutividade, indicando a ocorrência de coalescência das partículas. Segundo Barra e colaboradores,⁹⁹ a mudança de condutividade da mistura, isto é, o limiar de percolação onde a mistura passa do estado isolante para condutor, é considerado como uma transição de fase onde a fase condutora (neste caso as cadeias de SPI) é instantaneamente convertida de fase dispersa para uma fase agregada suspensa, com maior mobilidade iônica. Sendo assim, a coalescência da fase dispersa provoca o aumento da condutividade das emulsões.

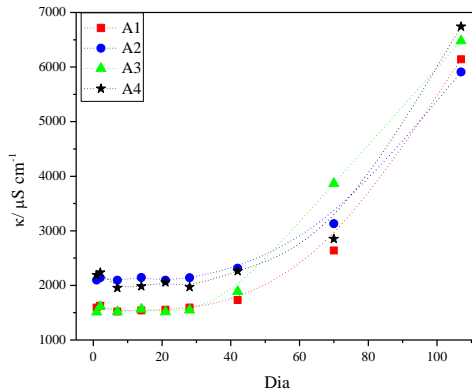


Figura 17. Condutividade específica em função do tempo de estocagem das emulsões o/a. Linhas somente como guia para os olhos.

Apesar da interpretação das mudanças observadas no pH das emulsões durante a estocagem apresentar certa complexidade, uma alteração significativa em seu valor pode sugerir modificações químicas dos componentes presentes na formulação.⁹⁸

Inicialmente, como pode ser observado na Tabela 5, o valor de pH de todas as emulsões ficou em torno de 7,0. A partir do segundo dia houve um aumento em até 23 % desses valores, provavelmente devido ao processo de protonação das cadeias protéicas. Desta forma, a protonação da SPI também contribuiu para a diminuição do potencial Zeta das emulsões, como anteriormente mencionado.

Tabela 5. Valores de pH das emulsões o/a.

Dia	pH			
	A1	A2	A3	A4
1	7,0	7,3	7,0	7,4
2	8,7	8,6	7,8	7,8
7	8,4	8,3	7,6	7,7
14	8,4	8,2	7,5	7,5
21	8,6	8,5	7,7	7,8
42	8,2	8,8	7,4	7,5
70	7,6	7,6	7,5	7,4
107	8,3	8,1	8,4	8,1

Como o estudo da estabilidade das emulsões demonstrou, há uma grande variação do tamanho e da polidispersidade das gotas de óleo das emulsões com o tempo de estocagem. Desta forma, as características de microcápsulas formadas a partir destas emulsões seriam também uma

função do intervalo de tempo entre o preparo da emulsão e a posterior secagem da mesma no spray-dryer.

Para suprimir esta variável do sistema, optou-se pela secagem de todas as emulsões no $t=0$, isto é, imediatamente após o preparo das mesmas. Para isso, as emulsões foram feitas *in situ* e mantidas sob agitação durante o bombeamento para o spray dryer.

4.1.2. Análise morfológica

4.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio da microscopia eletrônica de varredura é possível examinar as amostras em seu estado original e conseguir grandes ampliações e profundidade de foco.¹⁰⁰ O estudo da morfologia é importante por vários aspectos e neste caso foi usado para fins de elucidar possíveis diferenças estruturais nas microcápsulas, além de conhecimento das propriedades de superfície e sua porosidade.

As micrografias revelaram partículas com dimensões variadas e ausência de material livre na formação das microcápsulas. Pela Figura 18, onde são mostradas as micrografias das microcápsulas com formulação A1, A2, A3 e A4, é possível observar que todas as microcápsulas de SPI apresentaram superfície lisa, compacta e com ausência de poros. As microcápsulas obtidas por diferentes formulações apresentaram aparência similar: esféricas e com concavidades na superfície. Tais concavidades são típicas em amostras produzidas em spray drying, além de possivelmente serem artefatos pronunciados pelo efeito do vácuo, utilizado pelo aparelho de MEV para a realização da análise, uma vez que as cápsulas são ocas.

As paredes externas não apresentaram fissuras ou rachaduras, o que é fundamental para garantir menor permeabilidade de gases, maior proteção e retenção do agente encapsulado. Algumas microcápsulas apresentaram-se rompidas devido ao manuseio da amostra durante sua preparação para a microscopia, permitindo a visualização da cavidade interna das cápsulas. Ainda, foi possível observar paredes mais homogêneas nas cápsulas com agente reticulante (Figura 18(B) e 18(D)) provenientes da estrutura em rede tridimensional mais rígida, formada pela maior quantidade de ligações cruzadas.

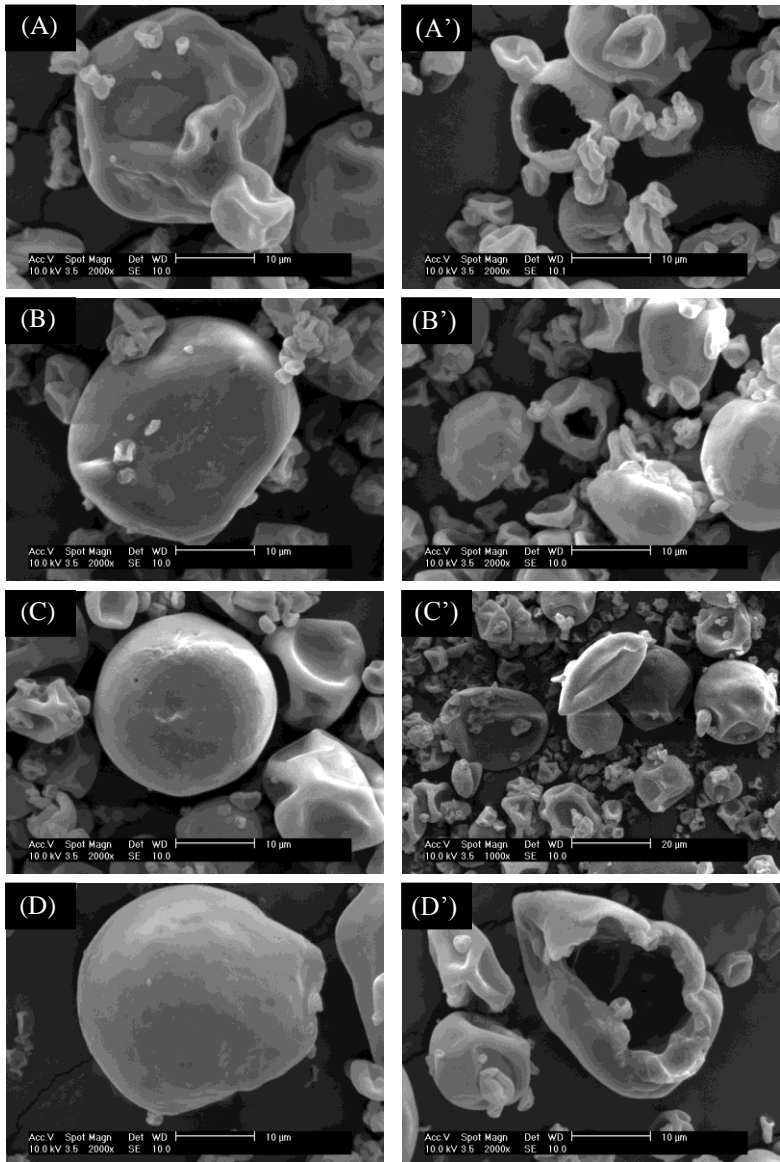


Figura 18. Micrografias obtidas por MEV das microcápsulas com formulação (A e A') A1, (B e B') A2, (C e C') A3 e (D e D') A4.

4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A fim de analisar mais detalhadamente as paredes da matriz de SPI, a microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo torna-se apropriada, pois oferece imagens com resolução nanométrica através de ampliações em até 65000 vezes.

Analisando as imagens das microcápsulas rompidas (Figura 19), confirma-se que a matriz polimérica se apresentou lisa e compacta. Também não foram observados poros e rachaduras na superfície das partículas. Foi possível observar paredes mais espessas nas amostras que contém 4%(m/v) de SPI (Figura 19(C) e 19(D)) devido à maior concentração de material na fase aquosa e na interface óleo-água das emulsões A3 e A4. Entretanto, a espessura das paredes poliméricas não se apresentou constante ao longo da microcápsula, variando de 100 a 290 nm. Como a interface é formada por cadeias de macromoléculas (SPI) com baixa mobilidade (alta viscosidade), tende a ter uma distribuição heterogênea; processos de associação de partículas também produzem interfaces heterogêneas e, em adição, o processo de remoção da fase dispersante por spray drying pode congelar situações de não-equilíbrio na distribuição das cadeias pela interface e promover a agregação extra de proteína dispersa na fase aquosa.

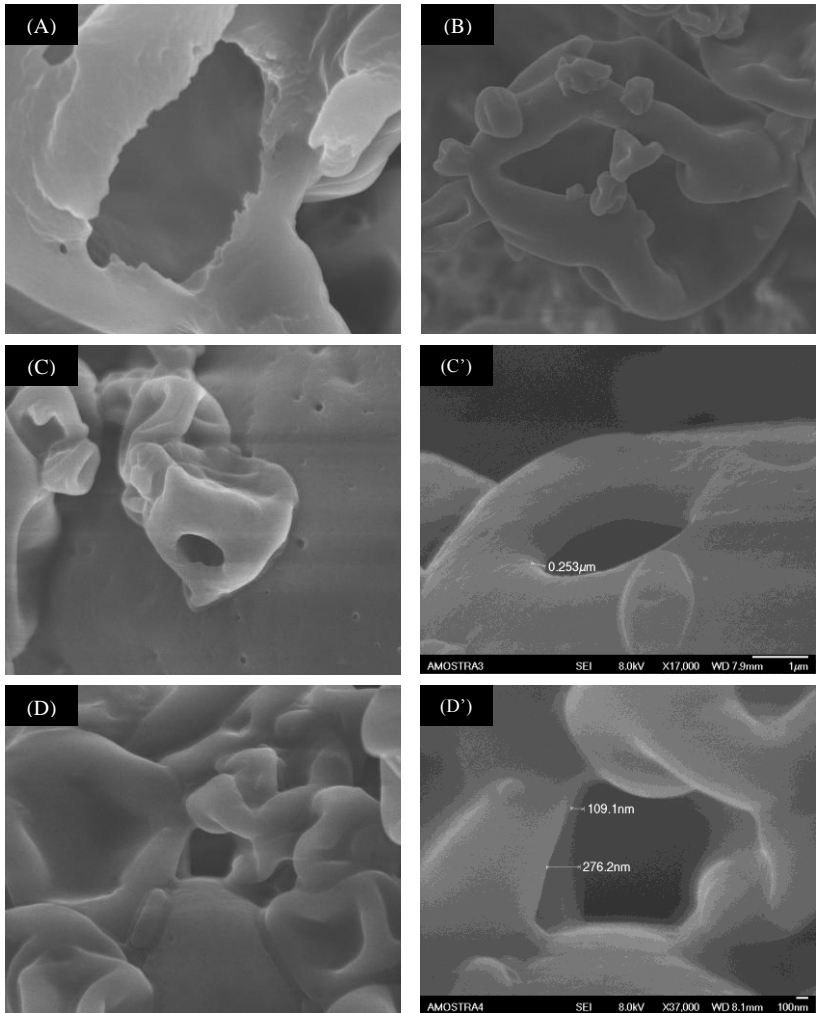


Figura 19. Micrografias obtidas por MEV-FEG das microcápsulas com formulação (A) A1, (B) A2, (C e C') A3 e (D e D') A4.

4.1.3. Análise térmica

4.1.3.1. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar a estabilidade e propriedades térmicas dos polímeros. O parâmetro medido por essa técnica é a massa, ou seja, o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função da temperatura ou do tempo a uma temperatura

constante.¹⁰⁰ Os polímeros apresentam uma diminuição na sua massa molar que pode ser justificada por mudanças estruturais que ocorrem quando são submetidos a um tratamento térmico. Tais mudanças estruturais são caracterizadas pela ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e laterais produzindo novas estruturas (compostos) voláteis.¹⁰¹

Os valores dos parâmetros termogravimétricos, como temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima (T_{max}), porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação e porcentagem de resíduos sólidos a 600 °C estão resumidos na Tabela 6. As curvas de degradação térmica (TG e DTG) obtidas com velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio para todas as amostras são mostradas nas Figuras 20 e 21. A SPI em pó e as microcápsulas sem EDC apresentaram um primeiro decréscimo apreciável de massa, não mostrado na tabela, até cerca de 60 °C, que é atribuído à evaporação de água presente nas amostras com um conteúdo de umidade residual variando de 3 a 4%, sugerindo que seu acondicionamento não deve ter garantido amostras completamente isentas de água. A porcentagem de massa residual a 600 °C foi de 40% para a proteína pura e 22% em média para as microcápsulas. Esta diminuição na porcentagem de resíduos pode estar associada à interação óleo-polímero e também à maior desestabilização da rede protéica, causada pela diminuição de ligações de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros com a presença de ligações cruzadas, aumentando assim a efeito da degradação.

Tabela 6. Parâmetros termogravimétricos dos materiais estudados.

		SPI	Micro	Micro+EDC	Óleo
2º estágio	T ^a	321,9	208,1	194,9	164,3
	M ^b	56,2	14,2	14,1	72,4
3º estágio	T ^a	-	261,3	269,3	237,8
	M ^b	-	14,7	14,6	3,5
4º estágio	T ^a	-	309,2	306,3	267,6
	M ^b	-	9,2	8,1	3,5
5º estágio	T ^a	-	325,8	332,6	-
	M ^b	-	36,3	41,3	-
% de resíduo a 600 °C		39,9	22,6	21,9	nd

^a Temperatura de máxima degradação (°C).

^b Percentagem de perda de massa em cada estágio de degradação

A degradação térmica da amostra de SPI ocorre em um processo único de perda de massa (2º estágio), com T_{max} em 322 °C e 56,2% de perda de massa, a qual é associada à degradação da proteína. De acordo com a literatura, com o aquecimento a estrutura da proteína é lentamente destruída, ocorrendo clivagem das ligações peptídicas que unem os resíduos de aminoácidos. Até aproximadamente 250 °C, 60% dos resíduos de fenilalanina e 80% dos resíduos de tirosina da SPI são decompostos. A partir de 250 °C ocorrem três reações simultâneas na estrutura da proteína; (i) dissociação das subunidades 7 e 10 S; (ii) desnovelamento da estrutura secundária e terciária das subunidades protéicas e (iii) a re-associação de subunidades desnaturadas, através de ligações dissulfeto e forças hidrofóbicas e eletrostáticas.¹⁰²

O óleo apresentou três estágios de degradação, todos inferiores ao estágio principal de degradação da SPI. Apesar da escassez de informações sobre estudos térmicos do óleo de copaíba, pode-se atribuir os subseqüentes estágios de perda de massa à seqüência de reações pirolíticas dos diterpenos e sesquiterpenos que constituem a amostra.

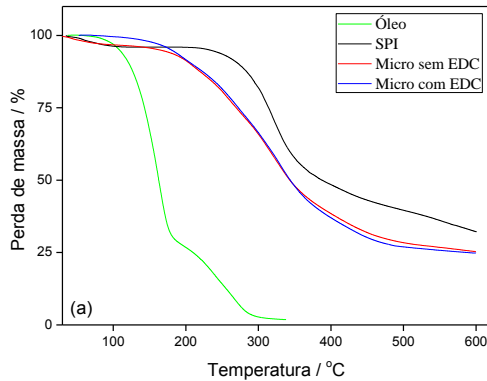


Figura 20. Curvas termogravimétricas para o pó de SPI, o óleo e as microcápsulas na taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min^{-1}).

As microcápsulas com e sem EDC apresentaram quatro estágios de perda de massa, sendo os três primeiros (faixa de $195 - 309\text{ °C}$) referentes à presença de óleo nas micropartículas e o último estágio de degradação (em $325,8$ para a microcápsula sem EDC e $332,6\text{ °C}$ para a microcápsula com EDC) proveniente da SPI. A temperatura de máxima degradação do último estágio de perda de massa das microcápsulas foi maior quando comparada à da proteína pura, indicando um aumento na estabilidade térmica das mesmas. Tal aumento de estabilidade é causado pela reticulação das microcápsulas, seja esta pelo uso de temperatura elevada, formando ligações dissulfeto, ou pelo uso do agente reticulante (EDC). Em sua maioria, a reticulação leva a um aumento da estabilidade térmica do polímero, elevando a temperatura de degradação quando comparado a sistemas não reticulados e, paralelamente, promove pequena desestabilização das estruturas terciárias e quaternárias da proteína devido à formação de ligação cruzadas entre as cadeias poliméricas.¹⁰³

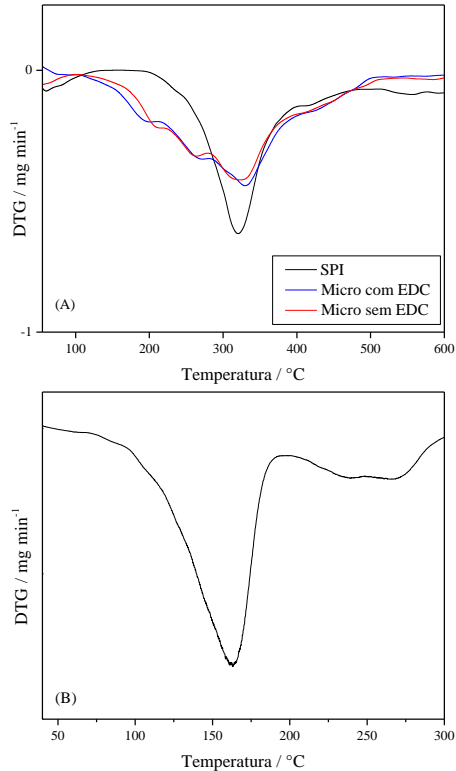


Figura 21. DTG para (a) o pó de SPI e as microcápsulas e (b) óleo de copaíba na taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio constante (50 mL min^{-1}).

4.1.3.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Além de exibir valores das variações de entalpia de fusão ($\Delta_m H$), de cristalização ($\Delta_c H$) e da capacidade calorífica (C_p), a calorimetria diferencial de varredura fornece valores de propriedades térmicas como as temperaturas de fusão (T_m), de cristalização (T_c) e de transição vítrea (T_g). A T_g é um importante parâmetro na determinação da estabilidade do material durante seu manuseio e estocagem¹⁰⁴ e é definida, em processos termodinâmicos, como uma transição de segunda ordem característica de um material amorfo ou semicristalino. Ainda, sua determinação é uma das formas de avaliação de possíveis interações em sistemas poliméricos.

A ausência de temperatura de cristalização na curva DSC da SPI, exibida na Figura 22, indica que a proteína é amorfa; na curva ainda é observada uma transição vítrea (T_g) bem definida em $-13,72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sabe-se que as proteínas sofrem desnaturação pelo calor, uma vez que há o

aumento do movimento molecular, rompendo as forças de atração e fazendo com que a macromolécula assuma uma conformação espiral randômica.³ Na Figura 22 também há uma ampliação da região de desnaturação da proteína e os picos em 70,29 °C e 93,58 °C são associados às frações 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) da globulina, respectivamente.¹⁰⁵

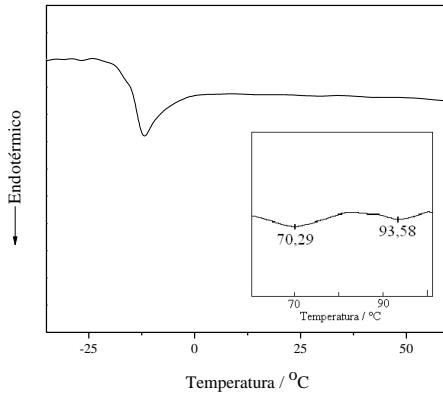


Figura 22. Curva de DSC obtida a partir da SPI.

A Figura 23 mostra as curvas de DSC do óleo de copaíba e da microcápsula sem a presença do agente reticulante. Devido à similaridade das curvas de DSC, a microcápsula com EDC não foi incluída na figura. O óleo de copaíba apresentou temperatura de fusão em 13,79 °C e temperatura de ebulição em 124,20 °C. Devido à baixa quantidade de óleo, não foi possível observar o valor da T_m na curva de DSC da microcápsula, entretanto nota-se a presença do pico exotérmico em 133,90 °C, referente à ebulição do óleo, comprovando sua encapsulação. O aumento no valor de T_b do óleo é natural, uma vez que nas microcápsulas o óleo está solubilizando as porções hidrofóbicas das cadeias protéicas. Com isso, a pressão de vapor do óleo diminui (Lei de Raoult)⁹² e, conseqüentemente, há aumento da temperatura de ebulição.

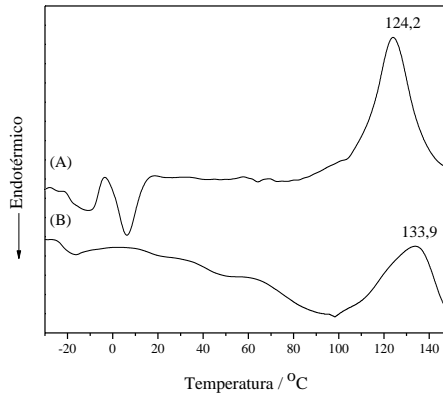


Figura 23. Curvas de DSC obtidas a partir do (A) óleo de copaíba e da (B) microcápsula sem EDC.

Observa-se, na Figura 24, que a temperatura de transição vítrea diminuiu de $-13,72\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a SPI em pó, para $-21,93\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-24,64\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as microesferas de SPI sem e com a presença de agente reticulante, respectivamente. Essa diminuição no valor da T_g sugere que o óleo de copaíba agiu como lubrificante das cadeias poliméricas, aumentando a flexibilidade e a mobilidade molecular do polímero, conseqüentemente diminuindo a viscosidade local e facilitando a transição de fase do material. Normalmente, a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas leva a um aumento da temperatura de transição vítrea, devido à restrição do movimento molecular. Todavia, o valor da T_g para as microcápsulas reticuladas foram inferiores ao da proteína pura, sugerindo que a formação de ligações dissulfeto e a interação entre o reticulante EDC e proteína aumentou a mobilidade das cadeias poliméricas, provavelmente devido à desnaturação de sua estrutura terciária e quaternária, diminuindo sua rigidez.

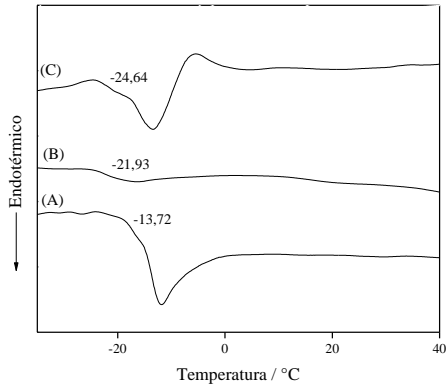


Figura 24. Curvas de DSC obtidas a partir da (A) SPI, microcápsula (B) sem e (C) com EDC.

4.1.4. Espectroscopia de infravermelho por refletância atenuada total (FTIR-ATR)

Por possuírem vibrações moleculares características, situadas na região do infravermelho do espectro eletromagnético, os grupos funcionais podem ser identificados pela espectroscopia de infravermelho. Frequentemente utilizada em estudos de modificações poliméricas a nível molecular, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada para verificar as possíveis interações existentes entre os materiais, bem como mudanças a nível molecular que podem ter ocorrido durante o processo de formação das microcápsulas em spray drying.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam as principais bandas do espectro de infravermelho da SPI, do óleo de copaíba e das microcápsulas, mostrados nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

Tabela 7. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para a SPI.

Comprimento de onda / cm^{-1}	Tipo de absorção
3380	Deformação O–H e N–H
3000 - 2850	Deformação C–H (grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$)
1637	Estiramento C=O e C–N (amida I)
1543	Deformação N–H e estiramento C–N (amida II)
1450	Estiramento C–H
1242	Estiramento C–N e N–H (amida III)

No espectro de FTIR da SPI, mostrado na Figura 25, observou-se determinadas bandas da absorção características desta proteína, referentes à amida I, amida II e amida III. A banda em 1074 cm^{-1} foi, provavelmente, formada pela contribuição de diferentes funções químicas, tais como C–H (de estruturas aromáticas), PO^- ou P–OH de ésteres de fosfato, os quais estão presentes em quantidades significativas na SPI e em outras proteínas, especialmente nos resíduos do aminoácido serina (aproximadamente 5% na SPI).²¹ Em 3380 cm^{-1} foi observada uma banda larga, provavelmente devido à sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos N–H e O–H. Entretanto, acredita-se que esta banda larga está associada principalmente ao estiramento de O–H da água presente na proteína, indo de encontro ao primeiro estágio de perda de massa apresentado nos resultados da análise termogravimétrica.

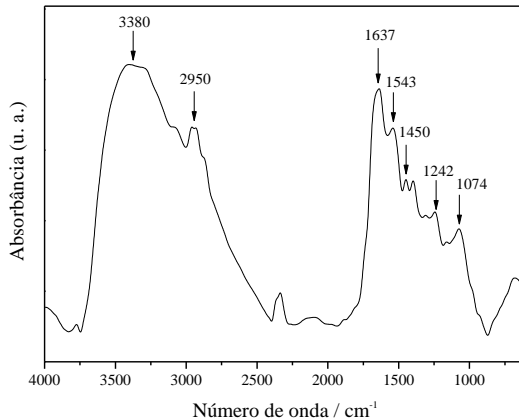


Figura 25. Espectro de infravermelho da SPI.

Tabela 8. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para o óleo de copaíba.

Comprimento de onda / cm^{-1}	Tipo de absorção
2926 - 2858	Estiramento grupos $-\text{CH}_2$
1700	Estiramento C=O
1643	Estiramento C–C
1446	Vibração grupos $-\text{CH}_2$
885	Vibração CH_2

No espectro da Figura 26 são mostradas as bandas de absorção no infravermelho para o óleo de copaíba. Observou-se uma banda intensa em 885 cm^{-1} relativa às vibrações dos grupos CH_2 e uma banda

em 1700 cm^{-1} referente ao estiramento de carbonilas de ácidos graxos presentes na amostra. Além disso, pôde-se observar claramente uma banda na região de 2926 cm^{-1} que pode ser associada à sobreposição do estiramento assimétrico dos grupos $-\text{CH}_2$ e uma banda em 2858 cm^{-1} concernente ao estiramento simétrico do grupo $-\text{CH}_2$.¹⁰⁶

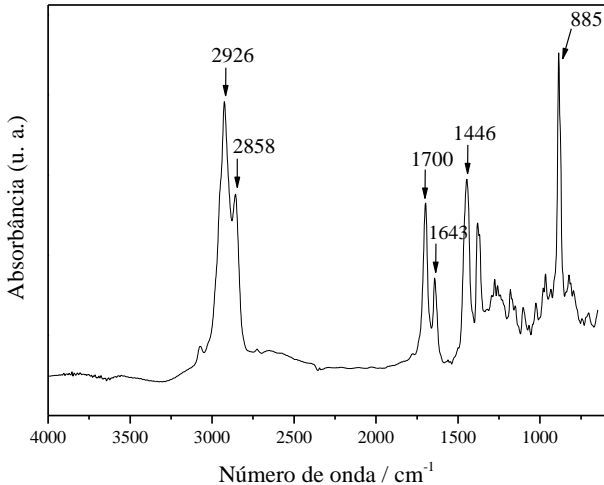


Figura 26. Espectro de infravermelho do óleo de copaíba.

Tabela 9. Principais correlações espectroscópicas de infravermelho para as microcápsulas.

Comprimento de onda / cm^{-1}	Tipo de absorção
3288	Deformação O–H e N–H
2929	Deformação C–H (grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$)
1664	Estiramento C=O e C–N (amida I)
1537	Deformação N–H e estiramento C–N (amida II)
1448	Estiramento C–H

As microcápsulas sem e com agente reticulante apresentaram espectros de infravermelho semelhantes. Através da Figura 27 observou-se que as microcápsulas continham bandas relacionadas à matriz de SPI, como amida I, amida II e estiramento C–H. Observou-se também um deslocamento na banda relacionada à vibração de estiramento dos grupos N–H e O–H, indicando que houve uma redução de grupos OH livres na amostra, provavelmente devido à reticulação protéica, que

promove a formação de ligações cruzadas entre as macromoléculas.

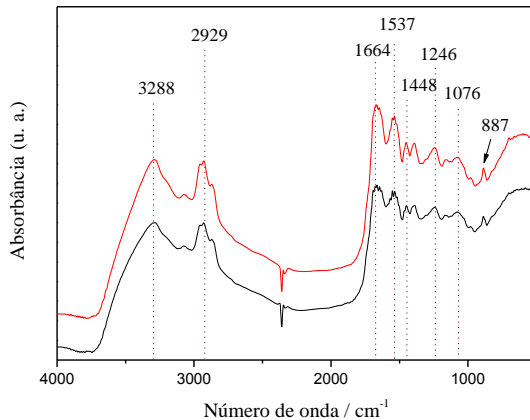


Figura 27. Espectros de infravermelho das microcápsulas (—) sem e (—) com EDC.

Analisando a sobreposição dos espectros de SPI, óleo de copaíba e microcápsula em EDC, na região de 2000 - 600 cm^{-1} (Figura 28) observa-se um pequeno deslocamento na banda referente ao estiramento C=O e C-N, de 1637 cm^{-1} para 1656 cm^{-1} , e uma diminuição na intensidade da banda. Um deslocamento para menor número de onda ou uma diminuição na intensidade da banda pode ser um indicativo de um maior grau de desordem molecular¹⁰⁷. Assim, esta diferença sugere um maior grau de desordem interna causado pelo processo de reticulação, que destrói a estrutura terciária da proteína.

Por outro lado, as principais bandas relacionadas ao óleo de copaíba, em 1700 cm^{-1} (estiramento C=O) e em 1446 cm^{-1} (referente à vibração $-\text{CH}_2$), não foram observadas no espectro das microcápsulas, provavelmente porque o óleo se encontrava em pequena quantidade nas micropartículas. Entretanto, foi possível identificar um pico em 887 cm^{-1} , relativo às vibrações dos grupos CH_2 do óleo de copaíba. O pequeno deslocamento, de apenas 2 cm^{-1} , pode indicar alguma interação entre o óleo e a matriz de SPI, como apurado anteriormente nos resultados de DSC.

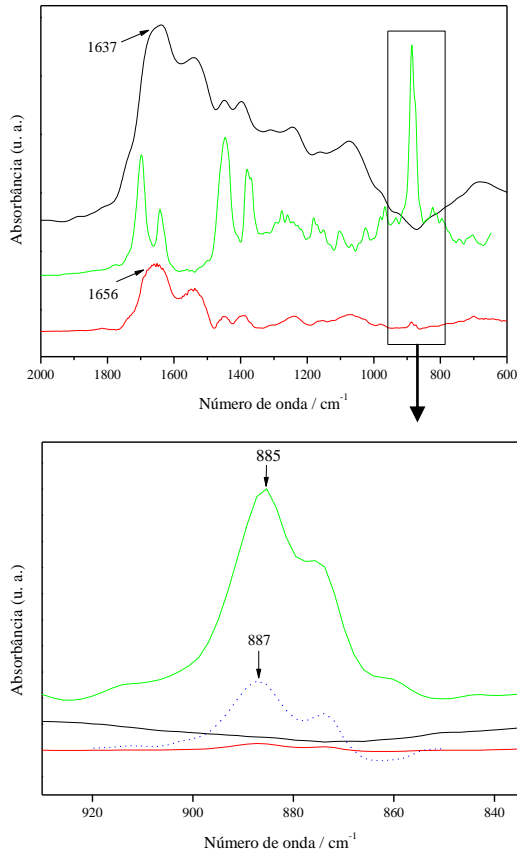


Figura 28. Espectros de infravermelho da (—) SPI, (—) óleo de copaíba e das (—) microcápsulas sem EDC (---) com ampliação de 10x.

4.1.5. SPI na região interfacial: um estudo por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

A intensidade de SAXS para todas as emulsões o/a é apresentada na Figura 29. As curvas apresentam um aumento pronunciado da intensidade do espalhamento a ângulos mais baixos, indicando a presença de objetos espalhadores grandes – provavelmente das gotas da emulsão. As curvas também indicam o efeito da concentração de proteína, já que as curvas de emulsões preparadas com a mesma concentração de SPI (formulações A1/A2 e A3/A4) aparecem sobrepostas na figura.

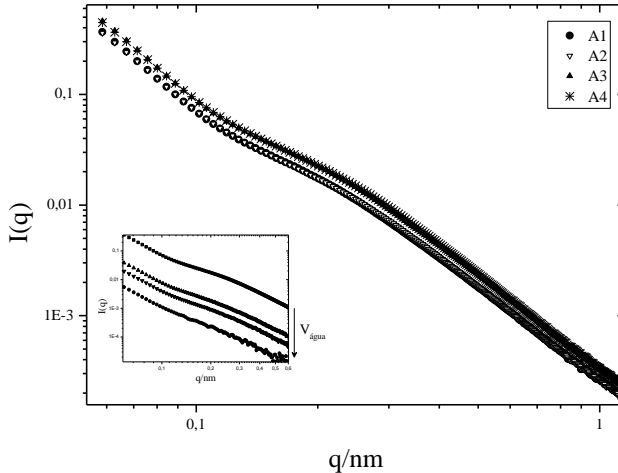


Figura 29. Intensidade de SAXS para as emulsões com formulação A1, A2, A3 e A4. A figura inserida apresenta o efeito da diluição (adição de água) na intensidade de SAXS da emulsão com formulação A2.

Todas as curvas exibidas na Figura 29 apresentam um pico de espalhamento próximo a $q_{\max} = 0,15 \text{ nm}^{-1}$. Atribui-se este pico ao fator de estrutura da emulsão,¹⁰⁸ já que a inserção da Figura 29 mostra que este pico é atenuado pela diluição da amostra.

A interpretação da dependência angular da intensidade do espalhamento de raios-X a baixos ângulos de sistemas complexos – tal como o sistema investigado neste trabalho – é simplificada quando a geometria fractal é usada na descrição de sua estrutura.¹⁰⁹ A intensidade de SAXS para objetos fractais segue a equação:

$$I(q) = I_0 q^{-\alpha} \quad (\text{Eq. 11})$$

Desta forma, quando o sistema tem estrutura fractal, uma região linear é observada no gráfico $\ln I(q)$ vs. $\ln(q)$, cujo coeficiente angular é $-\alpha$; se $1 < \alpha < 3$, então a região resulta de um fractal de volume (massa ou poros) cuja dimensão d_f desta unidade básica do fractal é o coeficiente angular α .¹¹⁰ Uma relação entre d_f e topologia é estabelecida na Tabela 10.⁹⁵ Já quando a região linear apresenta $3 < \alpha < 4$, esta provém de um fractal de superfície, cuja dimensão d_s é então $6 - \alpha$.

Tabela 10. Dimensões fractais de algumas topologias. Adaptado da referência 92.

Topologia	Dimensão Fractal d_f
<i>Cilindros, bastões</i>	1
<i>Cadeia polimérica Gaussiana</i>	2
<i>Esferas com superfície fractal ou rugosa</i>	2,5 a 3
<i>Esferas com superfícies lisas</i>	3
<i>Polímero ramificado solvatado</i>	2

A Figura 30 apresenta o comportamento fractal da SPI em três sistemas: em suspensão aquosa, na interface das gotículas na emulsão com formulação A2 e nas paredes das microcápsulas após evaporação da fase aquosa desta mesma emulsão. As regiões lineares estão representadas e os respectivos coeficientes angulares destas regiões são indicados.

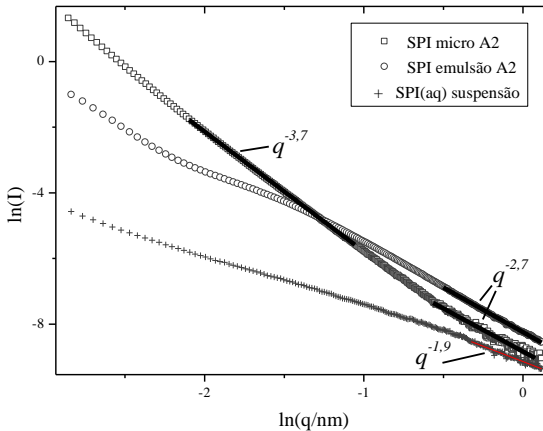


Figura 30. Gráfico de Porod da SPI em suspensão aquosa (0,5%), na emulsão A2 e nas microcápsulas obtidas após secagem da A2. Os coeficientes angulares das regiões lineares estão indicados.

A curva referente à suspensão de SPI(aq) apresenta apenas uma região linear, cujo coeficiente indica uma dimensão fractal $d_f = 1,9$. De acordo com a Tabela 10, esta dimensão é característica de macromoléculas em contato com solvente. Portanto, as cadeias protéicas da SPI estão parcialmente estendidas na fase aquosa. Nenhum fractal de superfície foi observado. Já a curva referente à emulsão com formulação A2 indica um fractal de dimensão $d_f = 2,7$; este valor é próximo a de esferas com superfície rugosa, indicando que cadeias de SPI estão formando agregados parcialmente esféricos na região interfacial óleo-água. Esta mesma dimensão é observada mesmo quando a fase aquosa é

removida. Todavia, a secagem da emulsão de formulação A2 provoca o desaparecimento do pico de espalhamento q_{\max} (que anteriormente foi atribuído ao fator de estrutura da emulsão) e o surgimento de uma nova região linear, desta vez indicando um fractal de superfície com $d_s=2,3$. Estes valores mostram que a superfície da microcápsula é rugosa e parcialmente esférica e por sua vez é formada pela união de objetos parcialmente esféricos e rugosos.

A intensidade de SAXS de emulsões também pode ser interpretada pelo formalismo de Guinier¹¹¹, descrito na Equação 6.

De acordo com a aproximação, é possível se obter o raio de giro R_g a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas de SAXS no limite $q \rightarrow 0$ no gráfico de Guinier, isto é, $\ln(I(q))$ vs q^2 . A Figura 31 apresenta o gráfico de Guinier para a SPI em três sistemas diferentes.

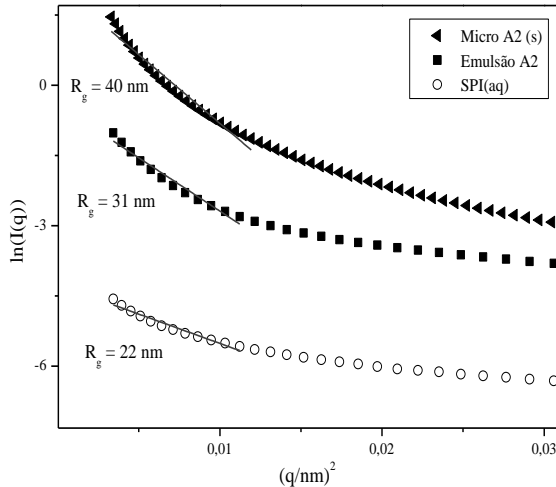


Figura 31. Gráfico de Guinier para curvas de SAXS de suspensão, emulsão e microcápsulas de SPI, referente à composição A2. Os valores de Raio de Giração explícitos foram calculados de acordo com Equação 6 no limite $q \rightarrow 0$.

Na figura, a dependência linear das curvas é somente em pequena faixa angular e isto é um indicativo de sistema polidisperso. Experimentos similares, envolvendo as demais emulsões e respectivas micropartículas também foram feitos, apresentando resultados semelhantes e, por isso, não foram mostrados. Observa-se que há um aumento do raio na medida em que as moléculas da SPI são privadas de água: de 23 nm quando em suspensão para 31 nm na interface óleo-água e 40 nm na interface óleo-ar. Este comportamento deve-se à remoção da água que promove a agregação de cadeias protéicas, levando a objetos

maiores. Esta hipótese está em acordo com as observações anteriores, em relação ao surgimento de um objeto esférico fractal – ou seja, o agregado entre cadeias de SPI.

4.2. SISTEMA B: Nanopartículas de SPI

4.2.1. Nanopartículas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente

A obtenção de nanopartículas de SPI não foi possível através deste método. Durante o processo de evaporação do solvente, dois fenômenos indesejados foram observados: o primeiro foi a cremagem de grande parte da proteína, que subia à superfície sob a forma de nata espumosa. O segundo fenômeno foi a reticulação das cadeias de SPI, devido à ação do calor sob os resíduos de aminoácidos com grupos sulfetos (cisteína e metionina). A reticulação levou ao aprisionamento do óleo na matriz protéica. Este fato impossibilitou a remoção do óleo e promoveu a coalescência irreversível das partículas, de forma que o produto obtido foi uma goma oleosa.

Embora indesejada para a produção de nanopartículas de SPI por este método, a reticulação por ação do calor e incorporação do óleo são propriedades interessantes da SPI que poderão ser exploradas em futuros trabalhos.

4.2.2. Nanopartículas preparadas pela técnica de coacervação

O método de coacervação foi satisfatório para a obtenção de nanopartículas de SPI. A distribuição de tamanho e potencial de superfície das partículas, assim como sua estabilidade e morfologia em função de algumas variáveis no método de preparação foram investigadas, tal como descrito a seguir.

4.2.2.1. Distribuição de tamanho das partículas

4.2.2.1.1. Efeito da força iônica da solução tampão hostil

A solução que promove a coacervação é a solução tampão hostil, que consiste em uma solução de surfactante tamponada em $\text{pH} = 5$. A força iônica do tampão pode ser ajustada e apresenta grande efeito no tamanho das partículas, como ilustrado na Figura 32(A). A figura indica que o diâmetro médio das partículas é menor quando a força iônica é pequena; quando $I=20\text{mM}$ as partículas passam a ter dimensões micrométricas. A figura também indica que a concentração de SPI(aq) não tem um efeito muito pronunciado no tamanho das partículas, ao menos na faixa estudada.

O aumento da força iônica também leva ao aumento da polidispersidade em tamanho das partículas, como visto na Figura 32(B). As partículas obtidas com $I=1\text{mM}$ são as menos polidispersas,

enquanto que o índice de polidispersidade chega a 1 para as partículas preparadas com $I=20\text{mM}$.

Estas observações sugerem que o aumento de força iônica promove a coalescência das partículas menores, produzindo um sistema mais polidisperso e com maior população de partículas maiores.

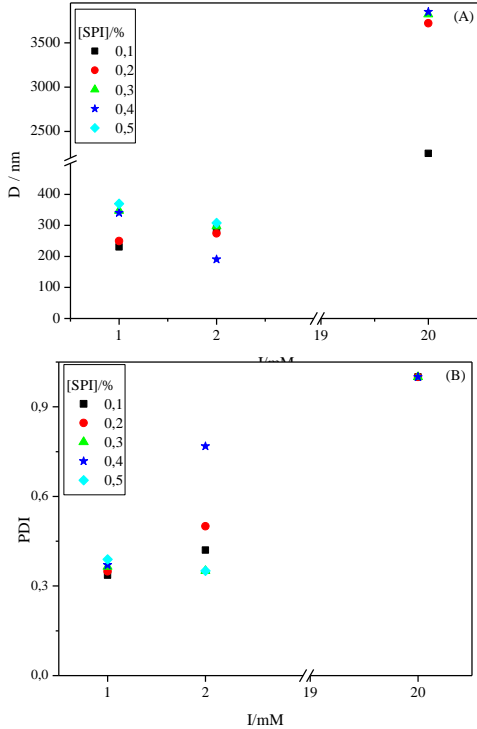


Figura 32. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80.

A explicação para este comportamento pode ser encontrada se considerarmos a teoria DLVO para o mecanismo de estabilidade de dispersões coloidais. De acordo com a Equação 3, quanto maior for κ^{-1} , maior será a barreira de repulsão elétrica para o processo de coalescência de duas partículas. Entretanto, como demonstrado na Equação 4, o comprimento de Debye diminui com o aumento da força iônica.^{93,94} Em outras palavras, o aumento da força iônica promove a contração da dupla camada elétrica difusa e, conseqüentemente, diminui o potencial de repulsão V_R . Isto facilita a coalescência das partículas,

justificando o tamanho e a alta polidispersidade nas formulações com $I=20\text{mM}$.

4.2.2.1.2. Efeito da concentração de surfactante na solução tampão hostil

Outra variável de ajuste no preparo das emulsões foi a concentração do surfactante Tween 80 na solução tampão hostil (na força iônica $I=1\text{mM}$). A Figura 33(A) apresenta os valores do diâmetro médio das partículas de SPI obtidas em diferentes $[\text{SPI}(\text{aq})]$, para dois sistemas com diferentes concentrações de surfactante – 0,5% e 1,0% (m/m) de Tween 80 – na solução tampão hostil. A Figura 31(B) apresenta a polidispersidade em tamanho dos mesmos sistemas.

Embora o efeito do aumento da concentração de surfactante não seja muito pronunciado, leva à diminuição do tamanho médio e da polidispersidade nas formulações com até 0,2% de SPI e ao aumento do tamanho e da polidispersidade nas formulações mais concentradas. Este comportamento é justificado pelo seguinte mecanismo: as moléculas de Tween são adsorvidas na superfície das partículas formadas durante a coacervação. Quando a concentração de proteína é pequena, as moléculas de Tween atuam como agentes de estabilização estérica, prevenindo a coalescência. O excesso de Tween na fase aquosa, não adsorvido na região interfacial, atua como um agente de estabilização por depleção osmótica. Ambos os processos levam a partículas menores.

Se a concentração de SPI for maior a população de partículas aumenta e, durante a coacervação, uma mesma molécula de Tween 80 pode ser adsorvida nas superfícies de duas ou mais partículas, levando a um processo de floculação-coagulação via ponte de Tween 80. Ainda, o aumento da concentração de SPI leva ao aumento da área superficial para adsorção de surfactante; isto diminui a estabilização por depleção osmótica, pois há menos moléculas de Tween dissolvidas na fase aquosa. Ambos os processos levam a um aumento do tamanho das partículas.

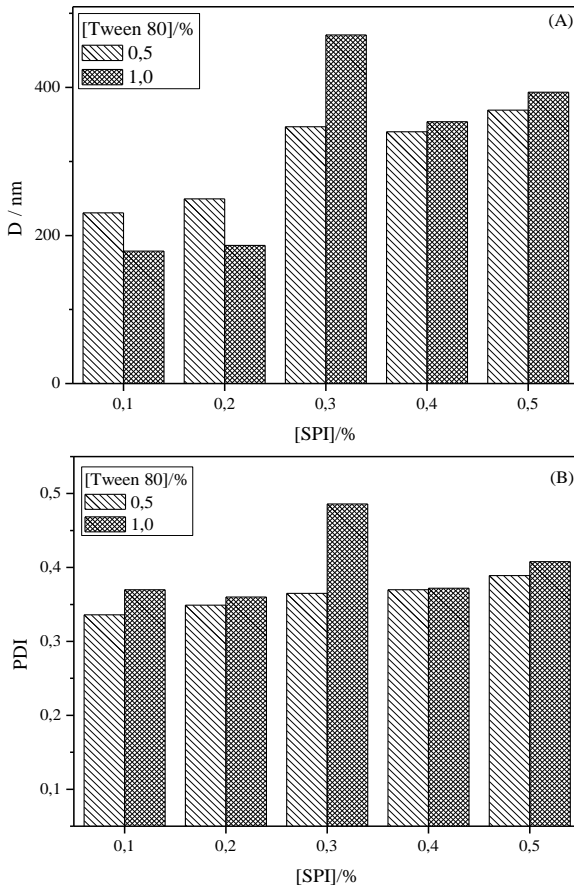


Figura 33. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da concentração de SPI na presença de diferentes concentrações de Tween 80 na solução tampão hostil.

Outro fator observado foi uma distribuição de tamanho bimodal das partículas de SPI. O aumento da concentração de surfactante leva a um aumento na população do primeiro pico na curva de distribuição de tamanho, localizado em aproximadamente 10 nm (Figura 34). Este pico é referente às micelas de surfactante Tween 80, que variam em tamanho de 5 a 20 nm¹¹² e, provavelmente, das cadeias de SPI não coacervadas associadas com o surfactante. O aumento na quantidade destas espécies no meio também contribuiu com o aumento do valor de polidispersidade das partículas, como visto na Figura 33(B).

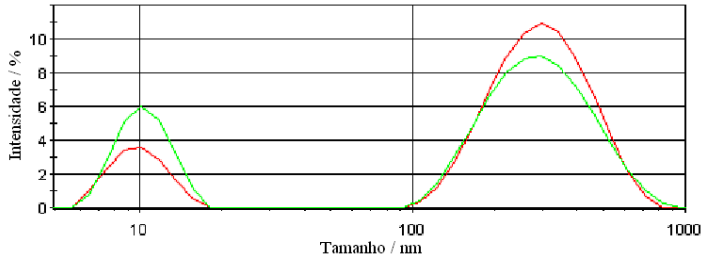


Figura 34. Curvas de distribuição de tamanho das partículas com 0,2% de SPI e (—) 0,5% e (—) 1,0% de Tween 80.

4.2.2.1.3. Efeito do surfactante na solução tampão hostil

A comparação da eficácia de diferentes surfactantes no preparo das partículas foi mais uma variável estudada. A Figura 35(A) e 35(B) apresentam, respectivamente, os valores do diâmetro médio e a polidispersidade de tamanho das partículas de SPI obtidas em diferentes [SPI(aq)], para dois sistemas com diferentes surfactantes – Tween 80 e Pluronic F-68 – numa concentração de 0,5% (m/m), adicionados na solução tampão hostil (na força iônica $I=1$ mM).

Um comportamento similar ao apresentado no item anterior (4.2.2.1.1) é observado nas partículas preparadas na presença do surfactante Pluronic, em relação à dependência do tamanho médio com a concentração de SPI. Entretanto, este surfactante leva a suspensões com partículas maiores e mais polidispersas do que as preparadas usando Tween. Tal comportamento pode ser justificado com base nas diferenças entre as estruturas moleculares dos dois surfactantes (Figura 10).

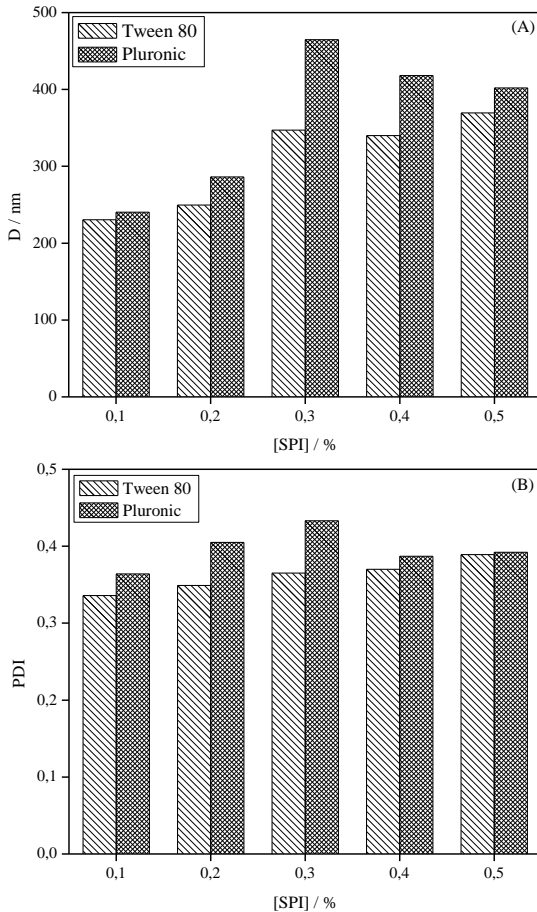


Figura 35. (A) Diâmetro e (B) polidispersidade em função da concentração de SPI na presença de diferentes surfactantes na solução tampão hostil.

Pluronic é, na verdade, o nome genérico comercial para uma série de copolímeros triblocos poli(EO-PO-EO), onde os blocos de poli(óxido etileno) (PEO) são hidrofílicos e o bloco central de poli(óxido propileno) (PPO) é hidrofóbico. O Pluronic F-68 é um tribloco simétrico, com estrutura poli(EO₈₀-PO₃₀-EO₈₀). Quando adsorvido na região interfacial do coacervato, os blocos de PEO (com 80 monômeros cada) são projetados para a fase aquosa e o bloco de PPO é ancorado na superfície. Já o termo Tween refere-se a uma série de surfactantes homólogos derivados do sorbitol, um açúcar polar, pela inclusão de um éster com cadeia alquílica hidrofóbica e um oligômero de óxido de etileno. No Tween 80 a cadeia hidrofóbica é a do ácido oléico (18

carbonos) e o grau de polimerização do EO é 20. Portanto, a região hidrofílica projetada da superfície da partícula para a fase aquosa contém apenas uma cadeia por molécula de surfactante, com 20 monômeros de EO, em contraposição às duas cadeias, de 80 monômeros cada, quando o surfactante é o Pluronic. Apesar do ganho na proteção estérica, o maior tamanho da corona hidrofílica resulta num aumento no tamanho médio das partículas, tal como evidenciado por DLS. Em adição, processos como i) a flocculação das partículas através de ponte entre moléculas de surfactantes, dado o tamanho considerável das cadeias do Pluronic; e ii) diminuição da proteção por depleção osmótica, provocada pela diminuição do número de moléculas de Pluronic dissolvidas na fase aquosa em razão do maior tamanho do bloco hidrofóbico, levam também ao aumento da polidispersidade do sistema e do tamanho médio observado.

4.2.2.2. Potencial Zeta das partículas

4.2.2.2.1. Efeito da força iônica da solução tampão hostil

Como as equações 4 e 10 sugerem, o aumento da força iônica promove a contração do comprimento de Debye e a diminuição do potencial Zeta. Isto foi verificado experimentalmente, tal como exibido na Figura 36. O potencial Zeta de todas as partículas é negativo, indicando que mesmo em $\text{pH} = 5$ a carga residual das cadeias de SPI é negativa. Observa-se ainda que, para uma mesma força iônica, o aumento da concentração de SPI leva a um aumento do potencial Zeta, indicando a formação de partículas com maior densidade de carga superficial.

Como exibido na Figura 36, o aumento da força iônica levou a diminuição do potencial Zeta; este fator favoreceu a coalescência das partículas e, como já mostrado anteriormente, produziu partículas maiores e mais polidispersas.

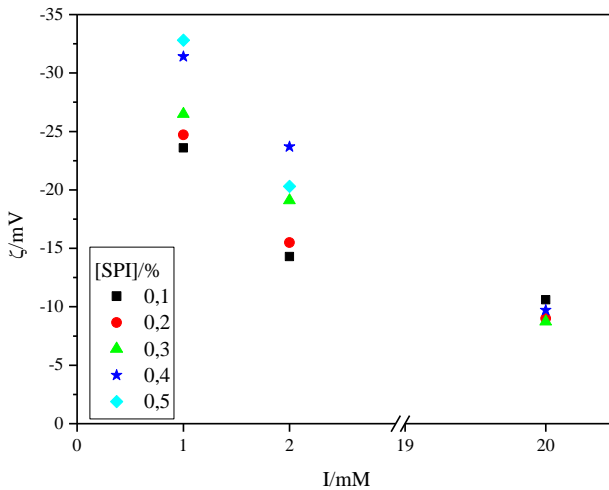


Figura 36. Potencial Zeta das nanopartículas em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80.

4.2.2.2.2. Efeito da concentração de surfactante na solução tampão hostil

A Figura 37 mostra o efeito do aumento da concentração de proteína no potencial Zeta das partículas em soluções tampão hostil (na força iônica $I=1\text{mM}$) feitas com duas concentrações de surfactante Tween 80. Como visto anteriormente, o aumento da concentração de proteína leva ao aumento do potencial Zeta das partículas, devido ao aumento da quantidade de carga superficial.

O efeito do aumento da concentração de surfactante é o de aumentar o potencial Zeta nas soluções com concentração de SPI $< 0,4\%$. Como já discutido, as moléculas de Tween adsorvem na superfície das partículas. O impedimento estérico causado pelos segmentos das moléculas de surfactante desloca alguns íons do plano de cisalhamento e da camada de Stern, diminuindo a neutralização do potencial de superfície. Isto é observado através do aumento do potencial eletrocinético. Já em concentrações maiores de proteína o potencial Zeta medido foi ligeiramente menor quando a concentração de Tween 80 era de $1\%(m/m)$. Neste caso, o efeito anterior pode ter sido compensado pelo aumento do diâmetro médio das partículas, tal como anteriormente demonstrado. Conforme a equação de Hückel (Equação 10), o potencial eletrocinético é diretamente proporcional à carga Q_E da unidade eletrocinética e diminui com o aumento do raio a das partículas.⁹⁷ Como o aumento da concentração de surfactante levou ao

aumento do tamanho das partículas obtidas com as soluções de concentrações de SPI mais altas, as partículas formadas tiveram menor potencial eletrocinético, conforme justificado anteriormente através da equação 10.

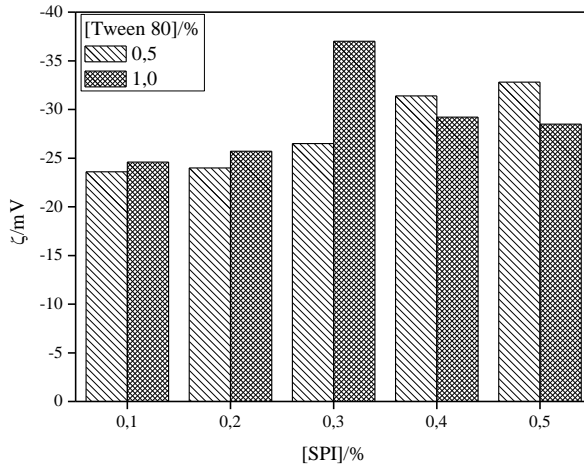


Figura 37. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI na presença de diferentes concentrações de Tween 80 na solução tampão hostil.

4.2.2.2.3. Efeito do surfactante na solução tampão hostil

Na Figura 38 é apresentado o efeito do tipo de surfactante no valor do potencial Zeta das partículas. Observa-se que, independentemente do tipo de surfactante utilizado, o potencial Zeta aumenta com o incremento da concentração de SPI, o que é justificado pelo aumento da área superficial para adsorção de surfactante. Como discutido anteriormente, a diminuição da neutralização do potencial de superfície (e conseqüente aumento do potencial eletrocinético) tem origem no deslocamento de íons das vizinhanças da superfície da partícula promovido pela adsorção de moléculas do surfactante.

Entretanto, o potencial Zeta das partículas é menor para todas as partículas preparadas quando o surfactante é o Pluronic. A explicação para esse comportamento pode ser dada usando-se a Figura 35(A). Através da figura é possível observar que todas as partículas preparadas na presença de Pluronic possuem maior valor de diâmetro médio, e conforme já explicado com o uso da equação de Hückel (Equação 10), o aumento do tamanho das partículas produz partículas com menor

potencial eletrocinético, pois este é diretamente proporcional à carga da unidade eletrocinética e decresce com o aumento do raio das partículas. Em adição, o maior volume de exclusão das moléculas de Pluronic promove um deslocamento de íons da região interfacial mais significativo, diminuindo a dissipação do potencial de superfície e, conseqüentemente, resultando num maior valor de potencial Zeta.

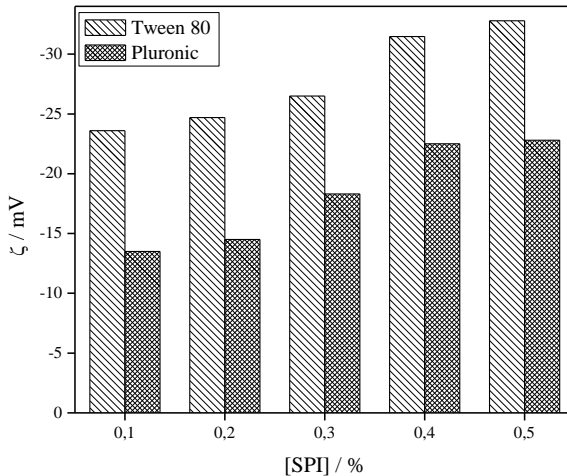


Figura 38. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI na presença de 0,5% de diferentes surfactantes na solução tampão hostil.

4.2.2.3. Análise morfológica via microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As micrografias (Figura 39) revelam nanopartículas compactas esféricas, cujo diâmetro varia entre 200 a 400 nm, valores similares aos observados via Zetasizer. Através da Figura 39(A) observa-se um aglomerado de partículas, obtidas a partir de suspensão aquosa SPI 0,3%. Neste aglomerado também é possível observar a sobreposição das partículas, pois o contraste apresentado em micrografias de TEM refere-se à espessura ou densidade do material. A Figura 39(A') apresenta uma partícula isolada, da mesma amostra, com uma morfologia “bowl-shaped”¹¹³.

A Figura 39(B) mostra as nanopartículas preparadas a partir de suspensão aquosa de SPI 0,5%. Aumentando a ampliação das microscopias foi possível notar que todas as partículas apresentavam pequenos pontos ao seu redor (Figura 39(B')), dispostos de modo a formar uma circunferência com diâmetro variado. Provavelmente, essa

circunferência é resultado da deposição de material na borda final da evaporação do solvente. Através da análise de TEM foi possível constatar que diferentemente do material formador das nanopartículas, cuja difratometria indicou uma organização amorfa, os pequenos pontos ao redor das partículas eram cristalinos. Provavelmente essas estruturas referem-se ao material hidrossolúvel presente nas suspensões, ou seja, os 8% de carboidratos contidos no pó de SPI, o surfactante e o sal usado na solução tampão hostil.

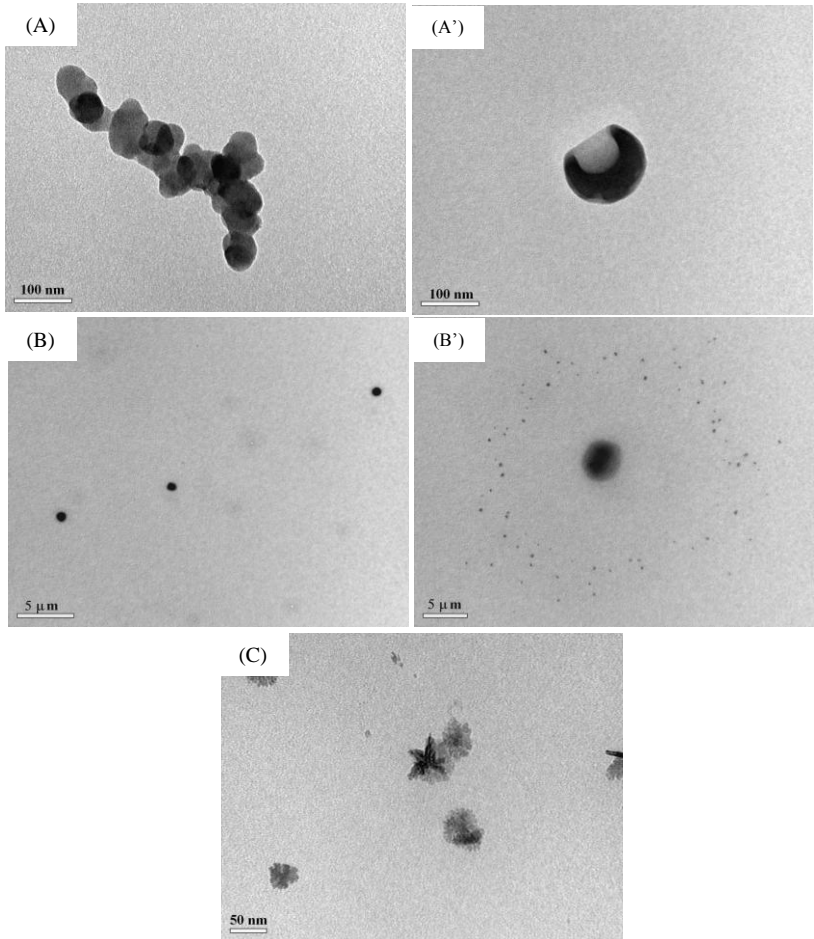


Figura 39. Micrografias obtidas por TEM das nanopartículas com formulação (A e A') F3, (B e B') F5 e do (C) material hidrossolúvel na presença de 0,5% de Tween 80.

4.2.2.4. Estudo da estabilidade cinética das suspensões coloidais

4.2.2.4.1. Distribuição de tamanho das partículas

Os valores de distribuição de tamanho médio das nanopartículas em diferentes intervalos de tempo durante seu armazenamento são apresentados na Tabela 11. De maneira análoga a demonstrada anteriormente, os índices de polidispersidade estão entre parêntesis. As medidas mostram que houve um aumento em até 155% no diâmetro médio das nanopartículas de SPI até o 122° dia de análise.

Tabela 11. Valores de diâmetro médio das nanopartículas de SPI.

Formulação/Dia	D/nm			
	1	22	64	122
F1	231 (0,3)	307 (0,4)	315 (0,4)	318 (0,4)
F2	250 (0,4)	305 (0,4)	638 (0,7)	504 (0,5)
F3	347 (0,4)	411 (0,4)	687 (0,7)	695 (0,7)
F4	340 (0,4)	413 (0,6)	535 (0,6)	408 (0,4)
F5	369 (0,4)	553 (0,6)	561 (0,6)	426 (0,5)

Todas as formulações exibiram, até o segundo mês de armazenamento, um deslocamento da distribuição de tamanho das nanopartículas de SPI para valores maiores durante a armazenagem, como visto na Figura 40(A) e 40(B). Este deslocamento pode ser atribuído a vários processos degradativos da suspensão que levam à agregação das nanopartículas.

As medidas realizadas no quarto mês de armazenamento mostram uma diminuição na amplitude de distribuição de tamanho médio das nanopartículas de SPI. Sabe-se que as suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. Entretanto, com o tempo, ocorre a aglomeração das partículas maiores e, conseqüentemente, a sedimentação. O tamanho médio das partículas pode sofrer uma diminuição em função do processo de sedimentação, pois ficam dispersas na fase aquosa apenas as partículas menores.

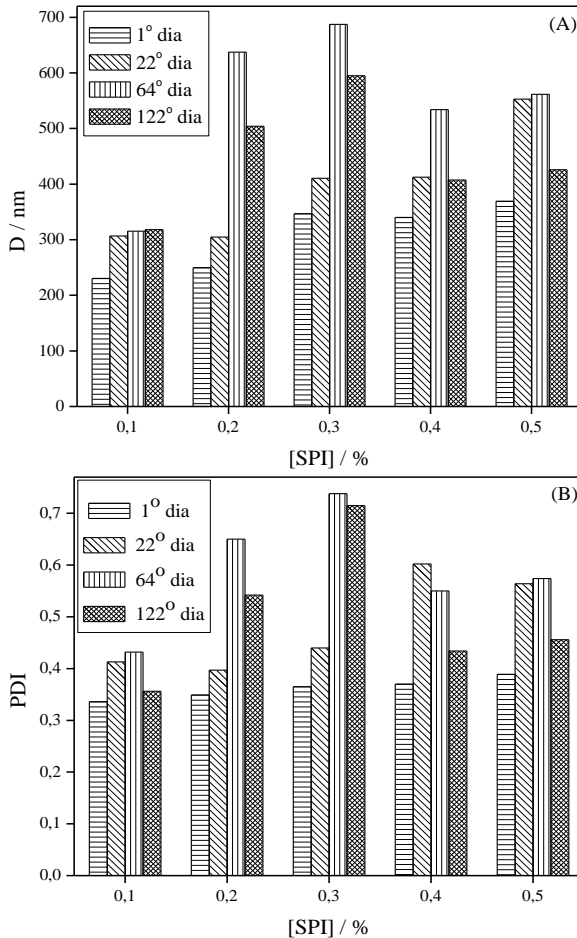


Figura 40. (A) Diâmetro médio e (B) polidispersidade das nanopartículas em função da concentração de SPI e do tempo de estocagem.

4.2.2.4.2. Potencial Zeta das partículas

Observa-se, na Figura 41, que no intervalo de tempo de estocagem o valor do potencial Zeta é sempre negativo para todas as nanopartículas, indicando que mesmo com o armazenamento a carga residual das cadeias de SPI presentes na superfície das partículas continua negativa. Ainda, nota-se que há um decréscimo gradual no valor de potencial Zeta das partículas em função do tempo de estocagem, que pode ser atribuído à agregação das nanopartículas. A agregação provoca o aumento no tamanho das nanopartículas e

conseqüente diminuição do potencial eletrocinético. A contínua neutralização do potencial Zeta reflete a desestabilização das suspensões coloidais, pois baixas forças repulsivas não evitam a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

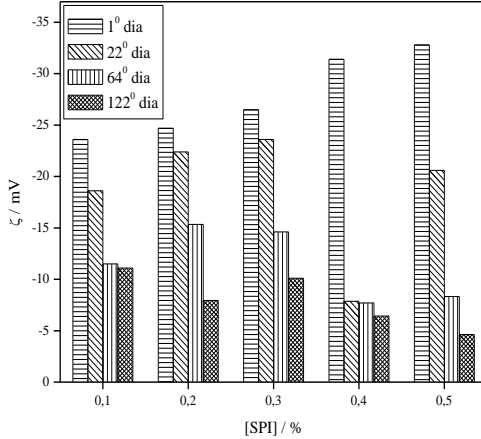


Figura 41. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI e do tempo de estocagem.

4.2.2.4.3. Condutivimetria

Na Figura 42 são apresentados os valores de condutividade específica das suspensões aquosas de nanopartículas em função do tempo. Aproximadamente até a quinta semana de armazenamento das suspensões os valores de condutividade não apresentaram variações significativas, indicando que as nanopartículas não sofreram modificações físicas ou químicas relevantes. Porém, a partir desse período houve um pequeno aumento na condutividade das partículas. Provavelmente houve um aumento da força iônica do meio durante o processo de agregação das nanopartículas, através da re-suspensão de algumas cadeias protéicas e migração de íons adjacentes para fase aquosa. Sabendo-se que a condutividade é a medida da mobilidade das espécies iônicas em solução, o aumento da força iônica do meio foi responsável pelo aumento da condutividade e a conseqüente diminuição do potencial Zeta, como já discutido anteriormente.

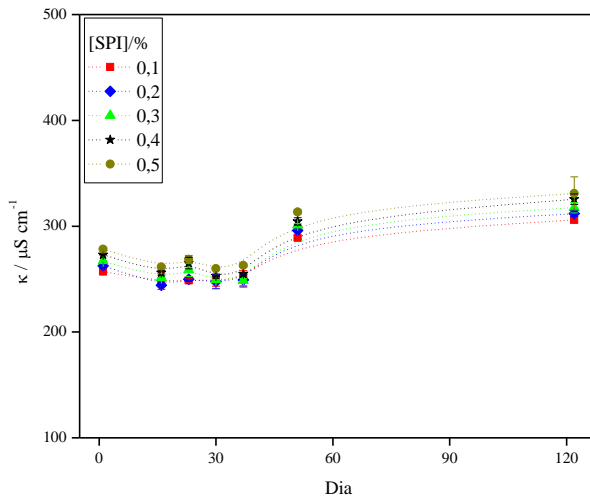


Figura 42. Condutividade específica em função do tempo de estocagem das nanopartículas preparadas com diferentes concentrações de SPI. Linhas somente como guia para os olhos.

4.2.2.5. Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)

A dependência angular da intensidade de espalhamento de luz de suspensões de nanopartículas de SPI foi investigada e a Figura 43 apresenta a $I(q)$ da amostra F5. A má correlação linear dos pontos é um indicativo da relevante polidispersidade do sistema; somente sistemas monodispersos resultam em uma perfeita correlação linear desta função, no limite $q \rightarrow 0$.

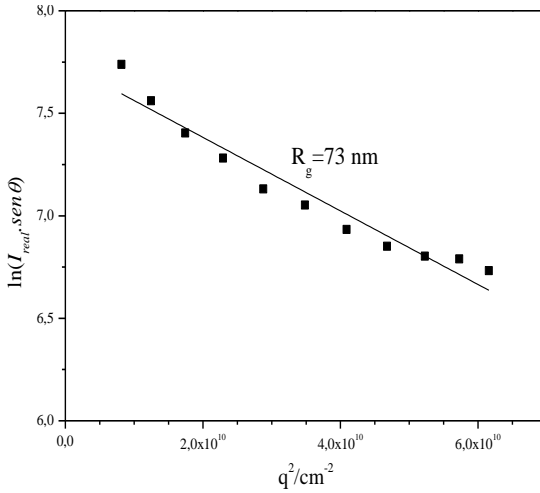


Figura 43. Gráfico de Guinier para os dados de espalhamento de luz estático (SLS) da suspensão F5. O valor de raio de giração médio inserido foi calculado com base no coeficiente angular da curva de linearização dos pontos experimentais.

Como previamente mostrado na Figura 32, o raio de giração de SPI(aq) era de 22 nm; o tamanho médio das nanopartículas de SPI, como expresso na Figura 43, é 73 nm. Isto significa que, em média, uma nanopartícula é formada por grupos de 3 a 4 unidades protéicas do SPI.

Simultaneamente, medimos também o espalhamento de luz dinâmico (DLS) das mesmas amostras. A Figura 44 apresenta a dependência angular da frequência média de relaxação das curvas de autocorrelação de DLS da suspensão F5 e o respectivo raio hidrodinâmico, calculado com base na Equação de Stokes-Einstein (Equação 8).

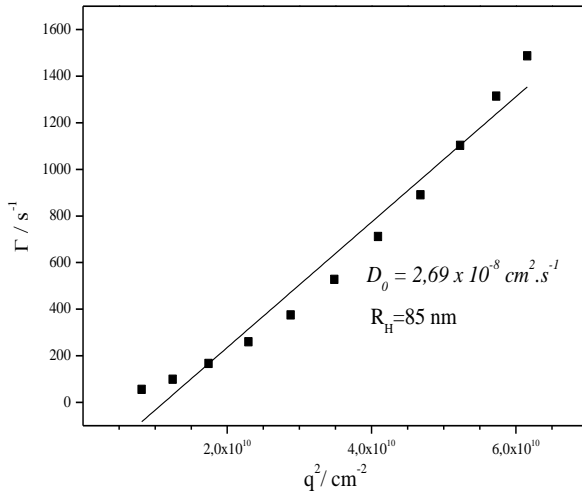


Figura 44. Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do espalhamento de luz dinâmico (DLS) da suspensão F5. O valor de raio hidrodinâmico médio foi calculado através da equação de Stokes-Einstein, usando o coeficiente angular das curvas como D_0 .

A Figura 44 fornece tanto o coeficiente de difusão translacional das nanopartículas de SPI como também o seu raio hidrodinâmico médio. Novamente, a ausência de uma correlação linear perfeita entre os pontos experimentais indica polidispersidade relevante no sistema – algo também observado por SLS e medidas anteriores no Zetasizer.

Todavia, o $\langle R_H \rangle$ determinado por esta técnica difere do determinado através do Zetasizer, que foi de 369 nm. Aquele instrumento também utiliza o espalhamento de luz; entretanto, não é capaz de medir a dependência angular. O instrumento opera medindo a luz espalhada somente em um ângulo $\theta=173^\circ$ e utiliza uma aproximação conhecida como “*back scattering*”. Esta aproximação é parcialmente válida para sistemas monodispersos e, em sistemas polidispersos, tende a superestimar o valor do raio hidrodinâmico, dada a maior contribuição de partículas grandes na intensidade de espalhamento neste ângulo. De fato, a Figura 44 indica que o coeficiente angular da região correspondente a este ângulo (onde $q \rightarrow 0$) é menor do que o coeficiente angular da curva que usa todos os ângulos, isto é, se a medida fosse feita somente usando esta estreita faixa angular ($q \rightarrow 0$) o valor de R_H (Eq. 4) estimado seria maior.

Algo bastante interessante quando estabelecemos uma razão entre os valores de $\langle R_g \rangle$ e $\langle R_H \rangle$: esta razão é conhecida como fator ρ e é um

indício da morfologia da amostra. A Tabela 12 apresenta uma relação entre alguns valores de ρ e a respectiva topologia associada.

Tabela 12. Relação entre a razão ρ e a morfologia das partículas. Adaptado da referência 92.

Topologia	Razão ρ
Esfera idealmente homogênea	0,775
Esfera oca	1,0
Polímero randomicamente enovelado	1,505

De acordo com os resultados apresentados, a suspensão F5 apresenta $\rho = (73/85) = 0,86$. Este valor é próximo a de uma esfera compacta e homogênea ($\rho=0,78$); entretanto, a divergência de 10% sugere que as nanopartículas de SPI são rugosas com cadeias poliméricas protuberantes e/ou micelas de surfactante na superfície. Esta hipótese é bastante coerente, tendo em vista que as partículas são formadas pela coacervação de cadeias protéicas e estabilizadas por surfactante Tween.

A Figura 45 indica que há uma grande dependência angular no espalhamento da suspensão F5; isto é um indicativo de (a) partículas grandes e/ou (b) sistema polidisperso. Esta figura também justifica as diferenças de tamanho médio encontradas quando se utilizou o Zetasizer, instrumento incapaz de ponderar a dependência angular e que faz medida somente em um único ângulo fixo. Como se percebe, o tamanho obtido a partir da curva correspondente a $\theta=90^\circ$ deve ser bastante diferente do obtido a partir de $\theta=140^\circ$, pois as curvas possuem tempo de relaxação bastante distinto.

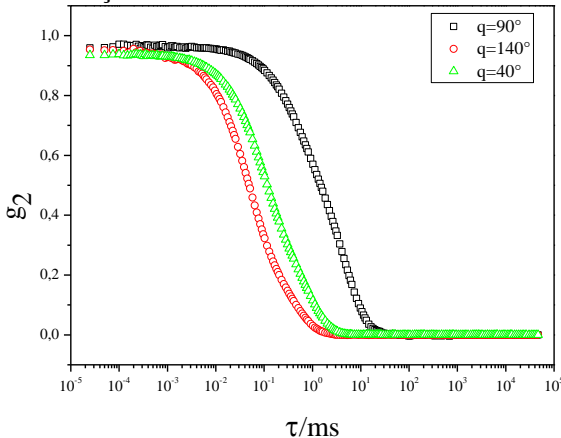


Figura 45. Dependência angular das curvas g_2 de autocorrelação de DLS da suspensão F5 (para clareza, somente as curvas de 3 diferentes ângulos de espalhamento são exibidas).

A Figura 46 apresenta a análise da distribuição de tamanho da suspensão F5 medida a $\theta=90^\circ$, obtida pelo ajuste regularizado (método CONTIN¹¹⁴) da respectiva curva de autocorrelação de DLS. O histograma indica a presença de duas populações, tal como anteriormente visto pelo Zetasizer. A primeira população é a de micelas de surfactantes e cadeias poliméricas dissolvidas na fase aquosa, enquanto que a segunda população é a de nanopartículas de SPI que, de acordo com a Figura 46, possuem um raio médio de 110 nm.

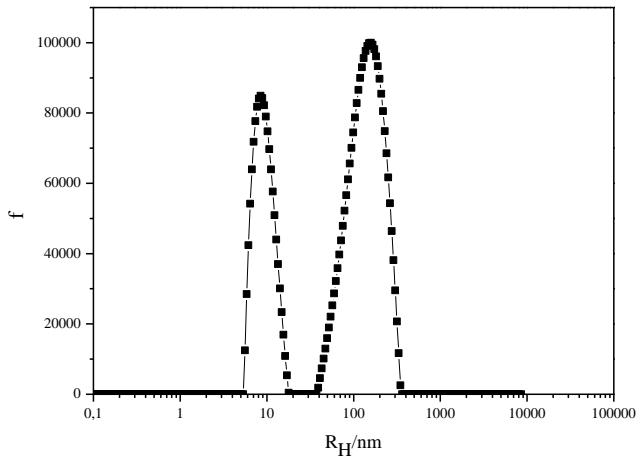


Figura 46. Histograma de distribuição de tamanho dado pelo ajuste CONTIN da curva de autocorrelação

5. CONCLUSÕES

As estratégias utilizadas e desenvolvidas foram viáveis para a preparação de micro e nanopartículas a partir da SPI.

✓ Devido a processos degradativos durante o armazenamento, optou-se pela preparação da emulsão *in situ*, seguida da introdução imediata no *Spray Dryer* para a preparação das microcápsulas.

✓ Foram obtidas microcápsulas com diâmetros entre 1 a 2 μm e com superfície sem porosidade.

✓ A presença de óleo de Copaíba no interior das microcápsulas foi comprovada por meio do uso de técnicas como TGA, DSC e FTIR-ATR.

✓ Através do método de coacervação em água obteve-se nanopartículas com cerca de 200 nm de diâmetro.

✓ O estudo de estabilidade cinética das suspensões de nanopartículas de SPI indicou que os processos degradativos ocorreram em pequena escala até o quarto mês de armazenamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, p. 35-42, 2004.
2. FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1-18, 2004.
3. BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v. 2.
4. YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 576-602, 2006.
5. SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 84-95, 2007.
6. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. USA: Worth, 1993.
7. GENNADIOS A. (Ed.). **Protein-Based Films and Coatings**. Florida: CRC Press, 2002.
8. Adaptado de <http://barleyworld.org/css430_09/lecture%209-09/notes9-09.htm>. Acesso em: 20 novembro 2009.
9. MCMURRY, J. **Organic chemistry**. 4 ed. Pacific Grove: Brooks/Cole, 1996.
10. STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1995.
11. THE SOLAE COMPANY – BRAZIL. Disponível em <<http://www.solae.com/global/portuguese/index.html>>. Acesso em 12 novembro 2009.
12. HO, K. G.; WILSON, L. A.; SEBRANEK, J. G. Dried soy tofu powder effects on frankfurters and pork sausages patties. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 434-437, 1997.
13. AKESOWAN, A. Effect of soy protein isolate on quality of light pork sausages containing konjac flour. **African Journal of Biotechnology**, vol. 7, n. 24, p. 4586-4590, 2008.
14. LODHA, P.; NETRAVALI, A. N. Thermal and mechanical properties of environment-friendly 'green' plastics from stearic acid modified-soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 49-64, 2005.
15. KUMAR, R.; CHOUDHARY, V.; MISHRA, S.; VARMA, I. K.; MATTIASON, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p.155-172, 2002.
16. MALHOTRA, A.; COUPLAND, J. N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 101-108, 2004.

17. GIACOMELLI, V. S. **Morfologia, propriedades termicas e mecanicas de filmes de proteina isolada de soja/dodecilsulfato de sódio/policaprolactona-triol**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
18. KEERATI-U-RAI, M.; CORREDIG, M. Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2141–2148, 2009.
19. JONG, L. Fractal Dimensions of Soy Protein Nanoparticle Aggregates determined by Dynamic Mechanical Method. *Materials Research Society Symposia Proceedings*, v.1086, 2008.
20. WALSH, D. J.; CLEARY, D.; MCCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITGETALD, R. J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, v. 36, p. 677–683, 2003.
21. SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, p. 25-31, 2005. Artigo vanessa
22. RHIM, J. W.; LEE, J. H.; NG, P. K. W. *LWT - Food Science and Technology* 42 (2009) 919–923 Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009. Jong-Whan Rhima,_, Jun Ho Leeb, Perry K.W. Ng
23. GU, X.; CAMPBELL, L. J.; EUSTON, S. R. *Food Research International* 42 (2009) 925–932 Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. **Food Research International**, v. 42, p. 925–932, 2009. Xin Gu, Lydia J. Campbell *, Stephen R. Euston
24. CABELL, G.M.; WEBB, C.; MCKNEE, S. L. **Cereals: novel uses and processes**. New York: Plenum Publishers 1997., 1997. p. 107-7e116
25. GAN, C. Y.; CHENG, L. H.; EASA, A. M. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9 (2008) 563–569 Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. **Chee-Yuen Gan, Lai-Hoong Cheng, Azhar Mat Easa** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, p. 563–569, 2008.
26. MENDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M. *Food Research International* 42 (2009) 1099–1104 Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099–1104, 2009. Debora V. Mendanha a, Sara E. Molina Ortiz b, Carmen S. Favaro-Trindade a*, Adriana Mauri b, Ednelí S. Monterrey-Quintero a, Marcelo Thomazini

27. FAVARO-TRINDADE, A. S.; SANTANA, E. S.; MONTERREY-QUINTERO, M. A.; TRINDADE, F. M. NETTO. The Use Of Spray Drying Technology To Reduce Bitter Taste Of Casein Hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, no preloIn Press, Accepted Manuscript, Available , 2009.
28. VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. O gênero copaífera L. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p.273-286, . abr./maio, 2002.
29. SERVIÇO DE APOIO AS PESQUISAS E MICROEMPRESAS DO ACRE - SEBRAE. **Produtos Potenciais da Amazônia:** copaíba: opções de investimentos no Acre com produtos florestais não madeireiros. Rio Branco: 1995. p. 26
30. Biavatti, M. W.; Dossin, D.;Deschamps, F. C.;Lima, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 230-235, 2006.
31. SANTOS, A. O.; TÂNIA UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS B. P.FILHO, VEIGA V. F. JR.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on Leishmania amazonensis **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008.
32. ESTRELLA, E. **Plantas medicinales amazónicas:** realidad y perspectivas. Lima: TCA, 1995. p. 302.
33. OLIVEIRA, W. A ciência testa os milagres da floresta. **Galileu**, São Paulo, n. 133 p.37-41, ago. 2002.
34. ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de Copaífera multijuga HAYNE - LEGUMINOSASEAE, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. **Acta Amazônica**. v. 12, n. 1, p. 79-82, 1982.
35. ALENCAR, J.C. et al.; **Inventário florestal do distrito da zona franca de Manaus. Manaus**, p. 177, 1972.
36. VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n.6, p.1057-1060, 2002.
37. LEITE, A.; ALECHANDRE, A.; RIGAMONTE, C.; CAMPOS, C.; OLIVEIRA, A. Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba. Rio Branco: UFAC-SEFE-BRILHOGRAF, 2001. 38 p.
38. LANGENHEIM, J.H.; FEIBERT, E.B. Leaf resin variation in Copaífera langsdorfii: relation to irradiance and herbivory. **Phytochemistry**, v.27, n.8, p.2527-32, 1988.
39. PINTO, A. C.; BRAGA,W. F.; REZENDE,C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA, V. F. JR.; BERGTER,L.; PATITUCCI. M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of Copaífera cearensis Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hidroxide impregnated sílica gel. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p.355-60, 2000.

40. BOURGEAT-LAMI, E., How Particles. **Coloidal Polymers**, p. 212-215, 2003.
41. SOPPIMATH, S. K.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.
42. ANDREANI, L.; CERCENÁ, R.; RAMOS, B. G. Z.; SOLDI, V. Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 524-531, 2009.
43. PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E. J.; DURÁN-DOMÍNGUEZ, C.; TREJO-MARTÍNEZ, S. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation — I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure **Food Research International**, v. 32, n. 5, p. 367-374, 1999.
44. COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P. ; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology : a review. **Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002
45. KAWAGUSHI, H. Funcional polymer microspheres. **Progress in polymer sciences**, v. 25, n. 8, p. 1171-1210, 2000.
46. PAVANETTO, F.; GENTA, I.; GIUNCHEDI, P.; CONTI, B. Evaluation of spray-drying as method for polylactide and polylactide - co - glycolide microspheres preparation. **Journal of Microencapsulation**, v.10, p. 487-497, 1993
47. KIM, C. **Controlled release dosage from desing**. 1. ed. Lancaster: Technomic, 2000, p. 301.
48. SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.33, n. 6, p.501-547, 1993.
49. RÉ, M. I. Microencapsulação de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v.27, n.162, p. 25-27, jul. 2000.
50. CUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F., Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles – Current Possibilities and Future-Trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 2-13, 1995.
51. QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p.1113-1128, 1998.
52. KREUTER, J. Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems. I: Preparation Methods. **Pharma Acta Helvetica**, v. 58, n. 7, p. 196-208, 1983.
53. DELLACHERIE, E.; GREF, R.; QUELLEC, P. Les nanosphères furtives comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités. **Médecine/Sciences**, v. 17, n. 5, p. 619-626, 2001.

54. MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.
55. ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 271- 280, 2004.
56. RAMOS, B. G. Z. **Avaliação do potencial de utilização de um poliuretano obtido a partir de um polioli de origem natural como material polimérico para a micro e nanoencapsulação de fármacos**. 2006. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
57. SANTINHO, A. J. P.; PEREIRA, N. L.; FREITAS, O.; COLLETT, J. H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles **International Journal of Pharmaceutics**, v. 186, n. 2, p.191-198, 1999.
58. BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. D. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray -drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, n. 1-2, p.45-55, 2003.
59. EZPELETA, I.; IRACHE, J. M.; STAINMESSE, S.; CHABENAT, C.; GUEGUEN, J.; POPINEAU, Y.; ORECCHIONI, A. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, n. 2, p.191-200, 1996.
60. ZHAO, J., WU, J. Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe Chinese. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, n. 11, p. 1555-1559, 2006.
61. BHARDWAJ, S.B.; SHUKLA, A.J.; COLLINS, C.C. Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 1, p.71-81, 1995.
62. WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p.235-259, 1990.
63. VILA JATO, J. L. (Ed). **Tecnologia Farmacêutica: Aspectos Fundamentals de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas**. Madrid: editorial Síntesis S.A., 1997, p. 577-608.
64. JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p.2475-2490, 2000.
65. CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26 p.4646-4654, 2006.

66. GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, n. 7-8, 330-347, 2004.
67. VILA JATO, J. L. (Ed). **Tecnología farmacéutica – Formas farmacéuticas**. 5. ed. Madrid: Editorial Síntesis, v.2, 1997.
68. GOULA, M.; ADAMAPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. The effect on product recovery. **Journal of Food Engineering**, v.66, p.25-34, 2005.
69. WANG, S.; LANGRISH, T.A.G. A distributed parameter model for particles in the spray drying process. **Advanced Powder Technology**, v. 20, n. 3, p. 220-226, 2009.
70. ORTIZ, S. E.; MAURI, A.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. T.; SANTANA, A. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate . **Food Science and Technology**, v. 42, p. 919–923, 2009.
71. DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIERA, P.; POPINEAUC, Y.; BOURY, F. Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p.239-247, 2006.
72. SILVA, C; RIBEIRO, A; FERREIRA, D; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas. II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, p.1-30, 2003.
73. J. LAZKO, J.; POPINEAU, Y.; LEGRAND, J. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 37, n. 1-2, p.1-8, 2004.
74. RABELLO, M. **Aditivação de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2000.
75. Gerrard, J. A. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p.391–399, 2002.
76. TROPINI, V.; LENS, J. -P.; MULDER, W. J.; SILVESTRE, F. Wheat gluten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and *N*-hydroxysuccinimide. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 3, p. 281-289, 2004.
77. RHIM, J. W., GENNADIOS, A., WELLER, C. L., & HANNA, M. A. Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 15, n. 2, p.199–205, 2002.
78. STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 6, p.1332–1337, 1994.

79. CAO, Y. M.; CHANG, K. C. Edible films prepared from water extract of soybeans. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p.1449–1454, 2001.
80. MASAKI, K.; AIZAWA, T.; KOGANESAWA, N.; NIMORI, T.; BANDO, H.; KAWANO, K.; NITTA, K. Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*). **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, p.107–113, 2001.
81. LINDSAY, M. P.; SKERRITT, J. H. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p.247–253, 1999.
82. TOMIHATA, K.; BURCZAK, K.; SHIRAKI, K.; IKADA, Y. Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. **Polymers of Biological and Biomedical Significance**, v.24, p.275-286, 1993.
83. NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, p.123-130, 1995.
84. LIANG, H. C.; CHANG, W. H.; LIANG, H. F.; LEE, M. H.; SUNG, H. W. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water soluble carbodiimide. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, p.4017-4026, 2004.
85. CHEN, L.; REMONDETTO, G.; ROUABHIA, M.; SUBIRADE, M. Kinetics of the breakdown of cross-linked soy protein films for drug delivery. **Biomaterials**, v. 29, p.3750–3756, 2008.
86. TANG, C-H.; JIANG, Y.; WEN, Q-B.; YANG, X-Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 296–307, 2005.
87. JIANG, Y.; TANG, C-H.; WEN, Q-B.; LI, L.; YANG, X-Q. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p.218–225, 2007.
88. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.1-13, 2002.
89. HAMLEY, I. W. **Introduction to Soft Matter - Polymers, Colloids, Amphiphiles and Liquid Crystals**. Chichester: J. Wiley, 2000. p. 342
90. WULFF-PÉREZ, M.; TORCELLO-GÓMEZ, A.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.1096–1102, 2009.
91. HOU, W.; PAPADOPOULOS, K. D. W1/O/W 2 and O1/W/O 2 globules stabilized with Span 80 and Tween 80. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 125, p.181-187, 1997.

92. ATKINS, P. W.; de Paula, J. **Físico-Química**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. v. 1.
93. MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 1999.
94. SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992.
95. WOLFGANG SCHARTL. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**, Springer, Berlin, 2007.
96. GER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetic & Toiletries**, v. 8, n. 5, p. 47-53, 1996.
97. SCHICK, M. J.; HUBBARD, A. T.. Emulsions And Emulsion Stability, **Taylor & Francis Group, LLC**, Santa Barbara, 2006.
98. CASTELI, V. C.; MENDONÇA, C. C.; CAMPOS, M. A. L.; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Sci. Health Sci**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.
99. BARRA, G. M. O.; LEYVA, M. E.; SOARES, B. G. Condutividade elétrica de misturas mecânicas de polianilina e EVA. **Simpósio Matéria 2000 - NOTIMAC**, Rio de Janeiro, 2000.
100. BARRETO, P. L. M. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol**. 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
101. LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. **Caracterização de Polímeros**, 2001
102. NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Thermal Degradation Analysis of Biodegradable Plastics from Urea-Modified Soy Protein Isolate. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 46, p.207-211, 2007
103. PORTO, L. C. **Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água**. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
104. LAU, C.; MI, Y. A study of blending and complexation of poly(acrylic acid)/poly(vinyl pyrrolidone). **Polymer**, v. 43, p. 823-829, 2002.
105. RYAN, M.; MCEVOY, E.; DUGNAN, S.; CROWLEY, C.; FENELON, M.; O'CALLAGHAN, D. M.; FITZGERALD, R. J. Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 503-510, 2008.

106. ALBUQUERQUE, I.; GUEDES, P.; ALCANTARA JR., S.G.C.; MOREIRA, M.L.S. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**, v.33, p.127–131, 2003.
107. MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bonés of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 86, p. 325–332, 2004.
108. TEUBNER, M.; STREY, R. Origin of the scattering peak in microemulsions. **Journal of Chemical Physics**, v.87, p.3195, 1987.
109. SØRENSEN, C. M.; WANG, G. M. Size distribution effect on the power law regime of the structure factor of fractal aggregates. **Physical Review E**, v.60, n.6, p.7143, 1999.
110. VAN BEURTEN, P.; VRIJ, A. Polydispersity effects in the small-angle scattering of concentrated solutions of colloidal spheres. **Journal of Chemical Physics**, v.74, n., p.2744, 1981.
111. GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small-Angle Scattering of X-Rays**, John Wiley and Sons, New York, 1955.
112. TÜRK, M.; LIETZOW, R. Stabilized Nanoparticles of Phytosterol by Rapid Expansion From Supercritical Solution Into Aqueous Solution. **AAPS PharmSciTech**, v.5, n.4, 2004
113. RIEGEL, IZABEL CRISTINA; EISENBERG, ADI; PETZHOLD, CESAR LIBERATO; SAMIOS, DIMITRIOS. Novel bowl-shaped morphology of crew-cut aggregates from amphiphilic block copolymers of styrene and 5-(N,N-diethylamino)isoprene. **Langmuir**, v.18, n.8, p.3358, 2002.
114. S.W. PROVENCHER: Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy. **Makromol. Chem.** v.180, p.201, 1979