



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Nutrição



VICTOR HUGO OLIVEIRA DE ANDRADE

***UTILIZAÇÃO DO SORO DE LEITE BOVINO NO PROCESSO DE SECAGEM
DE PRÓPOLIS VERMELHA EM SPRAY-DRYER***

MACEIÓ
2013

VICTOR HUGO OLIVEIRA DE ANDRADE

***UTILIZAÇÃO DO SORO DE LEITE BOVINO NO PROCESSO DE SECAGEM
DE PRÓPOLIS VERMELHA EM SPRAY-DRYER***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientador: Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio
Júnior

**MACEIÓ
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Fabiana Camargo dos Santos

A553u Andrade, Victor Hugo Oliveira de.
Utilização do soro de leite bovino no processo de secagem de própolis
Vermelha em spray-dryer / Victor Hugo Oliveira de Andrade, Maceió – 2013.
63 f. : il.

Orientador: Irinaldo Diniz Basílio Júnior.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas,
Programa de Pós-Graduação em nutrição, 2013.

Bibliografia: f. 50-56.
Apêndice: f. 57-63.

1. Soro de queijo - Análise. 2. Própolis vermelha. 3. Soro de queijo -
Proteínas. 4. Soro de queijo - Flavonóides. 5. Secagem por pulverização.
5. Spray-dryer. I. Título.

CDU: 612.39:637.344

Dedico a minha mãe Neilma, a quem devo
minha vida, que hoje e sempre estará
comigo em meu coração e nos meus
pensamentos...

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de conhecimento, sabedoria...

A Universidade Federal de Alagoas e a Faculdade de Nutrição, pela oportunidade de realização desse Mestrado;

A CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado;

Ao professor Irinaldo Diniz Basílio Júnior que aceitou o convite para me orientar e compartilhar comigo de mais uma etapa que se encerra;

Aos professores do Programa em Pós-graduação em Nutrição, pelos ensinamentos, e a Amanda da secretaria da PPGNUT, pela disponibilidade, compreensão e suporte;

As professoras Ângela Froehlich e Camila Dornelas pela participação na banca e pelas colaborações, que me farão crescer pessoal e profissionalmente;

Aos professores Ticiano Gomes e Cristina Delgado pelas orientações e conselhos além do suporte laboratorial e pela experiência em sala de aula;

Ao laboratório de Bromatologia no nome da professora Giselda Lira, e em especial a Ariane Azevedo e Bruna Brito “as fodásticas” pela ajuda nas análises de proteína e pelos momentos de descontração e troca de experiências;

Ao IFAL, campus Satuba por estar sempre de portas abertas quando preciso, e a professora Camila Sampaio por permitir a realização dos meus experimentos;

A todos os meus colegas de mestrado... pela convivência e partilha;

A Erika, pela amizade, e por crescer junto comigo durante todo esse período, compartilhando e vivenciando os momentos bons e os difíceis;

Ao Danilo e a Tássia por toda ajuda e suporte nos experimentos e nas análises; E a todos do LCQA (Cantídeo, Juliana, Malu, Michelle, Rozália, Bárbara, Adélia e Louise) pessoas a quem tenho um carinho especial;

Ao meu pai Izidoro, a minha mãe Neilma (em memória), aos meus Irmãos Carlos, Joatam e a minha cunhada Lilian pelo apoio, carinho e amor que me ajudam a vencer todos os obstáculos impostos pela vida;

Ao meu sogro Mário Jorge, a minha sogra Maria José e ao meu cunhado e amigo Mário Alberto, a família que escolhi para se unir a minha;

A minha amada esposa Marília, fonte de inspiração, a quem amo muito e admiro com quem irei compartilhar de todos os momentos de minha vida;

RESUMO

Culturalmente no Brasil, o soro de queijo é destinado à alimentação animal ou descartado em rios, lagos e solo, tornando-se um agente poluidor. Devido à presença de proteínas de alto valor biológico e por apresentar propriedades funcionais e tecnológicas de interesse para a indústria de alimentos, diversos estudos buscaram investigar e controlar a influência da temperatura aplicada no processo secagem por pulverização sobre as propriedades das proteínas do soro. Os principais efeitos encontrados (agregação, desnaturação, formação de gel, etc.) estão intimamente ligados à temperatura aplicada em processos anteriores e durante o processo de secagem por pulverização, vale destacar os aspectos relacionados à solubilidade das proteínas e a capacidade de formação de emulsões. Essas características foram determinantes para a utilização do soro de queijo, na secagem de própolis vermelha (substância resinosa rica em compostos bioativos), para a obtenção de microencapsulados, através da técnica de secagem por pulverização. A partir da mistura entre soro de queijo coalho adicionado de excipientes (maltodextrina, goma arábica, amido e gelatina) e extrato etanólico de própolis (EEP) foram obtidas duas formulações F01 e F02, as quais foram analisadas quanto à composição, morfologia, distribuição de tamanho de partículas. Os resultados obtidos quanto à composição das formulações demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) para o teste t, nos parâmetros de umidade, proteínas e cinzas e não significativo para matéria seca e flavonóides totais. A formulação F01 apresentou menor tamanho médio de partícula ($12,02 \mu\text{m}$) comparado com a formulação F02 ($42,13 \mu\text{m}$). A morfologia das partículas analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), demonstrou que a formulação F01 apresentou um maior número de partículas esféricas e com menor agregação entre elas, o que pode ter ocorrido devido à presença de gelatina apenas na formulação F02. Através desses resultados podem ser realizados outros estudos que possam atestar a viabilidade e aplicabilidade da formulação F01.

Palavras-chave: Soro de queijo. Própolis vermelha. Proteínas do soro. Flavonoides totais. Secagem por pulverização.

ABSTRACT

Culturally in Brazil, the whey is used for animal feed or disposed of in rivers, lakes and soil, becoming a polluting agent. Due to the presence of proteins of high biological value and provide functional and technological properties of interest to the food industry, several studies sought to investigate and control the influence over of the applied temperature at the spray drying process on the properties of whey proteins. The main effects found (aggregation, denaturation, gelation, etc.) Are closely linked to the temperature applied in previous cases and during the spray drying process, it is worth highlighting the aspects related to the protein solubility and ability to form emulsions. These features were decisive for the use of whey in the drying of propolis (resinous substance rich in bioactive compounds) to obtain microcapsules by the spray drying technique. From the mixture of between the whey of Coalho cheese added of excipients (maltodextrin, gum arabic, starch and gelatin) and ethanolic extract of propolis (EEP) were obtained two formulations F01 and F02, which were analyzed as to the composition, morphology, distribution, particle size. The results regarding the composition of the formulations had demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) for the t test, to the parameters of moisture, protein and ash and not significant for dry matter and total flavonoids. The F01 formulation showed a lower average particle size (12.02 μm) compared to formulation F02 (42.13 μm). The morphology of the particles analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated that the formulation F01 presented a larger number of spherical particles with less aggregation among them, which may be due to the presence of gelatin in the formulation F02. Through these results can be carried out other studies that can attest to the feasibility and applicability of the formulation F01.

Key words: Cheese whey. Red propolis. Whey protein. Total flavonoids. Spray drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de obtenção do soro de queijo.....	33
Figura 2 – Distribuição cumulativa de tamanho de partícula dos microencapsulados obtidos na secagem por pulverização	43
Figura 3 – Microencapsulados contendo maltodextrina/goma arábica/amido.....	44
Figura 4 – Microencapsulados contendo maltodextrina/goma arábica/gelatina.....	44
Figura 5 – MEV fotomicrográfica dos microencapsulados de própolis com soro de queijo: a) formulação F01 200x; b) formulação F01 3.500x; c) formulação F02 200x; d) formulação F02 3500x.	45
Figura 6 – Curva de calibração com padrão de catequina a 280 nm.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual em massa dos excipientes nas formulações.....	34
Tabela 2 – Percentual em massa dos componentes nas formulações	35
Tabela 3 – Composição do soro de queijo coalho	38
Tabela 4 – Composição centesimal das formulações em base úmida (b.u.)	40
Tabela 5 – Percentual de cinzas, proteínas e flavonoides totais no extrato etanólico de própolis, nas formulações e no soro de queijo em base seca (b.s.)..	41
Tabela 6 – Concentração flavonóides totais em b.s. através do método direto	41
Tabela 7 – Percentual dos componentes nas formulações e seus respectivos percentuais de proteínas	42
Tabela 8 – Índice de polidispersidade e diâmetro médio de partículas em volume D[4,3] dos pós encapsulados F01 e F02	43
Tabela 9 – Curva de calibração da catequina pelo método de leitura direta a 280 nm	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPS – Concentrado protéico de soro

EEP – Extrato de Própolis Vermelha

F01 – Formulação 1

F02 – Formulação 2

IPS – Isolado protéico de Soro

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

T_{Entr} – Temperatura de Entrada

T_{saída} – Temperatura de Saída

α-La – Alfa -Lactoalbumina

β-Lg – Beta-Lactoglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	15
1º ARTIGO: ARTIGO DE REVISÃO	16
INTRODUÇÃO.....	18
Agregação	20
Composição	20
Desnaturação	21
Funcionalidades.....	23
Formação de gel	23
Propriedade emulsificante	24
Solubilidade.....	26
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
2º ARTIGO: ARTIGO DE RESULTADOS	29
1 Introdução	31
2 Materiais e métodos.....	32
<i>2.1 Materiais</i>	<i>32</i>
<i>2.2 Obtenção do extrato etanólico de própolis</i>	<i>33</i>
<i>2.3 Obtenção dos microencapsulados de própolis com soro.....</i>	<i>34</i>
<i>2.3.1 Preparo das formulações</i>	<i>34</i>
<i>2.3.2 Atomização das formulações</i>	<i>35</i>
<i>2.4 Caracterização do soro de queijo.....</i>	<i>35</i>
<i>2.4.1 Determinação de umidade</i>	<i>36</i>
<i>2.4.2 Determinação da matéria seca.....</i>	<i>36</i>
<i>2.4.3 Teor de cinzas.....</i>	<i>36</i>
<i>2.4.4 Determinação de proteína total</i>	<i>36</i>
<i>2.5 Caracterização do extrato etanólico de própolis e dos microencapsulados de própolis com soro.....</i>	<i>36</i>

2.5.1 Determinação dos flavonóides totais	37
2.5.2 Análise Estatística	37
2.5.3 Análise de tamanho de partículas dos microencapsulados	37
2.5.4 Caracterização morfológica dos microencapsulados através do MEV	38
3 Resultado e discussões	38
3.1 Caracterização físico-química do soro de queijo	38
3.2 Caracterização química do extrato etanólico de própolis (EEP)	40
3.3 Caracterização dos microencapsulados de própolis com soro de queijo	40
3.4 Análise de distribuição de tamanho de partícula	43
3.5 Caracterização morfológica dos microencapsulados	45
4 Conclusão	45
Referências	46
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	57
APÊNDICE A - Fotos de antes, durante e após a secagem das formulações em mini Spray Dryer B-290 da Büchi®.	58
APÊNDICE B - Teste t de student aplicado aos parâmetros de composição através do programa estatístico Minitab® 15.	61
APÊNDICE C – Curva de calibração da catequina	63

Historicamente, o soro tem sido considerado um resíduo e vem sendo destinado à alimentação de animais, ou transformado em commodities de valor relativamente baixo, tais como soro em pó e vários tipos de concentrado ou isolado protéico de soro (CPS, IPS) (CHATTERTON et al., 2006). Entretanto as proteínas presentes no soro de leite bovino desempenham papéis importantes na formulação de alimentos e produtos farmacêuticos, bem como em sistemas biológicos.

Contudo, a procura crescente por alimentos contendo proteínas como um dos principais componentes, criou uma necessidade por proteínas com propriedades funcionais específicas e consistentes (PELEGRINE; GASPARETTO, 2005), tais como formação de espuma, absorção de água, melhora na viscosidade, formação de emulsões e gelificação e de fácil solubilização (SMITH, 1976; KINSELLA; FOX, 1986; AKHTAR; DICKINSON, 2003). As proteínas do soro apresentam tais propriedades que permitem a utilização da mesma como material de revestimento para a microencapsulação na secagem por pulverização.

As proteínas do soro já foram utilizadas com sucesso como material de parede para encapsular em spray-dryer, gordura de leite (YOUNG et al., 1993; KEOGH; O'KENNEDY, 1999) bactérias lácticas (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; RAJAM et al., 2012) substâncias voláteis (ROSENBERG; SHEU, 1996) compostos bioativos (GUNASEKARAN; XIAO, 2007).

No entanto, um projeto estratégico na formulação de alimentos pode aperfeiçoar ainda mais as funcionalidades nutricionais das proteínas do soro, desenvolvendo, novas aplicações na indústria de alimentos (CHAI et al., 2010).

A própolis é um produto resinoso natural coletado pelas abelhas de brotos e exsudatos de várias fontes vegetais e ganhou popularidade como um suplemento alimentar, com finalidade terapêutica. Além disso, a própolis é amplamente utilizada em alimentos e bebidas em diferentes partes do mundo (BANSKOTA et al., 2001).

As substâncias que constituem a própolis estão diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem. Os flavonoides têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis (CABRAL et al., 2009). Também fazem parte de sua composição: ceras, óleos essenciais, pólen, alguns minerais tais como ferro e zinco e vários componentes orgânicos como, vitaminas (B1, B2, B3 e B6), ácido benzóico, ésteres, cetonas, lactonas, quinonas, esteróides e açúcares, além de pigmentos naturais como

clorofilas e carotenóides (FARRÉ et al., 2004; JULIANO et al., 2007; CAVACO et al., 2008).

O extrato de própolis tem sido aplicado em diversos produtos tais como nutracêuticos, cosméticos, de higiene dental, cremes dermatológicos e suplementos alimentares (CATCHPOLE et al., 2004). Sendo o extrato etanólico a forma mais utilizada, no entanto, processos alérgicos têm sido identificados ao uso do etanol (BISCAIA; FERREIRA, 2009).

Dependendo da aplicação, o solvente presente no extrato de própolis deve ser reduzido ou eliminado. Os processos comumente utilizados na redução ou eliminação de solventes são: liofilização, destilação a vácuo e evaporação apresentam como desvantagens o elevado consumo de energia e o uso de altas temperaturas (MELLO et al., 2010). Apesar de usar elevadas temperaturas, a técnica de secagem por pulverização é tecnológica e economicamente aplicável, devido ao curto tempo de contato da amostra com o ar quente, partículas mais uniformes e o menor gasto energético quando comparado com a liofilização.

As propriedades farmacêuticas da própolis e as propriedades funcionais do soro de leite podem ser uma alternativa viável para agregar valor ao soro e enriquecer nutricionalmente a própolis. O uso da técnica de secagem por pulverização para obtenção de própolis em pó pode ser otimizada utilizando-se o soro líquido para a solubilização da própolis antes do processo de secagem. As propriedades emulsificantes do soro de leite, associadas ao uso de alguns adjuvantes no processo de secagem podem conferir ao produto final características desejáveis, tais como, baixa umidade, uniformidade do pó, rendimento e manutenção das características iniciais da matéria prima.

1º ARTIGO: ARTIGO DE REVISÃO

ANDRADE, VHO; COSTA, MNS; ALMEIDA, ETC; NASCIMENTO, TG; SILVA, MCD; BASÍLIO JÚNIOR, ID. Efeitos do processo de secagem por pulverização sobre as proteínas do soro de leite bovino.

Revista que será submetido: Química Nova

RESUMO

Produtos lácteos são muitas vezes secos por pulverização a fim de melhorar a estabilidade ao armazenamento, através da redução da água disponível para alterações microbianas e reações químicas, além de melhorar a logística de armazenamento e transporte. As proteínas de soro de leite em especial, são submetidas ao processo de secagem por pulverização, seja para obtenção de concentrados ou isolados protéicos em pó, ou utilizadas como material de parede. Este artigo teve como objetivo descrever os principais estudos e técnicas usadas, a fim de investigar e controlar a influência da temperatura aplicada no processo de secagem por pulverização sobre as propriedades das proteínas do soro de leite. A desnaturação das proteínas do soro é um dos principais objetos de estudo, por se tratar de um material biológico e especificamente susceptível a processos térmicos. Os principais efeitos sobre as proteínas do soro estão intimamente ligados à temperatura aplicada em processos anteriores e durante o processo de secagem por pulverização, o que influi diretamente na qualidade do pó, seja no teor de umidade, formato, tamanho e distribuição das partículas, como também nas propriedades das proteínas do soro.

Palavras-chave: Soro, leite bovino, secagem por pulverização, temperatura.

ABSTRACT

Milk products are often spray dried in order to improve the storage stability, by reducing the water available for chemical reactions and microbial changes, and

improve the logistics of storage and transportation. The whey protein in particular, are spray dried in obtaining concentrate or protein isolate powder, or used as wall material. This article aims to describe about the main studies and techniques used in order to investigate and control the influence of the applied temperature spray drying process on the properties of whey proteins. The denaturation of whey protein is one of the main objects of study because it is a biological material and specifically susceptible to thermal processes. Therefore, the main effects over whey proteins are closely related to the temperature applied in previously and during spray drying, which directly influences the quality of the powder, as in the moisture content, shape, size and distribution of particles as well as the properties of whey proteins.

Key words: Whey, bovine milk, spray drying, temperature.

INTRODUÇÃO

As proteínas do leite são proteínas importantes e amplamente utilizadas como ingredientes nas indústrias de alimentos e laticínios¹ estão classificadas em duas categorias de acordo com sua estrutura: proteínas flexíveis para as caseínas e proteínas globulares para as proteínas do soro.²

Existem duas principais proteínas no soro, a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina. A β -lactoglobulina representa 50% em massa de proteína no soro de leite e tem uma massa molecular de 18.400 Da. Ela desempenha um papel extremamente importante na indústria de alimentos, por apresentar propriedades de gelificação e de emulsificação.³ A α -lactoalbumina é a segunda maior proteína globular do soro (constituindo 20% da massa de proteína de soro de leite) apresenta

uma menor massa molecular (14.200 Da) e esta pode se ligar com íons de Ca^{2+} . As propriedades bioquímicas e físico-químicas dessas duas proteínas têm sido amplamente estudadas e suas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias estão bem documentadas.⁴

Alguns derivados lácteos são muitas vezes secos por pulverização para melhorar a estabilidade de armazenamento, minimizar os requisitos de embalagem, transporte e reduzir o peso.^{5,6} É intenção do processo de secagem é obter um produto que após a reconstituição com água seja apresente propriedades muito semelhantes ao material original. Para a qualidade do pó obtido o comportamento dos constituintes termolábeis durante o processo secagem é de fundamental importância.⁷

As proteínas do soro são sensíveis ao calor e durante o processo de secagem, podem ocorrer mudanças estruturais e físicas devido à desnaturação, agregação entre as proteínas do soro de leite, e a formação de complexos de proteínas entre as proteínas do soro e caseínas.⁸ Particularmente, as proteínas do soro de leite bovino são conhecidas por desnaturar facilmente após aquecimento, e de forma irreversível.⁹

Durante a secagem por pulverização, a temperatura da gotícula de soro sobe rapidamente, enquanto ao mesmo tempo, o teor de água da mesma diminui. Dessa forma a desnaturação das proteínas e agregação só ocorrerá nesse estágio do processo de secagem, quando a temperatura e a atividade de água da gotícula estão relativamente altas.¹⁰

Inúmeros estudos abordaram o efeito dos tratamentos de calor sobre as proteínas do soro, quer em solução ou incorporados em emulsões. Segundo dados da literatura, o aquecimento das proteínas de soro de leite a temperaturas superiores

a 70°C, estejam elas em solução ou em emulsão induz a desnaturação, resultando no desdobramento das moléculas das proteínas do soro e expondo seus sítios reativos.¹¹

O presente trabalho teve por objetivo analisar e avaliar artigos científicos que estudaram os efeitos da temperatura sobre as proteínas do soro de leite bovino durante o processo de secagem por pulverização, através de uma revisão.

Agregação

De La Fuente et al.¹² estudaram as mudanças na composição e no estado de agregação de proteínas de soro em diferentes fases do processamento utilizado na fabricação de concentrados proteicos de soro (CPS) comerciais, e notaram que pequena quantidade de agregados das proteínas do soro nestes produtos se dá provavelmente devido aos tratamentos de calor aplicados ao leite e ao soro (principalmente a pasteurização) antes da concentração e secagem.

Composição

Gaiani et al.¹³ investigaram a influência da temperatura de saída do spray-dryer sobre a composição da superfície do pó, através da análise de misturas contendo diferentes proporções de caseína e proteínas do soro, com o interesse de ajustar a temperatura de secagem do spray-dryer de acordo com a composição da superfície desejada: mais ou menos caseína e/ou proteínas do soro na superfície.¹³ E verificaram que não há diferenças para amostras com a mesma formulação em diferentes $T_{saída}$. O que indica que a secagem por pulverização em alta temperatura

de saída de ar (130 ° C) não modifica a estrutura das proteínas, em comparação com a baixa $T_{saída}$ (80 ° C).¹³ No entanto a presença de pelo menos 20% de caseína nas misturas antes da secagem por pulverização podem proteger as proteínas de soro de leite da desnaturação.¹³

Eles demonstraram também que efeito da temperatura de secagem por pulverização sobre a composição da superfície pode ser atribuída mais a cinética da secagem, e não necessariamente ao estado em que se encontram as proteínas (nativas, desdobradas, agregada etc.) à medida que a secagem por pulverização aumenta a temperatura de 80 para 130 ° C, a superfície pode solidificar rapidamente, e pode refletir na composição em massa da superfície.¹³ Dessa forma a difusão dos diferentes componentes, durante a secagem por pulverização pode ser interrompida antes que o sistema tenha alcançado o equilíbrio.¹³

Desnaturação

Oldfield et al.¹⁴ relatam que a desnaturação irreversível nas proteínas que estão em maior concentração (β -lg A, β -lg B e α -la) e proteínas com menores concentrações (IgG e BSA) no soro no leite desnatado ocorreu principalmente durante o pré-aquecimento em comparação com efeito da evaporação e da secagem por pulverização foram relativamente menores.¹⁴ Aumentando a temperatura do pré-aquecimento de 70-120 ° C, a quantidade de proteína soro em amostras nativas diminuiu. Quando o pré-aquecimento ocorreu em temperaturas de 80, 100 ou 120°C por 52 segundos foi suficiente para desnaturar toda a concentração de proteínas soro imunoglobulina (IgG).¹⁴

No entanto diferentes quantidades de aquecimento nas temperaturas de entrada e saída na secagem por pulverização ao longo de um intervalo típico para a fabricação de leite em pó, não afeta muito a desnaturação medida nas proteínas do soro. A β -Lg e BSA formaram principalmente agregados de pontes dissulfeto.¹⁴ Os níveis de β -Lg e BSA associados com as micelas de caseína foram inferiores aos respectivos níveis de desnaturação.¹⁴ A agregação e associação de α -Lg e BSA ocorreram predominantemente durante o pré-aquecimento, pois a evaporação que ocorre no processo de secagem por pulverização teve um efeito insignificante.¹⁴

Já para Sliwinski et al.,¹⁵ o grande evento durante a secagem por pulverização é a desnaturação e a agregação de β -lactoglobulina. Onde esta combinação de eventos faz com que seja muito complicado prever corretamente o efeito da secagem sobre a estabilidade de proteínas globulares. Segundo estes mesmos autores a desnaturação das proteínas e agregação só ocorrerá na medida em que em uma fase do processo de secagem a atividade de água e a temperatura da gotícula da amostra estiverem altas o suficiente.¹⁵

Gaiani et al.¹ demonstraram que o aumento da temperatura do ar de saída, é outro fator que pode ocasionar a desnaturação, segundo esses autores a única diferença significativa entre os pós de proteína do soro e caseína (composição em massas idênticas) é a porcentagem de desnaturação dessas proteínas. Esta porcentagem aumenta claramente com o aumento da temperatura do ar de saída.¹ A presença de pelo menos 20% de caseína nas misturas antes da secagem no spray-dryer podem proteger as proteínas do soro de desnaturação.¹³

Funcionalidades

Fang et al.¹⁶ estabeleceram uma relação direta entre a temperatura de secagem e as funcionalidades dos produtos resultantes, proporcionando uma melhor visão das alterações microestruturais causadas por diferentes condições de secagem. Seu estudo demonstrou que é possível pulverizar gotas secas em spray-dryer usando temperatura consideravelmente inferior, sem quaisquer efeitos adversos sobre a funcionalidade do produto. Isto é, desde que haja contato efetivo com o ar de secagem.¹⁶ Como o conteúdo de umidade dos pós secos a baixas temperaturas foram relativamente altos, um estágio de secagem secundário pode ser necessário em prática. No entanto, o resultado também enfatizou que ao longo de secagem a alta temperatura era indesejável, devido à diminuição da solubilidade dos pós, causada principalmente pela desnaturação das proteínas em excesso.¹⁶

Diferenças na composição protéica e nas funcionalidades entre os diferentes tipos de soro estão provavelmente relacionadas com os processos que são utilizados na fabricação de queijo ou de caseína, ao invés de alterações durante o processo de fabricação do CPS.¹²

Formação de gel

Zisu et al.¹⁷ utilizou ultrassom a uma frequência de 20 kHz para reduzir a viscosidade das proteínas do soro e das caseínas a fim de melhorar a estabilidade térmica das proteínas de soro de leite em escala piloto industrial. Quando a sonicação aplicada foi combinada com um tratamento térmico acima da temperatura de desnaturação térmica de proteínas do soro, a estabilidade térmica de ingredientes lácteos contendo proteínas do soro foi melhorada.¹⁷ Outro fator

importante foi que as propriedades de gelificação e aspectos de estabilidade ao calor foram mantidos durante a secagem por pulverização e após a reconstituição.¹⁷

Sui et al.¹⁸ investigou o efeito da aplicação de Campo Elétrico Pulsado (CEP) sobre as propriedades físico-químicas e funcionais de um Isolado Protéico de Soro (IPS) de alta qualidade comercial, no intervalo de temperaturas abaixo das temperaturas de pasteurização, e comparou o efeito do CEP com o tratamento térmico.¹⁸ Seus resultados demonstraram que os efeitos do CEP nas propriedades de gelificação IPS podem ser benéficos em aplicações onde a precipitação das proteínas do soro de leite e gelificação não são desejáveis, tais como durante a concentração de proteína de soro e preparações antes da secagem por pulverização.¹⁸

Propriedade emulsificante

Bernard et al.¹⁹ avaliaram entre outros parâmetros, o efeito da secagem por pulverização sobre as propriedades emulsificantes das proteínas de CPS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE, aplicando temperaturas de entrada entre 170 – 260 °C.¹⁹ E constataram que no final da secagem, a temperatura das gotículas do CPS podem aumentar muito rapidamente, chegando a temperaturas superiores a 100 °C, enquanto, que ao mesmo tempo, o teor de água da gotícula diminui na mesma velocidade.¹⁹ Esse aquecimento provoca então a desnaturação da β -lg e da α -la, tornando essas proteínas responsáveis pela estabilização do concentrado proteico de soro e também pelas propriedades emulsificantes, porém, ocorre em paralelo uma diminuição na viscosidade da emulsão.¹⁹

Um desdobramento parcial das proteínas do soro envolve a quebra de interações físicas (perda de estrutura secundária), de modo que as partes hidrofóbicas da molécula são expostas e facilitam a ancoragem da proteína na interface da partícula, aumentando a sua capacidade emulsificante.¹⁹ Misturas de proteínas de soro nativas e desnaturadas podem atuar de forma complementar em sistemas emulsionados como as proteínas do soro nativas se movem rapidamente para a superfície, enquanto que as partículas desnaturadas produzem uma membrana grossa na interface.¹⁹

Millqvist-Fureby & Smith,²⁰ estudaram o efeito da secagem por pulverização sobre a estabilidade das emulsões água em óleo estabilizadas com proteínas do leite. Tais emulsões foram preparadas com teores de proteína constante, mas diferentes relações de caseína e a proteína do soro, essas emulsões foram secas em spray-dryer e as propriedades emulsificantes do produto original e as dos reconstituídos foram comparadas. E foi observado que a substituição de 50% de caseinato de sódio pela proteína de soro de leite quase não teve influência sobre as propriedades físico-químicas das emulsões água / óleo de soja após a secagem por pulverização.²⁰ Observaram também que a secagem por pulverização resultou em um aumento da quantidade adsorvida de proteína de soro de leite de emulsões contendo frações 60% ou mais de proteínas do soro, e um aumento de distribuições de tamanho de partícula de emulsões contendo frações de proteínas do soro de 70% ou mais.²⁰

De acordo com vários autores, as proteínas do soro em solução ou em emulsão são desnaturadas a temperaturas superiores a 70°C, resultando no desdobramento das moléculas de proteínas de soro do leite e na exposição dos seus sítios reativos com consequências sobre a formação de espuma e de

estabilização da emulsão.¹¹ Tratamentos induzidos por temperatura controlada podem conduzir a uma melhora nas propriedades emulsionantes e de formação de espuma nas proteínas do soro.¹⁹

Bernard et al.¹⁹ confirmaram que a secagem por pulverização em uma configuração co-corrente de produtos ricos em proteínas pode ser proposto como uma nova forma tecnológica para melhorar as propriedades de finais de proteínas de soro de leite.

Solubilidade

A solubilidade das proteínas está relacionada com o estado nativo ou desnaturado, pH e temperatura. O pH da solução influencia a natureza e a distribuição de carga líquida da proteína. Geralmente, as proteínas são mais solúveis em valores de pH baixo (ácido) ou alto (alcalino) devido ao excesso de cargas do mesmo sinal, produzindo repulsão entre as moléculas e, conseqüentemente, contribuindo para a sua maior solubilidade.²¹

Durante o processo de secagem por pulverização a solubilidade das proteínas do soro de leite diminui com o aumento da temperatura do ar de admissão. A perda de solubilidade é provavelmente devido aos agregados protéicos induzidos pelo calor. Apesar do tratamento térmico, a solubilidade continua sendo bastante elevada e a taxa de proteínas agregadas é relativamente baixa.¹⁹

Por outro lado, a diminuição do fluxo da alimentação pode promover a formação de crosta, o que aumentaria a temperatura das partículas e podendo ocasionar maiores níveis de desnaturação e agregação.⁴

Em geral, as proteínas que apresentam propriedades funcionais devem apresentar alta solubilidade, a fim de proporcionar boa emulsão, geleificação e propriedades espumantes.²² Desta forma, a diminuição na solubilidade da proteína afeta de maneira desfavorável sua funcionalidade.²³

CONCLUSÃO

A temperatura aplicada em processos anteriores e durante o processo de secagem por pulverização influi diretamente na qualidade do pó, principalmente nas propriedades das proteínas do soro (agregação, composição, desnaturação, solubilidade, formação de emulsão e de gel). Aparentemente, o grande evento durante a secagem por pulverização é a desnaturação e a agregação de β -lactoglobulina. É consenso entre os autores que a desnaturação ocorrer durante os tratamentos térmicos aplicados antes do processo de secagem, e poderá ocorrer durante o processo de secagem, caso seja aplicada uma elevada temperatura de entrada e a amostra apresente uma elevada atividade de água. Outro fator que favorece a desnaturação e agregação é uma elevada temperatura de saída no spray-dryer. A desnaturação expõe os seus sítios reativos das proteínas o que favorece a formação de emulsões e de espuma, que em certos casos é desejável. Vários estudos vêm buscando formas de se controlar os parâmetros de secagem a fim de melhorar as propriedades das proteínas do soro e assim utiliza-las em processos industriais.

REFERÊNCIAS

1. Gaiani, C.; Morand, M.; Sanchez, C.; Tehrany, E.; Jacquot, M.; Schuck, P.; Jeantet, R.; Scher, J. *Colloids Surf., B.* **2010**, 75, 377.
2. Dickinson, E. *Colloids Surf., B.* **2001**, 20, 198.
3. Anandharamakrishnan, C.; Raghavendra, S. N.; Barhate, R. S.; Hanumesh, U.; Raghavarao, K. S. M. S. *Food and Bioproducts Processing.* **2005**, 83, 191; Anema, S. G.; Stockmann, R.; Lowe, E. K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7783; Schokker, E. P.; Singh, H.; Creamer, L. K. *International Dairy Journal*, **2000**, 10, 843.
4. Anandharamakrishnan, C.; Rielly, C.D.; Stapley, A. G. F. *LWT - Food Science and Technology.* **2008**, 41, 270.
5. Fäldt, P.; Bergenståhl, B. *J. Am Oil Chem. Soc.* **1995**, 72, 171.
6. Landström, K.; Alsins, J.; Bergenståhl, B. *Food Hydrocolloids.* **2000**, 14, 75.
7. Walstra, P. et al. *Dairy Technology*; Marcel Dekker ed.; New York, 1999.
8. Corredig, M.; Dalgleish, D.G. *International Dairy Journal.* **1999**, 9, 233; Anema, S.G.; Li, Y. *Journal of Dairy Research.* **2003**, 70, 74; Anema, S.G.; McKenna, A.B. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 422; Gaiani, C.; Ehrhardt, J.J.; Scher, J.; Hardy, J.; Desobry, S.; Banon, S. *Colloids Surf., B.* **2006**, 49, 71.
9. Fox, P.; McSweeney, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, New York:Kluwer Academic Publishers, 1998.
10. Rüegg, M.; Moor, U. Blanc, B. *Journal of Dairy Research.* **1977**, 44, 509.
11. Galani, D.; Apenten, R. K. O. *International Journal of Food Science and Technology*, **1999**, 34, 467; Millqvist-Fureby, A.; Elofsson, U.; Bergenståhl, B. *Colloids Surf., B.* **2001**, 21, 47; Relkin, P. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **1996**, 36, 565.
12. De La Fuente, M. A.; Hemar, Y.; Tamehana, M.; Munro, P. A.; Singh, H. *International Dairy Journal.* **2002**, 12, 361.
13. Gaiani, C.; Mullet, M.; Arab-Tehrany, E.; Jacquot, M.; Perroud, C.; Renard, A.; Scher, J. *Food Hydrocolloids*, **2011**, 25, 983.
14. Oldfield, D. J.; Taylor, M. W.; Singh, H. *International Dairy Journal*, **2005**, 15, 501.
15. Sliwinski, E. L.; Lavrijsen, B. W. M.; Vollenbroek, J. M.; Van Der Stege, H. J.; Van Boekel, M. A. J. S.; Wouters, J. T. M. *Colloids Surf., B.* **2003**, 31, 219.
16. Fang, Y.; Rogers, S.; Selomulya, C.; Chen, X. D. *Biochemical Engineering Journal.* **2012**, 62, 101.
17. Zisu, B.; Bhaskaracharya, R.; Kentish, S.; Ashokkumar M. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2010**, 17, 1075.
18. Sui, Q.; Roginski, H.; Williams, R. P. W.; Versteeg, C.; Wan, J. *International Dairy Journal.* **2011**, 21, 206.
19. Bernard, C.; Regnault, S.; Gendreau, S.; Charbonneau, S.; Relkin, P. *Food Hydrocolloids*, **2011**, 25, 758.
20. Millqvist-Fureby, A.; Smith, P. *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21, 920.
21. Pelegri, D. H. G.; Gasparetto, C. A. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **2005**, 38, 77.
22. Nakai, S.; Chan, L. *Journal of Dairy Science.* **1985**, 68, 2763; Wit, J. N. Functional properties of whey proteins. Developments in dairy chemistry Em: P. F. Fox (Ed.) 1989 p. 285–321.
23. Vojdani, F. Em: G. M. Hall (Ed.) 1996, p. 11–60.

2º ARTIGO: ARTIGO DE RESULTADOS

ANDRADE, VHO; NASCIMENTO, TG; SILVA, MCD; VIEIRA, DA; ARANTES, JDB, LIRA, GM; BASÍLIO JÚNIOR, ID. Microencapsulação de própolis vermelha utilizando soro de queijo coalho através de secagem por pulverização.

Revista que será submetido: Journal of Food Composition and Analysis

Resumo

O soro de queijo foi considerado por muito tempo um resíduo gerado a partir da fabricação de queijos, porém esse conceito vem se perdendo, devido às possibilidades de reaproveitamento. Uma das alternativas é sua utilização em processos de secagem por pulverização devido às propriedades apresentadas por suas proteínas, dentre elas a capacidade de formação de emulsões. Tornando-se possível sua utilização no processo de secagem de extrato de própolis, que é rico em compostos bioativos, porém, com diversas limitações quanto ao uso como alimento. Através da mistura entre soro de queijo coalho adicionado de excipientes (maltodextrina, goma arábica, amido e gelatina) e extrato etanólico de própolis (EEP) foram obtidas duas formulações F01 e F02, sendo a F01 adicionada de amido e F02 de gelatina. As formulações foram analisadas quanto à composição, morfologia, distribuição de tamanho de partículas. Os resultados obtidos quanto à composição das formulações demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) para o teste t, nos parâmetros de umidade, proteínas e cinzas e não significativo para matéria seca e flavonóides totais. A formulação F01 apresentou menor tamanho médio de partícula ($12,02 \mu\text{m}$) comparado com a formulação F02 ($42,13 \mu\text{m}$). A morfologia das partículas analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), demonstrou que a formulação F01 apresentou um maior número de partículas esféricas e com menor agregação entre elas, o que pode ter ocorrido devido à presença de gelatina apenas na formulação F02. Através desses resultados podem ser realizados outros estudos que possam atestar a viabilidade e aplicabilidade da formulação F01.

Palavras-chave: Soro de queijo, própolis vermelha, proteínas do soro, flavonóides totais, spray drying.

Abstract

The cheese whey was considered for a long time a residue generated from the manufacture of cheese, but this concept has been lost due to the possibilities of reuse. One of the alternatives is its use in spray drying processes due to their

properties provided by proteins, among them the ability to form emulsions. Making it possible to use in the drying process of propolis extract etanolic, which is rich in bioactive compounds, but show several limitations as to use as food. Through the mixture of between the whey of Coalho cheese added of excipients (maltodextrin, gum arabic, starch and gelatin) and ethanolic extract of propolis (EEP) were obtained two formulations F01 and F02, the F01 were added of starch and F02 of gelatin. The formulations were analyzed as to the composition, morphology, distribution, and particle size. The results regarding the composition of the formulations had demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) for the t test, to the parameters of moisture, protein and ash and not significant for dry matter and total flavonoids. The F01 formulation showed a lower average particle size ($12.02 \mu\text{m}$) compared to formulation F02 ($42.13 \mu\text{m}$). The morphology of the particles analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated that the formulation F01 presented a larger number of spherical particles with less aggregation among them, which may be due to the presence of gelatin in the formulation F02. Through these results can be carried out other studies that can attest to the feasibility and applicability of the formulation F01.

Key words: Cheese whey, red propolis, whey protein, total flavonoids, spray drying.

1 Introdução

Uma indústria de laticínio geralmente trabalha com mais de um produto (iogurte, queijo, manteiga, creme, leite, sorvete, etc.) e uma grande preocupação é o grande volume gerado de resíduos com elevado teor de matéria orgânica e que na maioria das vezes são descartados diretamente no solo ou em águas receptoras (rios, lagos, açudes, etc.) sem nenhum tratamento prévio. E entre os resíduos gerados pelas indústrias de laticínios, um dos principais é o soro de queijo.

O soro de queijo foi considerado por muito tempo um resíduo gerado a partir da fabricação de queijos, porém esse conceito vem se perdendo, devido às possibilidades de reaproveitamento, seja na utilização para obtenção de produtos com maior valor agregado (CPS, soro em pó, panificação, sobremesas, etc.) ou na sua aplicação para geração de energia.

Outro produto que está sendo alvo de vários estudos é a própolis (Marcucci, 1995), em especial a própolis vermelha, que foi há pouco classificada como 13º tipo de própolis existente (Alencar et al., 2007). Essa classificação evidencia sua diferença entre as demais própolis. Alencar et al. (2007) encontrou pelo menos quatro isoflavonas nunca antes relatadas em própolis, onde ele considera a própolis vermelha como uma fonte promissora de novos compostos bioativos.

A própolis vermelha de Alagoas recebeu em 2012 o registro de Indicação Geográfica (IG201101) pelo INPI, delimitando o estado em 17 pontos os quais abrangem as áreas de manguezais, denominado assim a origem da própolis de alagoas.

A aplicação da própolis na alimentação é ainda limitada, isso porque, além de ser solúvel em álcool, tem sabor e aroma forte. A microencapsulação pode ser uma alternativa para reduzir estes problemas. Por muitos anos, esta técnica tem sido utilizada na indústria farmacêutica para a liberação controlada e maior estabilidade das formulações e mascaramento de sabor (Gouin, 2004; Nore et al., 2011).

O processo de secagem por “*spray*”, também conhecido como secagem por atomização ou pulverização, consiste em pulverizar uma solução líquida exposta a uma corrente de ar quente não saturada que deverá remover sua umidade, permitindo que o soluto que se encontrava diluído na solução seja obtido em forma de pó. Este tipo de secagem é largamente utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e metalúrgicas (Oliveira Filho, 2007).

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver e caracterizar microencapsulados de própolis vermelha com soro de queijo coalho, através da técnica de secagem por pulverização.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

A própolis vermelha foi obtida dos apiários localizados na região de mangue dos municípios de Marechal Deodoro-AL e Lagoa da Canoa-AL. As amostras foram coletadas e acondicionadas sob refrigeração por 24 horas. Após este tempo, foram trituradas em liquidificador industrial, acondicionadas em saco plástico e armazenadas em freezer (-18°C).

O leite utilizado para obtenção do soro de queijo foi obtido no setor de bovinocultura do Instituto Federal de Alagoas campus Satuba (IFAL campus Satuba) e processado no setor de agroindústria da mesma instituição.

No processo de produção do queijo tipo “Coalho”, foi utilizado, o coalho industrial líquido HA-LA® (Chis Hansen) e o soro de queijo foi obtido de acordo com o com fluxograma apresentado na Figura 1.

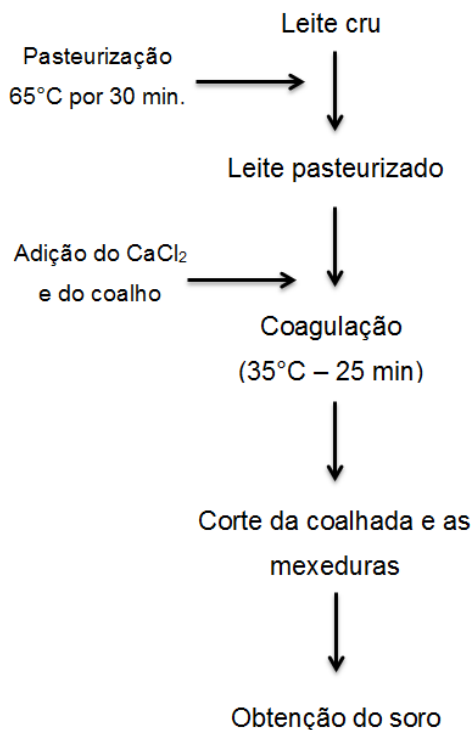


Figura 1. Fluxograma de obtenção do soro de queijo
Fonte:Autor, 2011

O soro retirado foi imediatamente submetido ao processo de pasteurização a 65°C por 30 minutos, e posteriormente fracionado e acondicionado ainda quente em recipientes de 500 mL de politereftalato de etileno (PET) estéreis e sob condições assépticas, sendo em seguida armazenados em câmara de congelamento a - 4°C.

2.2 Obtenção do extrato etanólico de própolis

A própolis bruta foi limpa, retirada poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer tipo de material estranho.

A amostra de própolis (500g) foi submetida à maceração, com álcool etílico comercial 96°GL (1.5 L) a temperatura ambiente, com troca do solvente de 48 em 48

horas e em seguida foi realizada filtração para se obter o extrato etanólico de própolis (EEP).

2.3 Obtenção dos microencapsulados de própolis com soro

2.3.1 Preparo das formulações

O soro foi deixado sob refrigeração por 24 horas antes do desenvolvimento das formulações, para o completo descongelamento.

Os excipientes utilizados nas formulações estão na Tabela 1, o cálculo percentual realizado teve como base o conteúdo de matéria seca do soro de leite somado a matéria seca do EEP na proporção 60:40, respectivamente.

Tabela 1 – Percentual em massa dos excipientes nas formulações

Excipientes	F01	F02
Maltodextrina	25%	25%
Goma Arábica	10%	10%
Amido	5%	-
Gelatina	-	5%

Fonte: Autor, 2011

Após obter os resultados da matéria seca do soro de queijo e do EEP foram determinados os volumes de ambos a ser utilizados nas formulações, a fim de obter uma proporção 60:40 de massa no produto final. Foram realizados também os cálculos dos excipientes, levando em conta o percentual que cada um deveria apresentar no pó final. Os excipientes foram pesados em balança analítica e adicionados ao soro líquido.

A maltodextrina e o amido foram adicionados diretamente ao soro líquido, já a goma arábica e a gelatina foram dissolvidos previamente em água. Foi preparada uma solução de 30% de goma arábica com auxílio de agitador mecânico digital modelo RW 20 Digital IKA®, e adicionada ao soro o volume correspondente à massa desejada no pó final. A quantidade desejada de gelatina no produto final foi pesada e dissolvida em água a 70°C até completa dissolução, e adicionada ao soro.

Foi realizada a mistura soro de queijo adicionado dos excipientes com o extrato etanólico de própolis, sabendo que o extrato de própolis é alcoólico, a

proporção estabelecida da mistura não traria risco quanto ao processo de secagem por pulverização. As formulações após a mistura apresentaram as seguintes proporções dos componentes, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Percentual em massa dos componentes nas formulações

Excipientes	F01	F02
Soro	42.88%	42.88%
Própolis	28.57%	28.57%
Maltodextrina	17.83%	17.83%
Goma Arábica	7.15%	7.15%
Amido	3.57%	-
Gelatina	-	3.57%

Fonte: Autor, 2011

2.3.2 Atomização das formulações

Para obtenção dos microencapsulados, as formulações preparadas acima foram atomizadas e secas em um mini *Spray Dryer* B-290 fabricado pela Büchi®, (Suiça). As condições utilizadas para obtenção dos microencapsulados foram obtidas de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante do equipamento e através relatos na literatura sobre secagem de soro de leite em *Spray Dryer* sendo, portanto, selecionada as condições de 180°C para temperatura de entrada, 110°C de temperatura de saída (não controlável), a aspiração ficou em 90% e a alimentação em 5 mL/min.

2.4 Caracterização do soro de queijo

A densidade do soro de queijo foi determinada através da imersão do termolactodensímetro na amostra e posterior verificação. A análise de acidez foi determinada através da titulação da amostra com hidróxido de sódio 0.1 M e para determinar o teor de gordura foi utilizado o método butirométrico (IAL, 2008).

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

2.4.1 Determinação de umidade

Para determinar a umidade das amostras, foi utilizado o método gravimétrico, por meio de balança eletrônica de umidade Shimadzu MOC-120H®, com precisão de 1 mg e ajustada com secador de infravermelho. Cerca de 5 g foi seco sob temperatura de 120 ° C, até obter perda de umidade inferior a 0.01%.

2.4.2 Determinação da matéria seca

A matéria seca das amostras foi determinada após a análise de umidade pela seguinte formula:

$$\text{Matéria seca \%} = 100 \times B/A$$
 Onde, A= amostra seca e B= peso da amostra *in natura*.

2.4.3 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado após incineração das amostras já carbonizadas em um forno mufla, a 550 ° C por 4 horas (IAL, 2008).

2.4.4 Determinação de proteína total

O teor de proteína foi determinado através pelo método de Kjeldahl e posterior conversão para proteína total multiplicando o resultado pelo fator médio 6.25 (IAL, 2008).

2.5 Caracterização do extrato etanólico de própolis e dos microencapsulados de própolis com soro

As análises de umidade, matéria seca, cinzas e proteína total foram realizadas como descrito nos itens de 2.4.1 a 2.4.4.

2.5.1 Determinação dos flavonóides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado nas formulações e no extrato etanólico de própolis (EEP), através do método de leitura direta em 280 nm. As soluções estoques das formulações foram preparadas na concentração 20 mg.mL^{-1} e a solução estoque do EEP na concentração 7 mg.mL^{-1} e seus volumes finais completados com metanol.

Após o preparo, as soluções estoque das formulações foram deixadas em repouso até decantar as proteínas e os excipientes, em seguida foram preparadas cinco soluções $80 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ a partir do sobrenadante e para EPP foram preparadas cinco soluções de $17.5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, em ambos os caso foi utilizado etanol como diluente.

As soluções do branco foram preparadas por substituição da amostra por uma alíquota equivalente de metanol e foram realizados todos os passos do processo aplicado. Soluções padrão de catequina ($10 - 80 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram utilizados para construir a curva de calibração de cinco pontos ($y = 0.0113x - 0.0147$; $R^2 = 0.9999$). Os resultados obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição. O conteúdo de flavonoides totais foram expressos em mg de equivalentes de catequina por 7 mg de própolis, para o EEP e em mg de equivalentes de catequina por 500 mg de pó, para as formulações.

2.5.2 Análise Estatística

As comparações entre as médias das formulações foram avaliadas utilizando o teste t de Student a um nível de significância de $p < 0.05$.

2.5.3 Análise de tamanho de partículas dos microencapsulados

As distribuições granulométricas das micropartículas de própolis com soro obtidas por atomização em *Spray Dryer* foram analisadas por difração a laser em aparelho Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra) no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP). Pequenas quantidades dos extratos secos foram dispersos em água com auxílio de ultra-som até atingirem o índice de obscuração requisitado pelo aparelho e analisadas na faixa de $0.020 - 2000 \text{ } \mu\text{m}$. O

tamanho médio de partícula foi expresso com o diâmetro médio em volume (D4.3). A polidispersidade foi dada pelo índice span o qual foi calculado por $(D_{0.9} - D_{0.5})/D_{0.1}$, onde $D_{0.9}$, $D_{0.5}$ e $D_{0.1}$ são respectivamente os diâmetros das partículas correspondentes a 90, 50 e 10% da distribuição amostral (Vijayan et al., 2010).

2.5.4 Caracterização morfológica dos microencapsulados através do MEV

Pequena quantidade dos microencapsulados foram fixados em cilindro metálicos, de 1.0 cm de altura e 8.0 cm de diâmetro, com fita metálica adesiva de dupla face preta. Este material foi transferido para um evaporador CRESSINGTON CARBON COATER® modelo 108carbon/A para ser recoberto com uma camada de carbono. Foi aplicada uma corrente de 60 mA por 30 segundos. O material revestido por carbono foi analisado em um microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6460 do Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas da Universidade Federal de Pernambuco (LDN/UFPE). As condições usadas na operação com o microscópio eletrônico foram as seguintes: Objetiva de 10 μ m; distância da amostra na faixa de 18 a 23 nm; aceleração de voltagem igual a 30 KV; e ângulo de análise igual a 0°. As amostras foram examinadas com ampliações de 200 até 3.500x.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização físico-química do soro de queijo

De acordo com os resultados da Tabela 3, os valores dos parâmetros do soro de queijo coalho utilizado no processo de fabricação das formulações, apresentaram-se dentro da média encontrada por outros autores (Fonseca & Teixeira, 2008; Oliveira, 2006; Pelegrine & Churasqueira, 2008; Serpa, 2005;). No entanto, o teor de proteína, matéria seca e consequentemente a densidade, estavam acima da média encontrada por esses mesmos autores.

Tabela 3 – Composição do soro de queijo coalho

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Literatura	Referências
Umidade (%)	92.33 $\pm$ 0.159	93.7 – 92.01	Pelegrine & Churasqueira, 2008; Serpa, 2005;
Matéria seca (%)	7.49 $\pm$ 0.163	6.33 – 6.30	Serpa, 2005; Fonseca & Teixeira, 2008

Cinzas (%)	0.84 ± 0.035	1.0 – 0.50	Ordóñez, 2005; Pelegrine & Churasqueira, 2008;
Proteína (%)	0.93 ± 0.084	0.84 – 0.68	Pelegrine & Churasqueira, 2008; Serpa, 2005;
Gordura (%)	0.50 ± 0.050	0.7 – 0.44	Oliveira, 2006; Pelegrine & Churasqueira, 2008;
Densidade (g/mL)	1.028 ± 0.001	1.027 – 1.025	Oliveira, 2006; Serpa, 2005; Fonseca & Teixeira, 2008;
Ac. Lático (%)	0.104 ± 0.001	0.13 – 0.10	Oliveira, 2006.

Fonte: Autor, 2012

O método de fabricação do queijo Coalho utilizado nesse trabalho, difere do queijo de Coalho artesanal que é produzido principalmente no Nordeste do Brasil e que não têm padronização (Silva et al., 2010; Silva et al., 2012), onde as principais diferenças estão na pasteurização do leite e no controle no tempo e na temperatura durante as mexeduras.

Vale destacar que os teores de gordura e cinzas estão de acordo com os dados da literatura (Oliveira, 2006; Ordóñez, 2005; Pelegrine & Churasqueira, 2008) para soro de queijo em geral, porém pode haver algumas diferenças, pois segundo Mizubuti (1994) a composição do soro é variável, e pode ser afetada pela variedade de queijo produzido e/ou método empregado para manufaturar a caseína.

Quanto ao teor de proteína, Lou & Ng-Kwai-Hang (1992) estudaram a relação entre os níveis de proteína e gordura no leite, e sua interferência na composição do soro, e seus resultados demonstraram que quanto maior o nível de gordura no leite, maior o teor de gordura e menor o teor de proteína no queijo, consequentemente maior o teor de proteína e menor o teor de gordura no soro.

Brito et al. (2009) avaliaram a composição do leite do mesmo local de obtenção do presente estudo, e constataram que o teor médio de gordura era 4.9%, que poderia elevar o teor de proteína do soro, portanto o leve aumento no teor de proteínas obtidos neste estudo foi provavelmente em decorrência da própria composição do leite.

A acidez de 0.104 % de ácido láctico corresponde a aproximadamente 10.4°D o que o classifica como soro doce, o que aumenta suas possibilidades de aplicação em diversos processos industriais, dentre eles a fabricação de concentrado protéico de soro (CPS), isolado protéico de soro (IPS) e soro em pó.

3.2 Caracterização química do extrato etanólico de própolis (EEP)

A matéria seca do EEP foi $8.22 \pm 0.14\%$, com 1.78% de desvio padrão relativo (DPR). O teor de flavonóides totais foi de $1.34 \pm 0.07\%$ e seu DPR foi 5.38%. O teor de cinzas foi $0.13 \pm 0.003\%$, com 2.06% de DPR e o teor de proteínas totais no EEP foi de $0.04 \pm 0.002\%$ e seu DPR foi 5.75%.

Bruschi et al. (2003) desenvolveram micropartículas de gelatina contendo própolis utilizaram também extrato etanólico, porém com 17.05% de matéria seca e com 1.98% de flavonoides totais, o que em base seca representa 11.61%, valor inferior aos 16.32% de flavonóides totais encontrado no nosso trabalho.

3.3 Caracterização dos microencapsulados de própolis com soro de queijo

Os parâmetros aplicados no processo de secagem foram suficientes para obter na formulação F01, 5.04% e 7.90% de umidade na formulação F02 (Tabela 4). De acordo com Ordóñez (2005) o teor de umidade ideal em alimentos em pó deve ser inferior a 5% e não deve ultrapassar a 8%, principalmente quando há lactose, pois ela passará do estado amorfo para o hidratado, tornando o pó mais higroscópico.

Além da umidade, os teores de cinzas e proteínas apresentaram diferença significativa para $p < 0.05$, que estar relacionada à presença da gelatina na formulação F02.

Tabela 4 – Composição centesimal das formulações em base úmida (b.u.)

Parâmetros	Amostras	
	F01	F02
Umidade (%)	5.04 ± 0.190^a	7.90 ± 0.274^b
Matéria seca (%)	94.97 ± 0.204^a	92.03 ± 0.315^a
Cinzas (%)	4.19 ± 0.302^a	5.21 ± 0.334^b
Proteínas (%)	5.42 ± 0.206^a	7.90 ± 0.427^b
Flavonóides Totais (%)	1.82 ± 0.057^a	1.76 ± 0.048^a

O resultado está expresso em média $\pm$ Desvio Padrão (DP). Letras diferentes na mesma linha representa diferença significativa ($p < 0.05$), no test t de Student.

Fonte: Autor, 2012

Outro fator relevante sobre os teores de cinzas e proteínas nas formulações F01 e F02 foi a utilização do soro de queijo, o qual apresentou 12.40% de proteínas e 11.20% de cinzas em base seca (b.s.) (Tabela 5) o que contribuiu de forma significativa para a presença desses componentes nas formulações.

Tabela 5 – Percentual de cinzas, proteínas e flavonoides totais no extrato etanólico de própolis, nas formulações e no soro de queijo em base seca (b.s.)

Parâmetros	Amostras			
	EEP	F01	F02	Soro de queijo
Cinzas (%)	1.61 ± 0.088	4.42 ± 0.310	5.67 ± 0.364	11.20 ± 0.368
Proteínas (%)	0.47 ± 0.027	5.71 ± 0.217	8.59 ± 0.464	12.40 ± 1.116
Flavonóides Totais (%)	16.32 ± 0.879	1.92 ± 0.060	1.92 ± 0.052	-

Fonte: Autor, 2012

O percentual de flavonoides totais no EEP em b.s. foi 16.32% (Tabela 5), utilizando o método de leitura direta de catequina como marcador a 280 nm, a qual apresentou uma maior sensibilidade quando comparada com o método de complexação com cloreto de alumínio e leitura em 425 nm (dados não apresentados) (Macucci et al., 1998).

As duas formulações foram preparadas com 28.57% de própolis o que em 500 mg de pó equivale a 142.85 mg, sendo 16.32% (Tabela 5) desse valor composto por flavonoides totais (23,81mg). Nas formulações F01 e F02 foi encontrado respectivamente 9.60 e 9.58 mg de flavonoides totais por 500 mg de pó (Tabela 6), isso equivale a uma redução de aproximadamente 59.7% no teor de flavonoides totais.

Tabela 6 – Concentração flavonóides totais em b.s. através do método direto

	Amostras		
	Própolis (mg/7mg)	F01 (mg/500mg)	F02 (mg/500mg)
Média	1.14	9.60	9.58
DP	0.061	0.298	0.259
DPR	5.38	3.10	2.70

Fonte: Autor, 2012

É possível notar na Tabela 6 quase não houve diferença na concentração dos flavonóides entre as formulações, o que indica que as condições utilizadas no processo de secagem e os excipientes, agiram de forma semelhante para as duas

formulações. Porém só foram recuperados 40.30% dos flavonoides totais adicionados às formulações.

Essa redução no teor de flavonóides pode estar ou não, diretamente ligado com a redução no teor de própolis na formulação, já que utilizamos apenas a catequina como marcador. No entanto o uso de maltodextrina nas formulações tinha o objetivo de proteger os flavonóides da própolis (Fang & Bhandari, 2011), o que não foi observado. Essa perda pode estar relacionada à adesão da própolis as paredes da câmara de secagem.

Quanto aos teores de proteínas esperados para as formulações F01 e F02 (Tabela 7) eram respectivamente 5.59% e 8.55% de acordo com os teores de proteínas dos componentes e seus respectivos percentuais nas formulações. Foram encontrados através da determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, 5.71% e 8.59% nas formulações F01 e F02 respectivamente.

Tabela 7 – Percentual dos componentes nas formulações e seus respectivos percentuais de proteínas

	% de massa em b.s.		Proteína % b.s.
	F01	F02	
Soro	42.88	42.88	12.40
Própolis	28.57	28.57	0.47
Maltodextrina	17.83	17,83	0.00
Goma Arábica	7.15	7.15	2.00
Amido	3.57	0.00	0.00
Gelatina	0.00	3.57	82.86
Total	100	100	
% Proteína Teórica	5.59	8.55	
% Proteína NKT	5.71	8.59	

Fonte: Autor, 2012

Esse resultado de proteínas é interessante na medida em que, a adição do soro de queijo líquido as formulação foi com o intuito de aumentar o teor de proteínas e auxiliar na emulsificação da própolis para o processo de secagem. E permanência de desse percentual no pó final, acima do valor teórico é possível quando há a perda de outros componentes.

3.4 Análise de distribuição de tamanho de partícula

Houve diferença de tamanho entre o encapsulado de amido (F01) e o microencapsulado de gelatina F02 (Tabela 8). O tamanho médio D [4.3] dos microencapsulados F01 e F02 foram respectivamente 12.017 e 42.128 μm . Tal diferença pode ser atribuída às características físico-químicas isoladas de cada material de revestimento utilizado.

Tabela 8 – Índice de polidispersidade e diâmetro médio de partículas em volume D[4,3] dos pós encapsulados F01 e F02

Formulações	Índice de Polidispersidade	Tamanho (μm)			
		D(v,0.1) *	D(v,0.5) **	D(v,0.9) ***	D[4.3]
F01	3.985	2.945	10.698	22.433	12.017
F02	41.028	2.767	10.788	124.313	42.128

* D(v,0.1) = diâmetro médio volumétrico de 10% das partículas;

** D(v,0.5) = diâmetro médio volumétrico de 50% das partículas;

*** D(v,0.9) = diâmetro médio volumétrico de 90% das partículas.

Fonte: Autor, 2012

Através do índice de polidispersibilidade (IPD) foi possível confirmar os dados observados na Figura 2 visto que a amostra F01 apresentou valor de IPD inferior ao microencapsulado F02 (Tabela 8). Tal fato demonstra que o microencapsulado F01 apresenta menor extensão de distribuição das partículas na amostra, quando comparado o microencapsulado F02.

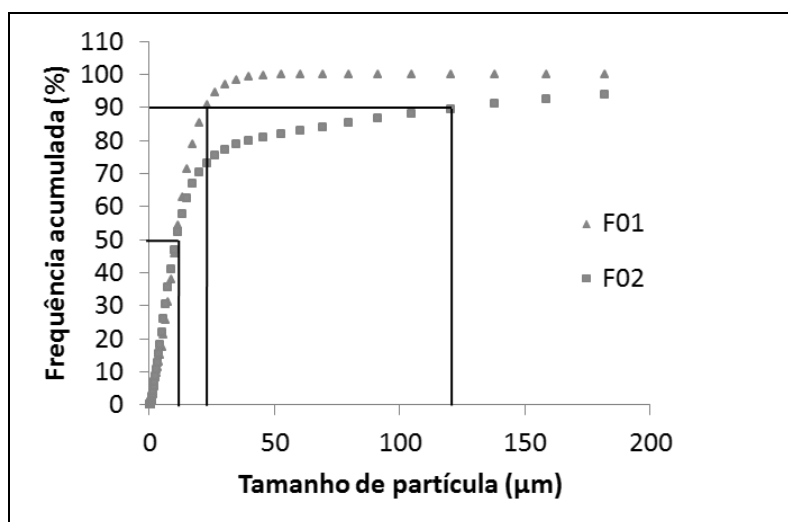


Figura 2 – Distribuição cumulativa de tamanho de partícula dos microencapsulados obtidos na secagem por pulverização

Fonte: Autor, 2013

A distribuição granulométrica dos microencapsulados F01 e F02 evidenciou que aproximadamente 50 % dos microencapsulados se distribuíram abaixo de 10.698 e 10.788 μm , respectivamente e 90 % distribuem-se abaixo de 22.433 e 124.313 μm , respectivamente (Tabela 8).

De acordo com as Figura 3 e Figura 4 as partículas mostram uma distribuição bimodal na formulação F02, em função da apresentação de dois picos bem definidos, que representam dois tamanhos de partículas predominantes. Este resultado é particularmente interessante quando se trabalha com pós microencapsulados, uma vez que se pode deduzir que a “população” de partículas menores pode penetrar e acomodar-se nos espaços entre as maiores, o que determina a presença de um modelo bimodal. A presença de partículas maiores no microencapsulado F02 pode ser atribuída a um começo do processo de aglomeração onde há formação de pontes de ligação irreversíveis para a produção de partículas com maior tamanho (Tonon et al., 2008).

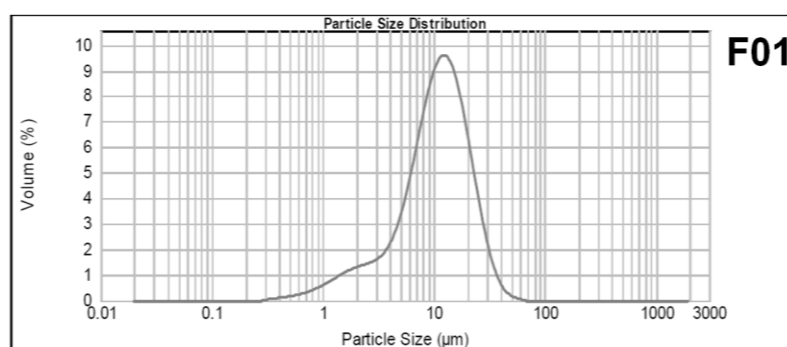


Figura 3 – Microencapsulados contendo maltodextrina/goma arábica/amido
Fonte: Autor, 2013

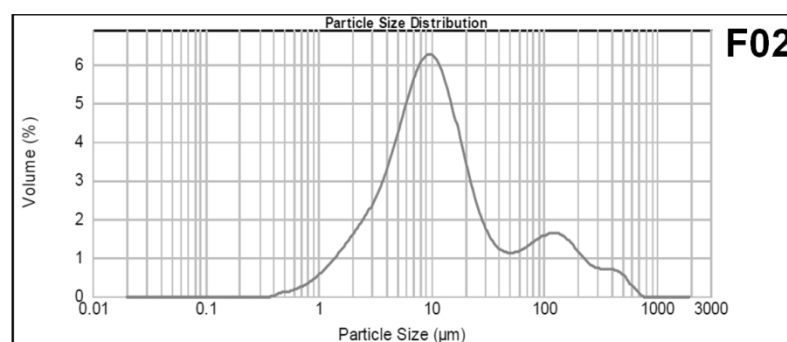


Figura 4. Microencapsulados contendo maltodextrina/goma arábica/gelatina
Fonte: Autor, 2013

3.5 Caracterização morfológica dos microencapsulados

As imagens do MEV dos microencapsulados de própolis com soro, secos por pulverização estão ilustrados nas Erro! Fonte de referência não encontrada.. Podemos notar que existem partículas esféricas de aproximadamente 10 μm , no entanto não apresentaram superfícies perfeitamente lisas, além de uma grande aglomeração de partículas.

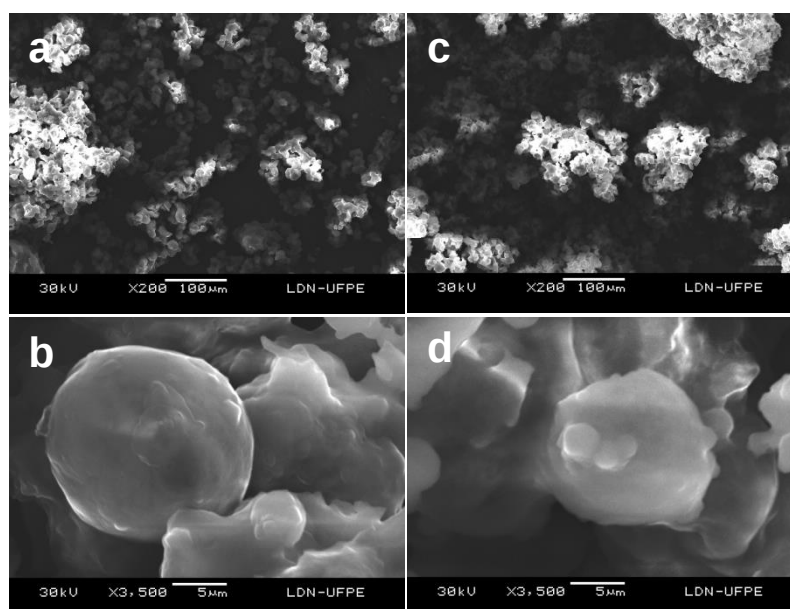


Figura 5 - MEV fotomicrográfica dos microencapsulados de própolis com soro de queijo: a) formulação F01 200x; b) formulação F01 3.500x; c) formulação F02 200x; d) formulação F02 3500x.

Fonte: Autor, 2012

O MEV vem mostrar que os excipientes não foram bem incorporados nas formulações, o que provavelmente ocasionou a pequena presença de partículas esféricas e tanta aglomeração. Tanto o soro de queijo quanto o EEP, deveriam estar mais concentrados e os excipientes deveriam formar uma emulsão, e a partir daí submeter às formulações ao processo de secagem.

4 Conclusão

A utilização do soro de queijo no processo de secagem de própolis, pode ser otimizada a fim de obter menores percentuais de umidade e principalmente maiores

percentuais de flavonoides totais no pó. No entanto a formulação F01 foi a que melhor se comportou quanto aos parâmetros utilizados, apresentando resultados satisfatórios para composição, morfologia e tamanho de partícula podendo a partir dela serem realizados outros estudos que possam atestar a viabilidade e aplicabilidade dessa formulação.

Referências

- Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 278-283.
- Brito, K. D., Andrade, V. H. O., Costa, M. A. S., Jerônimo, A. P. L., Santos, J. S. (2009) Avaliação da qualidade através dos parâmetros físico-químicos do leite produzido no IFAL, *campus* Satuba. In *Anais do IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica*, IV CONNEPI: Belém, Brasil.
- Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. D. (2003). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45-55.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139-1147
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330-347.
- IAL (2008). *Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos*. v. 1, Ed. 4, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz.
- Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI (2012). Registro de Indicação Geográfica. Acessado em 18 de Abril, 2013 do site: http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/registros_indicacao_geografica
- Lou, Y., & Ng-Kwai-Hang, K. F. (1992). Effects of protein and fat levels in milk on cheese and whey compositions. *Food Research International*, 25, 445-451.
- Marcucci, M.C., Woisky, R.G., Salatino, A. (1998). Use of aluminium chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. *Mensagem Doce* 46, 3–9 (in Portuguese).
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Mizubuti, I. Y. (1994). Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. *Semina: Ci. Agr.*, 15, 80-94.
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J. C., & Contreras Castillo, C. J. (2011). Microencapsulation of

- propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 429-435.
- Oliveira Filho, U. C. (2007). Desenvolvimento de um secador “spray” para obtenção de pós finos de precursor de Nióbio. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
- Oliveira, V. M. (2006). Formulação de bebida láctea com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais. Monografia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.
- Ordóñez, J. A. et al. (2005). *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. Vol.2. Porto Alegre, RS, Artmed.
- Pelegrine, D. H. G. & Carrasqueira, R. L. (2008). Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB. Acessado em 18 de Abril, 2013 de: http://bift.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0305.pdf.
- Serpa, L. (2005). Concentração de proteínas de soro de leite por evaporação a vácuo e ultrafiltração. Monografia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Erechim, RS.
- Silva, M. C. D., Ramos A. C. S., Moreno, I., Moraes, J. O. (2010). Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 69, 214-21.
- Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal "coalho" cheese from northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135, 1533-1538.
- Teixeira, L. V., & Fonseca, L. M. (2008). Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 243-250.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.
- Vijayan, V., Srinivasa Rao, D., Jayachandran, E., Anburaj, J. (2010). Preparation and characterization of Anti Diabetic Drug Loaded Solid lipid Nanoparticles, *JITPS1*, 320-328. Disponível em: Available online at www.itpsonline.net, acesso em: 15 de maio 2013.

O desenvolvimento de um alimento em pó, produzido a partir de soro de queijo e própolis vermelha pode ser utilizado tanto como fármaco ou como alimento, pois a própolis por apresentar várias funções biológicas, através de propriedades antioxidante (PASCUAL et al., 1994), antimicrobiana (GRANGE & DAVEY, 1990), anti-inflamatória (KHAYYAL et al., 1993), anticancerígenos (GRUNBERGER et al., 1988), e anti-cariogénico (PARK et al., 1998), aliada ao soro de queijo que é rico em proteínas, que também apresentam ampla atividade biológica, atuando como anti-hipertensivo, anticancerígeno, hipocolesterolêmico e antimicrobiano (CHATTERTON et al., 2006), podem fazer desse novo alimento um nutracêutico, e seus efeitos podem ser testados por exemplo em atletas, que já utilizam as proteínas do soro na alimentação, mas também necessitam manter corpo em perfeito estado de saúde, devido as exigências físicas que o esporte cobra de um atleta profissional.

Este produto necessita ser submetido a estudos, reológico, microbiológicos e sensoriais a fim de padronizar a obtenção da formulação e a partir dos resultados obtidos, viabilizar a sua produção a nível industrial.

AKHTAR, M.; DICKINSON, E. Emulsifying properties of whey protein /dextran conjugates at low pH and different salt concentrations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 125 -132, 2003.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 278-283, 2007.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C. et al. Aqueous two phase extraction for recovery of proteins from cheese whey. **Food and Bioproducts Processing**, v. 83, p. 191–197, 2005.

_____; RIELLY, C.D.; STAPLEY, A. G. F. Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 270-277, 2008.

ANEMA, S.G.; LI, Y. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size, **Journal of Dairy Research**, v. 70 p. 73–83, 2003.

_____; MCKENNA, A.B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 422–428, 1996.

_____; STOCKMANN, R.; LOWE, E. K. Denaturation of b-lactoglobulin in pressure-treated skim milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7783–7791, 2005.

BANSKOTA, A. H. et al. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561–571, 2001.

BERNARD, C. et al. Enhancement of emulsifying properties of whey proteins by controlling spray-drying parameters. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 758-763, 2011.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 17–23, 2009.

BRITO, K. D. et al. Avaliação da qualidade através dos parâmetros físico-químicos do leite produzido no IFAL, *campus* Satuba. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2009, Belém. **Anais...** Belém: IFPA, 2009. p. 3-4.

BRUSCHI, M. L. et al. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45-55, 2003.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v. 32, p.1523-1527, 2009.

CATCHPOLE, O. J. et al. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **J. of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 97–106, 2004.

CAVACO, A. M. et al. Pigments, protein and activity of antioxidant enzymes in propolis collected at various sites of Algarve. In ORIA, R.; VAL, J.; FERRER, A. (Eds.), **Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas**. Zaragoza: Acribia, 2008. p. 286–293.

CHAI, Z. et al. Effects of the free and pre-encapsulated calcium ions on the physical properties of whey protein edible film. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1532–1538, 2010.

CHATTERTON, D. E. W. et al. Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin—Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1229–1240, 2006.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. **International Dairy Journal**, v. 9 p. 233–236, 1999.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. Bifidobacterium bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.186-193, 2012.

DE LA FUENTE, M. A. et al. Process-induced changes in whey proteins during the manufacture of whey protein concentrates. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 361-369, 2002.

DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p.197, 2001.

FÄLDT, P.; BERGENSTÅHL, B. Fat encapsulation in spray-dried food powders. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 2, p. 171-176, 1995.

FANG, Y.; ROGERS, S.; SELOMULYA, C.; CHEN, X. D. Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62 p. 101, 2012.

FARRÉ, R.; FRASQUET I.; SÁNCHEZ, A. (2004). Propolis and human health. **Ars Pharmaceutica**, v. 45, p. 21–43, 2004.

FOX, P.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. New York:Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 453-457.

GAIANI, C. et al. How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Volume 75, Issue 1, 1 January 2010, Pages 377-384.

GAIANI, C. et al. Milk proteins differentiation and competitive adsorption during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 983-990, 2011.

_____ et al. Surface composition of dairy powders observed by X-ray photoelectron spectroscopy and effects on their rehydration properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, p. 71–78, 2006.

GALANI, D.; APENTEN, R. K. O. Heat-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide linked aggregates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 467-476, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, 15, 330-347. (2004).

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. R. Soc. Med.** v. 83, p. 159–160, 1990.

GRUNBERGER, D. et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v. 44, p. 230–232, 1988.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.31-40, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI. **Registro de Indicação Geográfica**. 2012. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/registros_indicacao_geografica>. Acesso em: 18 abr. 2013.

JULIANO, C.; PALA, C. L.; COSSU, M. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, p. 177–181, 2007.

KEOGH M.K.; O’KENNEDY B.T. Milk fat microencapsulation using whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 657–663, 1999.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Exp. Clin. Res.** v. 19, p. 197–203, 1993.

KINSELLA, J. E.; FOX, P. F. Water sorption by proteins: Milk and whey proteins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v.24, p.91-139, 1986.

LANDSTRÖM, K., ALSINS, J.; BERGENSTÅHL, B. Competitive protein adsorption between bovine serum albumin and β -lactoglobulin during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 1, p. 75-82, 2000.

LOU, Y.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of protein and fat levels in milk on cheese and whey compositions. **Food Research International**, v.25, p.445-451, 1992.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C., WOISKY, R.G., SALATINO, A. Use of aluminium chloride in the flavonoids quantification of propolis samples. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-9, 1998.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96 p. 533–539, 2010.

MILLQVIST-FUREBY, A.; ELOFSSON, U.; BERGENSTÅHL, B. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 21, n. 1-3, p. 47-58, 2001.

MILLQVIST-FUREBY, A.; SMITH, P. *In-situ* lecithination of dairy powders in spray-drying for confectionery applications. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 5-6, p. 920-927, 2007.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ci. Agr.**, v. 15, p. 80-94, 1994.

NAKAI, S.; CHAN, L. Structure modification and functionality of whey proteins: Quantitative structure-activity relationship approach. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2763–2772, 1985.

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p 429-435, 2011.

OLDFIELD, D. J.; TAYLOR, M. W.; SINGH, H. Effect of preheating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture **International Dairy Journal**, v. 15, n. 5, p. 501-511, 2005.

OLIVEIRA FILHO, U. C. **Desenvolvimento de um secador “spray” para obtenção de pós finos de precursor de Nióbio**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Natal, RN, 2007.

OLIVEIRA, V. M. **Formulação de bebida láctea com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro**: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Niterói, RJ, 2006.

ORDONEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 2 v.

PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr. Microbiol.**, v. 36, p. 24–28, 1998.

PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 41, p. 9–13, 1994.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB. 2008. Disponível em:
<http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0305.pdf.>
Acesso em: 18 Abr. 2013.

PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.38, p. 77–80, 2005.

PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.38, p. 77–80, 2005.

RAJAM, R. et al. Effect of whey protein - alginate wall systems on survival of microencapsulated lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.891-898, 2012.

RELKIN, P. Thermal unfolding of b-lactoglobulin, a-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, p. 565-601, 1996.

ROSENBERG, M.; SHEU, T. -. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. **International Dairy Journal**, v.6, p.273-284, 1996.

RÜEGG, M.; MOOR, U. BLANC, B. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. **Journal of Dairy Research**, v. 44 n.3, p. 509-520, 1977.

SCHOKKER, E. P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of b-lactoglobulin A and B with a-lactalbumin. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 12, p. 843–853, 2000.

SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de leite por evaporação a vácuo e ultrafiltração**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Erechim, RS, 2005.

SILVA, M. C. D. et al. Influencia dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, p. 214-21. 2010.

SILVA, R. A. et al. Can artisanal "coalho" cheese from northeastern brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, n. 1533-1538, 2012.

SLIWINSKI, E. L. et al. Effects of spray drying on physicochemical properties of milk protein-stabilised emulsions **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n. 1-4, p. 219-229, 2003.

SMITH, G. Whey protein. **World Rev. Nutr. Diet.**, v. 24, p. 88, 1976.

SUI, Q. et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 206-213.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, p. 243-250, 2008.

TONON, R. V., BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*euterpe oleraceae* mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 411-418, 2008.

VOJDANI, F. Solubility, Methods of testing protein functionality, In: HALL, G. M. (Ed.) **Methods of testing protein functionality**. London: Chapman & Hall, 1996. p.11–60.

WALSTRA, P. et al. **Dairy Technology**: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. 726 p.

WIT, J. N. Functional properties of whey proteins. In: FOX, P. F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 285–321.

YOUNG, S. L., SARDA, X.; ROSENBERG, M. Microencapsulation properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2868–2877,1993.

ZISU, B. et al. Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 6, p.1075-1081, 2010.

APÊNDICE A - Fotos de antes, durante e após a secagem das formulações em mini Spray Dryer B-290 da Büchi®.



(a)



(b)



(c)



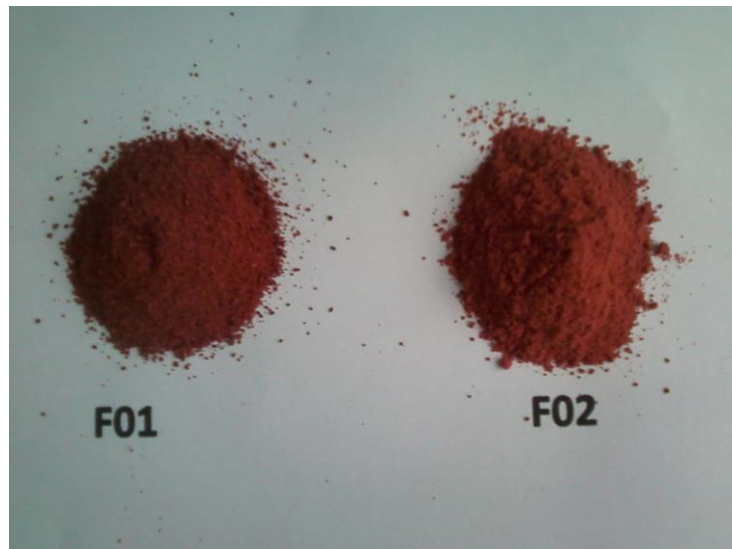
(d)



(e)



(f)



(g)

APÊNDICE B - Teste t de student aplicado aos parâmetros de composição através do programa estatístico Minitab® 15.

Teste T para as formulações F01 x F02 (Umididade)

Two-sample T for F01 vs F02

	N	Mean	StDev	SE Mean
F01	3	5,040	0,190	0,11
F02	3	7,897	0,274	0,16

Difference = mu (F01) - mu (F02)
 Estimate for difference: -2,857
 95% CI for difference: (-3,392; -2,322)
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -14,83 P-Value = 0,000 DF = 4
 Both use Pooled StDev = 0,2359

Teste T para as formulações F01 x F02 (Matéria seca)

Two-sample T for F01 vs F02

	N	Mean	StDev	SE Mean
F01	3	94,974	0,204	0,12
F02	3	92,026	0,315	0,18

Difference = mu (F01) - mu (F02)
 Estimate for difference: 2,947
 95% CI for difference: (2,346; 3,549)
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 13,60 P-Value = 0,000 DF = 4
 Both use Pooled StDev = 0,2655

Teste T para as formulações F01 x F02 (Cinzas)

Two-sample T for F01 vs F02

	N	Mean	StDev	SE Mean
F01	3	4,195	0,302	0,17
F02	3	5,214	0,334	0,19

Difference = mu (F01) - mu (F02)
 Estimate for difference: -1,020
 95% CI for difference: (-1,741; -0,298)
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -3,92 P-Value = 0,017 DF = 4
 Both use Pooled StDev = 0,3183

Teste T para as formulações F01 x F02 (Proteínas)

	N	Mean	StDev	SE Mean
F01	3	5,422	0,206	0,12
F02	3	7,904	0,427	0,25

Difference = mu (F01) - mu (F02)
 Estimate for difference: -2,481
 95% CI for difference: (-3,241; -1,722)
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -9,07 P-Value = 0,001 DF = 4
 Both use Pooled StDev = 0,3351

Teste T para as formulações F01 x F02 flavonoides totais

Two-sample T for F01 vs F02

	N	Mean	StDev	SE Mean
F01	5	1,8226	0,0566	0,025
F02	5	1,7636	0,0476	0,021

Difference = μ (F01) - μ (F02)

Estimate for difference: 0,0590

95% CI for difference: (-0,0173; 0,1353)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 1,78 P-Value = 0,112 DF = 8

Both use Pooled StDev = 0,0523

APÊNDICE C – Curva de calibração da catequina

Tabela 9 – Curva de calibração da catequina pelo método de leitura direta a 280 nm

µg/mL		Abs		Média	SD
10	0,13	0,132	0,12	0,127333	0,006429
20	0,24	0,235	0,241	0,238667	0,003215
40	0,479	0,474	0,466	0,473	0,006557
60	0,691	0,686	0,691	0,689333	0,002887
80	0,91	0,919	0,93	0,919667	0,010017

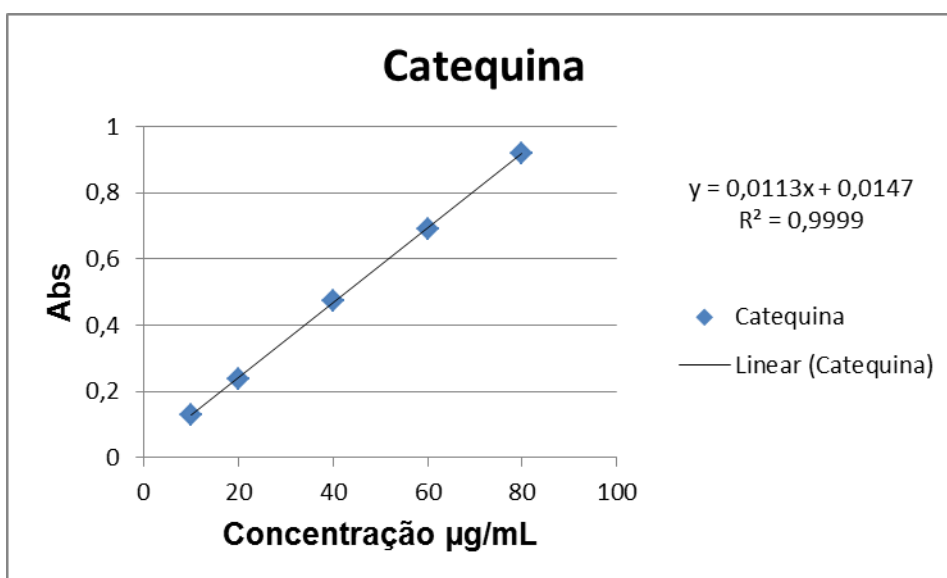


Figura 6 – Curva de calibração com padrão de catequina a 280 nm