

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Estudo das interações dos sistemas formados a partir de biopolímeros**

**Eliana Da Silva Gulão**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – PPGCTA**

**ESTUDO DAS INTERAÇÕES DOS SISTEMAS FORMADOS A PARTIR  
DE BIOPOLÍMEROS**

**ELIANA DA SILVA GULÃO**

*Sob a orientação do Professor*  
**Dr. Edwin Elard Garcia Rojas**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Maio de 2014

637.17

G971e

T

Gulão, Eliana da Silva, 1985-

Estudo das interações dos sistemas formados a partir de biopolímeros / Eliana da Silva Gulão. - 2014.

109 f.: il.

Orientador: Edwin Elard Garcia Rojas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

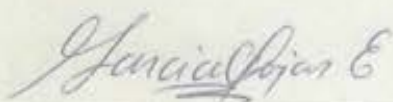
1. Soro do leite - Teses. 2. Leite - Proteínas - Teses. 3. Biopolímeros - Teses. I. Garcia Rojas, Edwin Elard, 1972-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO  
DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

ELIANA DA SILVA GULÃO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2014



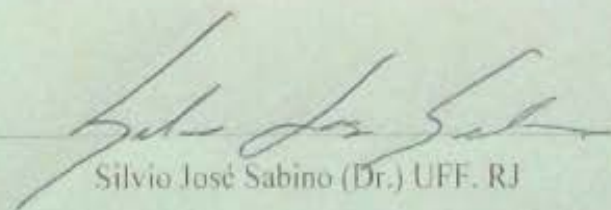
---

Edwin Elard Garcia Rojas (Dr.) UFF.RJ  
(Orientador)



---

Nathália Ramos de Melo (Dra.) UFF. RJ



---

Silvio José Sabino (Dr.) UFF. RJ

## DEDICATÓRIA

*In memoriam* de Ely Franco Gulão, meu pai,  
pois, em toda minha vida foi a maior inspiração e  
incentivador para meu crescimento pessoal e acadêmico.

## MENSAGEM



ESTE DESENHO É O RESULTADO DE 6 ANOS DE OBSTINADA LABUTA! UMA VIDA INTEIRA DE ESFORÇOS PARA CHEGAR A TAL RESULTADO!



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pelas bênçãos em toda minha trajetória;

Ao **Prof. Dr. Edwin Elard Garcia Rojas** pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por além de ser um orientador dedicado e passar seus conhecimentos com sabedoria e paciência, contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional com ensinamentos que vão além do conhecimento acadêmico, mas por toda a vida.

Ao **PPGCTA, UFRRJ e todos os Professores, Técnicos e demais profissionais** pela oportunidade do mestrado e todas as oportunidades advindas do curso;

A **UFF** pelo espaço cedido para o desenvolvimento deste trabalho e por toda sua equipe que auxiliaram no desenvolvimento do mesmo, especialmente **Nathália Ramos de Melo, Bernardo Sá, Jordana Reis e Alexandre Lemos**;

A **CAPES** pela bolsa de estudos concedida a qual possibilitou meus estudos;

Ao colega de laboratório e grande amigo **Clitor Fernandes**, por sempre de forma tão generosa passar seus conhecimentos, me ensinar e ajudar nas análises, por todas as dicas, conselhos, momentos de descontração e, além disso, por ser o grande amigo que se tornou e que levarei para sempre em minha vida.

Ao meu marido, **Francisco Luiz**, por toda compreensão e paciência ao longo desta jornada, principalmente nos momentos de ausência, por me incentivar, amar e respeitar mesmo nos momentos mais difíceis e por acreditar nos meus sonhos, nos nossos sonhos, mesmo sem eu pedir. A você todo meu amor.

À minha família: **Derli Gulão**, por ser a mãe incrível, doce e amiga que é. Por ser simplesmente a mulher mais inspiradora que conheço; **Sônia Gulão**, irmã e melhor amiga, por torcer e chorar junto, por todas as palavras de apoio e carinho em toda a minha vida; **Ana Lúcia Gulão e Fabiane Gulão**, irmãs, pelo apoio, carinho e amizade; **Lucas Gulão, André Gulão, José Gabriel Gulão e Júlia Gulão**, sobrinhos, simplesmente por existirem e alegrarem minha vida; **Elza Gulão, Eloy Gulão e Ivone Freitas**, tios, por todo apoio, torcida e carinho.

Aos amigos **Daniele Pereira do Amaral**, por ser minha companheira ao longo de todo ano, dando força, apoio e carinho. Por me aguentar e ser minha família quando estive longe. Ao **Wilson Lemos Júnior**, pelo amigo maravilhoso que é nos momentos de descontração e de tensão, por mesmo com a distância, se preocupar, apoiar e ajudar em todos os meus passos.

Aos amigos do laboratório LETA, especialmente **Regiane Ribeiro, Elder Simões, Rafaela Mendes, Bárbara Alves, Bárbara Drummond, Pedro Zódima, Clyselen Fernandes e Priscila Moura** pela amizade, carinho e momentos alegres que eu passei esse ano. A **Fernanda Sampaio** pelo carinho e ajuda nas análises de DRX.

Aos **amigos de turma da UFRRJ**, pela amizade, carinho e momentos felizes. Com certeza levarei cada um de vocês em meu coração. Foi um prazer fazer parte de uma turma tão unida e incrível.

Aos amigos **Paula Amaral, Rafaela Araújo, Hingrid Zimmermann e Róguerman Pancote** pela amizade, carinho e apoio.

Aos amigos da graduação que sempre serão como minha família: **Bianca Monteiro, Diego Muniz, Luiza Barcelos e Silvana Araújo** pela amizade e carinho de sempre. Amo vocês.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho, muito obrigada pelo apoio!

## RESUMO GERAL

GULÃO, Eliana da Silva. **Estudo das interações dos sistemas formados a partir biopolímeros**, 2014. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

As interações entre biopolímeros exercem importante influência nas propriedades dos alimentos em que são empregadas, podendo controlar e melhorar suas propriedades funcionais e organolépticas. No presente trabalho, foi estudada a formação de complexos coacervados a partir de biopolímeros do soro de leite, a proteína lactoferrina (Lf) e o polipeptídeo-leucina (PL) com o polissacarídeo goma arábica (GA). Em todos os sistemas formados, a partir dos dados de turbidez e potencial-  $\zeta$  foi possível observar que a formação dos precipitados insolúveis ocorreu abaixo do ponto isoelétrico (pI) da proteína e polipeptídeo. A presença de íons pode suspender ou beneficiar o fenômeno de complexação dependendo da natureza dos polímeros utilizados, foi observado que determinadas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) influenciaram positivamente no aumento da turbidez, indicando a formação de macromoléculas nos complexos formados entre Lf/GA e o contrário foi observado para os coacervados formados entre PL/GA. Tal fato pode ser comprovado a partir dos dados de tamanho de partícula. Os complexos formados a partir dos biopolímeros apresentaram microcápsulas esféricas devido ao natural potencial de encapsulamento da goma arábica. Foi possível obter emulsões óleo-água estáveis formadas a partir da lactoferrina e ovalbumina (OVA). Emulsões contendo apenas 3% lactoferrina se mostraram estáveis à agregação nos diferentes pH estudados, já as emulsões contendo apenas 3% OVA se mantiveram estáveis apenas em alto valor de pH (8.0). Quando as duas proteínas eram misturadas para formar as emulsões, foi possível observar sistemas estáveis em valores de pH intermediários ao ponto isoelétrico das proteínas. Nestas regiões as proteínas apresentavam-se com cargas opostas promovendo uma ligação eletrostática e provável complexação, que contribuiu para a estabilidade das emulsões.

**Palavras-chave: coacervados; proteínas do soro de leite; emulsificantes**



## ABSTRACT

GULÃO, Eliana da Silva. **Studying of interactions of systems formed from biopolymers**, 2014. 108p. Thesis (Master in Food Science and Technology) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Interactions between biopolymers have an important influence on the properties of foods in which they are employed, and can monitor and improve their functional and organoleptic properties. In the present work, the formation of complex coacervates of biopolymers from whey protein lactoferrin (Lf) and the polypeptide-leucine (PL) with polysaccharide gum arabic (GA) was studied. In all systems studied, from data of turbidity and  $\zeta$ -potential was observed that the formation of insoluble precipitates occurred below the isoelectric point (IP) of the protein and polypeptide. The presence of ions able to suspend or benefit complexation phenomenon depending on the nature of the polymers used, it was observed that certain concentrations of sodium chloride (NaCl) had a positive influence on the increase in turbidity, indicating the formation of the macromolecular complexes formed between Lf / GA and the opposite was observed for the coacervates formed between PL/GA. This fact can be seen from data of particle size. Complexes formed from polymers showed spherical microcapsules due to potential natural of encapsulation of gum arabic. It was possible to obtain stable oil-water emulsions formed from lactoferrin and ovalbumin (OVA). Emulsions containing only 3% lactoferrin were stable to aggregation at different pH in the study, the emulsions containing only 3% OVA were stable only at high pH (8.0). When the two proteins were mixed to form emulsions, we observed stable systems in intermediate pH values of the isoelectric point of proteins. In these regions the proteins presented with opposite charges and likely promoting an electrostatic complexation bond, which contributed to the stability of emulsions.

**Key-words: coacervates; whey proteins; emulsifier**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1.</b> Componentes do soro de leite. (O padrão escalável representa o valor mínimo e o padrão em negro representa o valor máximo).....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura da lactoferrina .....	6
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do comportamento de dispersões entre proteínas e polissacarídeos .....	10
<b>CAPÍTULO II- FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE LACTOFERRINA E GOMA ARÁBICA</b>	
<b>Figura 1.</b> Potencial- $\zeta$ das amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina. GA: 0,1%; NaCl:0,25 M; pH: 4.0; T:25°C .....	26
<b>Figura 2.</b> Diâmetro de partícula das amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina. GA: 0,1%; NaCl: 0,25 M; pH: 4.0; T:25°C. Fotografias destas amostras (A: 0,1, B:0,2, C: 0,3, D: 0,5 e E: 1% Lf).....	27
<b>Figura 3:</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 1:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 M; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.....	28
<b>Figura 4:</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 2:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mmol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.....	28
<b>Figura 5:</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 3:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.....	29
<b>Figura 6:</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 5:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.....	29
<b>Figura 7:</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 10:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.....	30
<b>Figura 8.</b> Fotografias de soluções contendo 0,2% Lf/ 0,1% GA com concentração de NaCl de 0,25 M em diferentes pH, sendo: A: pH 12,0; B: pH 7,1; C: pH 5,0; D: pH 4,1; E: pH 2,8 e F: pH 2,0. ....	31
<b>Figura 9.</b> Potencial- $\zeta$ das amostras contendo 0,1% GA, 0,1%Lf e das misturas contendo 0,1%Lf/0,1%GA em diferentes pH. (NaCl: 0,25 mol; Temperatura: 25°C). ....	32

<b>Figura 10.</b> Tamanho de partícula das misturas contendo 0,2%Lf/0,1%GA com diferentes concentrações de NaCl. Temperatura: 25°C; pH: 4,0. Fotografias das diferentes amostras: <b>A:</b> 0, <b>B:</b> 0,01, <b>C:</b> 0,25, <b>D:</b> 0,3 e <b>E:</b> 0,5 mol/L NaCl.....	<b>33</b>
<b>Figura 11:</b> Diagrama de estado das misturas contendo: A: 0,1 %Lf/0,1%GA; B: 0,2% Lf/0,1 %GA; C: 0,3 %Lf/0,1 %GA com diferentes concentrações de NaCl (0, 0,01, 0,25, 0,3 e 0,5 mol/L); temperatura: 25°C; sendo= (●) pH <sub>c</sub> ; (○) pH <sub>01</sub> e (▼) pH <sub>02</sub> . .....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Turbidez de amostras contendo misturas de Lf e GA submetidas a diferentes temperaturas. (●) 0,1% Lf/0,1%GA; (○) 0,2% Lf/0,1%GA; (▼) 0,3% Lf/0,1%GA. NaCl:0,25 mol/L.....	<b>35</b>
<b>Figura 13.</b> Tamanho de partícula de amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina a temperaturas entre 25 e 90°C. (●) 0,1%Lf/0,1%GA; (○) 0,2%Lf/0,1%GA; (▼) 0,3%Lf/0,1%GA. <b>pH:</b> 7.0 .....	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> Imagens de microscopia óptica a 50x das amostras contendo 0,2%Lf/0,1%GA. <b>NaCl</b> 0,25 mol/L; <b>pH</b> 4,0; <b>temperatura:</b> 25°C.....	<b>37</b>
<b>Figura 15.</b> Difratoograma da lactoferrina ( <b>A</b> ), Goma arábica ( <b>B</b> ) e da mistura contendo 0,2%Lf/0,1%GA ( <b>C</b> ) no pH 4,0, NaCl 0,25 mol/L e temperatura de 25°C.....	<b>38</b>
<b>Figura 16.</b> Difratoograma da lactoferrina ( <b>A</b> ), Goma arábica ( <b>B</b> ) e da mistura contendo 0,1%Lf/0,1% GA ( <b>C</b> ) no pH 7,0, NaCl 0,25 mol/L e temperatura de 80°C. ....	<b>39</b>
<b>Figura 17.</b> Imagem de microscopia de força atômica da amostra contendo 0,1 %Lf/0,1 %GA, 0,25 mol/L NaCl a 80°C.....	<b>39</b>

### **CAPÍTULO III - FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLIPEPTÍDEO LEUCINA E GOMA ARÁBICA**

<b>Figura 1.</b> Potencial- $\zeta$ e tamanho de partícula das amostras contendo diferentes concentrações de Goma arábica (0,03, 0,06, 0,09, 0,12 e 0,15 %m/m) e 0,2 %PL; NaCl: 0 mol/L; pH: 4,15; T:25°C. Fotografias ilustrando as mudanças visuais nas soluções contendo diferentes concentrações de GA no pH próximo a 4,15. <b>A:</b> 0,03% GA; <b>B:</b> 0,06% GA; <b>C:</b> 0,09% GA; <b>D:</b> 0,12% GA e <b>E:</b> 0,15% GA.....	<b>50</b>
<b>Figura 2.</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2%PL/0,03%GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L	<b>51</b>
<b>Figura 3.</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2%PL/0,06%GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L	<b>52</b>
<b>Figura 4.</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2%PL/0,09%GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L	<b>52</b>
<b>Figura 5.</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2%PL/0,12%GA com diferentes concentrações de sal: (▼) NaCl 0 mol/L; (●) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (■) NaCl 0,3 mol/L; (Δ) NaCl 0,5 mol/L	

	53
<b>Figura 6.</b> Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2%PL/0,15%GA com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (Δ) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (▼) NaCl 0,3 mol/L; (●) NaCl 0,5 mol/L	53
<b>Figura 7.</b> Aparência das soluções de acordo com o pH ao longo da titulação turbidimétrica.....	54
<b>Figura 8.</b> Potencial- $\zeta$ das amostras contendo 0,2% PL, 0,03%GA e das misturas contendo 0,2%PL/0,03%GA em diferentes pH. (NaCl: 0 mol/L; Temperatura: 25°C).....	55
<b>Figura 9.</b> Tamanho de partícula de amostras contendo 0,2%PL/0,03%GA com diferentes concentrações de NaCl. pH: 4,1; temperatura: 25°C .....	56
<b>Figura 10.</b> Diagrama de estado das amostras contendo 0,2% PL/0,03%GA em diferentes concentrações salinas. Temperatura: 25°C; sendo= (●) pH <sub>01</sub> ; (○) pH <sub>02</sub> .....	57
<b>Figura 11.</b> Imagens do MEV. Complexos coacervados desidratados contendo 0,2%PL/0,03%GA. NaCl: 0 mol/L; Temperatura: 25°C.....	58
<b>Figura 12.</b> Difratoograma de raios X da leucina, goma arábica e das misturas contendo 0,2%PL/0,03%GA com NaCl 0 mol/L e temperatura 25°C.....	59
<b>Figura 13.</b> Módulo de armazenamento ( $G'$ ), dissipação ( $G''$ ) e viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) dos complexos coacervados contendo 0,2% PL/ 0,03% GA, 0 mol/L, sendo: (○) $G'$ , (●) $G''$ e ( $\eta^*$ ) viscosidade aparente.....	60

#### **CAPÍTULO IV - ESTABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES FORMADAS ENTRE LACTOFERRINA E OVALBUMINA**

<b>Figura 1.</b> Efeito do pH no potencial- $\zeta$ das soluções contendo 3%Lf, 1% OVA e das misturas contendo 3%Lf/3%OVA.....	70
<b>Figura 2.</b> Potencial- $\zeta$ das emulsões contendo 10% de óleo de coco e diferentes proporções de proteína, no sétimo dia após sua formação .....	71
<b>Figura 3.</b> Influência do pH nos diâmetros de gotícula das emulsões contendo 10% de óleo de coco em diferentes proporções de proteína, no sétimo dia após sua formação .....	72
<b>Figura 4.</b> Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 3% Lf no sétimo dia após sua formação. <b>A:</b> pH 2,0; <b>B:</b> 3,0; <b>C:</b> pH 4,0; <b>D:</b> pH 5,0; <b>E:</b> pH 6,0; <b>F:</b> pH 7,0 e <b>G:</b> pH 8,0.....	72
<b>Figura 5.</b> Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 3% OVA no sétimo dia após sua formação. <b>A:</b> pH 2,0; <b>B:</b> 3,0; <b>C:</b> pH 4,0; <b>D:</b> pH 5,0; <b>E:</b> pH 6,0; <b>F:</b> pH 7,0 e <b>G:</b> pH 8,0 .....	73
<b>Figura 6.</b> Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 2,25%OVA/0,75%Lf no sétimo dia após sua formação. <b>A:</b> pH 2,0; <b>B:</b> 3,0; <b>C:</b> pH 4,0; <b>D:</b> pH 5,0; <b>E:</b> pH 6,0; <b>F:</b> pH 7,0 e <b>G:</b> pH.....	73

<b>Figura 7.</b> Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 2,25%Lf/0,75%OVA no sétimo dia após sua formação. <b>A:</b> pH 2,0; <b>B:</b> 3,0; <b>C:</b> pH 4,0; <b>D:</b> pH 5,0; <b>E:</b> pH 6,0; <b>F:</b> pH 7,0 e <b>G:</b> pH 8,0 .....	<b>74</b>
<b>Figura 8.</b> Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 1,5%Lf/1,5%OVA no sétimo dia após sua formação. <b>A:</b> pH 2,0; <b>B:</b> 3,0; <b>C:</b> pH 4,0; <b>D:</b> pH 5,0; <b>E:</b> pH 6,0; <b>F:</b> pH 7,0 e <b>G:</b> pH 8,0.....	<b>74</b>
<b>Figura 9.</b> Diâmetro de gotícula das emulsões contendo diferentes concentrações de Lf e Ovo submetidas a variação de temperatura. (●) 3% Lf, pH 7,0; (○) 2,25% Lf 0,75% Ovo, pH 6,0; (▼) 1,5% Lf 1,5% Ovo, pH 6,0; (Δ) 2,25% Ovo 0,75% Lf, pH 6,0; (■) 3% OVA, pH 8,0.....	<b>75</b>
<b>Figura 10.</b> Fotografias de emulsões contendo diferentes proporções LF/OVA após serem submetidas a altas temperaturas. <b>A:</b> 3%LF, 80°C; <b>B:</b> 2,25%LF/0,75%OVA, 70°C; <b>C:</b> 1,5%LF/OVA, 70°C; <b>D:</b> 2,25%OVA/0,75%LF, 70°C e <b>E:</b> 3%OVA, 90°C.....	<b>76</b>
<b>Figura 11.</b> Viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) das emulsões em dependência da temperatura. (●) 3% Lf; (○) 2,25% Lf/ 0,75% OVA; (□) 1,5% Lf/1,5% OVA; (Δ) 2,25% OVA/ 0,75% Lf; (▲) 3% OVA.....	<b>77</b>
<b>Figura 12. A:</b> Módulos de armazenamento ( $G'$ ), dissipação ( $G''$ ) das emulsões contendo diferentes misturas de polímeros. <b>B:</b> Viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) das emulsões contendo diferentes misturas de polímeros. T: 25°C.....	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1.</b> Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro de leite bovino .....	<b>5</b>
<b>Tabela 2.</b> Estudos sobre complexos coacervados e suas aplicações. ....	<b>13</b>

## NOMENCLATURA/ABREVIACOES

<b>Lf</b>	<b>Lactoferrina</b>
<b>GA</b>	<b>Goma arábica</b>
<b>OVA</b>	<b>Ovalbumina</b>
<b>DBO</b>	<b>Demanda bioqumica de oxignio</b>
<b>DQO</b>	<b>Demanda química de oxignio</b>
<b>PI</b>	<b>Ponto isoeltrico</b>
<b>PL</b>	<b>Polipeptídeo-leucina</b>
<b>DRX</b>	<b>Difratograma de Raios X</b>
<b>MEV</b>	<b>Microscopia Eletrnica de Varredura</b>
<b>WPI</b>	<b>Isolado proteico do soro de leite</b>
<b>AFM</b>	<b>Microscopia de força atômica</b>
<b>G'</b>	<b>Módulo de armazenamento</b>
<b>G''</b>	<b>Módulo de dissipacão</b>
<b><math>\eta^*</math></b>	<b>Viscosidade aparente</b>

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVO GERAL:.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	2
CAPÍTULO I.....	3
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1. Leite.....	4
1.1. Soro de leite .....	4
1.2. Lactoferrina (Lf) .....	6
1.2.1. Atividade antimicrobiana: bactérias, fungos filamentosos e leveduras.....	6
1.2.2. Atividade antimicrobiana: Vírus .....	7
1.2.3. Outras atividades .....	7
1.3. Leucina.....	8
2. CLARA DO OVO .....	8
2.1. Ovalbumina.....	8
3. Polissacarídeos .....	9
3.1. Goma arábica .....	9
4. Complexos proteína-polissacarídeo.....	10
4.1. Principais fatores que influenciam a formação dos complexos coacervados: .....	11
4.2. Propriedades funcionais dos complexos coacervados .....	11
4.2.1. Propriedades reológicas e gelificantes.....	12
4.2.2. Estabilidade térmica de proteínas .....	12
4.2.3. Propriedades morfológicas dos complexos coacervados.....	12
4.3. Complexos coacervados: aplicações.....	13
5. Emulsões.....	14
5.1. Emulsificantes.....	14
6. REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO II.....	21
FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE LACTOFERRINA E GOMA ARÁBICA. ....	21
1. INTRODUÇÃO.....	23



2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1.	MATERIAL.....	24
2.2.	MÉTODO .....	24
2.2.1.	Preparo das soluções.....	24
2.2.2.	Titulação turbidimétrica .....	24
2.2.3.	Influência da temperatura na interação entre os biopolímeros .....	24
2.2.4.	Potencial- $\zeta$ e tamanho de partícula.....	25
2.2.5.	Difração de raios X (DRX).....	25
2.2.6.	Microscopia óptica .....	25
2.2.7.	Microscopia de força atômica.....	25
2.3.	Análises estatísticas .....	26
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.1.	Efeito da concentração de lactoferrina na formação dos complexos coacervados ....	26
3.2.	Influência do pH e força iônica na formação dos complexos coacervados .....	27
3.3.	Influência da temperatura na interação entre a lactoferrina e goma arábica.....	34
3.4.	Características morfológicas dos complexos coacervados .....	36
4.	CONCLUSÃO.....	40
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
	CAPÍTULO III .....	45
	FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLIPEPTÍDEO LEUCINA E GOMA ARÁBICA.....	45
1.	INTRODUÇÃO.....	47
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1.	MATERIAL.....	47
2.2.	MÉTODO .....	48
2.2.1.	Preparo das soluções.....	48
2.2.2.	Titulação turbidimétrica .....	48
2.2.3.	Potencial- $\zeta$ e diâmetro de partícula .....	48
2.2.4.	Difração de raios X (DRX).....	48
2.2.5.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
2.2.6.	Propriedades reológicas .....	49
2.2.7.	Análises estatísticas .....	49
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49

3.1.	Efeito da concentração de polissacarídeo na formação dos complexos coacervados:	
	49	
3.2.	Influência do pH e força iônica na formação dos complexos coacervados .....	51
3.3.	Caracterização morfológica dos complexos coacervados.....	58
3.3.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
3.3.2.	Difração de raios X (DRX).....	59
3.3.3.	Propriedades reológicas .....	60
4.	CONCLUSÃO.....	61
5.	REFERÊNCIAS .....	62
CAPÍTULO IV .....		65
ESTABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES FORMADAS ENTRE LACTOFERRINA E OVALBUMINA .....		65
1.	INTRODUÇÃO.....	67
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1.	Material .....	67
2.2.	Método .....	68
2.2.1.	Preparo da solução de proteína.....	68
2.2.2.	Preparo da emulsão.....	68
2.2.3.	Potencial- $\zeta$ e diâmetro de gotícula .....	68
2.2.4.	Influência da temperatura sobre a estabilidade das emulsões .....	68
2.2.5.	Propriedades reológicas.....	69
2.2.6.	Análise estatística .....	69
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
3.1.	Propriedades das proteínas nas soluções aquosas.....	69
3.2.	Influência do pH e proporção dos biopolímeros nas propriedades e estabilidade das emulsões .....	70
3.3.	Influência da temperatura na estabilidade das emulsões .....	74
3.4.	Propriedades reológicas das emulsões .....	77
4.	CONCLUSÃO.....	79
5.	REFERÊNCIAS .....	80
CONCLUSÃO GERAL .....		82
ANEXOS .....		83
ANEXO A .....		83

Gráficos do potencial zeta em dependência do pH dos complexos coacervados formados entre a lactoferrina e goma arábica.....	83
ANEXO B .....	86
Gráficos do potencial zeta em dependência do pH dos complexos coacervados formados entre o polipeptídeo-leucina e goma arábica .....	86
ANEXO C .....	88
Potencial zeta e diâmetro de gotícula dependentes do pH das emulsões contendo as diferentes proporções entre lactoferrina e ovalbumina no primeiro dia de formação .....	88

## INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas e os polissacarídeos classificam-se como biopolímeros e sua interação exerce influência direta sobre aspectos macroscópicos do alimento, tais como: fluidez, textura, estabilidade e sensação bucal. A interação entre ambos tende geralmente a ser instável, gerando o fenômeno de separação de fases, podendo ocorrer de duas maneiras distintas: através da incompatibilidade termodinâmica (segregação) ou separação de fases segregativa; ou ainda pela complexação (coarcevação complexa), conhecida como separação de fases associativa.

Os complexos coacervados possuem diferentes aplicações, como por exemplo: na separação de proteínas, como espessantes, estabilizantes em alimentos, na imobilização de enzimas e principalmente na microencapsulação nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos (HUANG et al., 2012). São atraentes para a indústria, pois são produtos naturais obtidos a partir de ingredientes de baixo custo e são de fácil aprovação para utilização em alimentos. Além disso, após sua formação, surge um biopolímero com novas propriedades funcionais, normalmente superiores quando comparado ao polímero original (SOUZA et al., 2013).

As proteínas remanescentes no soro de leite apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto, um elevado valor nutricional. Entre estas, encontra-se a lactoferrina (Lf), uma glicoproteína com peso molecular de 80 KDa pertencente à família das transferrinas, sendo um componente importante no sistema imune e que exibe propriedades antioxidante, anti-inflamatória, bactericida e bacteriostática, antivirais, anticâncer, entre outras.

Os aminoácidos essenciais presentes no soro de leite exercem importantes papéis no sistema biológico. A leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética, estimulando a incorporação de aminoácidos nas proteínas e inibindo a degradação proteica.

As proteínas do ovo são altamente empregadas na indústria de alimentos por possuírem boa solubilidade, fator este que está diretamente ligado a propriedades funcionais tais como, excelentes propriedades emulsificantes e capacidade de interagir e formar ligações com outros componentes.

Os polissacarídeos são hidrocolóides de alto peso molecular, amplamente utilizados na indústria de alimentos para estabilizar emulsões óleo em água, controlar suas propriedades reológicas e como agente espessante, a goma arábica é um dos polímeros mais utilizados devido às suas propriedades funcionais. (FONSECA, 2008).

## **OBJETIVO GERAL:**

Estudar os fatores que influenciam nas interações entre biopolímeros em sistemas de formação de complexos coacervados e emulsões e caracterizar os produtos formados.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar a influência do pH, temperatura e concentração salina no processo de formação dos complexos coacervados entre a lactoferrina e o polissacarídeo goma arábica;
- Avaliar as propriedades morfológicas dos complexos formados entre a lactoferrina e o polissacarídeo goma arábica;
- Avaliar a influência do pH e concentração salina no processo de formação dos complexos coacervados entre o polipeptídeo-leucina e o polissacarídeo goma arábica;
- Avaliar as propriedades morfológicas e reológicas dos complexos formados entre o polipeptídeo-leucina e o polissacarídeo goma arábica;
- Avaliar a estabilidade e propriedades reológicas das emulsões formadas entre a lactoferrina e a ovalbumina.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

## **1. LEITE**

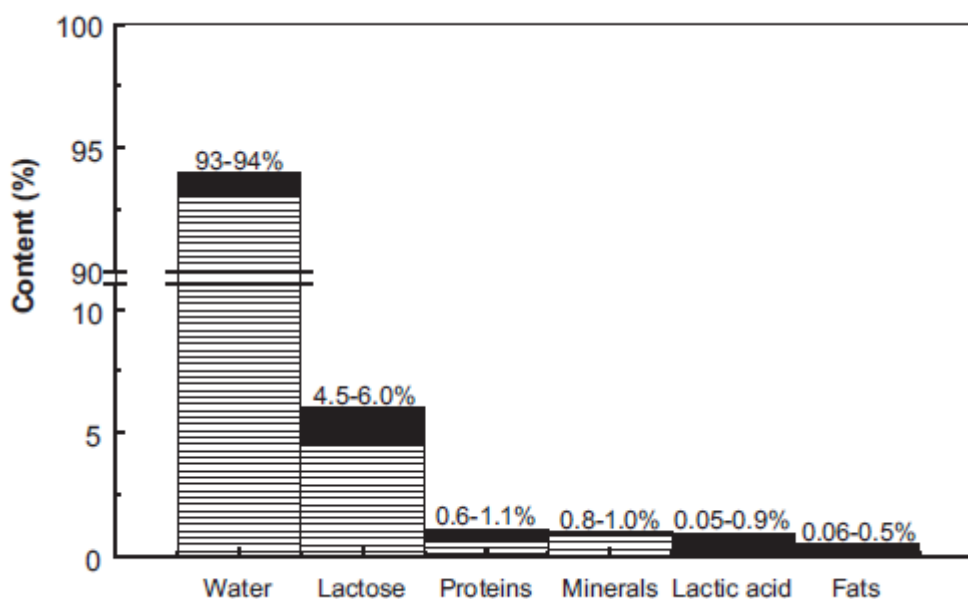
Segundo Brasil (2002), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda.

Mais de 4.000 espécies de mamíferos o produzem, com a função primordial de suprir as necessidades nutricionais de seus recém-nascidos. Além disso, possui importante papel em relação a funções fisiológicas no organismo humano, fornecendo imunoglobulinas, enzimas, proteínas, fatores de crescimento, vitaminas, entre outros. Como as necessidades nutricionais e fisiológicas são diferentes de acordo com a espécie, a composição do leite varia de acordo com a sua origem (ANTUNES, 2003).

Os macrocomponentes do leite bovino são: a água (87,30%), a lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gordura e micelas de caseína. O leite bovino é comercializado em suas formas líquida, integral ou desengordurado e pasteurizado ou esterilizado. Essas mesmas formas são também comercializadas desidratadas, leite em pó (SGARBIERI, 2004).

### **1.1. Soro de leite**

A indústria de queijos origina um importante subproduto associado com a contaminação de efluentes, que pode ter diferentes características de acordo com o produto produzido (iogurte, queijo, manteiga, leite, sorvete, etc.). Além disso, a gestão das águas residuais, o clima, as condições de funcionamento e tipos de limpeza no local também influenciam diretamente sobre as características desse efluente (PRAZERES et al., 2012). O principal parâmetro envolvido, que torna o soro de leite um importante produto em relação à contaminação ambiental, é a alta demanda de compostos orgânicos presente no mesmo, monitorada pelos índices DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio). Os compostos orgânicos responsáveis por essa elevada demanda são carboidratos e proteínas, especialmente lactose e caseína, respectivamente, que correspondem aos principais componentes do soro, como pode ser visualizado na Figura 1. A gordura, os sólidos suspensos e minerais (como sódio e fósforo) também contribuem para os altos índices de contaminação (PRAZERES et al., 2012).



**Figura 1.** Componentes do soro de leite. (O padrão escalável representa o valor mínimo e o padrão em negro representa o valor máximo). Fonte: (PRAZERES et al., 2012)

Apesar do efeito ambiental gerado pela produção de queijo ser bem conhecido, recentemente o soro de leite foi reconhecido por também representar uma excelente fonte de proteínas funcionais, peptídeos, lipídeos, minerais, vitaminas e lactose (QI e ONWULATA, 2011).

As investigações sobre o soro de leite, focadas principalmente em suas proteínas (Tabela 1) e peptídeos, têm contribuído para transformar o conceito antes conhecido do produto, passando a ser visto como uma importante e valiosa ferramenta, contendo componentes disponíveis para maior exploração pela indústria de alimentos, farmacêutica, de materiais e biotecnologia em geral (QI e ONWULATA, 2011).

**Tabela 1.** Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro de leite bovino.

Proteínas do soro de leite bovino (g/L)	
$\beta$ -lactoglobulina	3,2
$\alpha$ -lactoalbumina	1,2
Soroalbumina (BSA)	0,4
Imunoglobulinas	0,7
Lactoferrina	0,1

Fonte: Adaptado de Sgarbieri (2004).



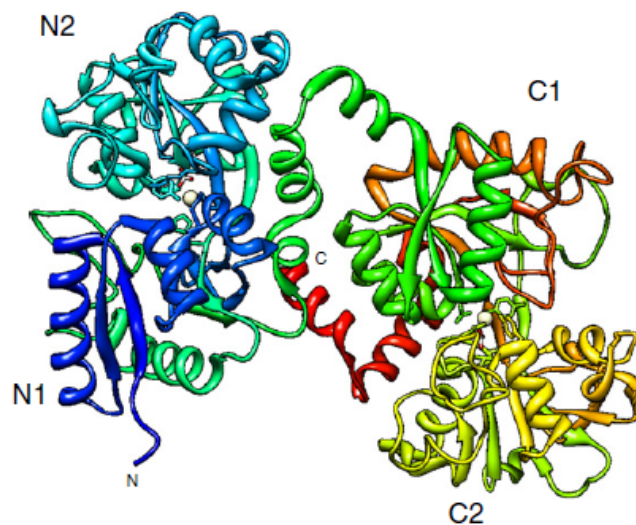
## 1.2. Lactoferrina (Lf)

As proteínas do soro de leite são importantes fontes de aminoácidos, contendo propriedades funcionais e fisiológicas importantes (EISSA, 2013).

A Lf é uma proteína pertencente à família das transferrinas, juntamente com a transferrina sérica, ovotransferrina e melanotransferrina, sendo responsáveis principalmente pelo transporte de ferro. É produzida pelas células epiteliais da mucosa da glândula mamária de muitas espécies, como humanos, bovinos, caprinos, equinos e roedores. Também pode ser encontrada em diversos fluidos, como: lágrima, saliva, sêmen, fluidos vaginas, brônquicos, nasais, gastrointestinais e urina. Possui alta afinidade ao ferro, sendo a única proteína capaz de reter esse metal sobre diferentes valores de pH, possuindo alta resistência a proteólise (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

O ferro é um importante metal utilizado na reprodução e manutenção de microrganismos, especialmente os patogênicos. Este fato torna a Lf uma importante ferramenta no controle de crescimento de bactérias patogênicas (QUINTIERI et al., 2012).

A molécula de Lf é constituída por uma cadeia única de polipeptídio, dobrado em dois lóbulos globulares simétricos (lóbulos N e C) ligados por uma determinada região, como ilustrado na Figura 2. Cada lóbulo é capaz de se unir a um átomo de Fe<sup>+2</sup> ou Fe<sup>+3</sup>, mas também pode se ligar ao Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005).



**Figura 2.** Estrutura da lactoferrina. Fonte: (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012)

A proteína possui peso molecular de 80 KDa, ponto isoelétrico entre 8,0 e 8,5 e sua maior concentração está presente no colostro, principalmente da espécie humana. Apesar de sua maior atividade ser relacionada à inibição de bactérias, a Lf atua em diferentes microrganismos (SERRANO, 2007).

### 1.2.1. Atividade antimicrobiana: bactérias, fungos filamentosos e leveduras

A lactoferrina pode atuar de forma bactericida e bacteriostática. A forma bactericida está associada à capacidade da proteína de se unir a íons Fe, sequestrando o metal presente que é essencial ao crescimento de microrganismos, como por exemplo: *Escherichia coli*,

*Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (FRANCO et al., 2005). No entanto, algumas bactérias Gram negativas desenvolveram mecanismos para recuperar o Fe perdido, sintetizando estruturas quelantes conhecidas como sideróforos, que possuem alta afinidade com o ferro, retirando assim o ferro transportado pelas transferrinas (SERRANO, 2007). Outros microrganismos do gênero *Neisseria*, possuem a capacidade de expressar receptores específicos na membrana para a lactoferrina, conseguindo também sequestrar o ferro ligado a ela (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005).

A capacidade bacteriostática está associada à capacidade da molécula da lactoferrina, ou parte dela, de se ligar a superfície de bactérias, sendo tanto gram negativas quanto gram positivas. No caso das gram negativas, como a *Escherichia coli* e o *Vibrio cholerae*, os pesquisadores observaram essa ligação com posterior liberação de lipopolissacarídeo e aumento da permeabilidade da membrana da bactéria e liberação de seu conteúdo citoplasmático. Nas bactérias gram positivas, foi observada essa ligação entre a lactoferrina e a membrana da bactéria, porém, ainda não foram constatadas as consequências dessa união (GARCÍA-MONTOYA et al., 2012).

Outra estratégia da lactoferrina é competir pelos sítios de ligação da célula que seriam usados pelos microrganismos, como os glicosaminoglicanos. Outros estudos ainda mostram que a lactoferrina possui a capacidade de se unir a adesina, proteína existente na membrana celular que permite a aderência das bactérias (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005).

### **1.2.2. Atividade antimicrobiana: Vírus**

A atividade antiviral da Lf foi observada em vírus como o Herpesvirus simples 1 e 2, adenovírus, vírus da hepatite C, HIV, calicivírus felino, vírus da FIV, rotavírus, entre outros. Pode ocorrer de 2 formas: se unindo a partícula viral, impossibilitando sua ligação a célula eucariótica, ou ocupando os sítios específicos de ligação na célula, impedindo a fixação do vírus (RODRÍGUEZ-FRANCO et al., 2005).

### **1.2.3. Outras atividades**

A Lf também demonstrou uma grande atuação antiparasitária, imunomoduladora, anti-inflamatória, anticarcinogênica e enzimática. (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2009). Estudos *in vitro* mostraram que a proteína consegue inibir ou destruir alguns protozoários, como o *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* e algumas espécies do gênero *Babesia sp.* Também foi comprovado que pessoas com deficiência ou carência da Lf são mais susceptíveis a infecções. A proteína também induz a produção de anticorpos em presença de componentes alergênicos (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009).

Em relação à atividade anticarcinogênica, a Lf pode induzir a apoptose e consequente a diminuição do crescimento de tumores *in vitro*. Ele também pode bloquear a transição a partir de G1 à S, no ciclo celular de células malignas. A proteína também pode atuar como uma enzima em algumas reações. Quando comparada a outras proteínas do leite, é a que apresenta maiores atividades de DNAase, RNAase e ATPase (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009).

### **1.3. Leucina**

A leucina é um dos 20 aminoácidos que as células do corpo humano utilizam para sintetizar proteínas, porém o mesmo não o produz. Desempenha funções importantes no aumento das proteínas e atua com fonte de energia durante os exercícios físicos, aumentando a resistência e reduzindo a fadiga. É integrante da cadeia ramificada, juntamente com a valina. Atualmente, a suplementação de leucina deixou de ser considerada apenas uma estratégia de oferta de aminoácidos essenciais ramificados. Tal designação deve-se aos potentes efeitos fisiofarmacológicos que a suplementação isolada de leucina é capaz de exercer sobre sistemas de síntese e degradação proteica muscular (NICASTRO et al., 2009).

A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada essencial na síntese proteica e foi recentemente identificada como tendo um papel crítico no metabolismo da insulina e da glicose. (SU et al., 2012). Os aminoácidos essenciais e os aminoácidos de cadeia ramificada da proteína do soro do leite não somente estão presentes em maiores concentrações do que em outras fontes de proteína, como soja, milho e trigo, como também, são eficientemente absorvidos e utilizados (SHE et al., 2013).

## **2. CLARA DO OVO**

A clara representa cerca de 59,0 % do ovo de galinha fresco. Como a gema, a clara do ovo apresenta baixo teor de carboidratos, sendo, entretanto, relativamente abundante em Mg e Na. Contém cerca de 88% de água e teor de proteínas entre 9,8 % e 10,6 % (SIM e NAKAI, 1994). A clara do ovo é um ingrediente essencial que tem sido usado por muitos anos na indústria de alimentos, devido às suas excelentes propriedades tecnológicas. Além disso, possui muitas proteínas biologicamente ativas que poderiam lhe oferecer uma melhor valorização: lisozima como antimicrobiana e antivirótica (NAIDU, 2000), ovotransferrina como um agente antimicrobiano, avidina como carreadora de vitamina e agente antimicrobiano (MINE, 1995), flavoproteína como um estabilizador de vitamina e ovomucina como uma fonte de glicopeptídeos com atividades antiviróticas, antitumor e efeitos imunomodulantes. Além disto, a clara pode ser utilizada como agente espumante (WATANABE et al., 1998).

### **2.1. Ovalbumina**

A ovalbumina representa 54 % das proteínas da clara. Foi obtida na forma cristalina pela primeira vez em 1889 por Hofmeister. É classificada como uma fosfoglicoproteína por possuir carboidratos e fosfatos ligados ao polipeptídeo. Pode ser encontrada nas formas A1, A2, A3 na proporção 85:12:3, respectivamente. A diferença entre essas formas está na quantidade de fósforo ligado à proteína, 2, 1 ou 0 átomo de fósforo por mole de ovalbumina, respectivamente. Esta proteína possui massa molar de 45 kg/mol, uma ponte dissulfeto e quatro grupos sulfidrilo livres que só reagem após a desnaturação da proteína, o que indica que na forma nativa os grupos sulfidrilo estão protegidos em regiões hidrofóbicas da proteína. Cerca de 50 % dos aminoácidos da ovalbumina são hidrofóbicos. Possui uma glicina acetilada no terminal N e prolina no terminal carboxílico. Contém uma única cadeia lateral de carboidrato formada de D-manose (2 %) e N-acetilglicosamina (1,2 %) (STADELMAN et al., 1995; SGARBIERI, 2004)

A ovalbumina possui uma menor superfície hidrofóbica e maior flexibilidade molecular na interface óleo-água do que a lisozima. Ela pode ser desnaturada quando submetida ao calor, pela absorção superficial ou em filmes, através da agitação ou pela ação

de vários agentes desnaturantes (ALLEONI, 2003). Em solução é facilmente desnaturada por exposição de sua superfície (por exemplo, na agitação), mas é relativamente estável ao tratamento térmico. O aquecimento da clara a 62 °C pH 9,0 por 3,5 min alterou entre somente 3 % e 5 % da proteína enquanto que em pH 7,0 praticamente não houve alteração (ALLEONI, 2003).

### **3. POLISSACARÍDEOS**

Os polissacarídeos desempenham um importante papel em todos os organismos vivos, para o fornecimento de energia, integridade estrutural e proteção da célula. A ciência envolvendo o uso dessas substâncias é bem evoluída nos setores de alimentação humana e animal, produção de cosméticos, medicamentos e materiais. No entanto, avanços na utilização de polissacarídeos estão intimamente ligados com a capacidade da comunidade científica de decifrar a complexidade dessas substâncias na natureza, por isso, é necessária a tradução destes conhecidos para maior aplicação prática (PERSIN et al., 2011).

Polissacarídeos são polímeros naturais formados por muitas moléculas de monossacarídeos, ligadas entre si por ligações glicosídicas. Aqueles com aplicações industriais são extraídos de plantas, algas, de animais e fungos ou são obtidos via fermentação microbiana. Nas plantas superiores estes podem ser obtidos de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos (CUNHA et al., 2009).

#### **3.1. Goma arábica**

A goma arábica (GA) é um exsudato de árvores Acacia, a qual possui muitas espécies distribuídas nas regiões de clima tropical e subtropical. As mais importantes áreas de crescimento das espécies que produzem as melhores gomas são o Sudão e a Nigéria (WILLIAMS e PHILLIPS, 2009). Quimicamente, a goma arábica é um heteropolissacarídeo complexo de estrutura muito ramificada, cuja cadeia principal é formada por unidades de D-galactopiranosose, unidas por ligações glicosídicas em  $\beta$  - D- (1 $\rightarrow$ 3). Cadeias laterais com diferentes estruturas químicas formadas de D-galactopiranosose, L-raminose, L-arabinofuranose e ácido D-glucurônico, estão ligadas a cadeia principal por ligação  $\beta$  - (1 $\rightarrow$ 6). É um material heterogêneo, mas geralmente consiste de duas frações. A primeira, que corresponde a 70% da molécula, é composta de cadeia de polissacarídeos, com pouco ou nenhum material nitrogenado. A outra fração possui alto peso molecular, tendo a proteína como uma parte integral da sua estrutura. As estruturas polissacarídicas são covalentemente ligadas ao componente proteico através da hidroxiprolina, e talvez unidades de serina, os dois aminoácidos predominantes no polipeptídeo (WILLIAMS e PHILLIPS, 2009).

De acordo com Klein et al. (2010), esta goma dissolve-se facilmente quando agitada em água e tem sido padrão de excelência como matriz de encapsulamento. É um emulsificante muito bom, com sabor suave e proporciona retenção de voláteis durante o processo de secagem. Além disso, é ideal para o encapsulamento, uma vez que cumpre os papéis de ambos os agentes de uma superfície ativa e a secagem da matriz e sua fácil e rápida solubilidade em água facilita a reconstrução de produtos desidratados, concentrados e a rápida liberação de aromas (AUGUSTIN e HEMAR, 2009).

#### 4. COMPLEXOS PROTEÍNA-POLISSACARÍDEO

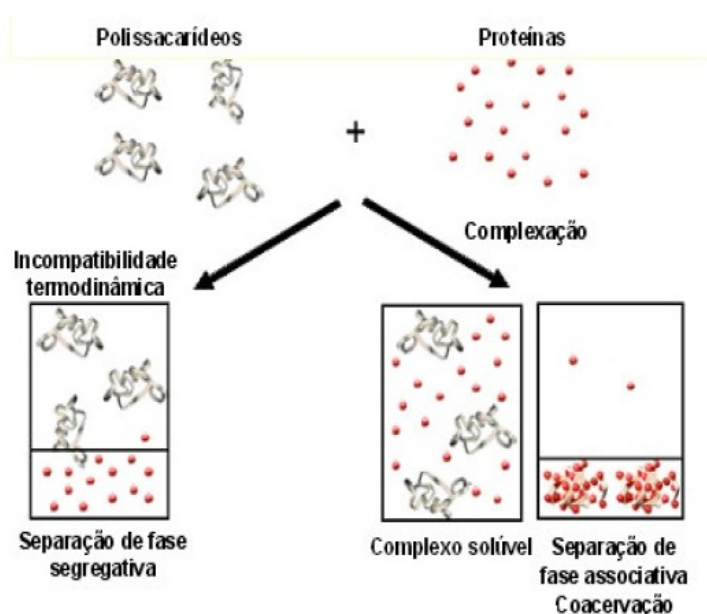
A interação entre proteínas e polissacarídeos constitui uma alternativa tecnológica para a recuperação de proteínas do soro e/ou obtenção de novos ingredientes funcionais. Adicionalmente, pode ser considerada uma tecnologia limpa, que não ocasiona acréscimo de agentes poluidores ao meio ambiente (CAPITANI et al., 2005).

Coacervação é definido pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) como sendo uma separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas. A coacervação complexa é impulsionada pela força de atração dos biopolímeros, contendo cargas opostas, no qual uma fase diluída coloidal interage com uma fase coloidal mais concentrada, sendo esta última chamada de fase de coacervado, como ilustrado na Figura 3 (LV et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

O termo “coacervação complexa” foi criado por Jong e Kruyt em 1929, para definir a interação de dois tipos de biopolímeros, ao contrário de “coacervação simples”, que é baseada em um único biopolímero (LV et al., 2013). Estes complexos insolúveis podem ser utilizados para processos de microencapsulação e na obtenção de diversos ingredientes alimentares. Contudo, para a utilização destes complexos em alimentos industrializados, é necessário fazer um estudo detalhado do seu comportamento frente às variações de pH e temperatura de sistemas alimentares onde podem ser utilizados (CAPITANI et al., 2005).

A interação proteína-polissacarídeo possui diversas aplicações, como por exemplo: na separação de proteínas, como espessantes, estabilizantes em alimentos e na microencapsulação de aromas, na imobilização de enzimas, bem como em cosméticos e medicamentos (HUANG et al., 2012).

Os coacervados são atraentes para a indústria, pois são produtos naturais obtidos a partir de ingredientes de baixo custo e são de fácil aprovação para utilização em alimentos. Além disso, após sua formação, surge um biopolímero com novas propriedades funcionais, normalmente superiores quando comparado ao polímero original (SOUZA et al., 2013).



**Figura 3.** Representação esquemática do comportamento de dispersões entre proteínas e polissacarídeos. Fonte: Camilo (2007).

A interação proteína-polissacarídeo possui diversas aplicações, como por exemplo: na separação de proteínas, como espessantes, estabilizantes em alimentos e na microencapsulação de aromas, na imobilização de enzimas, bem como em cosméticos e medicamentos (HUANG et al., 2012).

#### **4.1. Principais fatores que influenciam a formação dos complexos coacervados:**

Complexos coacervados são líquidos viscosos que consistem em macromoléculas opostamente carregadas. Estas macromoléculas podem ser constituídas por poliânions ou policátions, dependendo do grupo funcional disponível na cadeia (LINDHOUD et al., 2007)

A formação dos coacervados pode ser influenciada por fatores intrínsecos do polímero, como a estrutura e densidade das cargas, bem como por fatores extrínsecos, como o pH, força iônica e temperatura (TURGEON et al., 2007).

O pH pode influenciar a atração eletrostática das cargas, principalmente quando proteínas e outras biomoléculas estão inseridas no sistema, pois estes componentes normalmente são originados de dissociação ou associação com prótons, podendo depois sofrer variação com o pH (LINDHOUD et al., 2007).

A maior parte das interações que ocorrem no processo de coacervação complexa é do tipo eletrostática, por isso é necessário que os valores de pH do meio de reação estejam abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas do soro, onde se apresentam suficientemente protonadas, para que ocorra a reação de complexação com polissacarídeos aniônicos (CAPITANI et al., 2005).

A força iônica do meio e a concentração de polieletrólitos presentes em solução desempenham relevante importância para evitar a supressão do fenômeno. Deve haver uma equivalência elétrica entre as moléculas para que ocorra o ponto ótimo na formação dos complexos coacervados (BURGESS, 1990). Segundo Huang et al. (2012) o maior rendimento dos complexos coacervados ocorre próximo ao pI dos biopolímeros presentes no sistema. Na formação de um coacervado entre WPI (isolado de proteínas do soro) e quitosana, houve um rendimento máximo em uma estreita faixa de pH (6.0 e 6.5) e um rendimento consideravelmente menor em pH acima de 7.0 ou abaixo de 5.5, devido ao baixo grau de ionização e insolubilidade dos biopolímeros.

A temperatura é outro parâmetro que pode influenciar a formação dos complexos coacervados. Liu et al. (2010) demonstraram, através de dados turbidimétricos, que a temperatura entre 4°C e 45°C não influenciou de forma significativa na formação de coacervados entre proteínas de ervilha e goma arábica. Porém, quando utilizada temperatura acima de 55°C, a formação dos complexos foi consideravelmente reduzida. O mesmo foi observado por Girard et al. (2002) utilizando  $\beta$ -lactoglobulina e pectina na formação de coacervados.

Na maioria dos estudos sobre a formação dos complexos coacervados, foi demonstrada uma prevalência de ligações de hidrogênio entre proteínas e polissacarídeos, quando utilizadas baixas temperaturas em sua formação, enquanto em temperaturas mais elevadas ocorre maior formação de ligações hidrofóbicas (HUANG et al., 2012).

#### **4.2. Propriedades funcionais dos complexos coacervados**

As proteínas e polissacarídeos podem contribuir na estrutura e textura das propriedades do alimento, pela sua capacidade de agregação e gelificação. As proteínas são conhecidas por apresentarem a capacidade de emulsificação e formação de espuma,

enquanto os polissacarídeos possuem propriedades de retenção de água e espessamento e as funções de ambos os biopolímeros podem influenciar em outros ingredientes dos alimentos, podendo controlar a estabilidade e propriedades reológicas (DICKINSON, 2003).

#### **4.2.1. Propriedades reológicas e gelificantes**

As propriedades reológicas estão relacionadas com as características moleculares dos biopolímeros, como por exemplo, o seu peso molecular, forma e flexibilidade. Outros fatores são a concentração de biopolímeros e a interação dos biopolímeros com a água, bem como os fatores que cercam essas interações como pH, força iônica e a presença de outros componentes/ligantes. As propriedades reológicas de proteínas e polissacarídeos em condições associativas resultam em comportamentos reológicos diferentes de cada biopolímero individual (SCHMITT e TURGEON, 2011).

O comportamento reológico de vários sistemas mistos entre proteína e polissacarídeos tem sido estudado demonstrando que esse comportamento variou entre viscoso (WEINBRECK et al., 2004) à viscoelástico (WANG et al., 2005).

A estrutura molecular e concentração do polissacarídeo possui grande influência sobre o comportamento reológico dos complexos coacervados. Weinbreck et al. (2004) observaram um comportamento viscoso em sistemas contendo misturas entre isolado proteico de soro de leite (WPI) e goma arábica. A viscosidade máxima foi observada em misturas nas condições de neutralização máxima das cargas dos biopolímeros. Quando polissacarídeos mais lineares são utilizados, como pectina (SINGH et al., 2007) ou goma xantana (WANG et al., 2005) os coacervados foram descritos como um gel elástico.

#### **4.2.2. Estabilidade térmica de proteínas**

Dependendo da natureza dos biopolímeros, a estabilidade térmica de proteínas globulares pode ser melhorada ou prejudicada. Em um estudo sobre a interação entre a  $\beta$ -lactoglobulina e quitosana foi observado que a agregação da proteína foi impedida em presença da quitosana a pH 4,0, um valor de pH onde supostamente não haveria interação (SCHMITT et al., 2001). Logo, a repulsão eletrostática entre proteínas e polissacarídeos poderia evitar interações proteína-proteína que levam a agregação induzidas pelo calor. É importante ressaltar que o aquecimento pode induzir uma estabilidade de complexos de proteína-polissacarídeos contra subseqüente mudanças de pH (BENGOECHEA et al., 2011). Acredita-se que essa estabilização pode ser devido à formação de uma rede de proteínas agregadas com os polissacarídeos localizados internamente. A hipótese ainda precisa ser demonstrada, no entanto, a possibilidade de estabilizar a proteína, frente a tratamentos físicos, com o uso de polissacarídeos é realmente importante para aplicação industrial.

#### **4.2.3. Propriedades morfológicas dos complexos coacervados**

A formação dos complexos coacervados pode resultar em mudanças moleculares das proteínas e dos polissacarídeos. Apesar da existência de muitos estudos sobre a estrutura dos coacervados, ainda há muito a ser investigado em níveis microscópicos.

As alterações moleculares das proteínas podem ocorrer antes ou depois da formação dos coacervados e essas mudanças podem favorecer a complexação, sendo algumas vezes, inclusive, necessárias para que haja a formação do complexo (TURGEON et al., 2007).

Dependendo da força iônica, do comprimento da cadeia do polieletrólito, flexibilidade, densidade de carga e raio de esferas carregadas, uma variedade de estruturas complexas interessantes podem surgir, variando de esfera de "roseta", "bola de tênis", solenóide ou conformações multiloop (TURGEON et al., 2003).

Lollo et al. (2013) constataram através da microscopia óptica e de varredura que os coacervados apresentam superfície porosa e formato irregular, e que suas estruturas estão ligadas entre si através de pequenas pontes formando uma espécie de rede.

De acordo com Ducel et al. (2004) a morfologia dos coacervados depende da natureza das proteínas utilizadas, bem como a massa molecular, do pH e da concentração do polímero, e ainda segundo Favaro-Trindade et al. (2008) o tamanho dos complexos podem variar de 1 a 500 µm.

Através da dispersão de raios-X de pequeno ângulo, (Gummel et al. (2006)) observaram que a estrutura de coacervados formados entre proteínas do soro de leite e goma arábica era densa e estruturada, e que a difusividade entre os dois polímeros era reduzida quando comparado à mistura do biopolímero diluído na fase inicial.

### 4.3. Complexos coacervados: aplicações

A formação dos complexos coacervados tem por objetivo melhorar as características funcionais dos polímeros de origem. Com isso, diversos segmentos industriais utilizam a coacervação complexa como uma alternativa tecnológica, principalmente na encapsulação de compostos ativos. Dentre os principais, destacam-se: indústria de alimentos, higiene pessoal e cosméticos, medicamentos e agropecuários (SCHMITT et al., 1998).

Para efeito de ilustração da versatilidade nas aplicações dos complexos coacervados, a Tabela 2 apresenta exemplos de estudos realizados:

**Tabela 2.** Estudos sobre complexos coacervados e suas aplicações.

<b>Sistema</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Setor</b>	<b>Referência</b>
Gelatina/goma arábica	Microencapsulação de sulfametoxazol	Farmacêutica	Takenaka et al. (1980)
Caseína/glúten	Microencapsulação de pirrolnitrina	Farmacêutica	Yu e Lee (1997)
Caseína/pectina	Microencapsulação de aciclovir	Farmacêutica	CAMILO (2007)
WPI/carragena/goma xantana	Microncapsulação de probióticos	Alimentos Farmacêutica	ROKKA & RONTAMAKI, 2010
Ácido hialurônico/proteína de mexilhão	Microencapsulação de osteoblastos	Medicina	HUANG et al. (2012)
WPI/pectina	Elaboração de queijo do tipo Petit Suisse	Alimentos	Ramírez-Santiago et al. (2012)



Colágeno/quitosana	Microencapsulação de óleo de lavanda	Cosméticos	Ocak (2012)
Proteína de soja/ goma arábica	Microencapsulação de óleo de laranja	Alimentos	Nakagawa e Nagao (2012)

---

## 5. EMULSÕES

As características que interessam em uma emulsão são a capacidade de emulsificação, atividade emulsificante e estabilidade. A capacidade máxima de emulsificação da proteína é determinada no ponto em que se verifica o colapso ou quebra da emulsão. A quebra da emulsão poderá ser percebida de três maneiras diferentes: a) visualmente, pela separação de fases; b) por um som diferente produzido como consequência da separação das fases; c) pela queda de condutividade ou pelo aumento da resistência elétrica (BOUYER et al., 2012).

A estabilidade da emulsão pode ser compreendida como a capacidade da emulsão para conservar a sua estrutura ao longo do tempo. A medida pode ser direta (evolução do tamanho das gotículas ao longo do tempo) ou indireta, através da evolução das quantidades de óleo ou de fase aquosas separadas após um tratamento de desestabilização por centrifugação ou aquecimento (ANTON e GANDEMER, 1997).

### 5.1. Emulsificantes

As emulsões podem ser classificadas em duas categorias: simples ou múltiplas. Na primeira categoria, duas classes podem ser descritas: a emulsão óleo/água e a emulsão água/óleo. As emulsões múltiplas consistem em sistemas mais sofisticados, sendo eles: emulsão óleo/água/óleo ou água/óleo/água. As emulsões também podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho de gota, em três categorias: macroemulsões, microemulsões e nanoemulsões (GROSSIORD e SEILLER, 2001).

Um emulsificante é um composto orgânico que contribui para a estabilidade de uma emulsão devido a sua estrutura molecular anfifílica. Isto é, a sua estrutura contém uma parte apolar que possui afinidade com a gordura, referido como lipofílico, e outra parte polar com afinidade pela água, conhecido como hidrofílico (BOUYER et al., 2012).

A seção lipofílica é quase sempre composta por um ou mais ácidos graxos. A porção atraída para a gordura e geralmente uma estrutura que envolve um grupo de átomos de carbono, muitas vezes, com grupos hidroxila e/ou outras estruturas químicas ligadas. As propriedades anfifílicas dos emulsificantes permitem que as moléculas se alinhem sobre a superfície de um glóbulo de gordura com a porção hidrofílica, na fase aquosa, e a porção lipofílica na gordura. O resultado é um revestimento em torno de toda a superfície da partícula de gordura, que a impede de coalescer (DICKINSON, 2009).

Segundo a legislação vigente Brasil (1997), emulsificante é a substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme contendo fases imiscíveis, pois possui a função de reduzir a tensão interfacial entre elas, além de agir como estabilizante de emulsão óleo em água. Da mesma forma, estabilizante é a substância que torna possível a manutenção de uma dispersão uniforme, já que possuem a capacidade de interferir na estrutura dos alimentos assegurando as características físicas de emulsões e suspensões.

Os agentes emulsionantes são amplamente utilizados na indústria de alimentos para o controle de ingredientes ativos, solubilização e encapsulação. Podem ser classificados em quatro categorias, Bouyer et al. (2012): (I) íons não-surfactantes que podem adsorver na superfície da gota, sem afetar a tensão superficial; (II) pequenos colóides não-surfactantes que adsorvem e formam uma barreira física entre as gotas, assim previnem ou retardam a coalescência; (III) surfactantes monoméricos que diminuem a tensão interfacial e aumentam a estabilidade da emulsão; (IV) surfactantes poliméricos que além de provocar a diminuição da tensão interfacial, também induz ligações esféricas e principalmente eletrostática, alterando a viscosidade na maior parte dos sistemas, melhorando a estabilidade da emulsão.

A fim de utilizar tecnologias limpas, os polímeros naturais veem substituindo os surfactantes sintéticos, que podem ser potencialmente irritantes ao organismo. Todas as proteínas e alguns polissacarídeos têm a capacidade emulsificante, no entanto alguns polissacarídeos tem a capacidade de estabilizar emulsões apenas aumentando a viscosidade da fase contínua, enquanto associados às proteínas, possuem uma maior capacidade emulsificante (BOUYER et al., 2012).

A interação entre proteínas e polissacarídeos pode ajudar a manter e até otimizar a propriedade emulsificante das proteínas nas faixas de pH próximo ao ponto isoelétrico. A superfície ativa dos complexos proteínas-polissacarídeos, pode ainda, contribuir para a estabilidade das emulsões por aumentar a viscosidade da fase aquosa imediatamente adjacente à interface da emulsão. Geralmente os polissacarídeos são poucos sensíveis à presença de sais no meio e mudanças de pH (ELIAS et al., 2006).

Cabe ainda ressaltar, que tanto as proteínas de soro de leite, como as proteínas do ovo são biopolímeros que naturalmente possuem a capacidade de atuar como agentes emulsificantes, resultando num grande potencial de uso na indústria de alimentos (WANG et al., 2007).

## 6. REFERÊNCIAS

- ALLEONI, A. C. C. Propriedades funcionais do albume e qualidade de ovos de galinha cobertos com concentrado proteico de soro de leite bovino. 2003.
- ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. **J Food Sci**, v. 62, n. 3, p. 484-487, 1997.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Editora Manole Ltda, 2003.
- AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 4, p. 902-912, Apr 2009.
- BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1227-1232, 2011.
- BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **Int J Pharm**, v. 436, n. 1-2, p. 359-378, Oct 15 2012.
- BRASIL. **Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego**. Diário Oficial da União: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária 1997.
- \_\_\_\_\_. **Instrução Normativa n.51**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da União 2002.
- BURGESS. *Practical analysis complex coacervates*. 1990.
- CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. 2007. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesq. Agropec. Bras.. Brasília-DF**, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.
- CUNHA, P. L. R. D.; PAULA, R. C. M. D.; FEITOSA, J. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003.
- \_\_\_\_\_. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, 2009.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, 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, n. 2-3, p. 239-247, 2004.

EISSA, A. S. Newtonian viscosity behavior of dilute solutions of polymerized whey proteins. Would viscosity measurements reveal more detailed molecular properties? **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 200-205, 2013.

ELIAS, F.; CAPITANI, C.; MOLINA, S.; AÑÓN, M.; PACHECO, M. Propriedades emulsificantes de complexos de proteínas de soro de leite com polissacarídeos. **Brazilian Journal of Food Technology. III JIPCA**, p. 75-80, 2006.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. D.; ROCHA, G. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

GARCÍA-MONTOYA, I. A.; CENDÓN, T. S.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 226-236, 2012.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Interbiopolymer complexing between  $\beta$ -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 6, p. 585-591, 2002.

GONZALEZ-CHAVEZ, S. A.; AREVALO-GALLEGOS, S.; RASCON-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 4, p. 301-308, Apr 2009.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 4, p. 301-308, 2009.

GROSSIORD, J.; SEILLER, M. W/O/W multiple emulsions: a review of the release mechanisms by break-up of the oily membrane. **STP pharma sciences**, v. 11, n. 5, p. 331-339, 2001.

GUMMEL, J.; BOUÉ, F.; DEMÉ, B.; COUSIN, F. Charge stoichiometry inside polyelectrolyte-protein complexes: a direct SANS measurement for the PSSNa-lysozyme system. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 49, p. 24837-24846, 2006.

HUANG, G. Q.; SUN, Y. T.; XIAO, J. X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chem**, v. 135, n. 2, p. 534-539, Nov 15 2012.

KLEIN, M.; ASERIN, A.; SVITOV, I.; GARTI, N. Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 75-81, May 1 2010.

LINDHOUD, S.; DE VRIES, R.; NORDE, W.; STUART, M. A. C. Structure and stability of complex coacervate core micelles with lysozyme. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 7, p. 2219-2227, 2007.

LIU, S.; ELMER, C.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 489-495, 2010.

LOLLO, P. C. B.; BATISTA, T. M.; MOURA, C. S.; MORATO, P. N.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; CARNEIRO, E. M.; AMAYA-FARFAN, J. l-Leucine supplemented whey protein. Dose–response effect on heart mTOR activation of sedentary and trained rats. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 543-550, 8// 2013.

LV, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 323-332, 2013.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 225-232, 1995.

NAIDU, A. **Natural food antimicrobial systems**. CRC press, 2000.

NAKAGAWA, K.; NAGAO, H. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin–acacia complex coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 411, p. 129-139, 2012.

NICASTRO, H.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; COSTA, A. D. S.; LANCHA JUNIOR, A. H. Suplementação de leucina: nova estratégia antiatrófica? **Warning: get\_class () expects parameter 1 to be object, array given in < b>/home/abadan/web/tmp1/ojs-2.2.2/classes/cache/GenericCache. inc. php</b> on line< b> 63</b>< br/> REMEFE-Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 8, n. 1, 2009.

OCAK, B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of environmental management**, v. 100, p. 22-28, 2012.

PERSIN, Z.; STANA-KLEINSCHKE, K.; FOSTER, T. J.; VAN DAM, J. E.; BOERIU, C. G.; NAVARD, P. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 22-32, 2011.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **J Environ Manage**, v. 110, p. 48-68, Nov 15 2012.

QI, P.; ONWULATA, C. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2231-2244, 2011.

QUINTIERI, L.; CAPUTO, L.; MONACI, L.; DESERIO, D.; MOREA, M.; BARUZZI, F. Antimicrobial efficacy of pepsin-digested bovine lactoferrin on spoilage bacteria contaminating traditional Mozzarella cheese. **Food microbiology**, v. 31, n. 1, p. 64-71, 2012.

RAMÍREZ-SANTIAGO, C.; LOBATO-CALLEROS, C.; ESPINOSA-ANDREWS, H.; VERNON-CARTER, E. J. Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 4, p. 383-398, 2012.

RODRÍGUEZ-FRANCO, D. A.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; RAMOS-CLAMONT, M. G. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. **Rev Latino-am Microbiol**, v. 47, p. 101-111, 2005.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C.; DE KRUIF, C. G.; HARDY, J. Study of beta-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 267-280, Mar 2001.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 167, n. 1-2, p. 63-70, Sep 14 2011.

SERRANO, M. E. D. Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. **Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas**, v. 38, n. 3, p. 30-38, 2007.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev Nutr**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHE, P.; OLSON, K. C.; KADOTA, Y.; INUKAI, A.; SHIMOMURA, Y.; HOPPEL, C. L.; ADAMS, S. H.; KAWAMATA, Y.; MATSUMOTO, H.; SAKAI, R. Leucine and Protein Metabolism in Obese Zucker Rats. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59443, 2013.

SIM, J. S.; NAKAI, S. **Egg uses and processing technologies: new developments**. Cab International, 1994.

SINGH, S. S.; SIDDHANTA, A. K.; MEENA, R.; PRASAD, K.; BANDYOPADHYAY, S.; BOHIDAR, H. B. Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers. **Int J Biol Macromol**, v. 41, n. 2, p. 185-192, Jul 1 2007.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA ROJAS, E. E.; MELO, N. R.; GASPAR, A.; LINS, J. F. C. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 375-381, 2013.

STADELMAN, W. J.; NEWKIRK, D.; NEWBY, L. **Egg science and technology**. CRC Press, 1995.

SU, Y.; LAM, T. K.; HE, W.; POCAI, A.; BRYAN, J.; AGUILAR-BRYAN, L.; GUTIÉRREZ-JUÁREZ, R. Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 85-93, 2012.

TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S. Y. Micromeritic properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin–acacia coacervation. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 69, n. 5, p. 513-516, 1980.

TURGEON, S.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 4, p. 401-414, 2003.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 166-178, 2007.

WANG, X.; LEE, J.; WANG, Y. W.; HUANG, Q. Composition and rheological properties of beta-Lactoglobulin/pectin coacervates: effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 3, p. 992-997, Mar 2007.

WANG, X.; LI, Y.; LI, J.; WANG, J.; WANG, Y.; GUO, Z.; YAN, H. Salt effect on the complex formation between polyelectrolyte and oppositely charged surfactant in aqueous solution. **J Phys Chem B**, v. 109, n. 21, p. 10807-10812, Jun 2 2005.

WATANABE, K.; TSUGE, Y.; SHIMOYAMADA, M.; OGAMA, N.; EBINA, T. Antitumor effects of pronase-treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system. **J Agric Food Chem**, v. 46, n. 8, p. 3033-3038, 1998.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3550-3555, 2004.

WILLIAMS, P.; PHILLIPS, G. Gum arabic. **Handbook of hydrocolloids**, p. 252-273, 2009.

YU, J.-Y.; LEE, W.-C. Microencapsulation of pyrrolnitrin from *Pseudomonas cepacia* using gluten and casein. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n. 5, p. 444-448, 1997.

## **CAPÍTULO II**

### **FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE LACTOFERRINA E GOMA ARÁBICA.**



## RESUMO

Proteínas e polissacarídeos são os hidrocolóides mais utilizados na indústria de alimentos e sua interação pode fornecer produtos, como os complexos coacervados, que podem ser utilizados como ingredientes, biomateriais ou nos sistemas de microencapsulação. No presente trabalho, foi estudada a interação entre a lactoferrina (Lf 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 e 1 % m/m) e goma arábica (GA 0,1 % m/m) em diferentes concentrações de NaCl (0, 0,01, 0,025, 0,3 0,5 mol/L) e diferentes faixas de pH (1,0 até 12,0). O pH de formação (maior turbidez) dos complexos coacervados insolúveis ( $pH_{\emptyset 1}$ ), variou de acordo com a quantidade de NaCl empregado no sistema (pH 3,5 a 5,3), valores estes abaixo do ponto isoelétrico da Lf (8,0), quando está mais carregada positivamente, gerando uma ligação eletrostática. Próximo ao pH 2,0, esta ligação torna-se mais fraca levando a solubilização dos precipitados formados resultando em uma brusca diminuição da turbidez ( $pH_{\emptyset 2}$ ). As amostras que continham uma menor concentração de Lf (0,1, 0,2 e 0,3% m/m), apresentaram uma maior turbidez e consequentemente tiveram maior formação de precipitados. Ainda entre estas amostras, as que continham concentração salina de 0,3 mol/L apresentaram maior turbidez e deslocamento dos pontos de  $pH_{\emptyset 1}$  e  $pH_{\emptyset 2}$ . Potencial- $\zeta$  (Potencial zeta) e tamanho de partícula foram utilizados para estudar a influência do pH, força iônica e temperatura na interação entre os biopolímeros. Foi observado que a formação de macromoléculas ocorreu entre o ponto isoelétrico da proteína (8,0) e o pka do polissacarídeo (2,0) e certa concentração salina (0,25 mol/L) propiciou maiores tamanhos de partícula. Foi observado que ao pH 7,0, a concentração de 0,1% GA foi capaz de estabilizar a desnaturação da proteína em soluções contendo 0,1% Lf, apresentando tamanho de partícula constante em todas as temperaturas estudadas.

**Palavras-chave: proteínas do soro, coacervação, complexo polimérico**

## ABSTRACT

Proteins and polysaccharides are the most used hydrocolloids in the food industry and their interaction can provide products like complexes coacervates, which can be used as ingredients, biomaterials or in microencapsulation systems. In the present work was studied the interaction between lactoferrin (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 and 1% w/w) and gum Arabic (0.1% w/w) with different concentrations of NaCl (0, 0.01, 0.025, 0.3 0.5 mol/L) and different pH ranges (1.0 to 12.0). The formation pH (higher turbidity) of the insoluble complex coacervates ( $pH_{\emptyset 1}$ ), varied according to the amount of NaCl employed in the system (pH 3.5 to 5.3), these values below the isoelectric point of lactoferrin (8.0), when it is more positively charged, generating an electrostatic binding. Close to pH 2.0, this bond becomes weaker leading to solubilization of precipitates formed resulting in a sudden decrease in turbidity ( $pH_{\emptyset 2}$ ). Samples containing a lower concentration of Lf (0.1, 0.2 and 0.3% m/m), showed a greater turbidity and consequently had a higher formation of precipitates or aggregates. Even among these samples which contained salt concentration of 0.3 mol/L, showed higher turbidity and displacement of points of  $pH_{\emptyset 1}$  and  $pH_{\emptyset 2}$ .  $\zeta$ -Potential (zeta potential) and particle size were used to study the influence of pH, ionic strength and temperature on interaction between biopolymers. It was observed that the formation of macromolecules occurred between the isoelectric point of the protein (8.0) and the pka of polysaccharide (2.0) and certain salt concentration (0.25 mol/L) led to larger particle sizes. It was observed that at pH 7.0, the concentration of 0.1% GA was able to stabilize the denaturation of the protein in solutions containing 0.1% Lf, showing constant particle size at all temperatures studied.

**Key-words: whey proteins; coacervation; polymeric complex**

## 1. INTRODUÇÃO

A interação entre proteínas e polissacarídeos é um fenômeno físico-químico que desempenha importantes funções no controle da estrutura, textura e estabilidade dos alimentos, bem como dos sistemas que os envolvem, como revestimentos e embalagens. (HUANG et al., 2012). Em um sistema contendo mistura entre polissacarídeos e proteínas (biopolímeros), a formação dos complexos coacervados é influenciada pelas características dos compostos envolvidos, como a densidade de carga, peso molecular (LV et al., 2013), natureza química e proporção entre os polímeros (RU et al., 2012; SOUZA et al., 2013), e também das condições envolvidas no sistema, como pH, força iônica (LIU et al., 2010) e tipo de íon (WANG et al., 2007). Efeitos externos como temperatura (BENGOECHEA, JONES, et al., 2011; HUANG et al., 2012) cisalhamento e pressão também podem afetar a formação e estabilidade dos complexos (BÉDIE et al., 2008).

A formação de complexos coacervados entre proteínas e polissacarídeos vem sendo amplamente estudada (REMUNAN-LOPEZ e BODMEIER, 1996; SCHMITT et al., 1999; MAYYA et al., 2003; GUMMEL et al., 2006; LIU et al., 2010; HUANG et al., 2012; LV et al., 2013; SOUZA et al., 2013) para o desenvolvimento de novos produtos em diversos ramos da indústria, como a farmacêutica, cosmética e de alimentos, devido à possibilidade de serem empregados produtos naturais substituindo ingredientes sintéticos (BENGOECHEA, JONES, et al., 2011). As proteínas de soro de leite vêm sendo cada vez mais empregadas nestes sistemas devido as suas propriedades funcionais (SCHMITT et al., 1999; WEINBRECK et al., 2004; BENGOECHEA, JONES, et al., 2011)

Neste estudo, foi utilizada a proteína globular lactoferrina (Lf) e o polissacarídeo goma arábica (GA) para a formação dos complexos coacervados. A Lf proveniente do leite bovino é uma glicoproteína de cadeia única, com peso molecular de 80 KDa e possui cerca de 700 aminoácidos e ponto isoelétrico (pI) próximo a 8.0 (BENGOECHEA, JONES, et al., 2011). Possui a função de transportar ferro, apresentando em sua cadeia dois lóbulos com capacidade reversível de se ligar a dois átomos de  $Fe^{3+}$  e dois íons  $CO_3^{2-}$  que atua sinergicamente com o  $Fe^{3+}$  (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009). Além disso, é considerada uma proteína multifuncional, representando importante papel no sistema biológico, como a absorção de ferro intestinal durante a amamentação de recém-nascidos, além das atividades antibacterianas, antifúngicas, antiviral, anti-inflamatória e imunorreguladora (BALCÃO et al., 2013).

A GA é um polieletrólito aniônico amplamente utilizado na indústria devido a sua alta solubilidade e baixa viscosidade em altas concentrações, possuindo boa capacidade emulsificante e encapsulante. (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2007). É composto por uma mistura entre polissacarídeos que possuem três frações que variam de acordo com seu peso molecular e composição de proteína, sendo esta: 90-99% de arabinogalactana e 1% de glicoproteína (KLEIN et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi estudar a interação entre a lactoferrina e goma arábica na formação de complexos coacervados, avaliando a influência da concentração de proteína, pH, força iônica e temperatura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. MATERIAL**

A lactoferrina desidratada (Bioferrin® 2000) foi obtida a partir da empresa Glanbia Nutricionais (Fitchburg, EUA) e a composição reportada foi de: 95% de proteína, 5,0% de umidade, 0,5% de gordura, 2,0% de minerais. O polissacarídeo goma arábica (51198) foi obtido a partir da empresa Sigma e Aldrich (St. Luis, EUA) e o cloreto de sódio a partir da empresa Vetec (RJ, Brasil). Neste experimento foram utilizados reagentes analíticos e água deionizada (Master P & D, Gehaka, São Paulo, Brasil, condutividade 0,05  $\mu\text{cm} \pm 0,01$ ).

### **2.2. MÉTODO**

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de engenharia e tecnologia agroindustrial (LETA), localizado na Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Volta Redonda, RJ, Brasil.

#### **2.2.1. Preparo das soluções**

A goma arábica foi pesada em balança analítica (B-TEC-210, Tecnal, Brasil) para preparo de uma solução contendo concentração fixa de 0,1% m/m e solubilizada em água deionizada, utilizando agitador magnético (NT101, Novatecnica, Brasil) durante 30 minutos. Diferentes concentrações de proteína foram previamente pesadas para preparo de soluções contendo: 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 e 1% m/m. Em um sistema com mesmo volume total, diferentes razões de proteína / polissacarídeo foram avaliadas com as seguintes concentrações de sal (NaCl): 0, 0,01, 0,25, 0,3 e 0,5 mol/L, sendo assim, a proporção proteína / polissacarídeo variou de 1:1 à 10:1, sendo 1 parte de proteína para uma parte de polissacarídeo até 10 partes de proteína para uma parte de polissacarídeo, respectivamente.

#### **2.2.2. Titulação turbidimétrica**

A turbidez dependente do pH foi avaliada com o auxílio de um espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, Inglaterra) em um comprimento de onda de 400 nm, seguindo a metodologia proposta por Weinbreck et al. (2004). O espectrofotômetro foi calibrado para 100% de transmitância com água deionizada. A turbidez foi definida como  $T = -\ln(I/I_0)$ . A solução contendo a definida razão de proteína / polissacarídeo e sua respectiva concentração de NaCl teve seu pH ajustado com HCl, 0,5 mol/L e NaOH 0,25 mol/L, com o auxílio de um agitador magnético. Após a adição de uma pequena gota de HCl, o pH desta solução foi monitorado com auxílio de um pHmetro de bancada (mPA-210, Tecnopon, Brasil) e em seguida um alíquota de 2 mL foi retirada para aferição do valor de turbidez. Todas estas titulações foram aferidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) com quatro replicatas, sendo o intervalo entre as aferições de aproximadamente 1 minuto.

#### **2.2.3. Influência da temperatura na interação entre os biopolímeros**

A turbidez das soluções contidas em uma cubeta de quartzo foi analisada utilizando um espectrofotômetro (LIBRA S12, Biochrom, Inglaterra) com comprimento de onda de 400 nm. Primeiramente, as três amostras com suas respectivas proporções proteína/polissacarídeo

e concentrações de sal que obtiveram os maiores valores de turbidez na titulação turbidimétrica, foram preparadas ajustando-se o pH para 7.0. Seguindo a metodologia adaptada de Bengoechea, Jones, et al. (2011), as amostras foram adicionadas às cubetas vedadas e submetidas ao aquecimento em banho termostático com precisão de 0,05°C (MPC-108A, Huber, Offenburg, Alemanha) em temperatura variando de 25 a 90°C. As amostras foram submersas por 10 minutos a cada temperatura e após, a cubeta foi imediatamente transferida para o espectrofotômetro para leitura dos valores de transmitância em quatro replicatas, sendo a turbidez definida como  $100 - \% T$ . Logo, as amostras foram congeladas durante 24 horas e liofilizadas (Enterprise, Terroni, São Carlos, Brasil) para posterior caracterização.

#### **2.2.4. Potencial- $\zeta$ e tamanho de partícula**

As análises de potencial  $-\zeta$  e tamanho de partícula foram realizadas com auxílio do instrumento Zeta sizer nano (Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Inicialmente, as amostras (8 mL) foram acondicionadas em um titulador (MPT-2, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) contendo HCl 0,5 mol/L, NaOH 0,25 mol/L e NaOH 0,025 mol/L e as análises foram conduzidas em função do pH (1,0-12,0).

Na análise da influência da temperatura em relação à estabilidade da proteína, as amostras primeiramente foram submetidas ao aquecimento em banho termostático com precisão de 0,05°C (MPC-108A, Huber, Offenburg, Alemanha) ficando submersas por 10 minutos em cada temperatura (25-90°C com intervalo de 5°C) e logo, transferidas imediatamente ao Zeta sizer nano para análise do diâmetro de partícula.

#### **2.2.5. Difração de raios X (DRX)**

A estrutura interna dos complexos coacervados liofilizados (Enterprise, Terroni, São Carlos, Brasil) foi caracterizada empregando um difratômetro de raios X (Zimadzu, Japão) para avaliar a cristalinidade das partículas. A análise foi realizada utilizando velocidade de varredura de  $2\theta/\text{min}$  e condições de trabalho de 40 kv a 40 mA.

#### **2.2.6. Microscopia óptica**

A fase líquida superior das amostras foi removida com uma pipeta, o precipitado ressuspenso em 3,0 mL de água deionizada e uma alíquota de 1 mL foi tomada para ser observada por meio de um microscópio óptico (DFC 295, Leica Microsystems, Alemanha) amplificado 50x com câmera acoplada.

#### **2.2.7. Microscopia de força atômica**

Para obtenção das imagens no AFM (Nanosurf FlexAFM, Woburn, EUA) a solução contendo as misturas de polímeros que foram submetidas à variação de temperatura, foi diluída em água deionizada em proporção 1:200 e uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  foi adicionada ao centro de uma mica contida em uma lâmina para microscopia. Após, foi acondicionada em dessecador durante 24 horas para secagem da amostra.

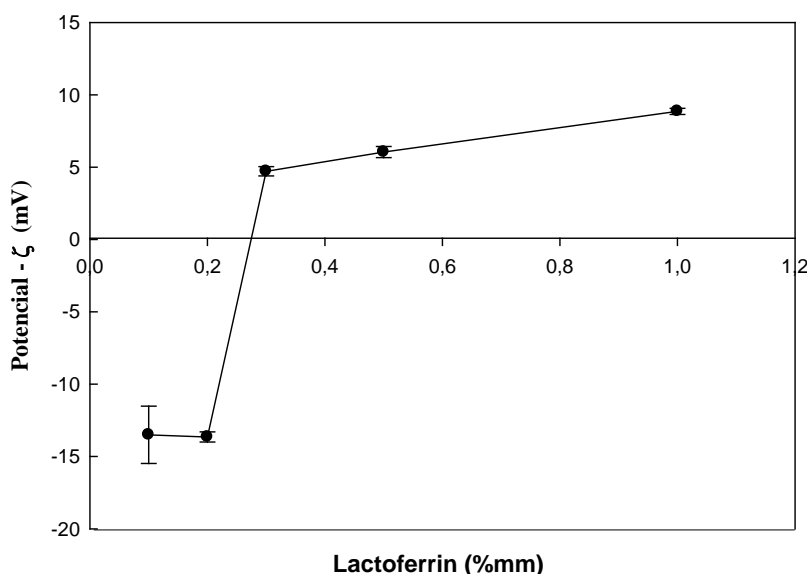
### 2.3. Análises estatísticas

As análises de turbidez foram realizadas com quatro replicatas. Os valores de potencial-  $\zeta$  e tamanho de partícula foram obtidos a partir da média de pelo menos 50 medições para cada pH e os resultados são apresentados com média e desvio padrão calculados ( $p < 0,5$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Efeito da concentração de lactoferrina na formação dos complexos coacervados

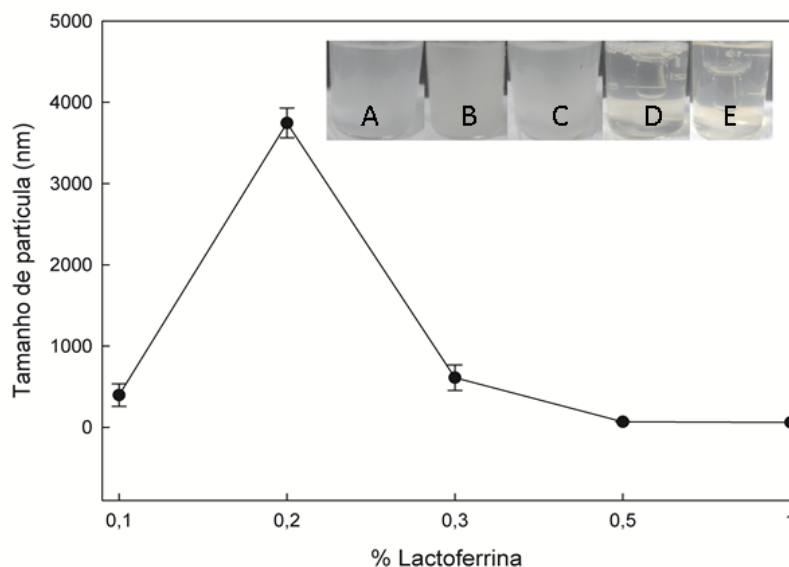
O comportamento individual dos biopolímeros é influenciado pela presença de outros biopolímeros à mistura (TOLSTOGUZOV, 1991). Nas análises de diâmetro de partícula a seguir, foi utilizada a concentração de NaCl (0,25 mol/L) que proporcionou maiores valores de turbidez na titulação turbidimétrica, indicando maior formação de macromoléculas. Na Figura 1, podemos observar a influência da concentração de proteína através do potencial-  $\zeta$  em diferentes amostras contendo mistura entre os biopolímeros no pH (4,0) e concentração salina (0,25 mol/L) onde houve a maior turbidez, indicando a interação entre os mesmos.



**Figura 1.** Potencial-  $\zeta$  das amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina. GA: 0,1%; NaCl: 0,25 mol/L; pH: 4,0; T:25°C

Pode-se observar que não houve variação na carga elétrica entre as amostras contendo 0,1 e 0,2 %Lf, porém, entre as concentrações de 0,3 e 1,0 %Lf, as soluções tiveram sua carga elétrica deslocada positivamente, passando da carga negativa à positiva, deduzindo-se a maior presença de proteína solúvel na solução (não associada ao polissacarídeo). Os dados também podem sugerir que uma concentração de até 0,2 % Lf é o suficiente para saturar as moléculas de polissacarídeo, como também foi observado por Weinbreck et al. (2003) que ao avaliar a formação de complexos coacervados entre o isolado proteico do soro de leite (WPI) e a goma arábica, observou que conforme foi aumentada a concentração de proteína e consequentemente a concentração total dos biopolímeros no sistema, observou a diminuição

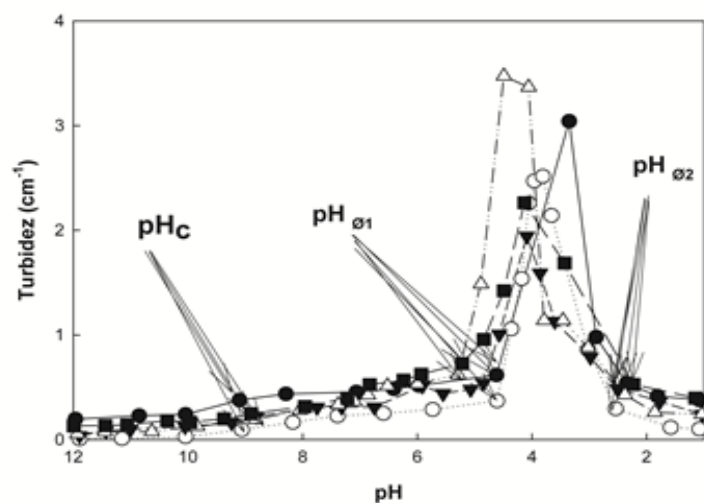
da formação de precipitados insolúveis. Os resultados apresentam-se de acordo com os mostrados na Figura 2, onde os diâmetros de partícula em relação à concentração de Lf estão representados, podendo ser visualizado um aumento significativo nos diâmetros de partícula das amostras que continham 0,2% Lf, caracterizando na formação de macromoléculas devido uma maior interação e saturação do polissacarídeo. O mesmo foi relatado por Bengoechea, Jones, et al. (2011) ao avaliar a formação de complexos coacervados entre a lactoferrina e pectina, demonstrando que a concentração de 0,2 %Lf foi a que proporcionou maior formação de precipitados insolúveis.



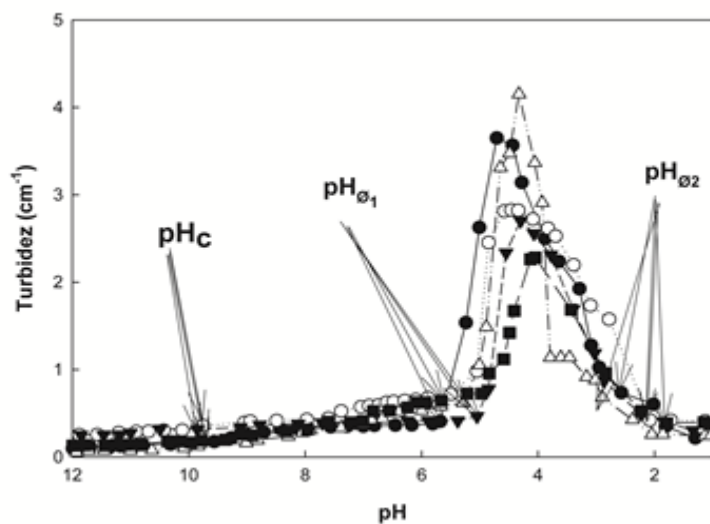
**Figura 2.** Tamanho de partícula das amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina. GA: 0,1%; NaCl: 0,25 mol/L; pH: 4,0; T:25°C. Fotografias destas amostras (A: 0,1, B:0,2, C: 0,3, D: 0,5 e E: 1% Lf).

### 3.2. Influência do pH e força iônica na formação dos complexos coacervados

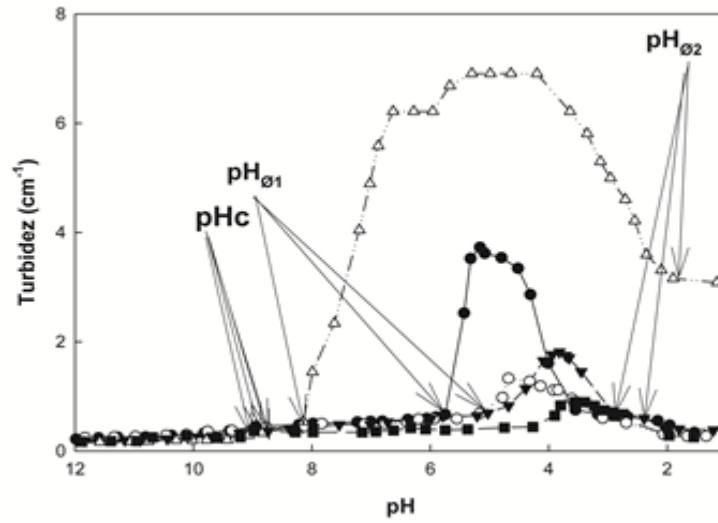
Os valores de turbidez em relação ao pH nos sistemas contendo diferentes proporções e concentrações de sal, podem ser visualizados nas Figuras 3-7.



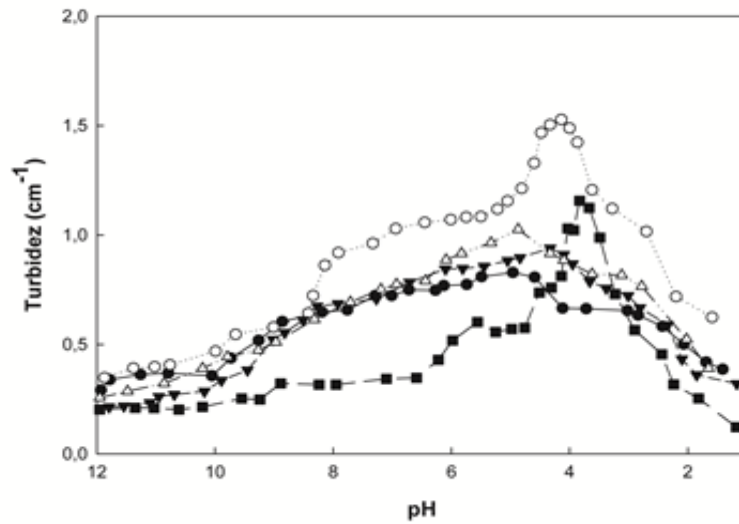
**Figura 3:** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 1:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.



**Figura 4:** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 2:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.

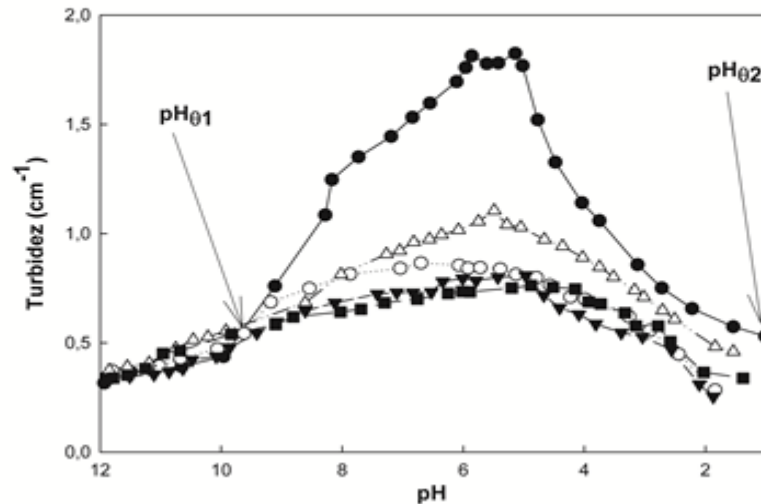


**Figura 5:** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 3:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.



**Figura 6:** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 5:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.





**Figura 7:** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo Lf/GA na proporção de 10:1 com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (○) NaCl 0,01 mol/L; (Δ) NaCl 0,25 mol/L; (●) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.

Nas Figuras 3 a 5 pode ser observado que os valores de turbidez se mantiveram praticamente constantes entre o pH 12,0 e 10,0, não ocorrendo um aumento significativo da mesma, indicando que os polímeros se apresentavam ainda na forma solúvel. Próximo ao pH 9,0 observamos um aumento gradativo da turbidez, sendo este pH denominado como  $pH_c$  (pH crítico) onde ocorre a fase de formação de complexos solúveis. Baseado em estudos anteriores (SEYREK et al., 2003; LAOS et al., 2007) estes complexos solúveis são formados acima do PI da proteína (FUJIMOTO et al.). Nesta faixa de pH há presença de fraca interação eletrostática e alta carga líquida entre os biopolímeros, enquanto na fase de coacervado existe forte interação eletrostática e baixa carga líquida (MCCLEMENTS et al., 2009). Entre o pH 5,0 e 4,5, houve um aumento abrupto da turbidez, e a solução passou do aspecto transparente ao turvo ( $pH_{\theta 1}$ ). Esta fase é caracterizada pelo surgimento da fase de coacervado ou de separação, onde o polissacarídeo apresenta-se com cargas negativas e a proteína com carga positiva, ocorrendo interação eletrostática e formação de precipitados insolúveis (TURGEON et al., 2003; DE KRUIF et al., 2004).

Próximo ao pH 4,0, a turbidez apresentou seu valor máximo tornando a solução completamente turva. O aumento da turbidez indica a formação de uma suspensão coloidal aparentemente estável de biopolímeros suficiente para promover a dispersão de luz (BENGOECHEA, JONES, et al., 2011). Entre o pH 3,0 a 2,5 iniciou-se o processo de dispersão da fase de complexado acarretando na diminuição da turbidez, até que próximo ao pH 2,0 a solução ficou totalmente transparente indicando o fim da complexação, sendo este ponto conhecido como  $pH_{\theta 2}$ . Resultados similares foram observados por Bengoechea, Jones, et al. (2011) e Weinbreck et al. (2003) ao avaliarem a formação de complexos coacervados entre lactoferrina/pectina e WPI/goma arábica, respectivamente, observando um aumento máximo da turbidez próximo ao pH 4,0 e ocorrendo a diminuição abrupta da mesma próximo ao pH

2,0. Neste pH a GA apresentou ponto de carga zero, perdendo grande parte das sua carga negativa, o que levaria a ligações eletrostáticas mais fracas, provocando a solubilização dos precipitados formados anteriormente (TURGEON et al., 2007).

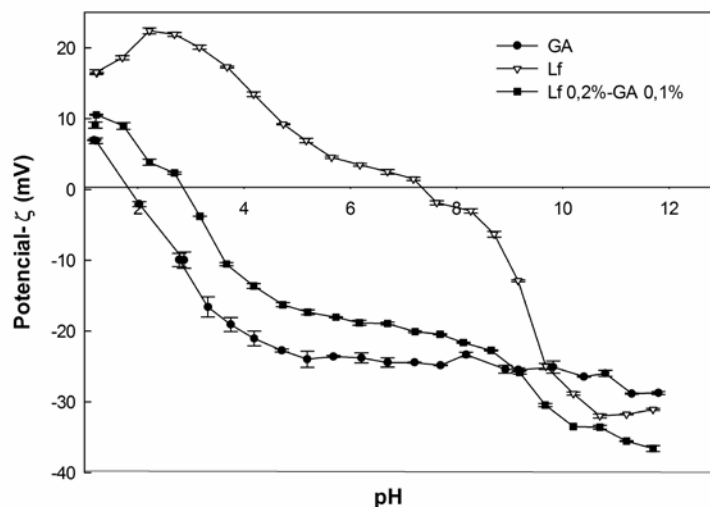
Nas figuras 6 e 7 podemos observar que quando utilizadas maiores concentrações de Lf (0,5 e 1% Lf, respectivamente) a turbidez reduziu significativamente quando comparada aos sistemas contendo menores concentrações da proteína. O mesmo foi observado por Priftis e Tirrell (2012) ao estudar a formação de complexos coacervados entre polipeptídeos-lisina e ácido glutâmico, observando que quando os polímeros estavam em concentrações mais próximas apresentavam maiores valores de turbidez, devido ao fato de os polímeros apresentarem mais sítios disponíveis para ligação. Quando a concentração da proteína está em excesso, sugere-se que as moléculas que não se ligaram ao polissacarídeo, estejam solúveis na solução superando a quantidade de moléculas ligadas, logo, não sendo capaz de proporcionar o aumento da turbidez. Ilustrando a influência do pH sobre a turbidez macroscopicamente, a Figura 8 contém fotografias da solução contendo 0,2 %Lf/0,1 %GA em diferentes pH ao longo da titulação turbidimétrica.



**Figura 8.** Fotografias de soluções contendo 0,2% Lf/ 0,1% GA com concentração de NaCl de 0,25 M em diferentes pH, sendo: A: pH 12,0; B: pH 7,1; C: pH 5,0; D: pH 4,1; E: pH 2,8 e F: pH 2,0.

A fim de avaliar as características eletrostáticas de cada biopolímero, bem como avaliar o comportamento dos polímeros associados, foi realizada a análise de potencial- $\zeta$  das misturas que apresentaram maiores valores de turbidez (0,2%Lf/0,1% GA) em sua respectiva concentração salina (0,25 mol/L), e da Lf (0,2% m/m) e GA (0,1% m/m) isoladamente.

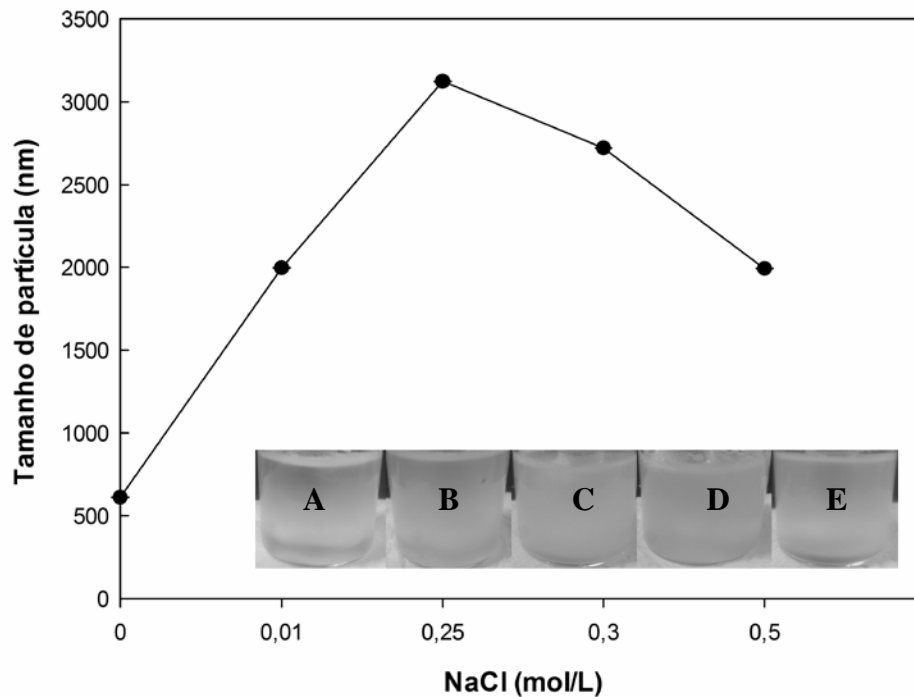
Observando a Figura 9 podemos visualizar que a Lf apresentou mudança na carga elétrica na solução individual de proteína, indo da carga negativa no pH 11,8 à positiva no pH 1,0 com ponto de carga zero (pI) próximo a 8,0, como relatado na literatura (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009). Em contra partida, a GA é um polissacarídeo aniônico, portanto, apresentou carga negativa do pH 11,8 ao pH 2,0, apresentando  $pK_a$  próximo ao pH 2,0, como também foi observado por Schmitt et al. (1999). Pode-se observar que os valores encontrados para a mistura contendo os dois polímeros são intermediários aos valores dos polímeros isolados. Os valores máximos de turbidez foram encontrados próximo ao pH 4,0, onde a GA apresenta-se com cargas negativas por estar acima do seu  $pK_a$  e a proteína encontra-se totalmente protonada por estar em pH abaixo do seu pI (SOUZA et al., 2013). Segundo Bengoechea, Jones, et al. (2011) este comportamento indica a interação entre os grupamentos carboxila do polissacarídeo aos grupamentos amina da proteína, caracterizando uma ligação eletrostática.



**Figura 9.** Potencial- $\zeta$  das amostras contendo 0,1% GA, 0,2%Lf e das misturas contendo 0,2%Lf/0,1%GA em diferentes pH. (NaCl: 0,25 mol/L; Temperatura: 25°C).

Para confirmar a influência da força iônica, foram utilizadas amostras contendo a proporção Lf/GA que apresentaram os maiores valores de turbidez, desta vez, adicionando as respectivas concentrações de NaCl estudadas na formação dos complexos. Logo, foram utilizadas amostras contendo 0,2%Lf/0,1%GA e diferentes concentrações de sal, como mostra a Figura 10, e podemos observar que o diâmetro das partículas tendeu ao aumento de acordo com a adição de sal no sistema (0,1 a 0,25 mol/L NaCl), apresentando tamanho máximo nas amostras contendo 0,25 mol/L NaCl (>3  $\mu\text{m}$ ), indicando a formação de macromoléculas.

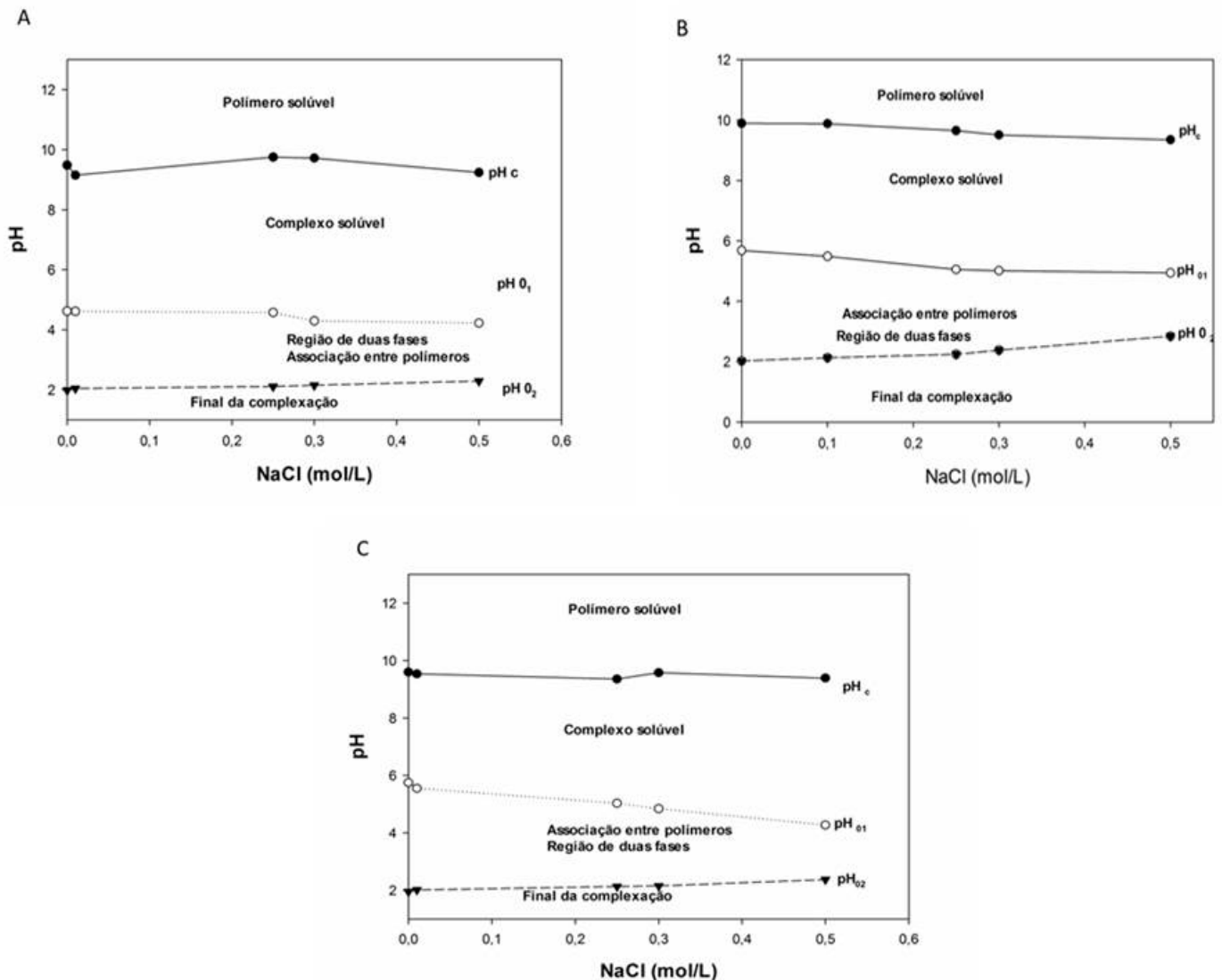
Ao adicionarmos concentrações salinas ainda maiores (0,3 e 0,5 mol/L NaCl) houve diminuição do diâmetro de partículas, e associando os valores aos dados de turbidez, podemos constatar que altas concentrações salinas acarretaram na diminuição da interação entre a proteína e polissacarídeo. A adição de certa quantidade de micro íons pode favorecer a complexação por promover uma maior solubilidade dos polímeros, levando ao enrolamento da molécula e expondo mais as suas cargas, favorecendo assim a ligação eletrostática (BURGESS, 1990), como também foi observado por Laos et al. (2007), que ao avaliar a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e albumina sérica bovina, com a goma furcellarana, observou a complexação mais favorável utilizando concentrações salina de 0,03 mol/L.



**Figura 10.** Tamanho de partícula das misturas contendo 0,2%Lf/0,1%GA com diferentes concentrações de NaCl. Temperatura: 25°C; pH: 4,0. Fotografias das diferentes amostras: **A:** 0, **B:** 0,01, **C:** 0,25, **D:** 0,3 e **E:**0,5 mol/L NaCl.

Porém, quando adicionados em excesso em determinados sistemas, a adição do sal pode desfavorecer a formação de complexos coacervados entre polímeros e proteínas chegando a inibir a complexação, devido à presença de micro íons que podem anular as interações eletrostáticas entre os polímeros (RU et al., 2012). O mesmo foi constatado por Wang et al. (2005) ao estudar o efeito da força iônica na formação de complexos coacervados entre  $\beta$ -lactoglobulina e pectina de baixo grau de metoxilação, observando que os sistemas se apresentaram sensíveis ao adicionar 20 mM de sal, levando a inibição da complexação. Segundo Ru et al. (2012), quando um sistema é formado apenas por ligações eletrostáticas, a presença da força iônica pode inibir as ligações, porém, sabe-se que apesar da complexação ser proveniente principalmente destas ligações, outras também podem estar presentes como ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou força de Van der Waals.

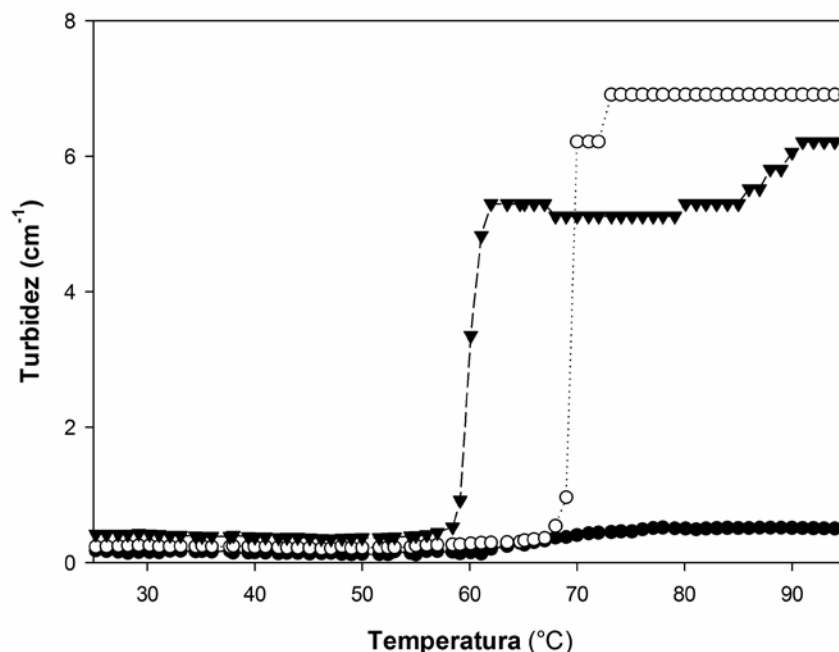
A presença de micro íons também pode modificar as cargas elétricas dos polímeros fazendo com que se estreite a região de associação entre os mesmos. A Figura 11 mostra a influência do sal na formação dos complexos coacervados, podendo ser observada a diminuição do  $pH_{01}$  para menores valores de pH enquanto o  $pH_0$  deslocou-se positivamente com o aumento da concentração de NaCl, como também foi observado por Weinbreck et al. (2003).



**Figura 11:** Diagramas de estado das misturas contendo: A: 0,1 % Lf/0,1 % GA; B: 0,2 % Lf/0,1 % GA; C: 0,3 % Lf/0,1 % GA com diferentes concentrações de NaCl (0; 0,01; 0,25; 0,3 e 0,5 mol/L); temperatura: 25°C; sendo= (●)  $pH_c$ ; (○)  $pH_{01}$  e (▼)  $pH_{02}$ .

### 3.3. Influência da temperatura na interação entre a lactoferrina e goma arábica

Para avaliar a influência da temperatura sobre a interação entre Lf e GA, amostras contendo misturas na proporção 1:1, 2:1 e 3:1 Lf/GA e 0,25 mol/L NaCl tiveram seu pH ajustado para 7,0 pois nesta faixa a lactoferrina encontra-se em sua forma mais estável, além de ser a faixa de pH crítico dos sistemas contendo a mistura entre os biopolímeros (BENGOECHEA, PEINADO, et al., 2011). Após isto, as soluções foram submetidas ao aquecimento de 25°C a 90°C para avaliar os impactos sobre a turbidez e diâmetro de partícula, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

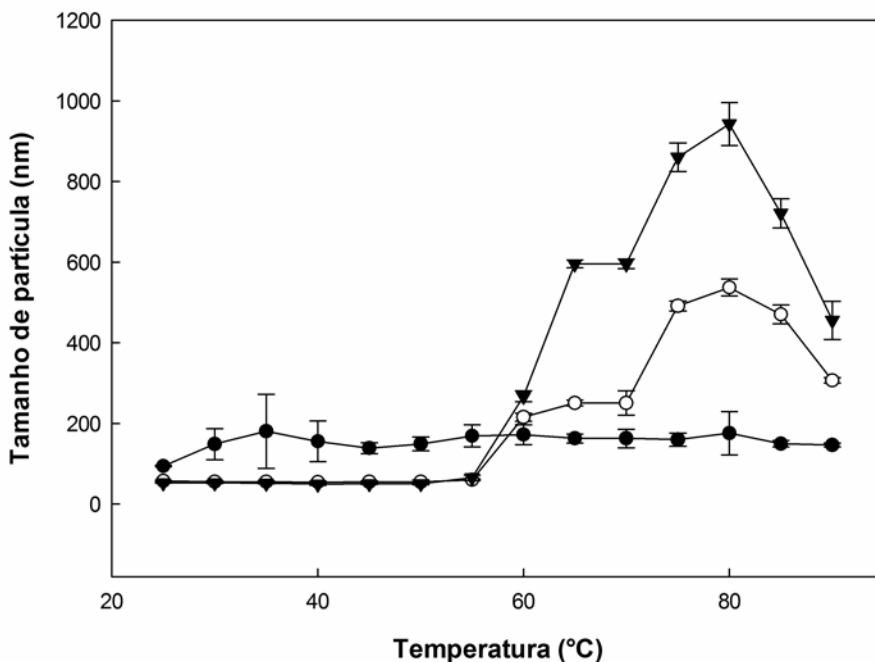


**Figura 12.** Turbidez de amostras contendo misturas de Lf e GA submetidas a diferentes temperaturas. (●) 0,1% Lf/0,1%GA; (○) 0,2% Lf/0,1%GA; (▼) 0,3% Lf/0,1%GA. NaCl:0,25 mol/L

Na Figura 12 podemos verificar que as amostras contendo 0,1%Lf/0,1% GA apresentaram turbidez quase constante em todas as faixas de temperatura estudadas. Estudos anteriores demonstraram que a presença de determinados polissacarídeos podem induzir a estabilidade da proteína quando estudadas a altas temperaturas, não ocorrendo mudança na conformação e agregação das moléculas da proteína (JONES et al., 2010). Resultado semelhante foi observado por Bengoechea, Jones, et al. (2011) que ao submeter amostras contendo 0,2% lactoferrina e 0,1% pectina a diferentes temperaturas, não observou mudanças significativas na turbidez, indicando a estabilidade térmica da lactoferrina pela pectina.

Quando foram utilizadas maiores concentrações de Lf (0,2% e 0,3%), houve um aumento abrupto ao atingir temperaturas entre 60 e 70°C e o sistema passou da aparência transparente a turva, sendo um indicativo de mudança na conformação ou agregação da proteína, já que as temperaturas de desnaturação da lactoferrina foram indicadas sendo 67 e 90,6 °C (MATA et al., 1998), além do fato de o aumento da temperatura reforçar as ligações hidrofóbicas pelo enfraquecimento das ligações de hidrogênio, causando o aumento da entropia e conseqüentemente a turbidez (MOHANTY e BOHIDAR, 2005). Gentes et al. (2010) estudaram a influência da temperatura na interação entre WPI e pectina no pH 4,5 (fase de complexado) ajustando para o pH 7,0 após a solução ser submetida a alta temperatura (76°C), observando que diferentemente dos resultados apresentados, as soluções se mantiveram estáveis apenas no pH de formação dos complexos (pH 4,5) quando foi ajustado ao pH 7,0 houve a desnaturação da proteína. Logo, sugere-se que quando a ligação entre os biopolímeros é realizada diretamente através de ligações hidrofóbicas proporcionadas pelo aumento da temperatura, já que no pH 7,0 não há atração eletrostática entre os biopolímeros, é possível estabilizar a desnaturação da proteína em determinada concentração. Com um excesso de proteína, o polissacarídeo não se mostrou o suficiente para saturar as moléculas de

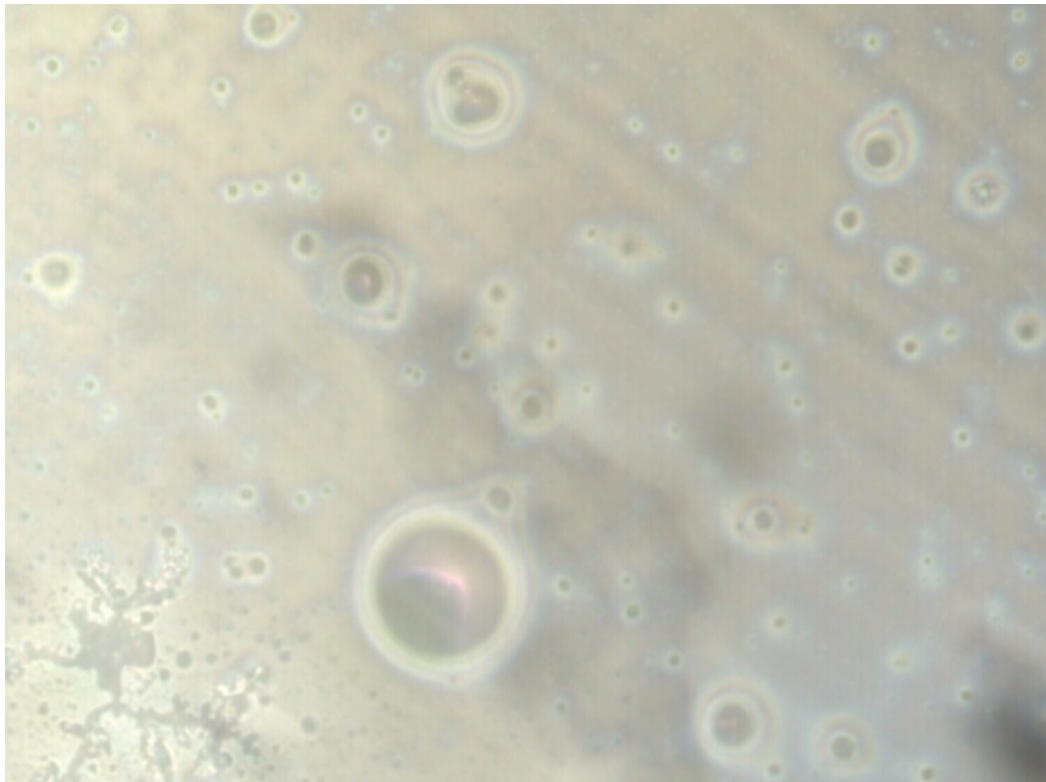
lactoferrina e estabilizar a agregação das moléculas. A Figura 13 reafirma os dados obtidos pela avaliação da turbidez, onde podemos observar tamanho de partículas em valores quase constantes nas misturas contendo 0,1%Lf/0,1%GA e nas misturas contendo 0,2 e 0,3%Lf/GA um acentuado aumento dos tamanhos entre as temperaturas de 60 a 80°C.



**Figura 13.** Tamanho de partícula de amostras contendo diferentes concentrações de lactoferrina a temperaturas entre 25 e 90°C. (●) 0,1%Lf/0,1%GA; (○) 0,2%Lf/0,1%GA; (▼) 0,3%Lf/0,1%GA. pH:7,0

### 3.4. Características morfológicas dos complexos coacervados

Através da microscopia óptica das amostras contendo 0,2%Lf/0,1%GA no pH 4,0 (Figura 14) podemos observar cápsulas com estrutura heterogênea, contendo núcleo único na fase polimérica. Apesar dos mecanismos para identificação dos biopolímeros nos processos de coacervação não estarem bem elucidados, sugere-se que a goma arábica tenha formado uma camada ao redor da proteína, devido a sua capacidade natural de encapsulamento (AUGUSTIN e HEMAR, 2009).



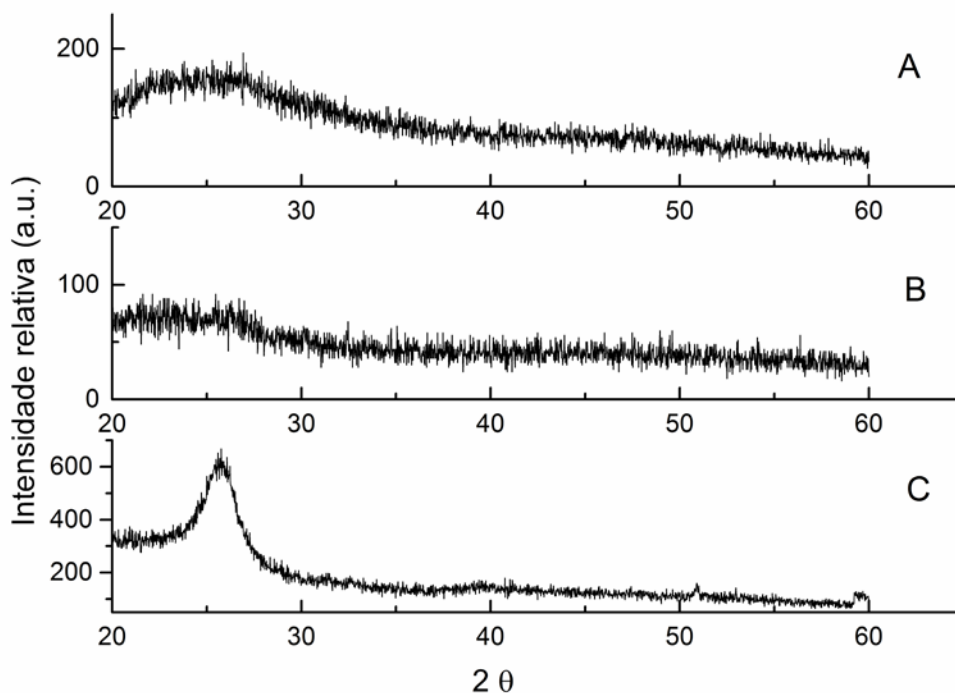
**Figura 14.** Imagem de microscopia óptica a 50x das amostras contendo 0,2%Lf/0,1%GA. NaCl 0,25mol/L; pH 4,0; temperatura: 25°C.

Observando os resultados de DRX da lactoferrina e da goma arábica (Figuras 15-A e 15-B, respectivamente), observam-se ausência de sinais de difração, sob  $2\theta$ . A ausência de picos e a presença de muitos ruídos, em ambos os casos, associam-se à detecção de fase amorfa nos polímeros. Um material cristalino contém arranjos ordenados de moléculas mantidas em contato por interações não covalentes, enquanto que a fase amorfa de uma amostra caracteriza-se pelo estado desorganizado ou randômico de suas moléculas (HELLEN et al., 2007).

No difratograma da mistura contendo 0,2 %Lf/0,1% GA, 0,25 mol/L NaCl à 25°C (Figura 15-C) liofilizada podemos observar o surgimento de novas áreas cristalinas, caracterizada pelo pico definido em 25° aproximadamente, além de aumento da intensidade relativa diferenciando-se dos biopolímeros originais, indicando a interação entre a Lf e a GA.

O estado amorfo apresenta maior solubilidade e velocidade de dissolução, enquanto, substâncias com áreas cristalinas tendem a ser menos solúveis por apresentarem menor higroscopicidade (HELLEN et al., 2007), reafirmando então a formação de precipitados insolúveis no processo de complexação.

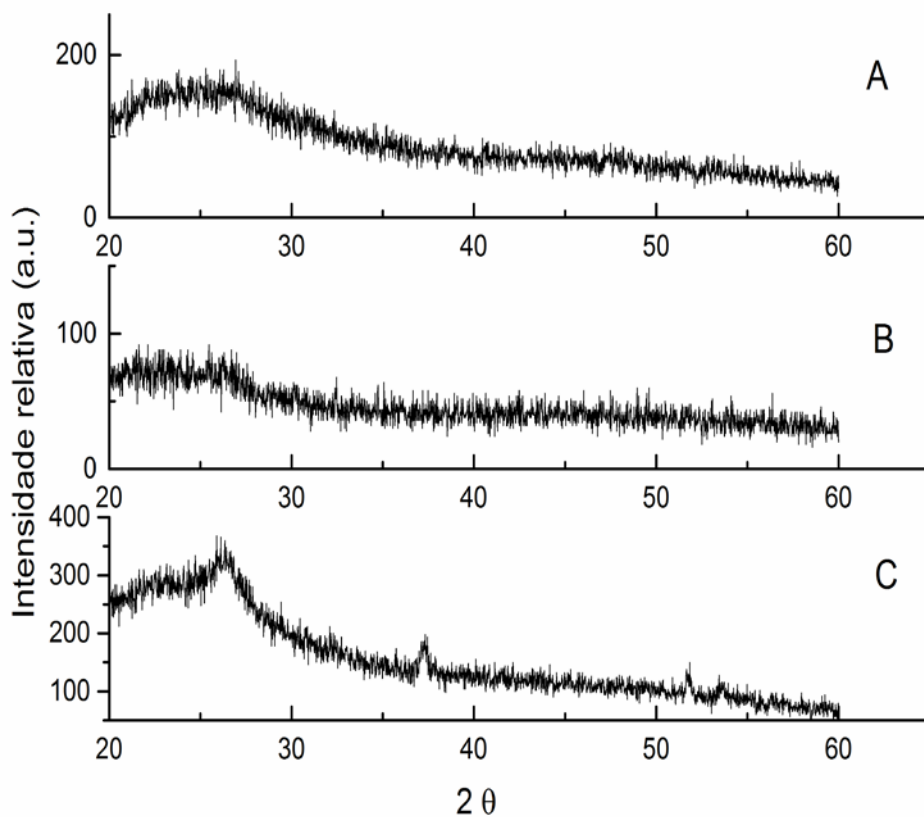




**Figura 15.** Difratoograma da lactoferrina (A), Goma arábica (B) e da mistura contendo 0,2%Lf/0,1%GA (C) no pH 4,0, NaCl 0,25 mol/L e temperatura de 25°C.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a morfologia dos complexos coacervados, as amostras contendo 0,1%Lf/0,1%GA e 0,25 mol/L NaCl tiveram seu pH ajustado para 7,0, foram aquecidas a temperatura de 80°C e posteriormente liofilizadas para análise de difração de Raios X.

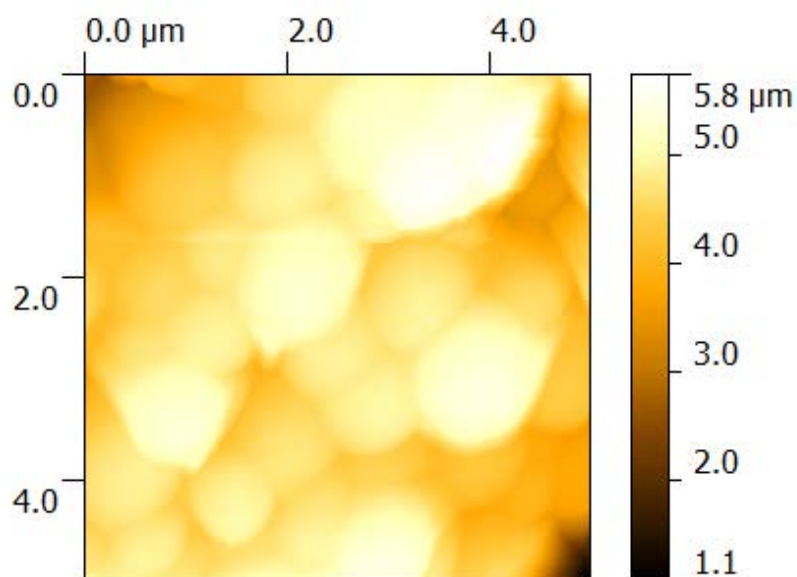
Através da Figura 16-C, podemos observar que ao contrário do ilustrado na Figura 15-C, a mistura quando submetida à alta temperatura, apresentou estado amorfo, caracterizado pela banda larga e indefinida entre os ângulos de 25 e 30° e pela presença de muitos ruídos. Ao estudar o efeito da temperatura sobre a turbidez (Figura 12) e diâmetro de partícula (Figura 13) pudemos constatar desnaturação e agregação das moléculas de lactoferrina, ocasionando a perda de sua configuração original, passando a apresentar um estado desorganizado.



**Figura 16.** Difratoograma da lactoferrina (A), Goma arábica (B) e da mistura contendo 0,1%Lf/0,1%GA (C) no pH 7,0, NaCl 0,25 mol/L e temperatura de 80°C.

Quando sistemas contendo biopolímeros são submetidos a altas temperaturas, as ligações eletrostáticas deixam de serem as principais dando lugar principalmente às ligações hidrofóbicas para formar diferentes estruturas tridimensionais (AUGUSTIN e HEMAR, 2009).

Na Figura 17 podemos observar fotografias obtidas a partir do microscópio de força atômica, ilustrando a topografia dos agregados formados a partir de soluções contendo 0,1%Lf/0,1 %GA.



**Figura 17.** Imagem de microscopia de força atômica da amostra contendo 0,1 %Lf/0,1 %GA, 0,25 mol/L NaCl a 80°C.

Através da imagem podemos observar uma área com vasta presença de agregados em formato globular. Nas análises de diâmetro de partícula pode ser observado que nestas amostras houve a estabilidade à agregação da Lf pela presença da GA, portanto, sugere-se que ocorreu a interação entre as moléculas do polissacarídeo e proteína formando estes agregados, visto que a temperatura beneficia ligações hidrofóbicas por expor frações apolares das cadeias dos polímeros (GENTES et al., 2010).

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a interação entre a Lf e a goma arábica pode resultar na formação de complexos solúveis ou insolúveis em função do pH e que a presença da força iônica beneficiou a complexação em determinada concentração de sal (0,25 mol/L) ou inibiu em concentrações mais altas (0,5 mol/L). Menores concentrações de proteína (0,2 %) propiciaram melhor formação de coacervado. Quando submetida a altas temperaturas, a desnaturação ou agregação da lactoferrina pode ser inibida pela presença, em mesma proporção de goma arábica. Os sistemas contendo as misturas entre os dois biopolímeros em determinada concentração de proteína (0,2%) e na presença de microíons (0,25 mol/L NaCl) apresentaram valores máximos de tamanho de partícula indicando a maior formação de macromoléculas proveniente dessa interação. Os coacervados desidratados apresentaram estrutura com núcleo único encapsulado e estrutura cristalina quando observados através da difração de Raios X e quando submetidos a altas temperaturas, passaram a apresentar estrutura amorfa. A formação de complexos coacervados entre a Lf e GA pode ser uma nova alternativa para incorporação de ingredientes funcionais em diferentes sistemas alimentares, visto que a Lf possui propriedades benéficas a saúde.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 4, p. 902-912, Apr 2009.

BALCÃO, V. M.; COSTA, C. I.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G.; AMORIM, M.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. P.; VILA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 425-431, 2013.

BÉDIÉ, G. K.; TURGEON, S. L.; MAKHLOUF, J. Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 836-844, 2008.

BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1227-1232, 2011.

BENGOECHEA, C.; PEINADO, I.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1354-1360, 2011.

BURGESS. Pratical analysis complex coacervates. 1990.

DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; BAEZ-GONZALEZ, J. G.; CRUZ-SOSA, F.; VERNON-CARTER, E. J. Gum arabic-chitosan complex coacervation. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 4, p. 1313-1318, Apr 2007.

FUJIMOTO, J.; DE OREIS, E.; PETRI, D. F.; FILHO, S. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.

GENTES, M. C.; ST-GELAIS, D.; TURGEON, S. L. Stabilization of whey protein isolate-pectin complexes by heat. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 11, p. 7051-7058, Jun 9 2010.

GONZALEZ-CHAVEZ, S. A.; AREVALO-GALLEGOS, S.; RASCON-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 4, p. 301-308, Apr 2009.

GUMMEL, J.; BOUÉ, F.; DEMÉ, B.; COUSIN, F. Charge stoichiometry inside polyelectrolyte-protein complexes: a direct SANS measurement for the PSSNa-lysozyme system. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 49, p. 24837-24846, 2006.

HELLEN, K. S.; MONIKA, P. T.; SILVA, M. A.; LARANJEIRA, M. C.; DE QUALIDADE, L. D. C. Desenvolvimento, Avaliação e Caracterização Físico Química de Micropartículas

Constituídas de Aciclovir/Quitosana Desenvolvidas pela Técnica de Spray-drying. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n. 6, p. 866-871, 2007.

HUANG, G. Q.; SUN, Y. T.; XIAO, J. X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chem**, v. 135, n. 2, p. 534-539, Nov 15 2012.

JONES, O.; DECKER, E.; MCCLEMENTS, D. Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 2-3, p. 239-248, 03/14/ 2010.

KLEIN, M.; ASERIN, A.; SVITOV, I.; GARTI, N. Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 75-81, May 1 2010.

LAOS, K.; BROWNSEY, G. J.; RING, S. G. Interactions between furcellaran and the globular proteins bovine serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 1, p. 116-123, 1/2/ 2007.

LIU, S.; ELMER, C.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 489-495, 2010.

LV, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 323-332, 2013.

MATA, L.; SÁNCHEZ, L.; HEADON, D. R.; CALVO, M. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. **J Agric Food Chem**, v. 46, n. 10, p. 3964-3970, 1998.

MAYYA, K. S.; BHATTACHARYYA, A.; ARGILLIER, J. F. Micro-encapsulation by complex coacervation: influence of surfactant. **Polymer International**, v. 52, n. 4, p. 644-647, 2003.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 49, n. 6, p. 577-606, Jun 2009.

MOHANTY, B.; BOHIDAR, H. B. Microscopic structure of gelatin coacervates. **Int J Biol Macromol**, v. 36, n. 1-2, p. 39-46, Jul 2005.

PRIFTIS, D.; TIRRELL, M. Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions. **Soft Matter**, v. 8, n. 36, p. 9396, 2012.

REMUNAN-LOPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. **Int J Pharm**, v. 135, n. 1, p. 63-72, 1996.

RU, Q.; WANG, Y.; LEE, J.; DING, Y.; HUANG, Q. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 838-846, 2012.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 6, p. 483-496, 1999.

SEYREK, E.; DUBIN, P. L.; TRIBET, C.; GAMBLE, E. A. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 273-282, 2003/03/01 2003.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA ROJAS, E. E.; MELO, N. R.; GASPAR, A.; LINS, J. F. C. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 375-381, 2013.

TOLSTOGUZOV, V. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 6, p. 429-468, 1991.

TURGEON, S.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 4, p. 401-414, 2003.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 166-178, 2007.

WANG, X.; LEE, J.; WANG, Y. W.; HUANG, Q. Composition and rheological properties of beta-Lactoglobulin/pectin coacervates: effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 3, p. 992-997, Mar 2007.

WANG, X.; LI, Y.; LI, J.; WANG, J.; WANG, Y.; GUO, Z.; YAN, H. Salt effect on the complex formation between polyelectrolyte and oppositely charged surfactant in aqueous solution. **J Phys Chem B**, v. 109, n. 21, p. 10807-10812, Jun 2 2005.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 293-303, 2003.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3550-3555, 2004.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: Oreparation, characterization and stabilization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.48, n.1, p.27-42, 2001.



## **CAPÍTULO III**

### **FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DE POLIPEPTÍDEO LEUCINA E GOMA ARÁBICA**



## RESUMO

A formação de complexos coacervados vem sendo amplamente estudada para aplicação de novos ingredientes funcionais em alimentos. No presente trabalho, foi estudada a interação entre o polipeptídeo-leucina (0,2% m/m) e goma arábica (0,03, 0,06, 0,09, 0,12 e 0,15 % m/m) em diferentes concentrações de NaCl (0, 0,01, 0,25, 0,3 0,5 mol/L) e diferentes faixas de pH (1,0-12,0). O pH de formação (maior turbidez) dos complexos coacervados insolúveis (4,0), não sofreu variação significativa de acordo com a quantidade de NaCl empregado no sistema, porém, o pH onde ocorreu a dissociação dos precipitados ( $pH_{\emptyset 2}$ ), sendo próximo ao pH 2,0, deslocou-se positivamente conforme era aumentada a concentração salina, diminuindo a região de associação entre os biopolímeros. As amostras que continham uma menor concentração de goma arábica (0,03% m/m) apresentaram uma maior turbidez e consequentemente tiveram maior formação de precipitados. Ainda entre estas amostras, as que continham ausência de sal apresentaram maior turbidez e tamanhos de partícula. Os coacervados desidratados apresentaram estrutura globular com múltiplos núcleos na fase polimérica e estrutura cristalina quando observados através da difração de raios X. Análises reológicas demonstraram que os coacervados formados a partir de 0,2% PL/0,03% GA apresentaram comportamento elástico, típico de géis.

**Palavras-chave: aminoácidos; cocervação; complexo polimérico**

## ABSTRACT

The formation of complex coacervates has been widely studied for application of new functional ingredients in foods. In this work, we studied the interaction between the polypeptide-leucine (0.2% w/w PL) and gum arabic (GA 0.03, 0.06, 0.09, 0.12 and 0.15% w / w) at different concentrations of NaCl (0, 0.01, 0.25, 0.3 0.5 mol / L) and different pH ranges (1.0 to 12.0). The pH of formation (higher turbidity) of the insoluble complex coacervates (4.0), showed no significant variation with the amount of NaCl used in the system, however, the pH where dissociation of precipitates ( $pH_{\emptyset 2}$ ) occurred, being close to pH 2.0, shifted positively as the salt concentration was increased, decreasing the region of association between the biopolymers. Samples containing a lower concentration of GA (0.03% w/w) had a higher turbidity and thus has increased formation of precipitates. Among these samples, which contained no salt, presented greater turbidity and particle sizes. Dehydrated coacervates present globular structure with multiple cores in the polymer phase and crystalline structure as observed by diffraction of X-rays rheological analyzes demonstrate that the coacervates formed from PL 0.2% / 0.03% GA exhibited elastic behavior typical gels.

**Key-words: amino acid; coacervation; polymeric complex**

## 1. INTRODUÇÃO

Interações eletrostáticas provenientes da associação entre biopolímeros, especialmente proteínas e polissacarídeos, induzem uma fase de separação associativa usualmente chamada de complexos coacervados ou fase de separação associativa (SCHMITT et al., 2001; TURGEON et al., 2007; SOUZA et al., 2013). Proteínas/polipetídeos e polissacarídeos estão presentes em diversos alimentos, contribuindo para sua estrutura, estabilidade e textura (SCHMITT et al., 2001) e quando estão sob a forma de complexos coacervados apresentam características funcionais superiores quando comparados ao polímero original (GUZEY et al., 2004; HUANG et al., 2012). Podem ser utilizados para processos de microencapsulação, na imobilização de enzimas, como espessantes e estabilizantes em alimentos, além de ser uma nova alternativa para a incorporação de ingredientes funcionais (HUANG et al., 2012).

Os aminoácidos assumem importante papel regulatório no metabolismo proteico, como os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA): leucina, valina e isoleucina. A leucina é um aminoácido importante como combustível metabólico da musculatura esquelética, estimulando a incorporação de aminoácidos nas proteínas e inibindo a degradação proteica (FOEGEDING et al., 2006; LIVNEY, 2010). A presença da leucina na alimentação contribui na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, no aumento da saciedade e no metabolismo da glicose por mecanismos periféricos e centrais (KADOWAKI et al., 2006; SU et al., 2012; LOLLO et al., 2013).

A goma arábica (GA), um exsudato da árvore acácia, é um polissacarídeo com estrutura ramificada contendo seis frações de hidrato de carbono e uma fração de polipeptídeo (COELHO et al., 2011). É um polieletrólito fraco com grupos carboxílicos que são responsáveis pela sua carga negativa acima do pH 2.0. Possui boa solubilidade em água, propriedades emulsificante e estabilizante, além de possuir baixa viscosidade, por isso, são amplamente utilizados em processos de microencapsulação, formação de filmes na estabilidade de emulsões (WEINBRECK et al., 2003; COELHO et al., 2011; LV et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi investigar a interação entre o polipeptídeo leucina e a goma arábica, avaliando a influência do pH, concentração de polissacarídeo e força iônica, bem como caracterizar as estruturas resultantes desta interação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

O polipeptídeo Leucina (PL) desidratado (*PepForm-Leucine Peptides*) foi obtido a partir da empresa Glanbia Nutricionals (Fitchburg, EUA) e a composição reportada foi de: 90% de proteínas, sendo entre estes 40% leucina, 5.0% de umidade, <1.0% de gordura, 5.0% de minerais e <1.0% de lactose. O polissacarídeo goma arábica (51198) foi obtido a partir da empresa Sigma e Aldrich (St. Luis, EUA) e o cloreto de sódio a partir da empresa Vetec (RJ, Brasil). Neste experimento foram utilizados reagentes analíticos e água deionizada (Master P&D, Gehaka, São Carlos, Brasil, condutividade  $0,05 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 0,01$ ).

## **2.2. MÉTODO**

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de engenharia e tecnologia agroindustrial (LETA), localizado na Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Volta Redonda, RJ, Brasil.

### **2.2.1. Preparo das soluções**

A GA foi solubilizada em água deionizada em concentrações de 0,03, 0,06, 0,09, 0,12 e 0,15% m/m, utilizando uma balança analítica (B-TEC-210, Tecnal, Brasil). A solução foi agitada durante 30 minutos utilizando agitador magnético (NT101, Novatecnica, Brasil). Concentrações do PL foram previamente pesadas, em concentração fixa de 0,2% m/m. Em um sistema com mesmo volume total, diferentes razões de PL/GA foram avaliadas, cada uma contendo as seguintes concentrações de sal (NaCl): 0, 0,01; 0,25; 0,3 e 0,5 mol/L.

### **2.2.2. Titulação turbidimétrica**

A turbidez dependente do pH foi avaliada com o auxílio de um espectrofotômetro (Biochrom mod. LIBRA S12, Inglaterra) com comprimento de onda de 400 nm, adaptando a metodologia proposta por Weinbreck et al. (2004). O espectrofotômetro foi calibrado para 100% de transmitância com água deionizada. A turbidez foi definida como  $T = -\ln(I/I_0)$ . A solução contendo a definida razão de PL/GA e sua respectiva concentração de NaCl foi agitada em agitador magnético até o equilíbrio e teve seu pH ajustado (12,0-1,0) com HCl, 0,5 mol/L e NaOH 0,25 mol/L sendo monitorado com auxílio de pHmetro de bancada, e em seguida, um alíquota de 2 mL foi retirada para aferição do valor de turbidez. Todas estas titulações foram aferidas em temperatura ambiente (25 °C) com quatro replicatas, sendo o intervalo entre as aferições de aproximadamente 1 minuto.

### **2.2.3. Potencial- $\zeta$ e diâmetro de partícula**

As análises de potencial-  $\zeta$  e tamanho de partícula foram realizadas com auxílio do instrumento Zeta sizer nano (Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Inicialmente, as amostras (8 mL) foram acondicionadas em um titulador (MPT-2, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) contendo HCl 0,5 mol/L, NaOH 0,25 mol/L e NaOH 0,025 mol/L e as análises foram conduzidas em função do pH (1,0-12,0).

### **2.2.4. Difração de raios X (DRX)**

A estrutura interna dos complexos coacervados liofilizados (Enterprise, Terroni, São Carlos, Brasil) foi caracterizada empregando um difratômetro de raios X (Zimadzu, Japão) para avaliar a cristalinidade das partículas. A análise foi realizada utilizando velocidade de varredura de  $2\theta/\text{min}$  e condições de trabalho de 40 kv a 40 mA.

### **2.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para a obtenção das imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura (ZEISS EVO MA 10 com filamento de tungstênio) as amostras foram acondicionadas em placas de petri e mantidas em dessecador até sua secagem. O microscópio foi operado no modo de elétrons secundários com tensão de aceleração de 20 kV.

### **2.2.6. Propriedades reológicas**

As propriedades reológicas dos complexos coacervados foram determinadas empregando um reômetro rotacional Haake™ Mars II *Rotational Rheometer* (Thermo Scientific Inc., Alemanha) com acessório cone e placa (20 mm, ângulo de 1°) e gap de 0,025 mm entre os elementos. As amostras foram preparadas e repousaram por 24h. Após este período foram centrifugadas à 9000 rpm para posterior análise. Antes das análises, os complexos foram acomodados na placa do reômetro (5 minutos) juntamente com a cúpula de proteção a fim de estabilizar a temperatura e evitar a evaporação da água durante a análise. O módulo de armazenamento ( $G'$ ), o módulo de dissipação ( $G''$ ) e a viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) foram medidos enquanto a frequência variava de 0,1 à 100 rad/s. Todas as amostras foram analisadas à 25 °C.

### **2.2.7. Análises estatísticas**

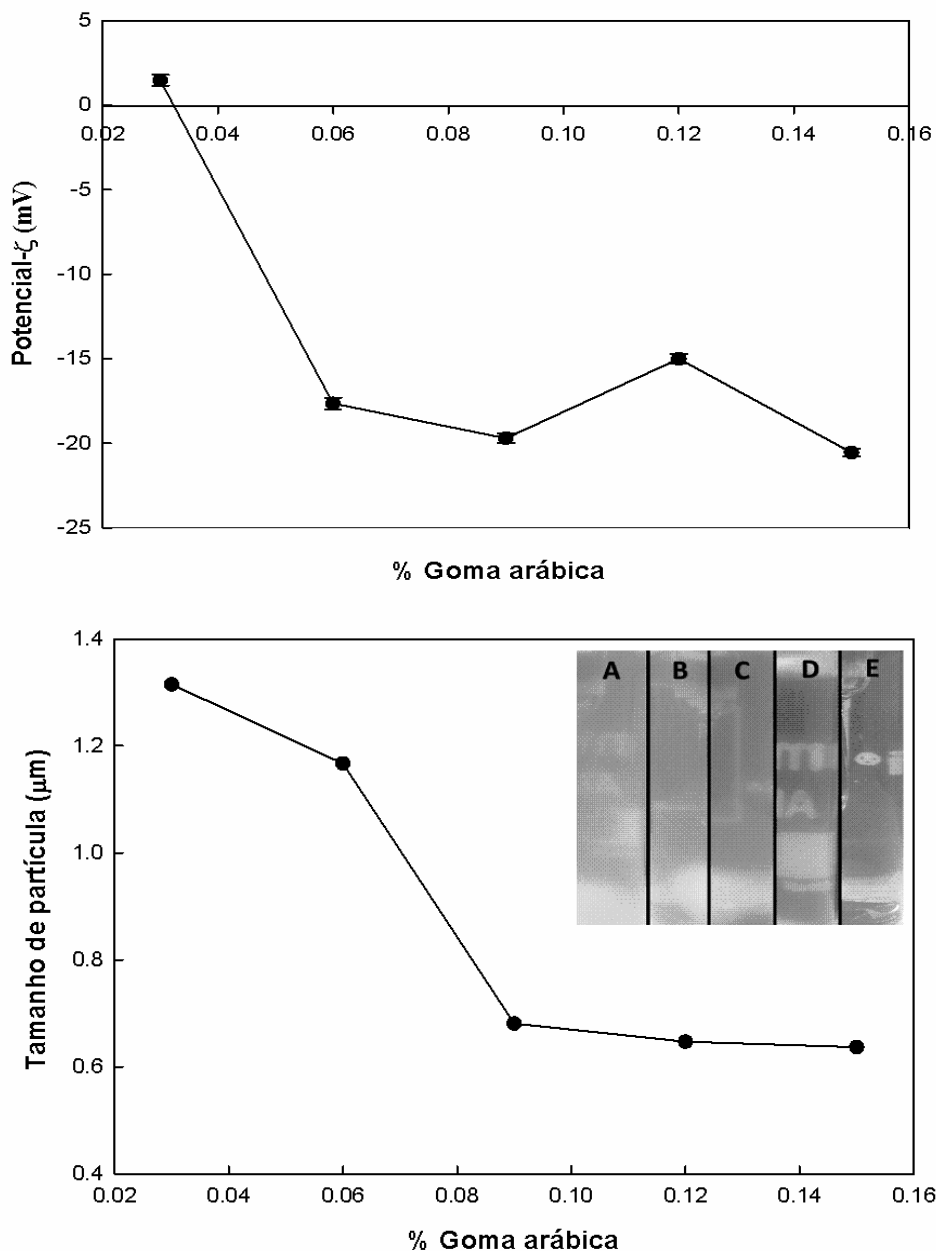
As análises de turbidez foram realizadas com quatro replicatas. Os valores de potencial-  $\zeta$  e tamanho de partícula foram obtidos a partir da média de pelo menos 50 medições para cada pH e os resultados são apresentados com média e desvio padrão calculados ( $p < 0,05$ ).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Efeito da concentração de polissacarídeo na formação dos complexos coacervados:**

A concentração de polissacarídeo, ou proporção entre os biopolímeros utilizados na mistura pode influenciar a formação dos complexos coacervados. Na Figura 1, podemos observar o potencial-  $\zeta$  e tamanho de partícula de diferentes amostras em função da concentração de GA utilizada no sistema.

Pode-se observar que o aumento da concentração de goma arábica deslocou os valores de potencial-  $\zeta$  negativamente, sugerindo que menores concentrações sejam suficientes para saturar as moléculas de polipeptídeo e conseqüentemente estar associadas a elas formando complexos coacervados. As amostras contendo 0,03% de goma arábica foram apontadas como sendo as que mais possuíam interações entre o polímero e o polipeptídeo, visto que apresenta potencial de carga próximo à zero, o que indica a neutralidade das cargas dos polímeros.



**Figura 1.** Potencial- $\zeta$  e tamanho de partícula das amostras contendo diferentes concentrações de Goma arábica (0,03, 0,06, 0,09, 0,12 e 0,15 %m/m) e 0,2 %PL; NaCl: 0 mol/L; pH: 4,15; T:25°C. Fotografias ilustrando as mudanças visuais nas soluções contendo diferentes concentrações de GA no pH próximo a 4,15. **A:** 0,03% GA; **B:** 0,06% GA; **C:** 0,09% GA; **D:** 0,12% GA e **E:** 0,15% GA.

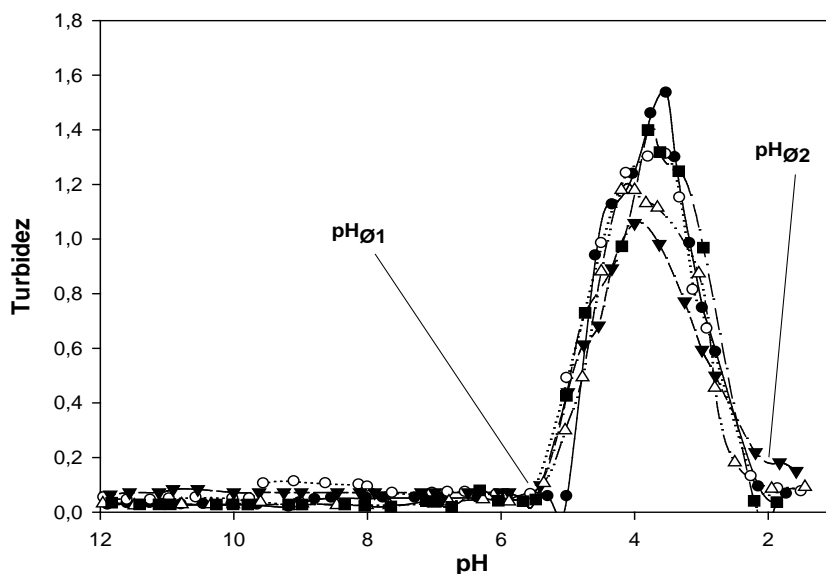
Ainda podemos observar que a amostra contendo 0,03%GA obteve os maiores tamanhos de partícula ( $>1,2 \mu\text{m}$ ) indicando a presença de macromoléculas. Conforme foi aumentada a concentração do polímero, os tamanhos de partícula tornaram-se cada vez menores, sugerindo-se a diminuição da interação entre os biopolímeros. O mesmo foi constatado por Bengoechea et al. (2011), ao analisar a concentração ideal de pectina para a formação de complexos coacervados, observando que uma concentração mínima do polímero foi suficiente para saturar as moléculas da proteína.

### 3.2. Influência do pH e força iônica na formação dos complexos coacervados

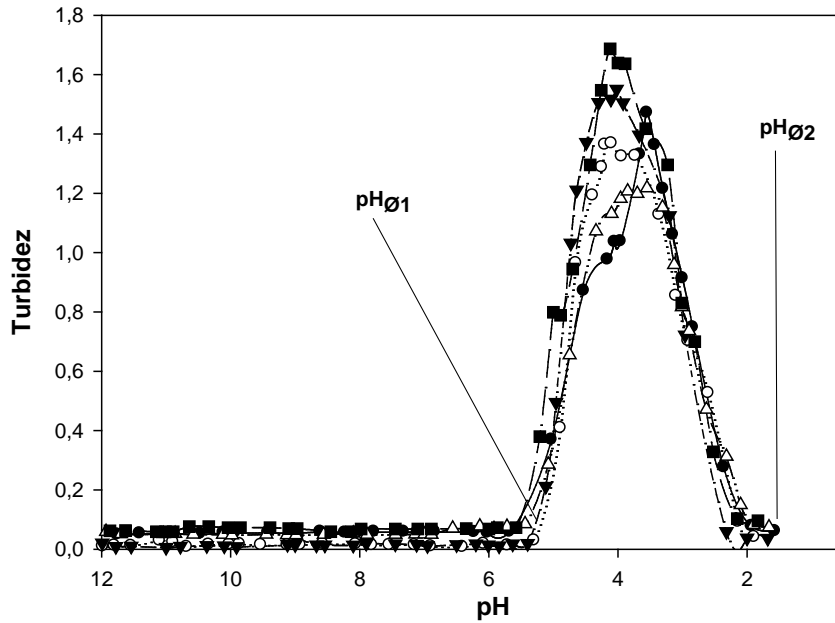
Os valores de turbidez em relação ao pH nos sistemas contendo diferentes proporções e concentrações de sal, podem ser visualizados nas Figuras 2-6 .

A partir dos resultados, podemos observar que em todos os sistemas a maior interação entre os biopolímeros iniciou próximo ao pH 5.0 ( $\text{pH}_{\text{Ø1}}$ ). Com os valores de turbidez quase constantes até o pH 6.0, o  $\text{pH}_c$  (pH crítico) não pode ser nitidamente identificado (RU et al., 2012), porém podemos afirmar que essa fase ocorreu acima do  $\text{pI}$  dos polipeptídeos, como também foi observado por Weinbreck et al. (2003), ao estudar a formação de complexos coacervados entre proteínas do soro de leite (WPI) e goma arábica. O  $\text{pH}_c$  é a fase onde ocorre o início da interação entre os biopolímeros, resultando na formação de complexos solúveis (DE KRUIF et al., 2004; WEINBRECK et al., 2004; COOPER et al., 2005; SCHMITT e TURGEON, 2011).

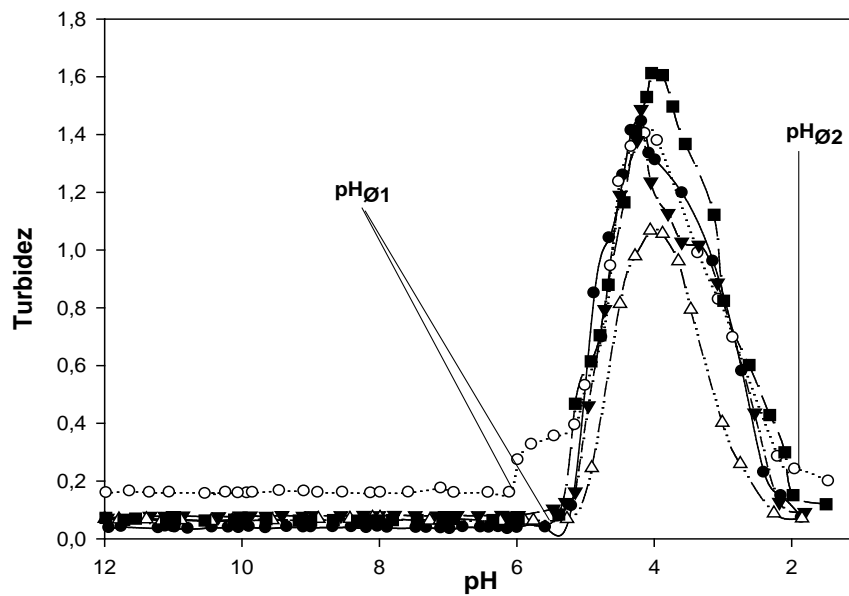
Segundo Singh et al. (2007), a partir desta interação, ocorre a diminuição de energia livre entre as moléculas dos biopolímeros promovendo um cenário de ligação cooperativa. A ligação dos segmentos de cargas opostas é acompanhada pela liberação de íons, aumentando a entropia da solução. Como resultado, as moléculas sofrem aumento em seu tamanho, ocasionando assim no aumento da turbidez, dando início a fase de  $\text{pH}_{\text{Ø1}}$  (pH próximo a 4.0), onde a ligação eletrostática é máxima resultando no aumento abrupto da turbidez (OU e MUTHUKUMAR, 2006; WITTEMANN e BALLAUFF, 2006; BENGOCHEA et al., 2011; SCHMITT e TURGEON, 2011; PRIFTIS e TIRRELL, 2012).



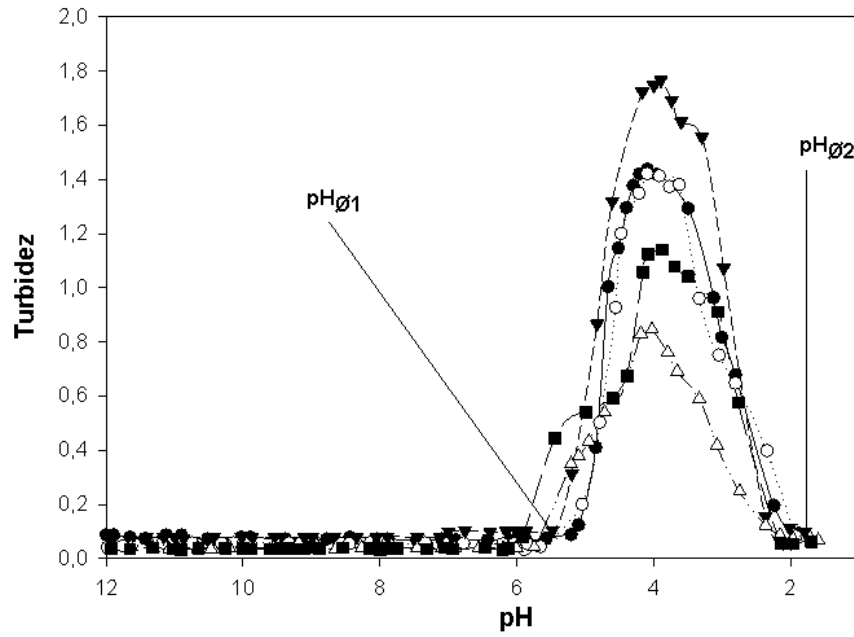
**Figura 2.** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2% PL/0,03% GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.



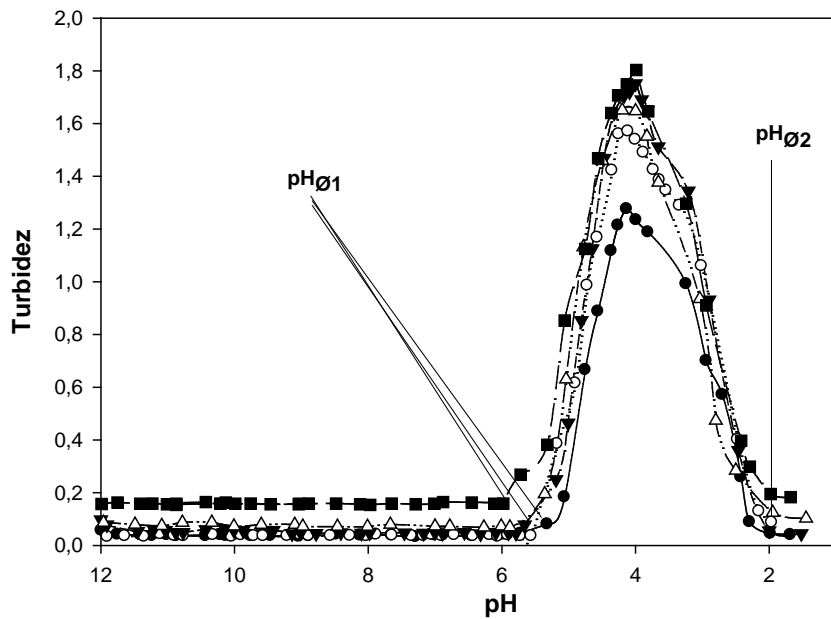
**Figura 3.** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2% PL/0,06% GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.



**Figura 4.** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2% PL/0,09% GA com diferentes concentrações de sal: (●) NaCl 0 mol/L; (■) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (Δ) NaCl 0,3 mol/L; (▼) NaCl 0,5 mol/L.



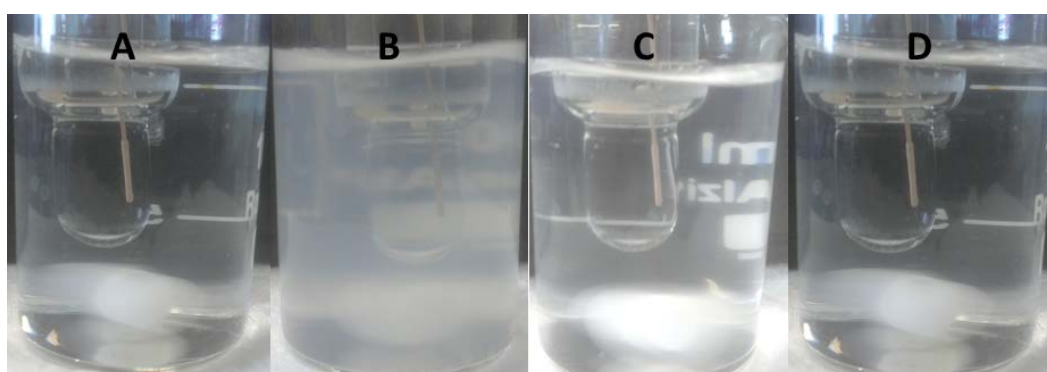
**Figura 5.** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2% PL/0,12% GA com diferentes concentrações de sal: (▼) NaCl 0 mol/L; (●) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (■) NaCl 0,3 mol/L; (Δ) NaCl 0,5 mol/L.



**Figura 6.** Influência do pH e NaCl na turbidez de amostras contendo 0,2% PL/0,15% GA com diferentes concentrações de sal: (■) NaCl 0 mol/L; (Δ) NaCl 0,01 mol/L; (○) NaCl 0,25 mol/L; (▼) NaCl 0,3 mol/L; (●) NaCl 0,5 mol/L.



Em todas as soluções, podemos observar que próximo ao pH 2,0 ocorreu a diminuição abrupta da turbidez, sendo esta fase denominada  $pH_{\theta 2}$ . O mesmo foi observado por Ru et al. (2012) ao estudar a formação de complexos coacervados entre albumina e pectina, indicando que o  $pH_{\theta 2}$  é influenciado pela natureza do polissacarídeo. Quando o pH é próximo ou inferior ao  $pKa$  do polissacarídeo, ocorre diminuição da carga negativa de sua cadeia, resultando em maior repulsão eletrostática e conseqüentemente dissociação dos complexos poliméricos, levando a formação de complexos solúveis ou na separação total das moléculas dos biopolímeros. Na Figura 7, podemos observar as mudanças na aparência das soluções, passando de translúcida do pH 11,5 para ligeiramente turva no pH 5,0 e totalmente turva no pH 4,0. No pH 2,0 podemos observar que o sistema volta a ser translúcido, como se apresentava inicialmente.

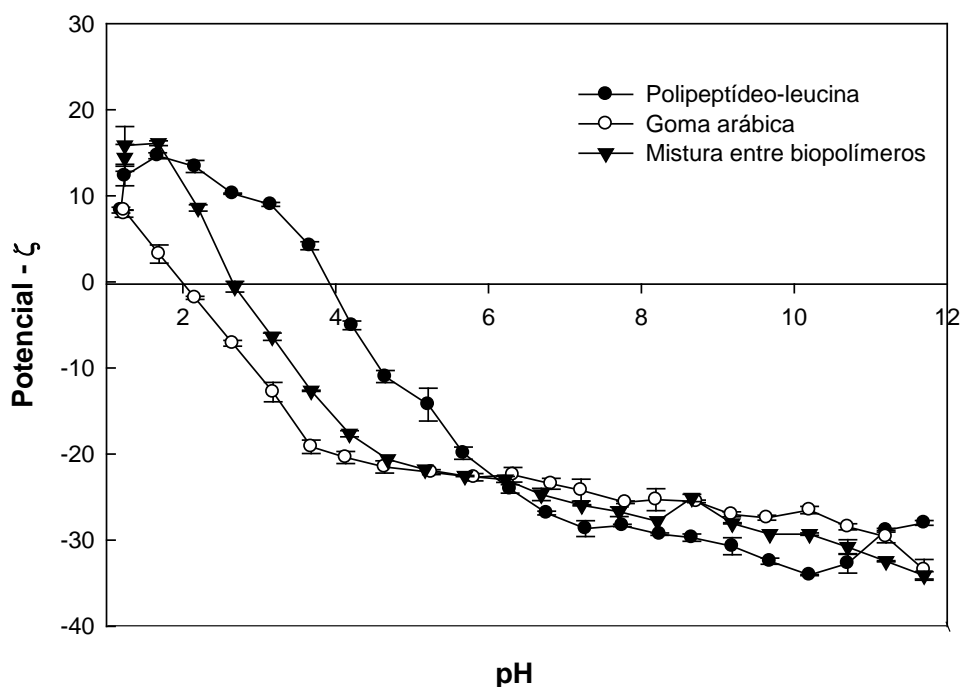


**Figura 7.** Aparência das soluções de acordo com o pH ao longo da titulação turbidimétrica das amostras contendo 0,2% PI/ 0,03% GA, 0 mol/L. A: pH 2,0; B: pH: 4,12; C: pH 7,2 e D: pH 11,28. T: 25°C.

O  $pH_{\theta 1}$  encontrado em todas as soluções foi intermediário aos valores encontrados para o pI da solução de polipeptídeos e o  $pKa$  da solução de goma arábica. Na Figura 8, podemos observar este comportamento para as amostras contendo 0,2% PL/0,03% GA.

Inicialmente, os valores de potencial-  $\zeta$  em função do pH (1,0-12,0) foram obtidos para cada polímero isoladamente, utilizando-se a concentração de GA adicionada aos sistemas que obtiveram os maiores valores de turbidez (0,03% m/m), e para a PL, a concentração fixa utilizada na formação dos complexos (0,2% m/m).

Podemos observar que o potencial-  $\zeta$  do polipeptídeo-leucina passou do negativo no pH 11,7 ao positivo próximo ao pH 4,2, com ponto de carga nula próximo ao pH 4,0. A goma arábica possuiu comportamento semelhante, porém passou a apresentar cargas positivas próximo ao pH 2,0. Apesar dos biopolímeros não apresentarem cargas totalmente opostas, é possível observar que houve interação entre ambos, já que a mistura apresenta comportamento intermediário aos biopolímeros originais.



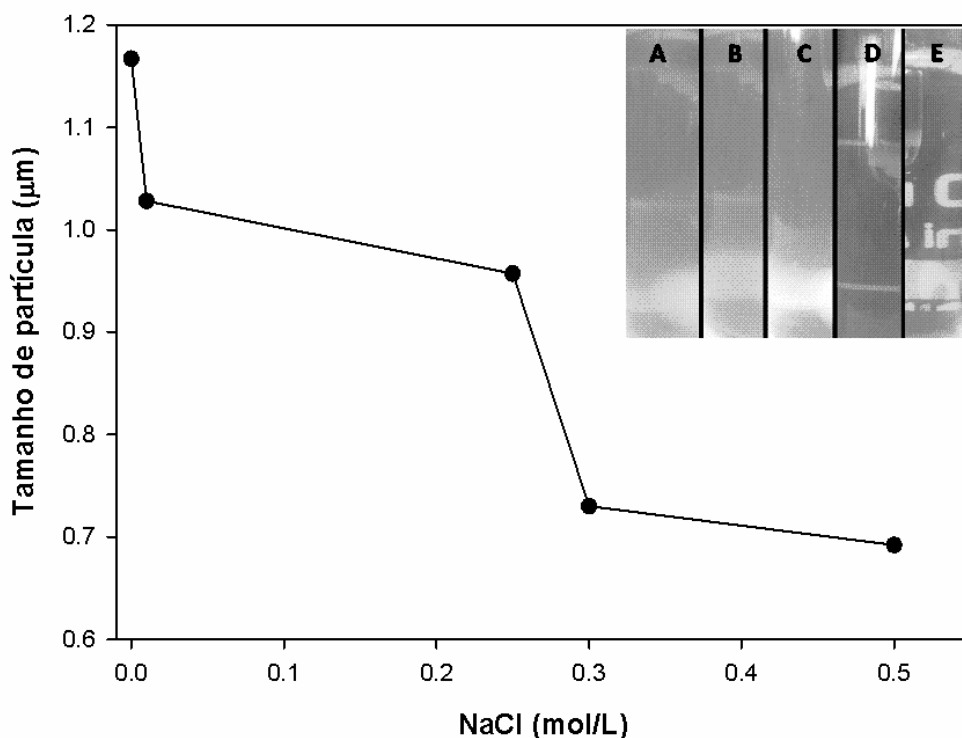
**Figura 8.** Potencial-  $\zeta$  das amostras contendo 0,2% PL, 0,03% GA e das misturas contendo 0,2% PL/0,03% GA em diferentes pH. (NaCl: 0 mol/L; Temperatura: 25°C).

Observando a Figura 9, podemos observar que a concentração de NaCl teve influência sobre os tamanhos de partículas nas amostras em seus respectivos pH de máxima turbidez. Foram utilizadas amostras contendo a proporção PL/GA que apresentaram os maiores valores de turbidez (0,2% PL/0,03% GA) adicionando as respectivas concentrações de NaCl estudadas na formação dos complexos.

As amostras sem adição de cloreto de sódio apresentaram os maiores valores de tamanho de partícula, ou seja, maior interação entre os biopolímeros ocasionando na formação de macromoléculas (complexos coacervados). Conforme foi aumentada a concentração salina, os diâmetros de partícula tenderam a diminuir, porém, não chegando a suspender a formação de macromoléculas.

Segundo Wang et al. (2007) a supressão ou diminuição da formação de complexos coacervados pela adição de sal ocorre devido ao efeito de “blindagem” nas moléculas dos biopolímeros, ou seja, os íons tendem a anular as cargas elétricas das moléculas, resultando em menores interações eletrostáticas. Em sistemas contendo biopolímeros com natureza eletrostática semelhante, a adição de íons pode reduzir a formação de complexos coacervados. A diminuição da formação de complexos coacervados pela adição de cloreto de sódio também foi observado por Weinbreck et al. (2003) ao estudar a interação entre proteínas do soro de

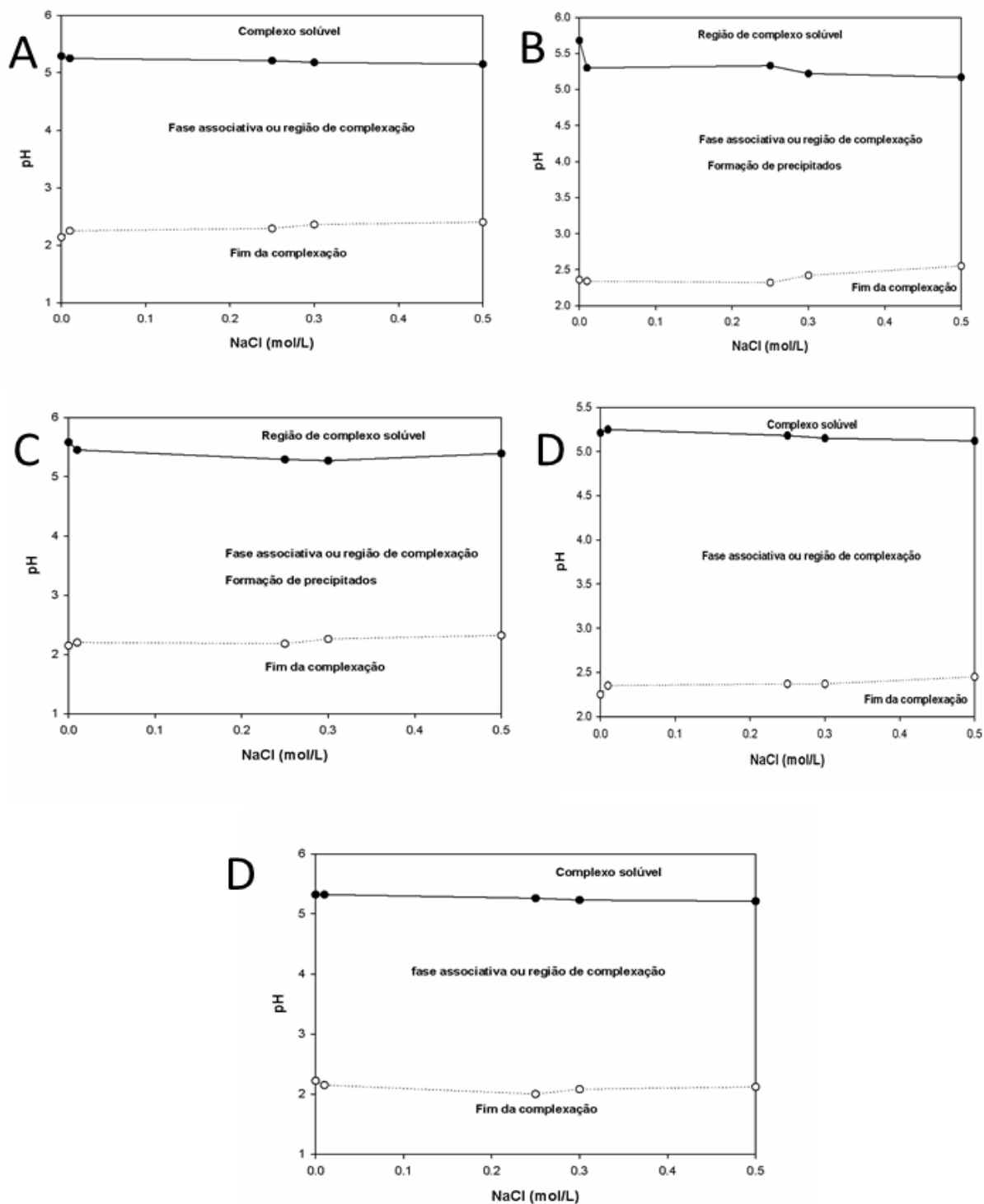
leite (WPI) com goma arábica, verificando maiores valores de turbidez em sistemas contendo NaCl 0 mM e brusca diminuição conforme foi adicionado sal aos sistemas, tendo menor turbidez na concentração máxima de NaCl (60 mM).



**Figura 9.** Tamanho de partícula de amostras contendo 0,2% PL/0,03% GA com diferentes concentrações de NaCl (0, 0,01, 0,25, 0,3 e 0,5 mol/L). pH: 4,1; temperatura: 25°C. Fotografias ilustrando as mudanças visuais nas soluções contendo diferentes concentrações de NaCl. A: 0 mol/L.

A força iônica também apresentou influência no  $pH_{\emptyset 1}$  e  $pH_{\emptyset 2}$ . A presença de microíons tende a reduzir a região de associação entre os biopolímeros, como observado na Figura 10.

Podemos observar que o  $pH_{\emptyset 1}$  sofreu ligeiro deslocamento, não sendo muito influenciado pela presença de NaCl, porém, a presença dos íons influenciou significativamente o  $pH_{\emptyset 2}$  deslocando-o positivamente, diminuindo deste forma a região de associação entre os biopolímeros, por induzir a repulsão eletrostática entre eles, como também foi observado por Li et al. (2012).

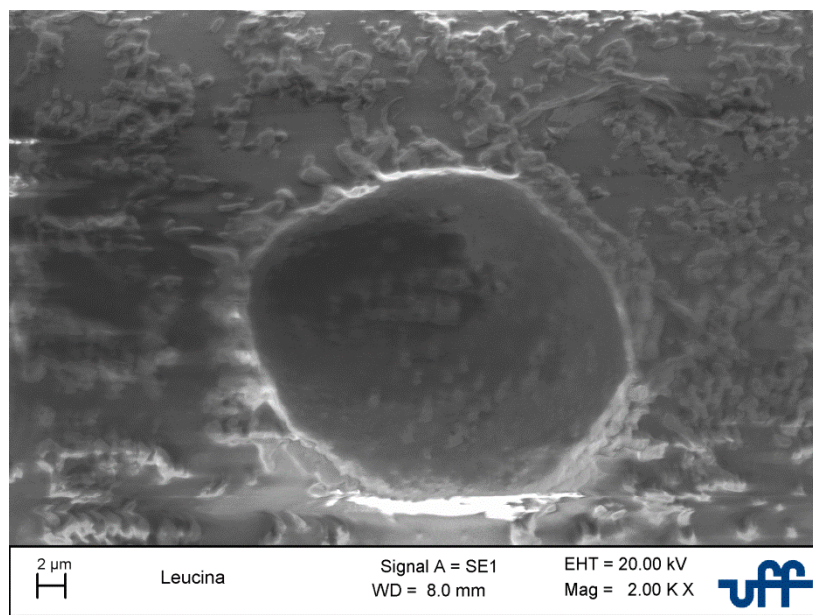


**Figura 10.** Diagrama de estado das amostras contendo diferentes proporções de polímeros, sendo **A**: 0,2% PL/0,03% GA, **B**: 0,2% PL/0,06% GA; **C**: 0,2% PL/0,09% GA; **D**: 0,2% PL/0,12% GA; **E**: 0,2% PL/0,15% GA em diferentes concentrações salinas. Temperatura: 25°C; sendo= (●)  $pH_{01}$ ; (○)  $pH_{02}$ .

### 3.3. Caracterização morfológica dos complexos coacervados

#### 3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 11 podemos observar as imagens da superfície do complexo coacervado formados a partir de misturas contendo 0,2% PL/0,03% GA no pH 4,1.

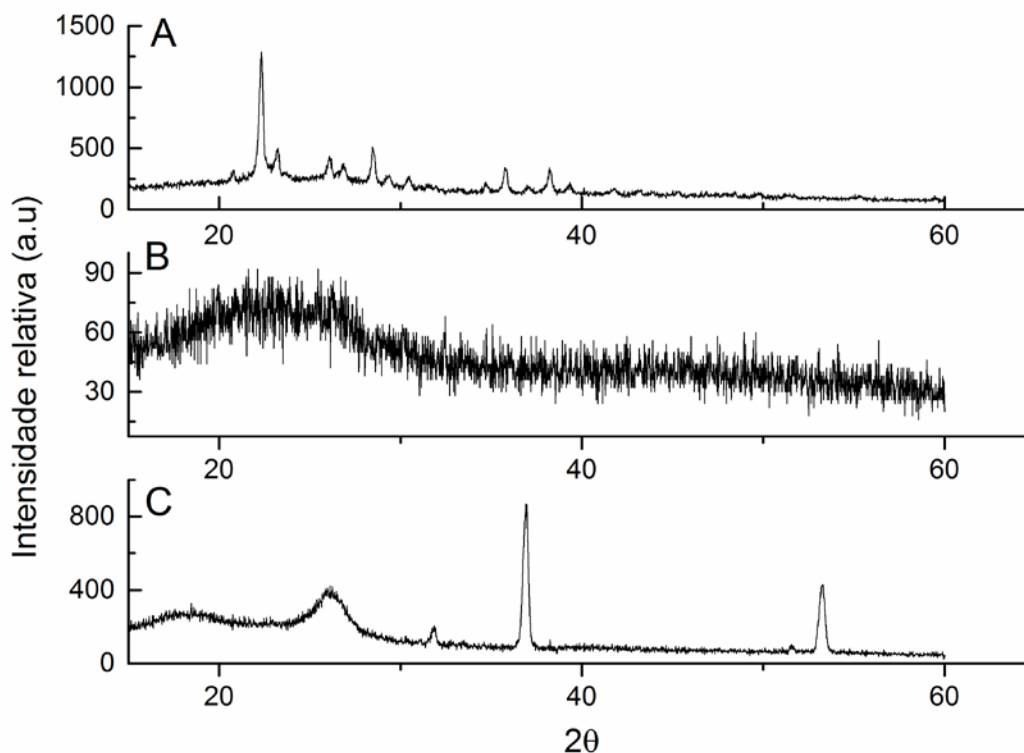


**Figura 11.** Imagens do MEV. Complexos coacervados desidratados contendo 0,2%PL/0,03%GA. NaCl: 0 mol/L; Temperatura: 25°C.

Podemos observar a formação de cápsulas contendo múltiplos núcleos dispersos na fase polimérica. O mecanismo responsável por esta formação ainda não foi bem elucidado, porém, sugere-se que o polissacarídeo influencie nesta característica, já que a goma arábica é conhecida pela capacidade natural de encapsulação (AUGUSTIN e HEMAR, 2009), resultando na estrutura globular. Estrutura similar foi observada por Schmitt et al. (2001) ao avaliar a formação de complexos coacervados entre  $\beta$ -lactoglobulina e goma arábica.

### 3.3.2. Difração de raios X (DRX)

A morfologia dos polímeros originais e as mudanças que ocorreram na mistura contendo 0,2% PL/0,03% GA podem ser visualizadas na Figura 12.



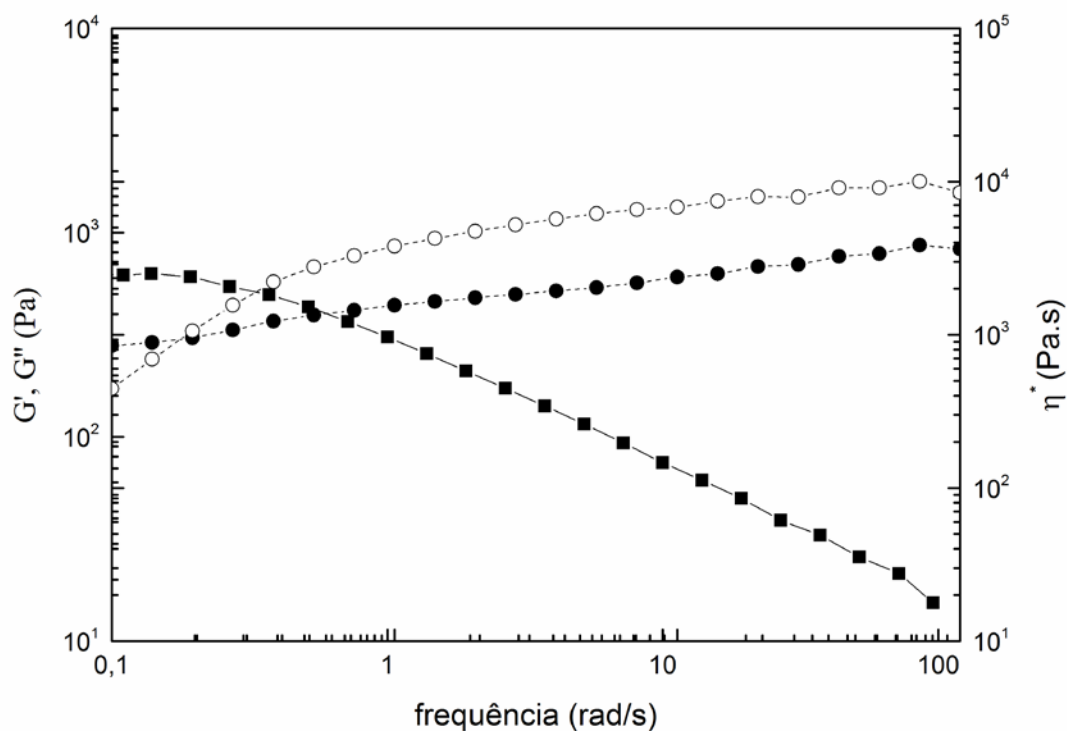
**Figura 12.** Difratoograma de raios X. A: leucina; B: goma arábica e C: misturas contendo 0,2% PL/0,03% GA com NaCl 0 mol/L; temperatura 25°C.

No difratograma do polipeptídeo leucina, podemos observar difração próxima a 20° com formação de pico bem definido, acompanhado de picos menores, porém também bem definidos o que indica a presença de zonas cristalinas na amostra. Esse fenômeno indica que a estrutura do polipeptídeo é formada por ligações não covalentes (BASTOS et al., 2012). Já no difratograma da goma arábica podemos observar uma estrutura amorfa que é caracterizada pela presença de muitos ruídos e banda larga, próximo a 20°. A estrutura amorfa possui arranjos desordenados, menor higroscopicidade e maior solubilidade em água.

Ao observarmos a estrutura dos complexos coacervados formados, observamos picos bem definidos próximos aos ângulos de 35 e 55°, juntamente com a presença de picos menores, indicando a presença de regiões cristalinas em sua estrutura. O estado amorfo apresenta maior solubilidade e velocidade de dissolução, enquanto, substâncias com áreas cristalinas tendem a serem menos solúveis por apresentarem menor higroscopicidade (HELLEN et al., 2007), reafirmando então a formação de precipitados insolúveis no processo de complexação.

### 3.3.3. Propriedades reológicas

Na figura 13 podemos observar o comportamento reológico dos complexos coacervados formados a partir de 0,2 %PL/0,03 %GA, 0 mol/L NaCl. Devido às características da GA, como a baixa viscosidade em solução, não foi possível obter os valores para o polímero isolado nas concentrações utilizadas na formação dos complexos, já que apresentaria comportamento Newtoniano.



**Figura 13.** Módulo de armazenamento ( $G'$ ), dissipação ( $G''$ ) e viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) dos complexos coacervados contendo 0,2% PL/ 0,03% GA, 0 mol/L, sendo: ( $\circ$ )  $G'$ , ( $\bullet$ )  $G''$  e ( $\blacksquare$ )  $\eta^*$ .

Em baixos valores de frequência, observamos que os complexos coacervados apresentam um comportamento mais viscoelástico, porém, conforme foi sendo aumentada a frequência, um comportamento típico de gel é observado nos complexos coacervados, visto que os valores de  $G'$  são superiores e independentes aos valores de  $G''$ . Este comportamento indica que houve alta interação entre o PL e a GA formando uma rede característica da estrutura do gel e comportamento elástico. Resultados similares foram observados por Ru et al. (2012) ao estudar a formação de complexos coacervados entre albumina e pectina. No entanto, De Kruif et al. (2004) observaram diferente comportamento ao utilizar complexos coacervados formados entre WPI/Goma arábica observando valores de  $G''$  muito superiores ao  $G'$  indicando comportamento predominantemente viscoelástico.

A viscosidade aparente diminui quase linearmente com o aumento da frequência, indicando que o comportamento elástico dos coacervados entre o PL e GA origina-se

principalmente das interações eletrostáticas entre a proteína e as cadeias de polissacarídeos (BASTOS et al., 2010), que são condizentes com os comportamentos dos complexos formados entre  $\beta$ -lactoglobulina e pectina anteriormente por Wang et al. (2007).

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a interação entre polipeptídeo-leucina e goma arábica pode resultar na formação de precipitados insolúveis, ou complexos coacervados, dependendo da concentração de polissacarídeo, pH e concentração salina. O pH de formação dos complexos coacervados foi de aproximadamente 4,0, sendo este intermediário ao pI dos polipeptídeos e o pKa da goma arábica. A presença de íons provenientes do cloreto de sódio diminuiu a interação eletrostática entre os biopolímeros, resultando na formação de menores diâmetros de partícula. Uma concentração mínima de 0,03% de goma arábica foi suficiente para se ligar e saturar as moléculas do polipeptídeo, resultando em precipitados com maiores diâmetros de partícula e comportamento elástico característico de géis. Os complexos coacervados formados apresentaram cápsulas esféricas com múltiplos núcleos dispersos na fase polimérica e sua estrutura apresentou zonas de cristalinidade, típica de moléculas com baixa solubilidade.

Visto que a leucina é um aminoácido com importantes propriedades funcionais e benéficas a saúde humana, a coacervação complexa se torna uma alternativa para incorporação deste biopolímero em alimentos.



## 5. REFERÊNCIAS

- AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 4, p. 902-912, Apr 2009.
- BASTOS, D. D. S.; GONÇALVES, M. D. P.; ANDRADE, C. T. D.; ARAÚJO, K. G. D. L.; ROCHA LEÃO, M. H. M. D. Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 683-692, 10// 2012.
- BASTOS, D. S.; BARRETO, B. N.; SOUZA, H. K. S.; BASTOS, M.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; ANDRADE, C. T.; GONÇALVES, M. P. Characterization of a chitosan sample extracted from Brazilian shrimps and its application to obtain insoluble complexes with a commercial whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 709-718, 2010.
- BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1227-1232, 2011.
- COELHO, S.; MORENO-FLORES, S.; TOCA-HERRERA, J. L.; COELHO, M. A.; PEREIRA, M. C.; ROCHA, S. Nanostructure of polysaccharide complexes. **J Colloid Interface Sci**, v. 363, n. 2, p. 450-455, Nov 15 2011.
- COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte–protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 1-2, p. 52-78, 2005.
- DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.
- FOEGEDING, E. A.; LUCK, P. J.; DAVIS, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2-3, p. 284-292, 2006.
- GUZEY, D.; KIM, H. J.; MCCLEMENTS, D. J. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin–pectin membranes. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 6, p. 967-975, 2004.
- HELLEN, K. S.; MONIKA, P. T.; SILVA, M. A.; LARANJEIRA, M. C.; DE QUALIDADE, L. D. C. Desenvolvimento, Avaliação e Caracterização Físico Química de Micropartículas Constituídas de Aciclovir/Quitosana Desenvolvidas pela Técnica de Spray-drying. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n. 6, p. 866-871, 2007.
- HUANG, G. Q.; SUN, Y. T.; XIAO, J. X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chem**, v. 135, n. 2, p. 534-539, Nov 15 2012.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.

LI, X.; FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; YAO, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, M.; ZHANG, K.; JIANG, F. Complexation of bovine serum albumin and sugar beet pectin: structural transitions and phase diagram. **Langmuir**, v. 28, n. 27, p. 10164-10176, Jul 10 2012.

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

LOLLO, P. C. B.; BATISTA, T. M.; MOURA, C. S.; MORATO, P. N.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; CARNEIRO, E. M.; AMAYA-FARFAN, J. l-Leucine supplemented whey protein. Dose–response effect on heart mTOR activation of sedentary and trained rats. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 543-550, 8// 2013.

LV, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 323-332, 2013.

OU, Z.; MUTHUKUMAR, M. Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations. **J Chem Phys**, v. 124, n. 15, p. 154902, Apr 21 2006.

PRIFTIS, D.; TIRRELL, M. Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions. **Soft Matter**, v. 8, n. 36, p. 9396, 2012.

RU, Q.; WANG, Y.; LEE, J.; DING, Y.; HUANG, Q. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 838-846, 2012.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C.; DE KRUIF, C. G.; HARDY, J. Study of beta-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 267-280, Mar 2001.

SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 167, n. 1-2, p. 63-70, Sep 14 2011.

SINGH, S. S.; SIDDHANTA, A. K.; MEENA, R.; PRASAD, K.; BANDYOPADHYAY, S.; BOHIDAR, H. B. Intermolecular complexation and phase separation in aqueous solutions of oppositely charged biopolymers. **Int J Biol Macromol**, v. 41, n. 2, p. 185-192, Jul 1 2007.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA ROJAS, E. E.; MELO, N. R.; GASPAR, A.; LINS, J. F. C. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 375-381, 2013.

SU, Y.; LAM, T. K.; HE, W.; POCAI, A.; BRYAN, J.; AGUILAR-BRYAN, L.; GUTIÉRREZ-JUÁREZ, R. Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 85-93, 2012.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4-5, p. 166-178, 2007.

WANG, X.; LEE, J.; WANG, Y. W.; HUANG, Q. Composition and rheological properties of beta-Lactoglobulin/pectin coacervates: effects of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 3, p. 992-997, Mar 2007.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 293-303, 2003.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 11, p. 3550-3555, 2004.

WITTEMANN, A.; BALLAUFF, M. Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 45, p. 5269, 2006.

## **CAPÍTULO IV**

### **ESTABILIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES FORMADAS ENTRE LACTOFERRINA E OVALBUMINA**

## RESUMO

As proteínas são amplamente utilizadas na formação de emulsões devido às suas capacidades emulsificantes e estabilizantes. Neste trabalho, foram utilizadas duas proteínas com diferentes estruturas moleculares e pontos isoelétricos, a lactoferrina (Lf) e a ovalbumina (OVA). Para avaliar a estabilidade dos sistemas, foram utilizadas diferentes proporções das proteínas individuais e de misturas contendo os dois polímeros, submetendo a diferentes faixas de pH e estocagem durante 7 dias a 25°C. Os sistemas contendo 3% da proteína Lf isolada se mantiveram estáveis em todos os pH estudados, enquanto os que continham 1% da proteína OVA só se mantiveram estáveis em alto valor de pH (8.0). As emulsões contendo as misturas entre as duas proteínas apresentaram-se estáveis na região de pH entre os pontos isoelétricos das proteínas que foi atribuído a ligação eletrostática devido as cargas opostas que as proteínas apresentam nesse pH. Na avaliação das propriedades reológicas, as emulsões contendo 3% Lf apresentaram comportamento viscoso, enquanto as que continham as misturas entre as proteínas e a emulsão contendo 3% OVA apresentaram comportamento elástico. Este estudo fornece importantes informações para a utilização de ingredientes funcionais através da aplicação de emulsões.

**Palavras-chave: proteínas do soro; proteínas da clara; emulsificantes**

## ABSTRACT

Proteins are widely used in the formation of emulsions due to its emulsifying and stabilizing capabilities. In this study, two proteins with different isoelectric points and molecular structures, lactoferrin (Lf) and ovalbumin (OVA) were used. To evaluate the stability of the systems, different proportions of the individual proteins were used and mixtures containing two polymers, submitting to different pH ranges and storage for 7 days at 25 ° C. Systems containing 3% of Lf isolated protein remained stable in all pH studied, while containing 1% of OVA, protein were stable only at high pH (8.0). Emulsions containing mixtures of the two proteins were stable in the pH region between the isoelectric points of the proteins that has been assigned to the connection because electrostatics oppositely charged proteins present in pH. In evaluation of rheological properties of emulsions containing 3% Lf showed viscous behavior, while containing mixtures of proteins and the emulsion containing 3% OVA exhibited elastic behavior. This study provides important information for the use of functional ingredients by applying emulsions.

**Key-words: whey proteins; white proteins; emulsifier**

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas são amplamente utilizadas como emulsificantes em diversos alimentos. A estabilidade de emulsões óleo-em-água contendo proteínas depende fortemente da densidade do polímero e da estrutura das camadas de adsorção sobre a superfície das gotículas, por essa razão elas vêm sendo amplamente estudadas para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos sistemas emulsionados (YADAV et al., 2010; TIAN et al., 2011; TOKLE e MCCLEMENTS, 2011; MCCARTHY et al., 2014). A camada formada ao redor da gotícula pela adsorção de proteínas evita a coalescência e estabiliza a emulsão. No entanto, as emulsões estabilizadas com proteína são altamente sensíveis às estresses como pH, força iônica, e temperatura (WILDE et al., 2004; SUN e GUNASEKARAN, 2009; XU e YAO, 2009).

As emulsões têm se mostrado muito adequadas para encapsular componentes lipofílicos. Estes sistemas podem ser produzidos a partir de ingredientes naturais, com alta qualidade nutricional usando operações de processamento relativamente simples, tais como mistura e homogeneização (MCCLEMENTS e LI, 2010; RAO e MCCLEMENTS, 2012; TOKLE et al., 2012; ZIANI et al., 2012). As características interfaciais das emulsões, tais como a espessura, carga elétrica e polaridade podem ser controladas selecionando proteínas emulsificantes com diferentes propriedades moleculares, tais como  $\beta$ -caseína, gelatina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina e lactoferrina (MCCLEMENTS, 2005; MCCLEMENTS e LI, 2010; TOKLE et al., 2012).

Os estudos envolvendo as emulsões têm aumentado devido a possibilidade de aplicação de ingredientes funcionais aos alimentos, como por exemplo, os óleos essenciais. O óleo de coco extra virgem é rico em ácidos graxos poli-insaturados e possui alta capacidade antioxidante, desempenhando importante função no sistema biológico, como por exemplo reduzir a susceptibilidade do LDL à peroxidação do lipídeo em seres humanos e animais de laboratório (NEVIN e RAJAMOHAN, 2004,2008).

O objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades físico-químicas envolvidas na estabilidade de emulsões óleo-água formadas a partir de óleo de coco extra virgem, utilizando as proteínas lactoferrina e ovalbumina como agentes emulsificantes e estabilizantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material

A lactoferrina desidratada (Bioferrin® 2000) foi obtida a partir da empresa Glanbia Nutricionais (Fitchburg, EUA) e a composição reportada era: 95% de proteína, 5% de umidade, 0.5% de gordura, 2.0% de minerais. A albumina cristalizada obtida do ovo (A5503) foi obtida a partir da empresa Sigma-Aldrich (St. Luis, EUA) contendo 98% da proteína. O óleo de coco extra virgem foi obtido a partir da empresa Copra (Brasil). Neste experimento foram utilizados reagentes analíticos e água deionizada (Master P&D, Gehaka, Brasil, condutividade  $0,05 \mu/cm \pm 0,01$ ).

## **2.2. Método**

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de engenharia e tecnologia agroindustrial (LETA), localizado na Universidade Federal Fluminense, Escola de Engenharia, Volta Redonda, RJ, Brasil.

### **2.2.1. Preparo da solução de proteína**

Todas as concentrações foram expressas com base no peso total (m/m). As concentrações de Lf (3%, 2,25%, 1,5%, 0,75% e 0%) e OVA (3%, 2,25%, 1,5%, 0,75% e 0%) foram preparadas dissolvendo-as previamente em água deionizada e agitadas com auxílio de agitador magnético (Novatecnica, modelo NT101, Brasil) por 3 horas. A solução contendo a mistura entre as duas proteínas (3% Lf, 0% OVA; 2,25% Lf, 0,75% OVA; 1,5% Lf, 1,5% OVA; 0,75% Lf, 2,25% OVA; 0% Lf, 3% OVA) foram ajustadas em diferentes valores de pH (2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0) e agitadas com auxílio de agitador magnético.

### **2.2.2. Preparo da emulsão**

As emulsões foram preparadas misturando 10% de óleo de coco com 90% da solução de proteína a partir das diferentes proporções das proteínas e pH das soluções. A solução foi homogeneizada utilizando ultra-turrax (T 10 Basic, Gehaka, Brasil) durante 2 minutos a 13.000 rpm e posteriormente foram submetidas ao ultrassom durante 3 minutos (Ultrasonic Processor, Hilscher, Alemanha) à amplitude de 100% e ciclo de 0,5/min.

### **2.2.3. Potencial- $\zeta$ e diâmetro de gotícula**

As propriedades físicas e estabilidade da emulsão foram monitoradas através da medição de distribuição do diâmetro de gotícula e potencial-  $\zeta$  no 1º e 7º dia após a formação. As emulsões foram diluídas em água deionizada com pH pré-ajustado em uma proporção de 1:200 (v/v) e foram acondicionadas em tubos capilares que foram posicionados dentro do equipamento (Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As amostras foram equilibradas no instrumento durante 1 minuto. Os dados foram coletados através de pelo menos 50 sequências de leitura e processados utilizando o modelo Smoluchowski.

### **2.2.4. Influência da temperatura sobre a estabilidade das emulsões**

Após a avaliação das emulsões mais estáveis através do item 2.2.3, as emulsões foram submetidas à variação de temperatura (30 a 90°C com intervalo de 10°C) em banho termostático com precisão de 0,05°C (MPC-108A, Huber, Offenburg, Alemanha) e mantidas em cada temperatura durante 20 minutos para posterior avaliação de seu diâmetro de gotícula. Seguindo a metodologia proposta por Bengoechea et al. (2011) as emulsões foram diluídas em água deionizada (1:200 v/v) com pH pré-ajustado para as análises.

### 2.2.5. Propriedades reológicas

As propriedades reológicas das emulsões formadas foram determinadas empregando um reômetro rotacional Haake™ Mars II *Rotational Rheometer* (Thermo Scientific Inc., Alemanha) com acessório cone e placa (20 mm, ângulo de 1°) e gap de 0,025 mm entre os elementos. Antes das análises, as emulsões foram acomodadas na placa do reômetro (5 minutos) juntamente com a cúpula de proteção a fim de estabilizar a temperatura e evitar a evaporação da água durante a análise. O módulo de armazenamento ( $G'$ ), o módulo de dissipação ( $G''$ ) foram medidos enquanto a frequência variava de 0,1 à 100 rad/s a 25°C. A fim de determinar o ponto de gelificação das soluções (viscosidade aparente), foi realizada a análise de rampa de temperatura (20 a 90°C, 0,5°C por min) utilizando uma frequência de 6,28 rad/s.

### 2.2.6. Análise estatística

Os valores de potencial-  $\zeta$  e diâmetro de gotícula foram obtidos a partir da média de pelo menos 50 medições para cada pH e os resultados são apresentados com média e desvio padrão calculados ( $p < 0,05$ ). As análises reológicas foram realizadas em duplicata.

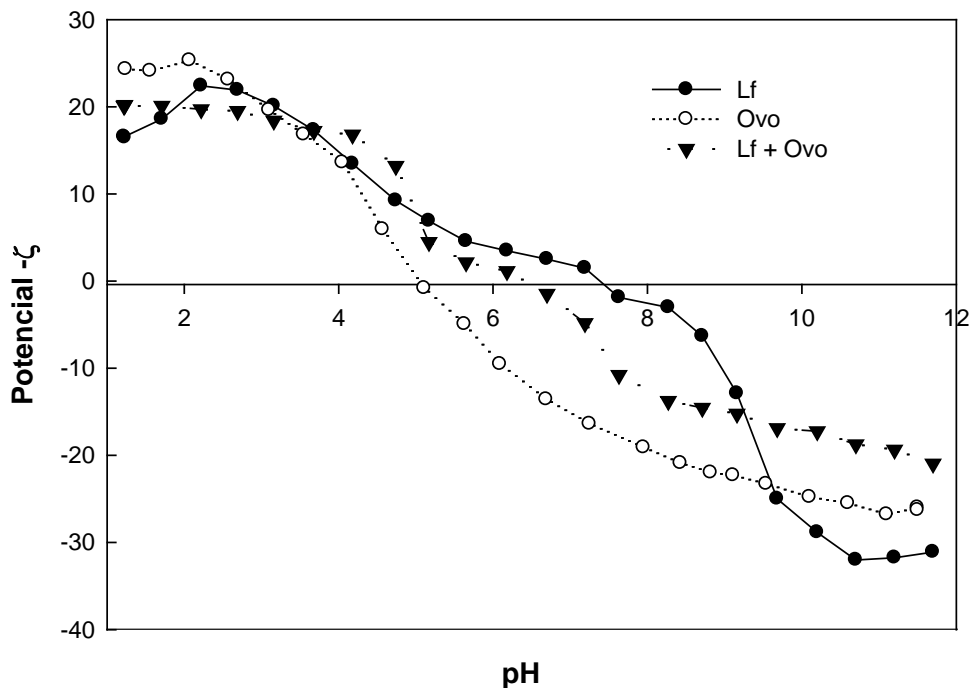
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Propriedades das proteínas nas soluções aquosas

Inicialmente, foi avaliado o potencial-  $\zeta$  individual das proteínas e das misturas contendo 3%Lf e 3%OVA para efeitos de comparação com seus comportamentos nas emulsões, como pode ser observado na Figura 1.

Podemos visualizar que a Lf apresentou mudança na carga elétrica na solução individual de proteína, indo da carga negativa no pH 11,8 (-31,1) à positiva no pH 1,8 (+16,45) com ponto de carga zero (pI) próximo a 8,0, como relatado na literatura (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009). A OVA apresentou comportamento semelhante, indo da carga negativa no pH 11,7 (-26,3) a carga positiva no pH 1,2 (+24,3) porém, com ponto de carga zero próximo ao pH 5,0, dados compatíveis como relatado por Croguennec et al. (2007) para o pI da proteína. A um baixo pH, o grupamento amino das proteínas está carregado positivamente e o grupo carboxílico encontra-se neutro, enquanto que em um pH mais alto o grupamento amino encontra-se neutro e o grupamento carboxílico está carregado negativamente. Logo, em um  $pH < pI$ , o número total de grupamentos amino é superior ao grupamento carboxílico, enquanto no  $pH > pI$  ocorre o oposto. Quando o  $pH = pI$ , o número de grupamentos amino e carboxílico encontra-se em equilíbrio, e então a proteína irá apresentar ponto de carga zero .





**Figura 1.** Efeito do pH no potencial-  $\zeta$  das soluções contendo 3%Lf, 3% OVA e das misturas contendo 3%Lf/3%OVA.

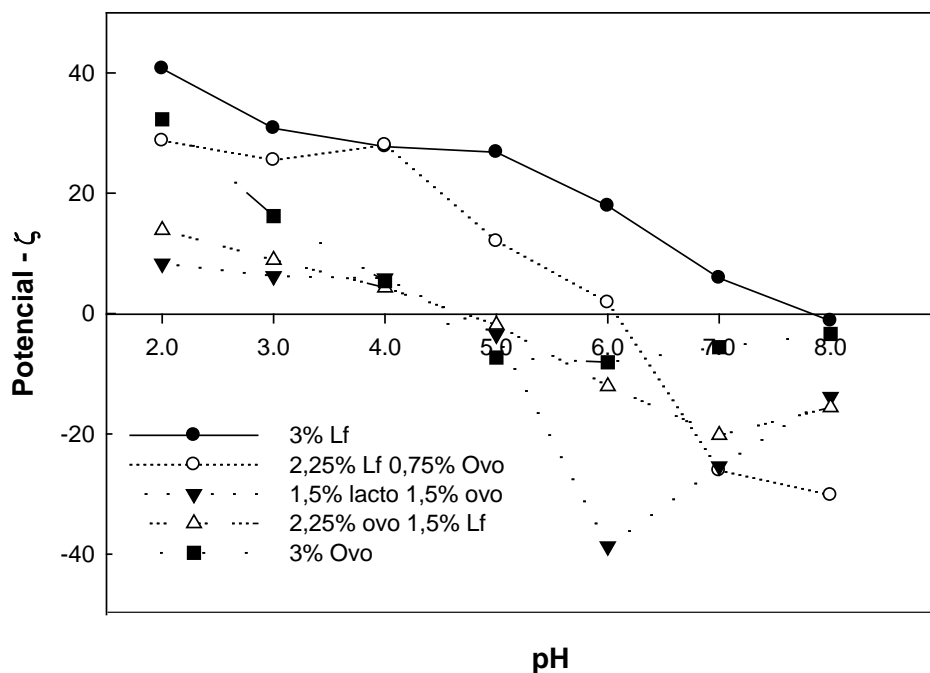
As misturas contendo 3% Lf/3%OVA apresentaram carga negativa (-20,96) no pH 11,7 até a carga positiva (+20,2) no pH 1,18, tendo com ponto de carga zero próximo ao pH 6,5, estando entre os dos polímeros originais. Neste pH a Lf apresenta-se carregadamente positivamente e a OVA carregada negativamente, o que indica a possível ligação eletrostática entre ambas.

### 3.2. Influência do pH e proporção dos biopolímeros nas propriedades e estabilidade das emulsões

As emulsões são amplamente utilizadas em alimentos com diferentes valores de pH, além de após a ingestão, serem submetidas a diferentes condições no trato digestivo, por isso, é de grande importância entender a influência do pH nas propriedades físico-químicas das emulsões (TOKLE et al., 2012).

Na Figura 2 podemos observar a influência do pH nas emulsões contendo diferentes proporções de proteína no sétimo dia após sua formação.

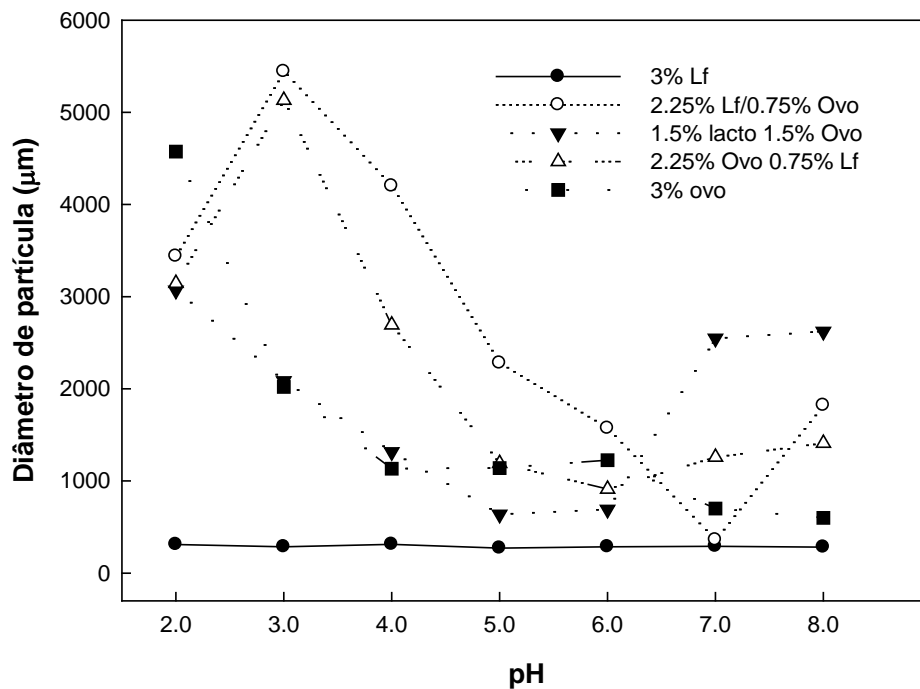
As emulsões contendo 3% Lf apresentaram comportamento similar quando comparadas a solução aquosa de proteínas (Figura 1) possuindo carga positiva do pH 1,7 ao pH 8,0, com um ponto de carga zero próximo ao pI da proteína. As emulsões contendo 3% OVA também apresentaram comportamento semelhante à solução aquosa do polímero original, com ponto de carga zero próximo ao pI da proteína (entre 4,5 e 5,0).



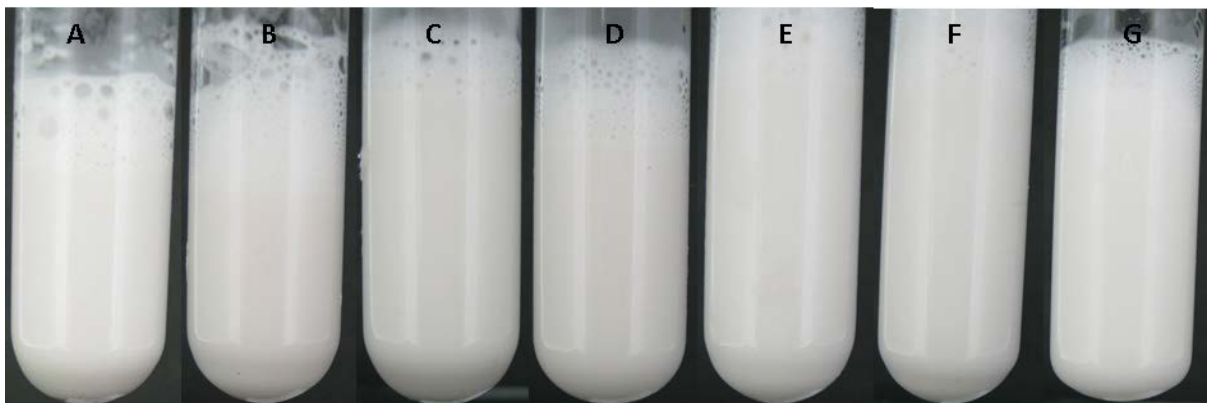
**Figura 2.** Potencial-  $\zeta$  das emulsões contendo 10% de óleo de coco e diferentes proporções de proteína, no sétimo dia após sua formação.

O comportamento das emulsões contendo as misturas entre as proteínas variou de acordo com a quantidade de Lf e OVA empregadas no sistema. Podemos observar que todas as emulsões apresentaram carga positiva em baixos valores de pH e carga negativa em altos valores de pH, com ponto de carga zero entre 5,0 e 6,2, sendo que quando a concentração de Lf era superior a da OVA (2,25% Lf/0,75% OVA) o ponto de carga zero (6,2) era mais próximo ao PI da Lf e quando a concentração de OVA era superior a concentração de Lf (2,25% OVA/0,75% Lf) o ponto de carga zero (5,0) era mais próximo ao pI da OVA. Comportamento similar foi observado em emulsões contendo lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina (YE e SINGH, 2006; TOKLE et al., 2012). A composição das proteínas também exerceu influência significativa na estabilidade à agregação das gotículas em função do pH (Figura 3).

Podemos observar que as emulsões contendo 3% Lf permaneceram estáveis do pH 2,0 ao 8,0, não havendo agregação das gotículas ( $<310$  nm). A alta estabilidade destas emulsões pode ser atribuída a uma combinação de repulsão eletrostática e estérica entre as gotículas. Presumidamente, as moléculas de Lf orientam-se na interface óleo-água de modo que os grupos hidrofílicos de hidratos de carbono apontam para a fase aquosa e fornecem uma forte repulsão estérica (WILDE et al., 2004; YE e SINGH, 2006; TOKLE et al., 2012). Visualmente, o resultado foi confirmado não sendo observada separação de fases (Figura 4).

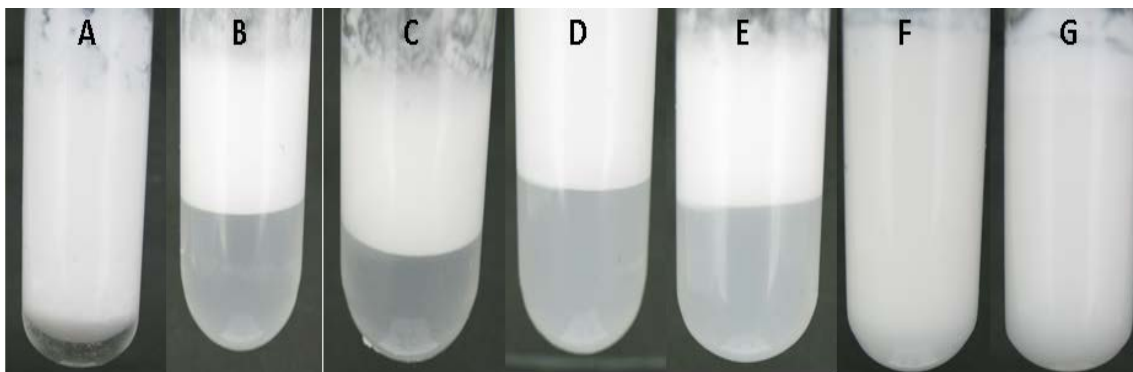


**Figura 3.** Influência do pH nos diâmetros de partícula das emulsões contendo 10% de óleo de coco em diferentes proporções de proteína, no sétimo dia após sua formação.



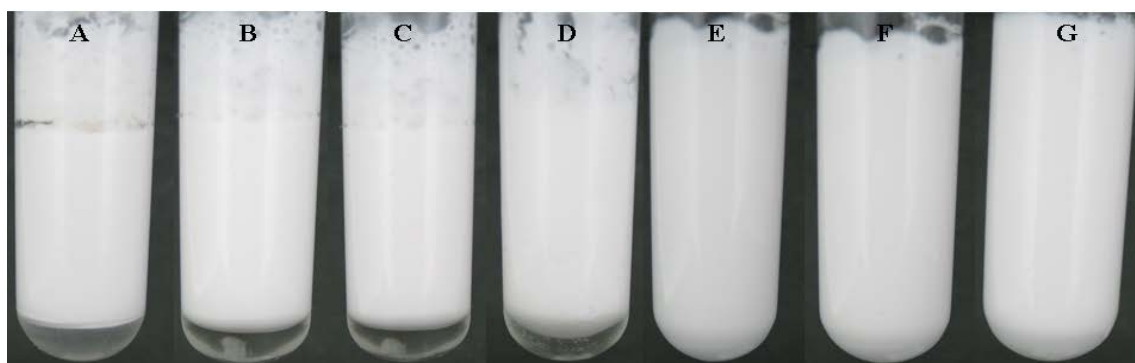
**Figura 4.** Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 3% Lf no sétimo dia após sua formação. **A:** pH 2,0; **B:** 3,0; **C:** pH 4,0; **D:** pH 5,0; **E:** pH 6,0; **F:** pH 7,0 e **G:** pH 8,0.

As emulsões contendo 3% OVA (Figura 5) sofreram forte influência do pH em relação a estabilidade à agregação das gotículas. Podemos observar que do pH 2,0 ao 6,0 ocorreu forte agregação das gotículas (>1.200 nm), porém em altos valores de pH (7,0 a 8,0) as emulsões tenderam à estabilidade apresentando menores valores de gotícula (< 702 nm).



**Figura 5.** Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 3% OVA no sétimo dia após sua formação. **A:** pH 2,0; **B:** 3,0; **C:** pH 4,0; **D:** pH 5,0; **E:** pH 6,0; **F:** pH 7,0 e **G:** pH 8,0.

O mesmo ocorreu com as emulsões contendo 2,25%OVA/0,75%Lf (Figura 6), apresentando menor agregação das moléculas em altos valores de pH (6,0 a 8,0). Este fato pode ser explicado por haver maior repulsão eletrostática ao invés de repulsão estérica entre as gotículas de óleo e as moléculas de ovalbumina, levando a estabilidade da emulsão. Consequentemente, as partículas tendem a agregar quando o pH está abaixo ou próximo do pI da proteína, pois a repulsão eletrostática não é forte o suficiente para superar as forças de atração entre as moléculas (DEMETRIADES et al., 1997).

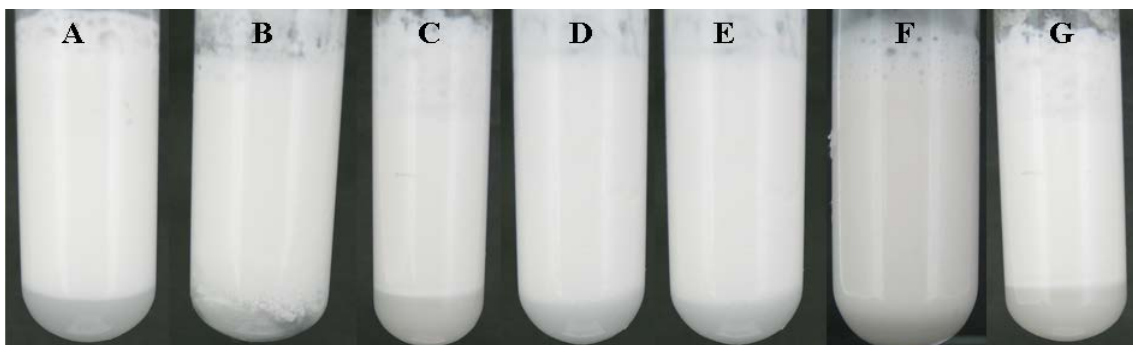


**Figura 6.** Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 2,25%OVA/0,75%Lf no sétimo dia após sua formação. **A:** pH 2,0; **B:** 3,0; **C:** pH 4,0; **D:** pH 5,0; **E:** pH 6,0; **F:** pH 7,0 e **G:** pH 8,0.

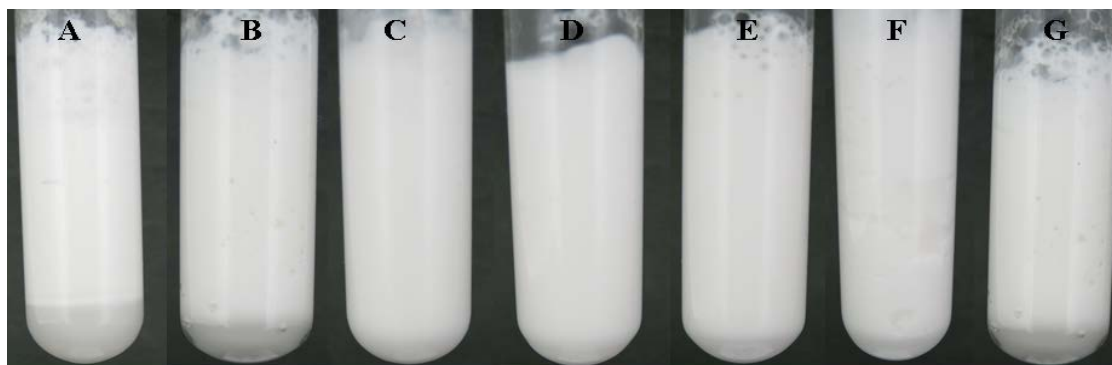
Todas as emulsões contendo as misturas entre Lf e OVA apresentaram agregação das moléculas em baixos valores do pH, ficando mais estáveis entre o pH 5,0 e 7,0, sendo estes valores intermediários aos pontos isoelétricos das proteínas. Estes resultados sugerem que a Lf e OVA são capazes de formar um complexo interfacial que melhora a estabilidade das emulsões à agregação. Segundo Tokle et al. (2012) estes complexos podem ser formados de diferentes maneiras que levam a uma variedade de estruturas interfaciais: 1) Lf adsorve a superfície das gotículas e, em seguida a OVA adsorve na parte superior formando uma multicamada; a OVA adsorve a superfície das gotículas, e, em seguida, Lf adsorve na parte superior formando uma multicamada; Lf e OVA formam um complexo em solução, que, em seguida, é adsorvido às superfícies das gotículas formando uma camada de mistura; Lf e OVA são co-adsorvidas às superfícies das gotículas formando uma camada de mistura, podendo ser

uma monocamada ou multicamada. Mais estudos são necessários para determinar o mecanismo preciso de formação de complexos e das estruturas interfaciais formadas.

Ainda entre as emulsões contendo as misturas entre as proteínas, a que continha 2,25%Lf/ 0,75% OVA (Figura 7) no pH 7,0 foi a que apresentou menor diâmetro de gotícula (361 nm), se mantendo totalmente estável durante os 7 dias de estocagem. Apesar das emulsões contendo apenas a ovalbumina só se apresentarem estáveis na faixa de pH entre 7,0 e 8,0, quando adicionadas ao sistema contendo 1,5%Lf/1,5%OVA (Figura 8) foi possível obter emulsões estáveis e com menores diâmetros de gotícula (<700 nm) entre o pH 5,0 e 6,0.



**Figura 7.** Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 2,25%Lf/0,75%OVA no sétimo dia após sua formação. **A:** pH 2,0; **B:** 3,0; **C:** pH 4,0; **D:** pH 5,0; **E:** pH 6,0; **F:** pH 7,0 e **G:** pH 8,0

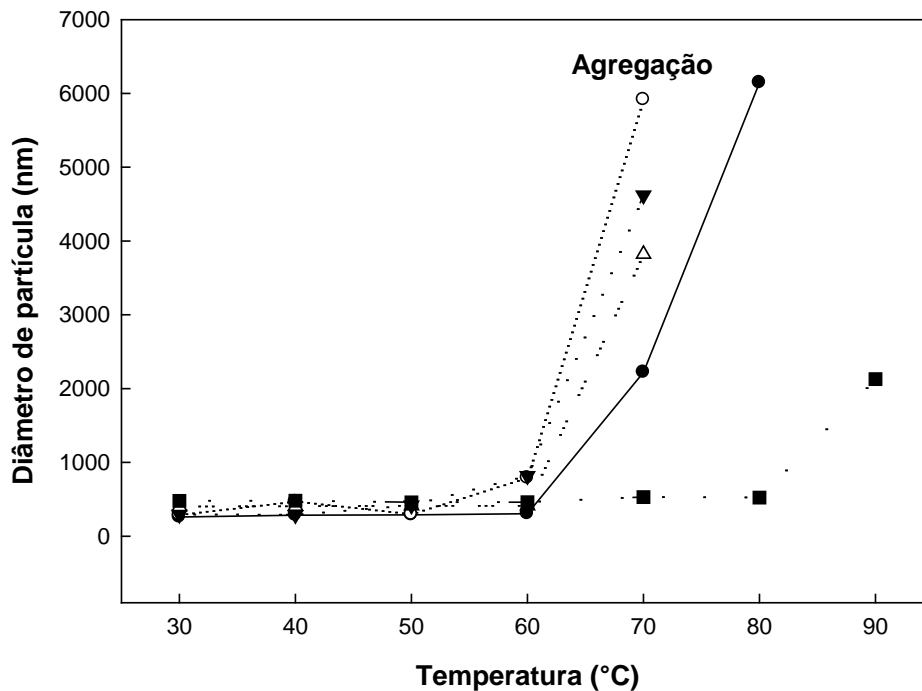


**Figura 8.** Fotografias das emulsões contendo 10% de óleo de coco e soluções a 1,5%Lf/1,5%OVA no sétimo dia após sua formação. **A:** pH 2,0; **B:** 3,0; **C:** pH 4,0; **D:** pH 5,0; **E:** pH 6,0; **F:** pH 7,0 e **G:** pH 8,0

### 3.3. Influência da temperatura na estabilidade das emulsões

Ao serem introduzidas em um alimento, emulsões podem ser submetidas a altas temperaturas durante a produção, estocagem ou utilização (ex. pasteurização, esterilização, cozimento), por isso é de grande importância avaliar a estabilidade das emulsões frente a diferentes temperaturas.

Na Figura 9 podemos observar os diâmetros de gotícula das emulsões contendo 3%Lf (pH 7,0), 3%Ovo (pH 8,0) e das emulsões contendo as misturas com diferentes proporções Lf/Ovo com pH entre os pontos isoelétricos das proteínas (6.0)

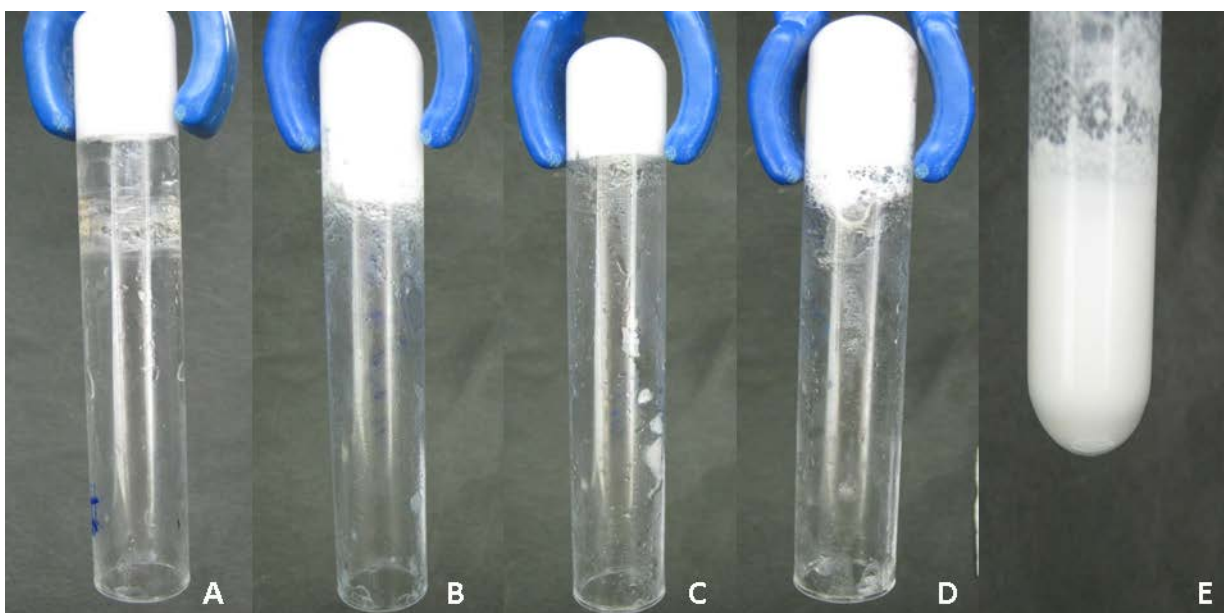


**Figura 9.** Diâmetro de partícula das emulsões contendo diferentes concentrações de Lf e OVA submetidas a variação de temperatura. (●) 3% Lf, pH 7,0; (○) 2,25% Lf 0,75% Ovo, pH 6,0; (▼) 1,5% Lf 1,5% Ovo, pH 6,0; (△) 2,25% Ovo 0,75% Lf, pH 6,0; (■) 3% Ovo, pH 8,0.

Inicialmente, todas as amostras contendo 3% OVA foram ajustadas para o pH 8,0 e todas as outras emulsões estudadas foram ajustadas para o pH 6,0 por ser o pH em que as emulsões apresentaram maior estabilidade a 25°C. As emulsões contendo 3% Lf apresentaram aumento do diâmetro de gotículas, indicando início de agregação próximo a 60°C, que é indicado por ser a primeira temperatura de desnaturação da Lf (CONESA et al., 2010). Ao atingir temperaturas superiores a 80°C, ocorreu agregação das moléculas, surgindo uma emulsão com aspecto de gel (Figura 10-A). Resultados semelhantes foram observados por Tokle et al. (2012) indicando que apesar de neste pH ocorrer forte repulsão eletrostática (por ser afastado do seu pI), ligações hidrofóbicas entre a proteína e as gotículas lipídicas superam a repulsão eletrostática levando a aproximação das micelas e consequente agregação. Segundo Croguennec et al. (2007) quando a temperatura de desnaturação é atingida ocorre exposição de aminoácidos não polares acarretando em interações hidrofóbicas.

Já as emulsões contendo 3% OVA se mantiveram estáveis à agregação em praticamente todas as temperaturas estudadas, ocorrendo aumento do diâmetro de gotículas acima de 80°C, não chegando a gelificar a emulsão (Figura 10-E). Croguennec et al. (2007) observaram através da cromatografia de permeação em gel que uma solução contendo 5% de OVA apresentou 65% de sua estrutura desnaturada após ser aquecida durante 5 minutos a temperatura de 80°C, porém, a desnaturação vai depender das condições do sistema, como pH, concentração da proteína e força iônica. No pH 8,0, há presença de forte repulsão eletrostática entre as moléculas da proteína por estar em pH afastado de seu pI, prevenindo a aproximação das moléculas e consequente gelificação.

As amostras contendo as misturas entre as proteínas (Figuras 10-B, 10-C e 10-D) tiveram comportamento variando de acordo com a concentração de cada biopolímero, porém, todas demonstraram instabilidade e sofreram agregação das gotículas entre as temperaturas de 60 e 70°C. Nestas temperaturas, pode ser observado que o diâmetro de gotículas das misturas era maior nas emulsões contendo maior concentração de lactoferrina (2,25% Lf/0,75% OVA, >6.000nm) e menor quando a concentração de OVA era superior a da Lf (2,25% OVA/0,75% LF, <4.000 nm), devido a maior instabilidade da Lf frente a altas temperaturas. Ainda podemos observar que as emulsões contendo as misturas apresentaram maiores diâmetros de gotícula em temperaturas inferiores quando comparadas as emulsões contendo cada proteína isolada. Resultados similares foram observados por (Tokle et al. (2012)) ao estudar a formação de emulsões a partir de interações entre a lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina. Este fato ainda não foi totalmente elucidado, porém, pode-se sugerir que uma possível interação eletrostática entre as moléculas da LF e OVA, por estarem em pH entre o pI de cada proteína, tenham causado mudanças físicas nas camadas das proteínas que envolvem as gotículas de óleo.



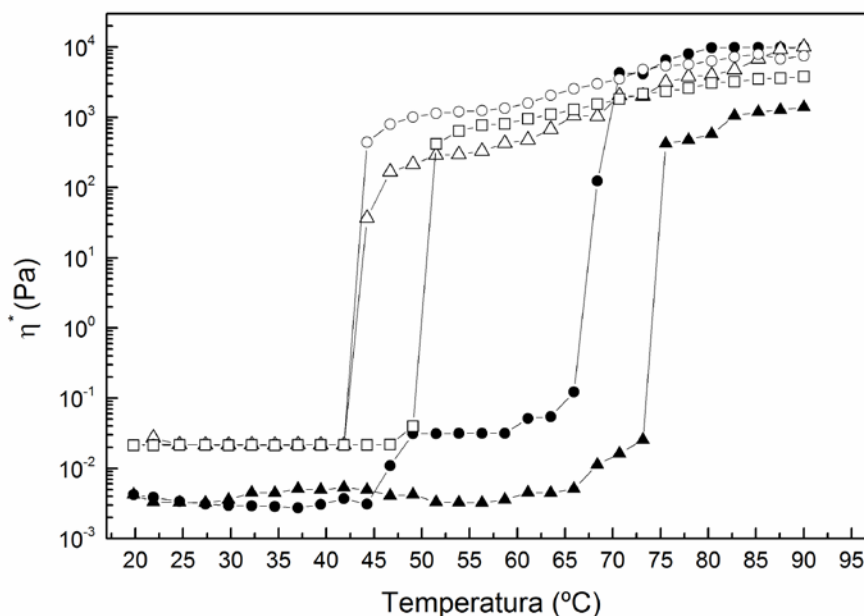
**Figura 10.** Fotografias de emulsões contendo diferentes proporções Lf/OVA após serem submetidas a altas temperaturas. **A:** 3% Lf, 80°C; **B:** 2,25% Lf/0,75% OVA, 70°C; **C:** 1,5% Lf/OVA, 70°C; **D:** 2,25% OVA/0,75% Lf, 70°C e **E:** 3% OVA, 90°C.

Para reafirmar os resultados apresentados, foi realizada a análise de viscosidade aparente com auxílio do reômetro (Figura 11), utilizando as emulsões formadas no pH em que apresentaram maior estabilidade nas análises de diâmetro de gotícula a 25°C.

Como esperado, as emulsões contendo 3% Lf apresentaram aumento abrupto da viscosidade entre as temperaturas de 65 a 70°C, mesmas temperaturas onde apresentaram sinais de agregação na análise de diâmetro de gotícula. As amostras contendo as misturas entre a Lf e OVA tiveram aumento da viscosidade nas temperaturas entre 40 e 50°C, um pouco abaixo das que apresentaram agregação nos diâmetros de gotícula (60°C). Este fato pode ter ocorrido devido às características da própria análise, como a aplicação da frequência

que acirram as mudanças na estrutura das moléculas. A viscosidade foi maior nas emulsões que continham concentrações de Lf superiores a OVA, e novamente, reafirmam os maiores diâmetros de gotícula e gelificação destas soluções.

O gel é formado quando os agregados interfaciais começam a se sobrepor e seu endurecimento ocorre principalmente devido ao rearranjo das moléculas em forma de rede em escala de diferentes comprimentos (VAN VLIET et al., 2004). É o resultado de interações químicas (eletrostática e hidrofóbica) entre as moléculas de uma proteína única ou partir de interações entre as moléculas de proteínas conjugadas. A desestabilidade da estrutura terciária nativa das proteínas aumenta suas interações para um nível que, em última instância provoca a formação de uma rede estável. Este mecanismo pode ser induzido pela adição de produtos químicos, pressão hidrostática, aquecimento ou hidrólise enzimática. Cada um destes processos induz o desdobramento parcial ou total da cadeia resultando na agregação da proteína e, finalmente, a formação do gel (VAN VLIET et al., 2004; SUN e ARNTFIELD, 2010).

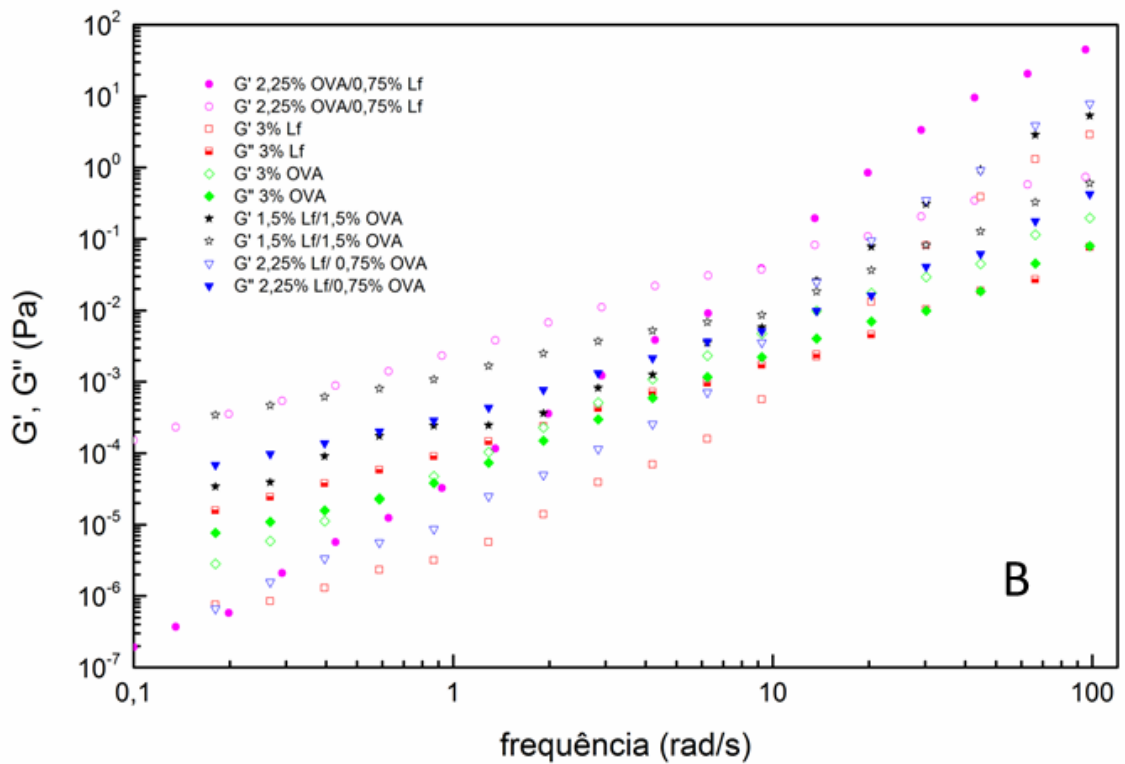
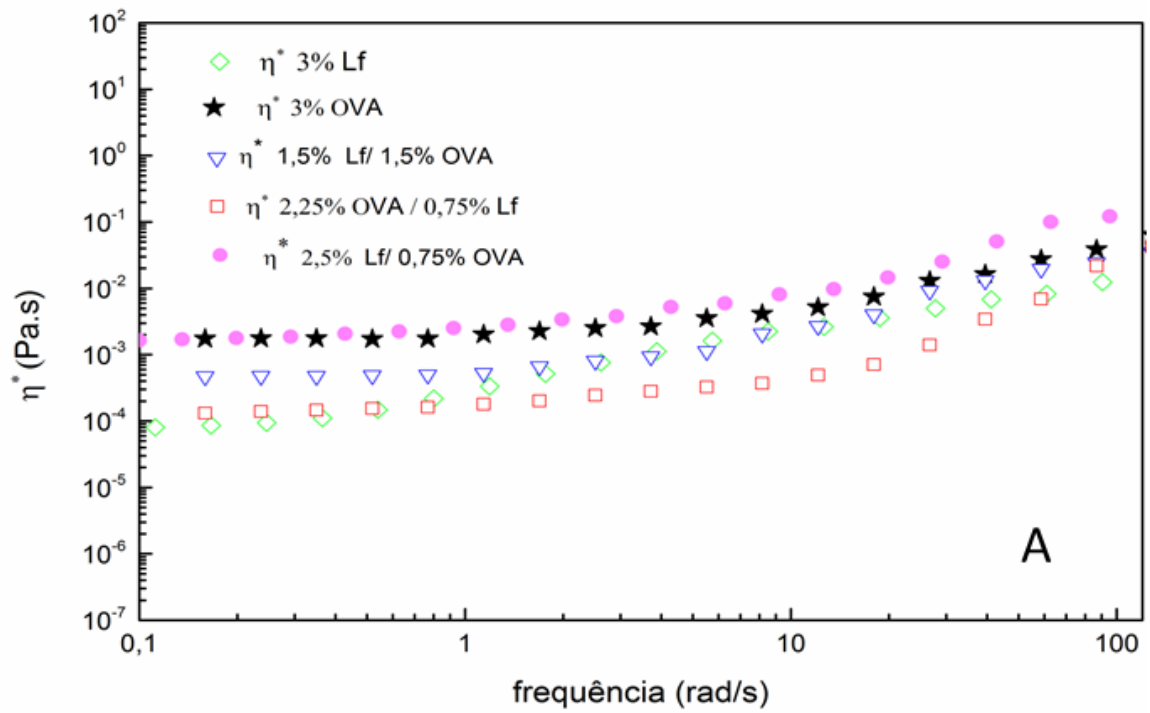


**Figura 11.** Viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) das emulsões em dependência da temperatura. (●) 3% Lf; (○) 2,25% Lf/ 0,75% OVA; (□) 1,5% Lf/1,5% OVA; (Δ) 2,25% OVA/ 0,75% Lf; (▲) 3% OVA.

### 3.4. Propriedades reológicas das emulsões

Os ensaios oscilatórios e a viscosidade aparente foram estudados com as emulsões formadas no pH em que se apresentaram mais estáveis (3% Lf, 2,25% Lf/0,75% OVA, 1,5%Lf/1,5% OVA, 2,25% OVA/ 0,75% Lf no pH 6,0 e 3% OVA no pH 8,0) como mostra a Figura 12.





**Figura 12.** **A:** Viscosidade aparente ( $\eta^*$ ) das emulsões contendo diferentes misturas de polímeros. **B:** Módulos de armazenamento ( $G'$ ), dissipação ( $G''$ ) das emulsões contendo diferentes misturas de polímeros. T: 25°C.

Podemos observar diferentes comportamentos de acordo com as proporções de Lf e OVA empregadas nas emulsões. As emulsões contendo 3% Lf apresentaram  $G' > G''$  e quase paralelos, o que indicou a formação de um gel fraco. No pH 6,0, a Lf estava mais próxima ao seu pI e por isso apresentou maior repulsão eletrostática, o que impossibilitou a agregação das moléculas, impedindo assim a formação da estrutura de rede, promovendo menores diâmetros de partícula e consequentemente maior estabilidade (MCCLEMENTS e LI, 2010). Diferentes resultados foram observados por McCarthy et al. (2014) que ao estudarem emulsões formadas a partir de lactoferrina e  $\beta$ -caseína na presença de cloreto de cálcio, observaram comportamento elástico em todas as amostras estudadas.

Todas as emulsões contendo as misturas entre as duas proteínas e a emulsão contendo 3% OVA apresentaram comportamento viscoso em menores frequências (até 10 rad/s), visto que  $G'' > G'$ . Este comportamento é típico de sistemas com ausência de polissacarídeo ou baixa concentração de proteínas (CAPITANI et al., 2007). Com o aumento da frequência, as emulsões passaram a apresentar comportamento mais elástico ( $G' > G''$ ) e maior viscosidade aparente (Figura 12-A) como também foi observado por Wooster e Augustin (2007) que ao estudarem a formação de emulsões filmogênicas a partir de conjugados de proteínas do soro de leite/ dextrana, formaram uma rede a partir da interação das moléculas de proteína, produzindo efeito mais elástico.

Nas análises de diâmetro de gotícula, pudemos observar que as emulsões contendo 3% Lf apresentaram menor diâmetro quando comparada as emulsões contendo as misturas entre as proteínas (Figura 3), o que reafirma os comportamentos reológicos descritos acima, considerando-se que maiores diâmetros de gotícula indicam maior interação entre as moléculas (agregação) e formação de estruturas de redes características de fluidos mais elásticos (VAN VLIET et al., 2004).

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as propriedades físico-químicas das emulsões podem ser moduladas através da variação da proporção entre duas proteínas globulares com diferentes pontos isoelétricos: lactoferrina e ovalbumina. A valores de pH entre os pontos isoelétricos, as proteínas apresentam cargas opostas podendo formar complexos interfaciais devido à atração eletrostática. Estes complexos interfaciais podem alterar a estabilidade das gotículas de óleo em relação ao pH e temperatura. Apesar de a ovalbumina ser capaz de estabilizar as emulsões apenas em pH restrito, quando associada a lactoferrina o sistema forneceu estabilidade as emulsões em uma maior faixa de pH. Esta abordagem pode ser útil para a concepção de sistemas baseados em emulsões, para utilização em alimentos e bebidas funcionais.

## 5. REFERÊNCIAS

- BENGOECHEA, C.; JONES, O. G.; GUERRERO, A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1227-1232, 2011.
- CAPITANI, C.; PEREZ, O.; PILOSO, A.; BERTOLDO PACHECO, M. T. Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1344-1355, 2007.
- CONESA, C.; ROTA, C.; CASTILLO, E.; PÉREZ, M. D.; CALVO, M.; SÁNCHEZ, L. Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three foodborne pathogens. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 209-215, 2010.
- CROGUENNEC, T.; RENAULT, A.; BEAUFILS, S.; DUBOIS, J. J.; PEZENNEC, S. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. **J Colloid Interface Sci**, v. 315, n. 2, p. 627-636, Nov 15 2007.
- DEMETRIADES, K.; COUPLAND, J.; MCCLEMENTS, D. Physicochemical Properties of Whey Protein - Stabilized Emulsions as affected by Heating and Ionic Strength. **J Food Sci**, v. 62, n. 3, p. 462-467, 1997.
- GONZALEZ-CHAVEZ, S. A.; AREVALO-GALLEGOS, S.; RASCON-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 4, p. 301-308, Apr 2009.
- MCCARTHY, N. A.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A.; FENELON, M. A. Sensitivity of emulsions stabilised by bovine  $\beta$ -casein and lactoferrin to heat and  $\text{CaCl}_2$ . **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 420-428, 2014.
- MCCLEMENTS, D. J. Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. **Langmuir**, v. 21, n. 21, p. 9777-9785, 2005.
- MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 159, n. 2, p. 213-228, Sep 15 2010.
- NEVIN, K.; RAJAMOCHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 830-835, 2004.
- \_\_\_\_\_. Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague–Dawley rats. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 1, p. e1-e8, 2008.
- RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chem**, v. 134, n. 2, p. 749-757, Sep 15 2012.

SUN, C.; GUNASEKARAN, S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 165-174, 2009.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 509-515, 2010.

TIAN, S.; CHEN, J. I. E.; SMALL, D. M. Enhancement of Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates by Glucose Conjugation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, n. 1, p. 80-95, 2011.

TOKLE, T.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Utilization of interfacial engineering to produce novel emulsion properties: Pre-mixed lactoferrin/ $\beta$ -lactoglobulin protein emulsifiers. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 46-52, 2012.

TOKLE, T.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 976-982, 2011.

VAN VLIET, T.; LAKEMON, C. M. M.; VISSCHERS, R. W. Rheology and structure of milk protein gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 298-304, 2004.

WILDE, P.; MACKIE, A.; HUSBAND, F.; GUNNING, P.; MORRIS, V. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 108-109, p. 63-71, May 20 2004.

WOOSTER, T. J.; AUGUSTIN, M. A. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1072-1080, 2007.

XU, K.; YAO, P. Stable oil-in-water emulsions prepared from soy protein-dextran conjugates. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 9714-9720, Sep 1 2009.

YADAV, M. P.; PARRIS, N.; JOHNSTON, D. B.; ONWULATA, C. I.; HICKS, K. B. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 476-483, 2010.

YE, A.; SINGH, H. Adsorption behaviour of lactoferrin in oil-in-water emulsions as influenced by interactions with beta-lactoglobulin. **J Colloid Interface Sci**, v. 295, n. 1, p. 249-254, Mar 1 2006.

ZIANI, K.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 209-216, 2012.

## CONCLUSÃO GERAL

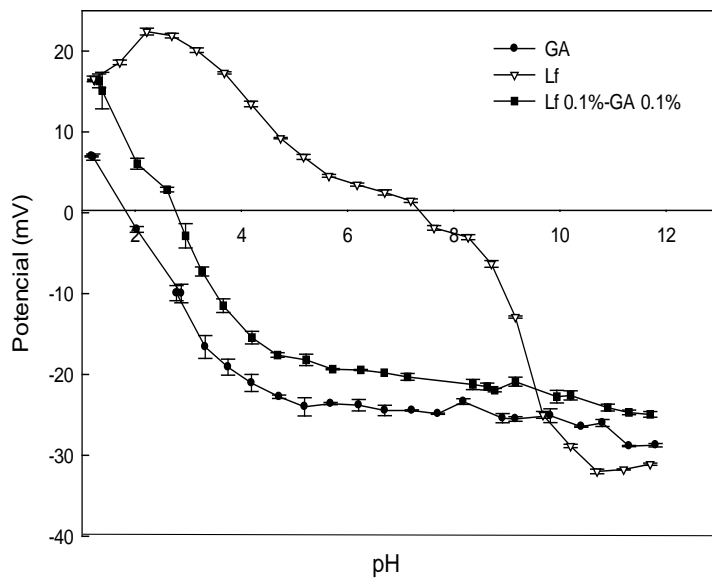
Este estudo demonstrou que os sistemas contendo a interação entre diferentes biopolímeros podem ser modulados em relação às variáveis intrínsecas (densidade de carga e concentração do biopolímero) e extrínsecas ao sistema (pH, força iônica e temperatura), possuindo novas características funcionais com aplicação em alimentos e demais sistemas, e que cada uma desses fatores exerce influência específica sobre as interações, como:

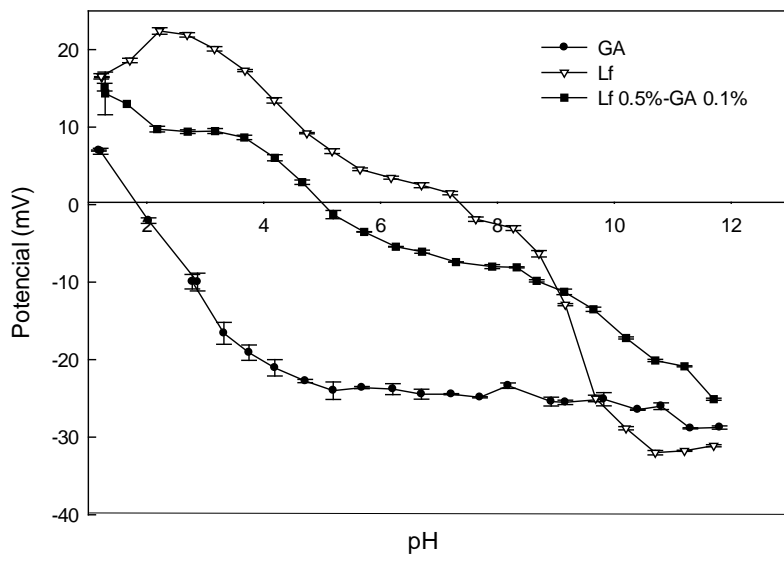
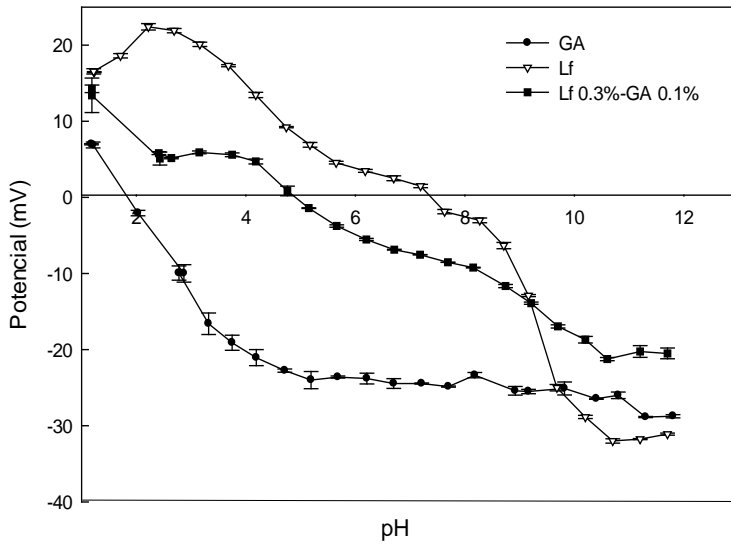
- A densidade de carga elétrica de cada biopolímero exerce influência direta na interação, sendo esta beneficiada quando os biopolímeros presentes nos sistemas possuem carga elétrica oposta, resultando na interação eletrostática entre os mesmos;
- A concentração inicial de cada biopolímero pode beneficiar ou retardar a interação eletrostática. Altas concentrações de proteína ou polissacarídeo podem levar a saturação do sistema, apresentando-se com maior concentração do biopolímero solúvel, superando a concentração dos complexos formados;
- O pH exerce importante influência na formação dos sistemas contendo biopolímeros. Por se tratar de uma interação eletrostática, é necessário que o sistema apresente pH onde os biopolímeros apresentem cargas opostas. Variando-se o pH, foi possível identificar as diferentes fases que ocorrem na formação dos complexos coacervados. Nos sistemas emulsionados, a maior estabilidade foi obtida em pH intermediário aos pontos isoeletrônicos das proteínas;
- A força iônica pode beneficiar, diminuir ou anular a interação eletrostática entre os biopolímeros, de acordo com sua natureza química. Já que em ambos os complexos formados foi utilizado o polissacarídeo goma arábica, e a presença de certa concentração salina exerceu influência positiva nos complexos contendo lactoferrina e negativa nos que continham leucina, pode-se sugerir que a influência da força iônica dependerá principalmente da natureza química da proteína utilizada no sistema;
- A interação entre proteínas e polissacarídeos pode evitar a denaturação da proteína exposta a altas temperaturas, quando utilizadas mesmas concentrações proteína/polímero, resultando em agregados com características diferentes dos polímeros originais;
- Através de técnicas microscópicas, podem ser observados que diferentes estruturas podem ser formadas a partir da interação entre proteínas e polissacarídeos, e por meio do difratômetro de raios X, observaram-se estruturas diferentes dos biopolímeros originais, caracterizando a formação de novos produtos;
- Mesmo a ovalbumina não possuindo boa capacidade de estabilizar emulsões, foi possível obter emulsões estáveis a partir da interação desta proteína com a lactoferrina.

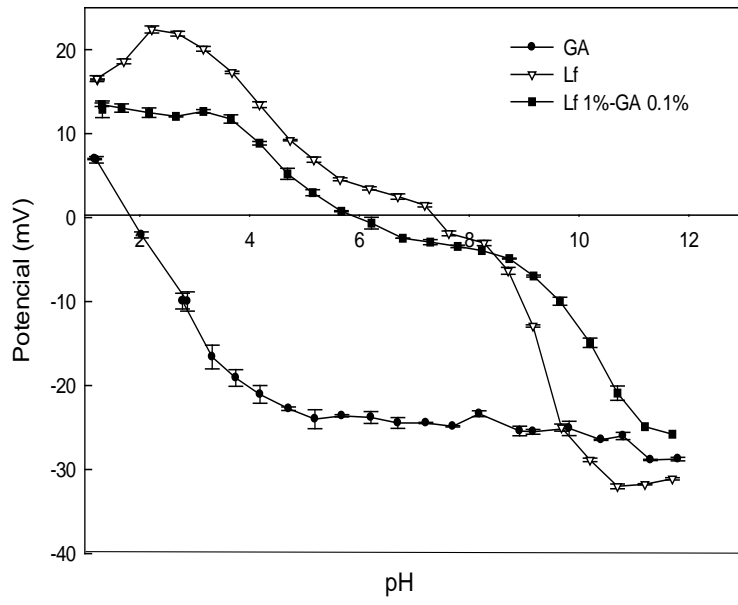
## ANEXOS

### ANEXO A

**Gráficos do potencial zeta em dependência do pH dos complexos coacervados formados entre a lactoferrina e goma arábica**



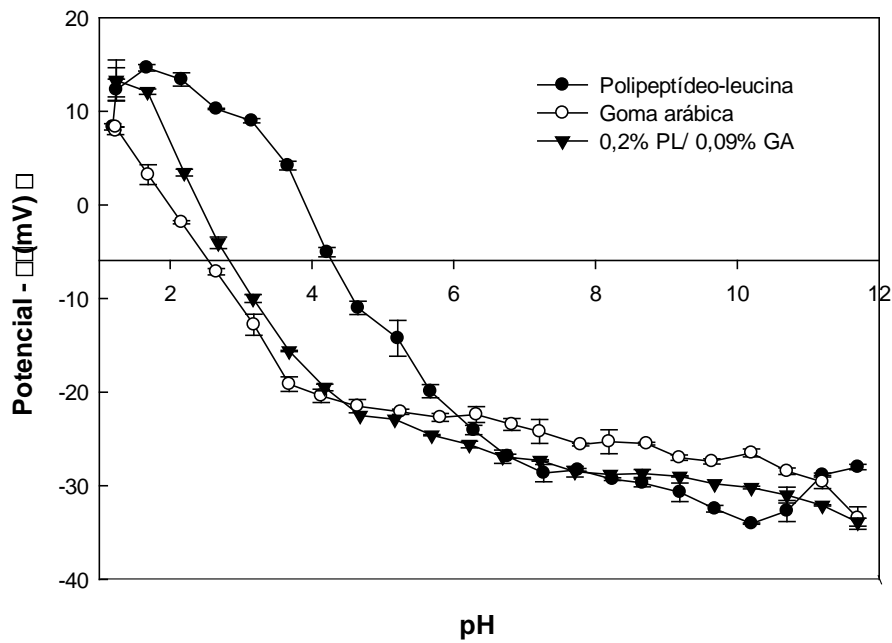
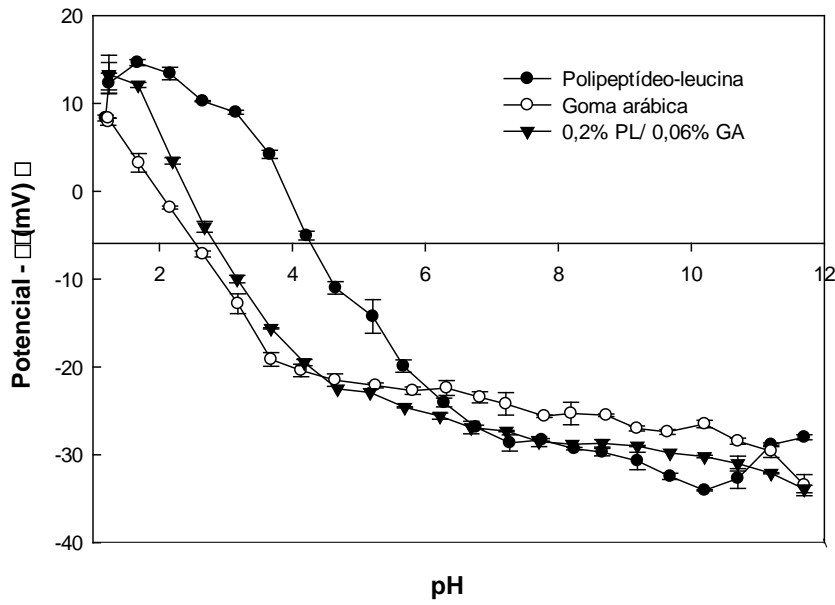


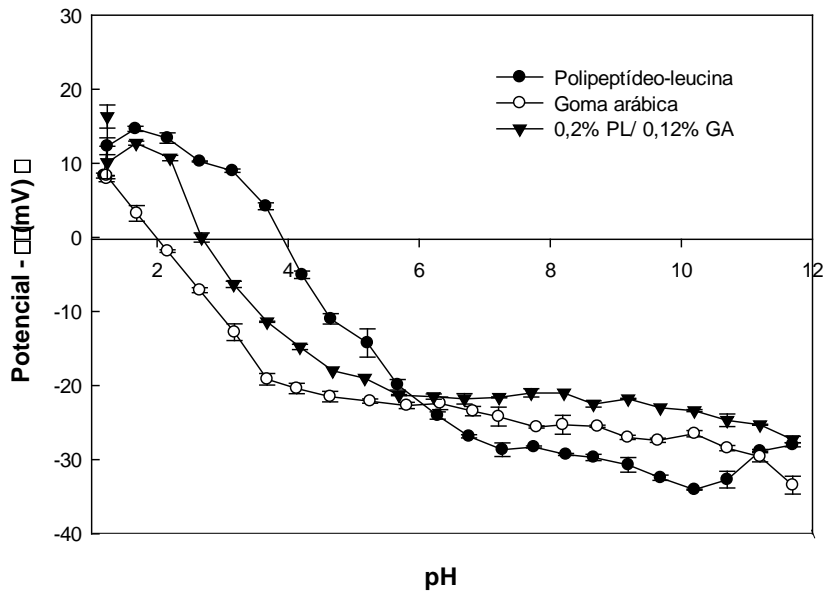




## ANEXO B

Gráficos do potencial zeta em dependência do pH dos complexos coacervados formados entre o polipeptídeo-leucina e goma arábica





## ANEXO C

**Potencial zeta e diâmetro de gotícula dependentes do pH das emulsões contendo as diferentes proporções entre lactoferrina e ovalbumina no primeiro dia de formação**

