

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

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

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS  
OBTIDOS A PARTIR DE PROTEINAS GLOBULARES.**

**Monique Barreto Santos**

**2016**



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

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS**  
**OBTIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS GLOBULARES.**

**Monique Barreto Santos**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Edwin Elard Garcia Rojas**

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

Seropédica, RJ

Fevereiro, 2016

664

S2373

Santos, Monique Barreto, 1987-

T

Estudo da formação dos complexos coacervados obtidos a partir de proteínas globulares / Monique Barreto Santos - 2016.

98 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.

Inclui bibliografia.

1. Microencapsulante - Teses. 2. Calorimetria diferencial de varredura - Teses. 3. Calorimetria de titulação isotérmica - Teses. I. Rojas, Edwin Elard Garcia. 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**

**MONIQUE BARRETO SANTOS**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/02/2016

---

Edwin Elard Garcia Rojas (Dr) UFFluminense.  
(Orientador)

---

Clitor Junior Fernandes de Souza (Dr) USP.

---

Carlos Wanderlei Piler Carvalho (Dr) Embrapa-CTAA.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação à minha família em especial meus pais pelo apoio e dedicação e ao meu noivo pelo carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e por ter me dado saúde, força e vigor para prosseguir a jornada. Aos meus pais, Eliezer e Adilce, pelo apoio incondicional, carinho e por serem exemplos de vida pra mim. À minha irmã, Aline, pela inspiração e amizade. Ao meu noivo, Marcos, pelas suas palavras doces e de incentivo, pela paciência e amor que fizeram toda a diferença. Um agradecimento especial aos meus tios Sérgio e Carmem, que prontamente me receberam em sua casa com todo o carinho, dividindo suas vidas comigo. À minha tia avó, Toninha, pelo cuidado e ternura que encheram muitos dos meus dias de graça. À professora Glória por ter sido a minha primeira incentivadora. Ao meu orientador, professor Edwin, por ter aceito me orientar e acreditado em mim. Obrigada pelos ensinamentos e pelo exemplo. Aos amigos do LETA-UFF, Angélica, Clitor, Clyselen, Juarez, Lívia, Lorena, Matheus e Naiara que de alguma forma contribuíram para esse trabalho, obrigada pela amizade, carinho e companheirismo, sem vocês não teria conseguido. À UFRRJ em especial ao PPGCTA pela oportunidade e o aprendizado e ao CNPq pela bolsa de estudos que me mantiveram nesse período. Um agradecimento final a banca, professor Carlos Piller e Clitor, pelo tempo dedicado as correções dessa dissertação.

## RESUMO

SANTOS, Monique Barreto. **Estudo da formação dos complexos coacervados obtidos a partir de proteínas globulares**. 2016. 98p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Proteínas são biopolímeros de grande importância nutricional e funcional tendo sido amplamente utilizadas como ingredientes alimentares. A interação entre duas proteínas diferentes e opostamente carregadas pode dar origem aos complexo coacervado, atualmente utilizados como ingrediente na tecnologia de alimentos ou como agente de microencapsulação. A formação de complexos coacervados entre Ovalbumina e Lisozima e entre Albumina sérica bovina (BSA) e Lisozima foi investigada em função do pH, razão de massa total e concentração de NaCl. Para as duas interações estudadas, a complexação ocorreu em uma ampla faixa de pH, que corresponde ao intervalo entre os pI das proteínas. Entre Ovalbumina e Lisozima a interação foi mais intensa na razão  $r=1$  em pH 7,5 e para BSA e Lisozima a maior formação de complexos ocorreu na razão  $r=0,5$  e pH 9,0. Alterações na força iônica por adição de NaCl influenciaram negativamente a interação entre Albumina BSA e Lisozima já na concentração de 0,01 mol/L e a 0,03 mol/L suprimiu a interação entre Ovalbumina e Lisozima. Por meio do Potencial - zeta pode-se verificar que a formação de complexos insolúveis foi máxima próximo ao pI para todas as razões estudadas, indicando que a interação se deu por neutralização de cargas opostas. Os espectros no infravermelho sugeriram que interações eletrostáticas conduziram as interações no entanto, ligações de hidrogênio também tiveram participação no processo de coacervação para as proteínas em estudo. As micrografias revelaram que os complexos insolúveis apresentavam estrutura esférica e o tamanho de partícula demonstrou a formação de estruturas com tamanho médio em torno de 2  $\mu\text{m}$ , as quais são bem maiores do que o tamanho observado para as proteínas isoladas. A calorimetria de titulação isotérmica demonstrou que a interação entre Ovalbumina e Lisozima foi exotérmica, a qual ocorreu em duas etapas, a primeira entropicamente dirigida e a segunda entálpicamente dirigida. A calorimetria diferencial de varredura sugeriu, pela presença de um único ponto de desnaturação, que a interação entre BSA e Lisozima deu origem a um novo biopolímero com temperatura de desnaturação a 67°C, diferente das proteínas isoladas. Estes estudos sugeriram que complexos coacervados formados entre Ovalbumina / Lisozima e BSA / Lisozima poderiam ser utilizados como agente encapsulante de bioativos ou como ingredientes alimentares com o objetivo de agregar valor nutricional.

**Palavras chave:** Microencapsulante, Calorimetria diferencial de varredura, Calorimetria de titulação isotérmica.

## ABSTRACT

SANTOS, Monique Barreto. **Study of formation of complex coacervates obtained from globular proteins**. 2016. 98p. Dissertation (Master in Science and Food Technology). Instituto de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Proteins are biopolymers of high nutritional and functional significance has been widely used as food ingredients. The interaction between two different proteins oppositely charged, and can give rise to complex coacervate currently used as an ingredient in food technology or as a microencapsulating agent. The formation of complex coacervates between Lysozyme and Ovalbumin and between Bovine serum albumin (BSA) and Lysozyme has been investigated as a function of pH, mass ratio of total and concentration of NaCl. For both interactions studied, complexing latched in a wide pH range which corresponds to the interval between the pI of proteins. Among Ovalbumin and Lysozyme interaction was more intense in the ratio  $r = 1$  at pH 7.5 and BSA and Lysozyme most complex formation has occurred on the ratio  $r = 0.5$  and pH 9.0. Changes in the ionic strength by adding NaCl negatively affected the interaction between Lysozyme and BSA already at a concentration of 0.01 mol / L and 0.03 mol / L abolished the interaction between Lysozyme and Ovalbumin. Through Potential - zeta can be seen that the formation of insoluble complexes was highest near the pI for all studied reasons, indicating that the interaction is given by neutralization of opposite charges. The Infrared spectra suggested that electrostatic interactions led interactions however, hydrogen bonds also had a hand in the coacervation process for the proteins under study. The micrographs showed that the insoluble complexes showed spherical structure and particle size showed the formation of structures with an average size around 2  $\mu\text{m}$ , much larger than the observable size for the isolated proteins. The isothermal titration calorimetry showed that the interaction between Lysozyme and Ovalbumin was exothermic and was performed in two steps, the first and second entropy directed enthalpy driven. The differential scanning calorimetry suggested the presence of a single point of denaturation, that the interaction between Lysozyme and BSA led to a new biopolymer with denaturation temperature 67 ° C differs from isolated proteins. These studies suggested that complex coacervates formed between Ovalbumin / Lysozyme and BSA / Lysozyme could be used as the encapsulating bioactive agent or as food ingredients in order to add nutritional value.

**Key words:** Microencapsulation, Differential scanning calorimetry, Isothermal titration calorimetry.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 1:</b> Características estruturais do S-ovalbumina - cadeia principal global da estrutura da S-ovalbumina (YAMASAKI et al., 2003).....	21
<b>Figura 2:</b> Estrutura da Lisozima (SUGAHARA et al., 2014) .....	21
<b>Figura 3:</b> Estrutura da Albumina Sérica Bovina (BUJACZ, 2012).....	23
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do comportamento de dispersões aquosa de misturas de polissacarídeos e proteínas (adaptado de TOLSTOGUZOV, 1991; WEINBRECK et al., 2004).....	26
<b>Figura 5:</b> Parâmetros físico-químicos que influenciam a formação do complexo coacervados em sistemas de proteína / polissacarídeos (SCHMITT e TURGEON, 2011). .....	29
<b>Figura 6:</b> Processos sequenciais envolvidos na formação de complexos coacervados. (adaptado de LIU et al.,2015).....	30
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 1:</b> (A) Turbidez (100 - %T) em função do pH das proteínas, Ova e Lis isoladas sem adição de NaCl. (B) Turbidez (100 - %T) em função do pH do sistema contendo Ova/Lis, em diferentes razões sem adição de NaCl e as variações do $pH_c$ , $pH_{01}$ e $pH_{02}$ .....	48
<b>Figura 2:</b> Variação da Turbidez nas diferentes razões (r) em pH 7,5 e sem adição de NaCl..	48
<b>Figura 3:</b> Diagrama de fases das misturas contendo Ova/Lis (0,1%) em diferentes razões (r) e a razão molar ( $r_m$ ) das misturas de Ova/Lis em função do pH.....	49
<b>Figura 4:</b> Potencial $\zeta$ (A) e pI (B) das proteínas isoladas e das diferentes razões (r) estudadas sem adição de NaCl. ....	50
<b>Figura 5:</b> Turbidez (100 - %T) em função do pH do sistema contendo as proteínas isoladas, Ova e Lis e das diferentes razões (r) de Ova/Lis em diferentes concentrações de NaCl $\blacklozenge$ 0 mol/L; $\blacktriangledown$ 0,01 mol/L; $\bullet$ 0,05 mol/L; $\blackstar$ 0,1 mol/L; $\blacksquare$ 0,3 mol/L. ....	52
<b>Figura 6:</b> Tamanho de partícula (d.nm) em pH 7,5 da Ova (A), Lis (B) e do complexo coacervado formados por Ova / Lis na razão $r=1$ .....	54
<b>Figura 7:</b> Espectros do FTIR da Ova, Lis e Ova/Lis razão $r=1$ . Os complexos foram preparados a pH 7,5 sem adição de NaCl.....	55
<b>Figura 8:</b> Microscopia óptica dos complexos coacervados Ova/Lis em pH 7,5, razão $r=1$ ...	56
<b>Figura 9:</b> MEV dos complexos coacervados de Ova/Lis em pH 7,5, razão $r=1$ . ....	57
<b>Figura 10:</b> (A)Termograma da fluxo de calor ( $\mu J/s$ ) em função do tempo (s) obtido durante a titulação de 1,44 mmol/L de Lisozima em 0,37 mmol/L de Ovalbumina em 10 mmol/L de tampão fosfato (pH 7,5) a 25°C. (B) Representação grafica da integral da área sob cada pico ( $\mu J$ ) em função da razão molar ( $r_m$ ) de Lis / Ova. ....	58
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 1:</b> Variação da turbidez ( $cm^{-1}$ ) em função do pH sem adição de NaCl das proteínas, BSA e Lis e da razão $r=0,5$ com a identificação do seu $pH_c$ , $pH_{01}$ e $pH_{02}$ . ....	70
<b>Figura 2:</b> Variação da Turbidez em função do pH da definida razão $r=0,5$ sem adição de NaCl.....	71
<b>Figura 3:</b> Variação da turbidez ( $cm^{-1}$ ) em função do pH dos sistema contendo Ova/Lis, em diferentes razões (r) sem adição de NaCl. ....	72
<b>Figura 4:</b> (A) Diagrama de fases das misturas contendo BSA/Lis (0,1%) em diferentes razões mássica (r) e razões molar ( $r_m$ ) em função do pH sem adição de NaCl... ..	73
<b>Figura 5:</b> (A) Potencial- $\zeta$ das proteínas isoladas (BSA e Lis) e da razão $r=0,5$ e o (B) pI das proteínas e das diferentes razões sem adição de NaCl .....	74

<b>Figura 6:</b> Turbidez (cm) <sup>-1</sup> em função do pH no sistema contendo BSA/Lis (r=0,5) sem adição de NaCl e em diferentes concentrações de NaCl.....	75
<b>Figura 7:</b> Tamanho de partícula (d.nm) em pH 9,0 sem adição de NaCl da (A) BSA, (B) Lis e do (C). complexo coacervado r=0,5 .....	76
<b>Figura 8:</b> Espectros do FTIR da BSA, Lis e BSA/Lis razão r=0,5. Os complexos foram preparados a pH 9 sem adição de NaCl.....	77
<b>Figura 9:</b> Microscopia óptica dos complexos coacervados BSA/Lis r=0,5 em pH 9,0.....	78
<b>Figura 10:</b> MEV dos complexos coacervados de BSA/Lis razão r=0,5 em pH 9,0. ....	78
<b>Figura 11:</b> Termograma gerado pela análise de DSC das amostras de (A) Lis, (B) BSA e (C) do complexo BSA/LIS razão r= 0,5 em pH 9,0.....	80
<b>CAPÍTULO III.....</b>	85
<b>Figure 1:</b> Graphical representation of data generated by the ITC due to the increase in binding affinity. Low (A), moderate (B) and High affinity (C). (CERVANTES et al., 2011). ....	91

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 1:</b> Características das principais proteínas da clara do ovo .....	20
<b>Tabela 2:</b> Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro do leite bovino e do leite humano.....	22
<b>Tabela 3:</b> Estudo sobre complexos coacervados e suas aplicações na microencapsulação de biomoléculas.....	32
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 1:</b> Parametros termodinâmicos da primeira e segunda fase de interação entre Lis e Ova obtidos a partir da titulação de Lis (1,44 mmol/L) em Ova (0,36mmol/L) em pH 7,5 a 25°C.....	59
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>85</b>
<b>Table 1:</b> Application of calorimetric techniques in interactions between polysaccharides and proteins. ....	87

## NOMECLATURA / ABREVIACÕES

Ova - Ovalbumina  
Lis - Lisozima  
WPI - Proteínas do soro do leite  
BSA - Albumina Sérica Bovina  
kDa - Kilodaltons  
pI - Ponto isoelétrico  
pH - Potencial de hidrogênio  
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada  
DSC - Calorimetria diferencial de varredura  
ITC - Calorimetria de titulação isotérmica  
 $\Delta H_d$  - Variação de Entalpia de desnaturação  
 $T_d$  - Temperatura de desnaturação  
 $\Delta G$  - Variação da energia livre de Gibbs  
K - Constante de associação  
n - Estequiometria  
 $\Delta H$  - Variação de entalpia  
 $\Delta S$  - Variação de entropia  
T - Transmitância  
 $\tau$  - Turbidez  
Pdi - Índice de polidispersividade  
%Pd - Percentagem de polidispersividade  
KBr - Brometo de Potássio  
NaCl - Cloreto de Sódio  
pH<sub>C</sub> - Região de ligeiro aumento de turbidez  
pH<sub>01</sub> - Região de aumento abrupto de turbidez  
pH<sub>02</sub> - Região de dissociação do complexado  
pH<sub>max</sub> - Região de turbidez máxima  
FTIR - Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier  
MEV - Microscópio eletrônico de varredura

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
1 <b>PROTEÍNAS.....</b>	<b>19</b>
1.1 Proteínas da clara do ovo.....	19
1.1.1 Ovalbumina.....	20
1.1.2 Lisozima.....	21
1.2 Proteínas do soro do leite .....	22
1.2.1 Albumina Sérica Bovina (BSA) .....	22
2 <b>PRINCIPAIS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Solubilidade .....	23
2.2 Capacidade de formação e estabilização de espuma.....	24
2.3 Capacidade de gelificação .....	24
2.4 Capacidade emulsificante.....	25
3 <b>COMPLEXOS COACERVADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Breve histórico sobre o estudo da formação dos complexados.....	25
3.2 Coacervação .....	25
3.3 Complexos Coacervados proteína-proteína .....	27
4 <b>ASPECTOS TERMODINÂMICOS.....</b>	<b>27</b>
5 <b>PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 pH.....	29
5.2 Força iônica.....	30
5.3 Razão e concentração de proteína.....	30
5.4 Temperatura .....	31
5.5 Massa molar .....	31
6 <b>APLICAÇÕES .....</b>	<b>31</b>
7 <b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>42</b>
<b>COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DA OVALBUMINA E LISOZIMA: FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA. ....</b>	<b>42</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>43</b>
1 <b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
2 <b>MATERIAS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
2.1 Materiais .....	44
2.2 Formação dos complexos .....	44

2.2.1	Preparação dos complexos .....	44
2.2.2	Titulação Turbidimétrica .....	45
2.3	Potencial - Zeta .....	45
2.4	Tamanho de partícula .....	45
2.5	Caracterização química e morfológicados complexos coacervados.....	45
2.5.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	46
2.5.2	Microscopia Óptica .....	46
2.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	46
2.6	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) .....	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1	Efeito do pH e da razão de massa total na formação dos complexos coacervados.....	46
3.2	Potencial-Zeta .....	49
3.3	Efeito do NaCl na formação dos complexos coacervados .....	50
3.4	Tamanho de partícula .....	53
3.5	Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados.....	55
3.5.1	FTIR.....	55
3.5.2	Microscopia óptica .....	56
3.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	56
3.6	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) .....	57
4	CONCLUSÃO .....	59
5	REFERÊNCIAS .....	60
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>65</b>
	<b>ESTUDO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) E LIOSOMA</b> .....	<b>65</b>
	RESUMO.....	66
1	INTRODUÇÃO .....	66
2	MATERIAS E MÉTODOS.....	67
2.1	Materiais .....	67
2.2	Formação dos complexos .....	67
2.2.1	Preparo das amostras .....	67
2.2.2	Titulação Turbidimétrica .....	68
2.3	Potencial-Zeta .....	68
2.4	Tamanho de partícula .....	68
2.5	Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados.....	68
2.5.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	69
2.5.2	Microscopia óptica .....	69
2.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	69
2.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	69

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1	Efeito do pH e da razão na formação dos complexos coacervados.....	69
3.2	Potencial - Zeta .....	73
3.3	Efeito do NaCl na formação dos complexos coacervados .....	74
3.4	Tamanho de partícula .....	75
3.5	Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados.....	77
3.5.1	FTIR.....	77
3.5.2	Microscopia óptica .....	78
3.5.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	78
3.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	79
4.	CONCLUSÃO .....	80
5.	REFERÊNCIAS.....	80
	<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>85</b>
	<b>CALORIMETRIC TECHNIQUES APPLIED TO THE THERMODYNAMIC STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS AND POLYSACCHARIDES.....</b>	<b>85</b>
	ABSTRACT.....	86
	RESUMO.....	86
1.	INTRODUCTION.....	86
2.	Calorimetric technique .....	88
2.1	Differential Scanning Calorimetry (DSC) .....	88
2.2	Isothermal Titration Calorimetry (ITC).....	90
3	CONCLUSION.....	92
4	AKNOWLEDGEMENTS .....	92
5	REFERENCES.....	92
	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>97</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas são biopolímeros versáteis que dispõem tanto de valor nutricional como funcionalidade. São amplamente utilizadas na indústria de alimentos como ingredientes funcionais essenciais para conferir textura e estabilizar emulsões e espumas (DICKINSON, 2008). Por suas importantes propriedades funcionais, ação antimicrobiana e propriedades nutricionais, as proteínas presentes na clara do ovo atualmente tem sido bastante empregada como ingrediente em alimentos processados. No entanto seu consumo, mesmo em visita a tantos benefícios, ainda tem se restringido pelo consumo de ovos *in natura* (STADELMAN e COTTERILL, 1995; KOVACS-NOLAN et al., 2005; FAO-DATABASE, 2015). Em contrapartida, as proteínas presentes no soro leite, de alto valor nutricional, na maioria das vezes tem sido objeto de descarte por indústria de laticínios (PELEBRINE e CARRASQUEIRA, 2008). A complexação e coacervação entre biopolímeros é uma método que pode ao utilizar essas proteínas agregar tanto valor nutricional como exercer função tecnológica quando utilizadas como agente de microencapsulação (DIARRASSOUBA et al., 2015).

O processo de Coacervação é definido pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) como sendo uma separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas, sendo a coacervação complexa impulsionada por forças de atração de dois tipos de biopolímeros com cargas opostas, no qual uma fase diluída coloidal interage com uma fase coloidal mais concentrada, chamada de fase de coacervado (SOUZA et al, 2013; ZHANG et al., 2013).

Os complexos coacervados têm inúmeras aplicações, que incluem: a utilização para processos de microencapsulação nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos e na obtenção de diversos ingredientes alimentares (HUANG et al., 2012). Por serem produtos naturais obtidos a partir de ingredientes de baixo custo são facilmente aprovados para utilização em alimentos. Além disso, após serem formados, surge um novo biopolímero com propriedades funcionais, normalmente superiores ao polímero original (SOUZA et al., 2013). Contudo, para que esses complexos sejam utilizados pela indústria é necessário fazer um estudo detalhado do seu comportamento frente às variações de pH, temperatura e concentração de sal de sistemas alimentares onde podem ser utilizados (NIU et al., 2014).

Muitos estudos têm sido feitos demonstrando a formação de complexos coacervados entre proteínas e polissacarídeos, no entanto, complexação entre proteínas globulares ainda tem sido pouco discutida. Estudos recentes demonstraram a formação de complexos coacervados através de duas proteínas do soro do leite (ANEMA; KRUIF, 2014; YAN et al., 2013) e DIARRASSOUBA et al. (2015), que estudou a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lisozima e aplicou como agente carreador de nutracêuticos. Apesar da sua aplicação ainda ser pouco explorada, acredita-se que complexos coacervados oriundos da interação entre proteínas tenham aplicações semelhantes àqueles observadas em complexos coacervados obtidos da interação entre proteínas e polissacarídeos assim como demonstrado por ZIMET e LIVNEY (2009), quando utilizou  $\beta$ -lactoglobulina /pectina para encapsular ácido graxo do tipo  $\omega$ -3 e JUN-XIA et al. (2011), que utilizou isolado proteico de soja e goma arábica para o encapsulamento de óleo de laranja

Assim, esta dissertação foi distribuída em capítulos onde no capítulo I foi estudado o processo de formação dos complexos coacervados entre duas proteínas globulares oriundas da clara do ovo, Ovoalbumina e Lisozima em função da razão de proteína e concentração de NaCl em diferentes pHs, além da caracterização morfológica e termodinâmica desses complexos. No capítulo II foi estudado o processo de formação dos complexos coacervados

uma proteína obtida do soro do leite, Albumina Sérica Bovina e a outra da clara do ovo, Lisozima em função da razão de proteína e concentração de NaCl em diferentes pHs, além da caracterização morfológica e termodinâmica desses complexos. No capítulo III foi feita uma descrição de duas técnicas calorimétricas, a calorimetria diferencial de varredura e calorimetria de titulação isotérmica utilizadas na caracterização de interações entre proteínas e polissacarídeos.

## **OBJETIVO GERAL**

Estudar a formação do complexo coacervado obtido a partir de proteínas globulares presentes na clara do ovo, Ovalbumina e Lisozima e proteína do soro de leite, Albumina Sérica Bovina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar a influência do pH, concentração salina e razão da concentração das proteínas no processo de formação dos complexos coacervados formados entre a Ovalbumina e Lisozima.
- Avaliar a influência do pH, concentração salina e razão da concentração das proteínas no processo de formação dos complexos coacervados formados entre a Albumina Sérica Bovina. e Lisozima.
- Descrever as técnicas de calorimetria de titulação isotérmica e calorimetria diferencial de varredura e sua aplicação na compreensão das interações entre proteínas e polissacarídeos em sistemas alimentares.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. PROTEÍNAS

As proteínas são compostos orgânicos solúveis em água e a nível estrutural contém em base m/m 50-55% de carbono, 6-7% de hidrogênio, 13-20% de oxigênio, 12-19% de nitrogênio e 0,2-3,0% de enxofre. Elas podem ser categorizadas conforme a função que desempenha como: por exemplo: catalisadores enzimáticos, hormônios, proteínas estruturais, proteínas contráteis, proteínas transportadoras, anticorpos, proteínas de armazenamento e proteínas protetora. As proteínas são moléculas poliméricas complexas, tendo massa molar entre a faixa de 20,000 Da e 100,000 Da. São formadas por um 21 aminoácidos diferentes (unidades monoméricas) ligados através de ligações peptídicas (amida substituída) e sua hidrólise pode clivá-la em unidades estruturais básicas, os aminoácidos (DAMODARAN et al., 2010).

Em geral, o termo proteína é usado para moléculas compostas por mais de 50 aminoácidos (resíduos) e peptídeo para moléculas com menos de 50 aminoácidos. A estrutura primária das proteínas é dada pela sequência de aminoácidos no entanto, por vezes se espiralizam e enovelam, num arranjo tridimensional. De acordo com esta conformação as proteínas podem ser classificadas em fibrosas e globulares (LEHNINGER et al., 1993; STRYER, 1996; DOSE, 1982; DAMODARAN et al., 2010). As proteínas globulares, são moléculas compactas de forma esférica ou elíptica. A estrutura terciária dessas proteínas é favorecida pelo grande número de aminoácidos hidrofóbicos orientados para o centro da molécula e responsáveis por lhe conferir essa característica globular. Dentre as proteínas globulares, incluem-se as proteínas de transporte, proteínas do soro, da clara do ovo, caseínas e albuminas (VACLAVIK, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2005).

### 1.1. Proteínas da clara do ovo

A clara do ovo, também chamado de albúmen é composto por quatro camadas distintas, a chalazas (2,7%), o albúmen fluido interno (17%), o albúmen denso (57%) e o albúmen fluido externo (23%) diferenciando entre si pela percentagem de umidade (ZEIDLER, 2002).

A clara ou albúmen, é constituído em sua maior parte por água (87 a 89%), variando de acordo com a raça, condições ambientais, tamanho, volume de produção e tempo de armazenamento. Seu teor lipídico é bem menor quando comparado à gema, apenas 0,3 %. Possui cerca de 0,8% de carboidratos, que podem ser encontrados na forma livre ou ligado a proteínas, sendo a glicose a sua maior fração livre. Possui 1% de sais minerais e cerca de 11% de proteínas, sendo suas principais, mostradas na Tabela 1 (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A clara do ovo é constituído pelas proteínas, lisozima, ovotransferrina e avidina, desempenha a função de defesa contra a penetração de microorganismos. Além disso, sua natureza viscosa e seu caráter alcalino, podendo chegar a um pH 9,5 reforçam essa função (NASCIMENTO e SALLE, 2003).

A clara pode ser considerada como um sistema proteico de caráter viscoso composto por fibras de ovomucina e de uma solução coloidal contendo várias proteínas globulares. (ORDÓÑEZ et al., 2005). Sendo constituída entre outras proteínas pela ovalbumina (54%), ovotransferrina (12%), ovomucoide (11%), ovomucina (3,5%), lisozima (3,4%) (SGARBIERI, 1996).

**Tabela 1:** Características das principais proteínas da clara do ovo

Proteína	Clara (%)	pI	Massa Molar (kDa)
Ovalbumina	54,0	4,5	45
Ovotransferrina	12,0	6,0	76
Ovomucoide	11,0	4,1	28
Ovoinibidor	1,5	5,0	49
Ovomucina	3,5	4,5 – 5,0	110
Lisozima	3,4	10,7	14
Ovoglicoproteína	1,0	3,9	24
Ovoflavoproteína	0,8	4,0	32
Ovomacroglobulina	0,5	4,5	900
Avidina	0,5	10,0	68

pI: Ponto Isoelétrico, M: Massa Molar

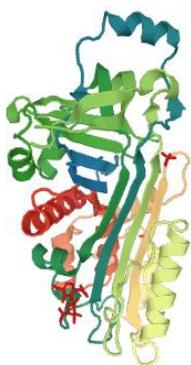
Fonte: Adaptado de ORDÓÑEZ, 2005 e SCARBIERI, 1996

### 1.1.1. Ovalbumina

A Ovalbumina (OVA) é classificada como uma fosfoglicoproteína, por possuir carboidrato e fosfato ligado à fração proteica. É a principal fração proteica da clara de ovo, representando 54% dentre as proteínas da clara. Possui massa molar de 45 kDa e ponto isoelétrico de 4,5 (SGARBIERI, 1996).

Contém cerca de 385 resíduos de aminoácidos ricos em enxofre com 6 resíduos de cisteína. Sua estrutura tridimensional é formada por 41% da  $\alpha$ -hélice, 34%  $\beta$ -folha, 12%  $\beta$ -giros e 13% de novelos aleatórios (NGARIZE et al., 2004; HUNTINGTON e STEIN, 2001).

Pode ser encontrada nas formas A1, A2, A3 na proporção 85:12:3, respectivamente. Diferenciada pela quantidade de fósforo ligado à proteína, 2, 1 ou 0 átomos de fósforo por molécula de OVA, respectivamente. Possui uma ligação dissulfeto e quatro grupos sulfídricos livres no núcleo da proteína que só reagem após a desnaturação da proteína. Possui uma glicina acetilada no terminal N, uma prolina no terminal carboxílico e uma única cadeia lateral de carboidrato formada de D-manose (2 %) e N-acetilglicosamina (1,2 %) (STADELMAN et al., 1995; SGARBIERI, 2004). As condições de estocagem de ovos, tempo e temperatura, podem promover a conversão da ovalbumina em S-ovalbumina, que pode alterar algumas propriedades funcionais como estabilidade de espuma e gelatinização. No entanto, não há diferença na composição em aminoácidos entre a ovalbumina e s-ovalbumina (ALLEONI e ANTUNES, 1997). As características estruturais da cadeia principal da S-ovalbumina estão representadas na Figura 1.



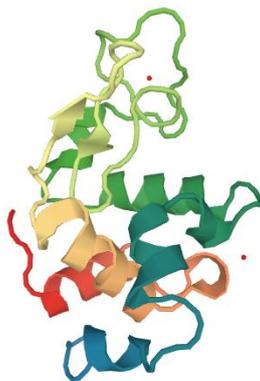
**Figura 1:** Características estruturais do S-ovalbumina - cadeia principal global da estrutura da S-ovalbumina (YAMASAKI et al., 2003)

### 1.1.2. Lisozima

A Lisozima (Lis) é uma glicoproteína globular com ação enzimática presente em maior concentração na clara do ovo (3,4%). É uma pequena proteína com massa molar de 14 kDa e carga positiva. O pI de Lis é 10,7, podendo transportar até 10 cargas positivas líquidas (a partir de arginina e lisina) a um pH neutro. Possui forma de esfera alongada estando na forma de dímero entre o pH 5 e 9 (LI-CHAN e NAKAI, 1989; ORDÓÑEZ, 2005; SGARBIERI, 1996; ANEMA e KRUIF, 2013).

Estruturalmente a Lisozima é formada por um único polipeptídeo com cerca de 129 resíduos de aminoácidos, dentre esses resíduos a histidina, lisina e arginina representam a maior percentagem. Sua elevada estabilidade se deve em parte por sua estrutura compacta com quatro pontes dissulfeto intramoleculares e a presença de apenas três moléculas de água por molécula de lisozima (SGARBIERI, 1996; YAMAMOTO, 1997). A imagem ilustrativa da Lisozima esta representada na Figura 2.

A Lisozima é uma importante enzima bactericida natural (CE 3.2.1.17) tendo recebido esse nome, a principio, devido à sua ação contra micro-organismos da espécie *Micrococcus lysodeikticus*. Sua ação bactericida se deve a hidrólise de tipos específicos de polissacáridos encontrados na parede celular de bactérias, principalmente gram-positivas (JOHNSON e LARSON, 2005; SGARBIERI, 1996). A ação bacteriostática da Lis contra *Clostridium tyrobutyricum*, um microorganismo que pode formar esporos em queijos maturados, fez com que ela fosse aplicada na fabricação de queijos e alvo de estudos sobre sua interação às caseínas (ANEMA e KRUIF, 2013)



**Figura 2:** Estrutura da Lisozima (SUGAHARA et al., 2014)

## 1.2. Proteínas do soro do leite

O soro do leite é um subproduto da fabricação de queijos, obtido a partir da coagulação da caseína por adição de ácido ou enzima. Ele possui alto valor nutricional, dada presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, que superam as doses recomendadas para crianças de dois a cinco anos e adultos (WIT, 1998; NEVES, 2001). Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite possuem propriedades funcionais tecnológicas o que facilita seu uso como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente pela elevada solubilidade e por sua capacidade de gelificante. Além disso, tem sido atribuído a essas proteínas o controle na modulação do metabolismo e nos mecanismos de defesa do organismo (SGARBIERI e PACHECO, 1999; MICKE et al., 2002; ROSANELI et al., 2002). Uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite no Brasil são as bebidas fermentadas e as bebidas lácteas não-fermentadas contudo, apenas 15% do total de soro produzido é aproveitado. (NEVES, 2001; NAKAMAE, 2004). A coacervação com polissacarídeos ou proteínas é uma opção, ainda pouco utilizado, para o aproveitamento dessas proteínas do soro de leite (CAPITANI et al., 2005). A seguir, estão as principais proteínas presentes no soro do leite bovino e no leite humano com suas respectivas quantidades em g/L (Tabela 2).

**Tabela 2:** Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro do leite bovino e do leite humano.

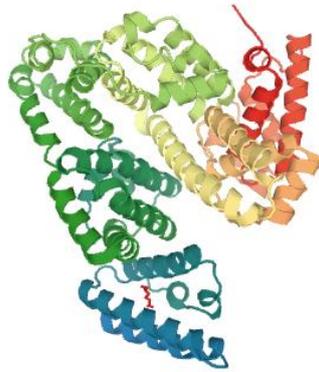
Proteínas de soro (g/L)	Leite bovino (g/L)	Leite humano (g/L)
$\beta$ -lactoglobulina	3,2	desprezível
$\alpha$ -lactalbumina	1,2	2,8
Soralbumina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2

Fonte: Adaptado de SGARBIERI, 2004

### 1.2.1. Albumina Sérica Bovina (BSA)

A BSA é uma proteína globular, formada por cerca de 583 resíduos de aminoácidos, de massa molar por volta de 66,5 kDa e pI de 4,96 (ZHAO et al., 2009; VINAYAGAM et al., 2010). Dentre as proteínas do soro do leite a BSA tem sido uma das mais estudadas, particularmente devido a sua semelhança estrutural com albumina de soro humano (HSA). A molécula de BSA é composta por uma cadeia organizada em três domínios helicoidais homólogos, os quais têm dois subdomínios, cada um com uma forma helicoidal comum unidos por ligações peptídicas e se caracterizam por conterem um pequeno número de

resíduos de triptofano e um alto número de cisteína. A albumina sérica bovina (BSA) possui apenas um resíduo de cisteína livre e os demais resíduos formam 17 pontes de dissulfeto que ajudam a manter a estrutura terciária (DONG et al., 2007; SINHA et al., 2008). Dados de cristalografia de raios-X mostraram que a estrutura da albumina é predominantemente composta por  $\alpha$ -hélice (67%) (BUJACZ, 2012; DAMODARAN et al., 2010). As características estruturais da cadeia principal da Albumina Sérica Bovina estão representadas na Figura 3.



**Figura 3:** Estrutura da Albumina Sérica Bovina (BUJACZ, 2012).

## 2. PRINCIPAIS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

O termo propriedade funcional é definido como qualquer propriedade que afeta a sua utilização como ingrediente em um produto, além das suas propriedades nutricionais inerentes à sua composição química (HALL, 1996).

Muitas das propriedades funcionais das proteínas dependem que grupos hidrofóbicos localizados no interior da molécula sejam expostos para que haja interação desses grupos com outras moléculas. No entanto, para que isso ocorra é necessário que haja o desnovelamento da estrutura nativa da proteína (LI-CHAN e NAKAI, 1989).

### 2.1. Solubilidade

A solubilidade é a manifestação termodinâmica no equilíbrio entre as interações proteína-proteína (hidrofóbica), que levam a redução dessa solubilidade e proteína-água (iônicas) que tendem a aumentá-la. Essa propriedade depende de fatores tais como: massa molar e conformação das moléculas; densidade, presença de substâncias não-proteicas, além das características do meio como pH; concentração salina, temperatura e interações com outros componentes (VOJDANI, 1996; WONG, 1995; DAMODARAN et al., 2010).

A solubilidade tende a ser mínima no ponto isoelétrico, pois nesse ponto pela redução da repulsão eletrostática, há menor interação da proteína com a água e forte interação hidrofóbica o que promove a agregação e precipitação da proteína. No caso da BSA, devido a grande proporção de resíduos hidrofílicos na superfície da molécula em comparação aos grupos não polares, isso não é observado (DAMODARAN et al., 2010).

Em altas concentrações de sal, os íons salinos competem com a proteína pelas moléculas de água presentes no meio, ocasionando a perda da água ligada a proteína e uma maior atração entre as moléculas proteicas e conseqüentemente formação de precipitados, efeito esse conhecido como *salting out*. Em contra partida em baixas concentrações de sal a

solubilidade em geral aumenta, pois os íons salinos tendem a se associar às proteínas contribuindo para uma maior hidratação e/ou repulsão das moléculas proteicas, efeito conhecido como *salting in* (SGARBIERI, 1996; BOLONTRADE et al., 2013).

## 2.2. Capacidade de formação e estabilização de espuma

As espumas são compostas basicamente por bolhas de ar em que cada uma é envolta por um filme fino e contínuo de moléculas proteicas. Essa propriedade pode ser afetada pela concentração da proteína, espessura da película, força iônica, pH, temperatura, presença de outros componentes, além das propriedades físico-químicas das proteínas (PHILLIPS et al., 1994; ADAMSON, 1982).

A propriedade de estabilizar espumas é a capacidade em reduzir as tensões gravitacionais e mecânicas em função do tempo de repouso (DAMODARAN et al., 2010). A extensão da formação de filme proteico está relacionada com a habilidade da proteína em reduzir a tensão superficial entre a gotícula de ar e a suspensão proteica. (PHILLIPS et al., 1994).

Ao contrário da solubilidade as espumas são mais estáveis na região do ponto isoelétrico, em virtude da repulsão eletrostática ser mínima e portanto, promover uma maior interação entre proteína-proteína (DAMODARAN et al., 2010).

Pelo fato de enfraquecer as interações proteicas, os sais tendem a reduzir a viscosidade e a rigidez dos filmes proteicos, no entanto em concentrações adequadas ajudam na capacidade espumante, pois previnem e auxiliam a difusão e expansão da interface (ALTSCHUL e WILCKS, 1985).

## 2.3. Capacidade de gelificação

A formação de gel é uma propriedade funcional térmica que ocorre após desnaturação pelo calor. O calor promove o enfraquecimento e a quebra das ligações de hidrogênio e dissulfídicas, desestabilizando a estrutura terciária e quaternária, das proteínas. Após o desnovelamento essas moléculas proteicas polimerizam ao interagir com moléculas vizinhas através de ligações hidrofóbicas e sulfidrílicas, formando uma estrutura tridimensional que imobiliza grande parte do solvente e moléculas de baixo massa molar (MANGINO, 1984).

Agregação proteica seguida da formação do gel é um processo influenciados pela concentração de proteína, pH, natureza e concentração do eletrólito (MULVIHILL e KINSELLA, 1987). Atualmente estudos tem demonstrado a formação de gel a partir de interações eletrostáticas entre proteínas e polissacarídeos por meio da acidificação lenta, sem a desnaturação previa pelo calor ou processo enzimático (LANEUVILLE et al., 2006; LE e TURGEON, 2013). Tem sido relatado também que algumas proteínas são capazes de formar gel à temperatura ambiente pelo método chamado de gelificação a frio, que consiste de um aquecimento prévio em pH distante do pI seguido pela indução da gelificação a temperatura ambiente por meio da adição de sais ou redução do pH (BRYANT e MCCLEMENTS 1998; (ALTING et al., 2002; CHAI et al., 2008)

## **2.4. Capacidade emulsificante**

Emulsão é um sistema composto por dois líquidos imiscíveis, tendo uma fase contínua e uma fase dispersa na forma de gotículas (ORNELLAS et al., 2000). Por possuir em sua estrutura uma porção hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), ou seja, ter natureza anfifílica as proteínas são capazes de se adsorver nas interfaces óleo/água sendo, portanto uma opção lógica na escolha de um emulsificante/estabilizante de emulsões (DICKINSON, 1999).

A propriedade emulsificante da proteína é importante para vários produtos alimentícios. Por serem naturais e não irritarem o organismo tem sido amplamente utilizadas para o controle de ingredientes ativos, solubilização e encapsulação (BOUYER et al., 2012).

## **3. COMPLEXOS COACERVADOS**

### **3.1. Breve histórico sobre o estudo da formação dos complexados**

A separação de fase foi inicialmente observada a partir de um estudo entre gelatina e goma arábica realizado por TIEBACKX em 1911. Em 1929 foi proposta por BUNGENBERG DE JONG e KRUYT a primeira explicação teórica sobre o fenômeno de coacervação simples. Posteriormente, em 1949, BUNGENBERG DE JONG, ao estudar a formação de coacervação complexa entre gelatina/goma arábica (GA), percebeu que a interação ocorria devido à alteração das cargas eletrostáticas ao redor dos biopolímeros (GA com carga – e gelatina com carga +) e que essas alterações de cargas eram promovida por alterações no pH e nos teores de NaCl.

OVERBEEK e VOORN (1957) baseados nos experimentos de Bungenberg de Jong interpretaram que a coacervação ocorria por uma competição entre as forças eletrostáticas que promoviam a interação entre as moléculas carregadas e os efeitos entrópicos que tendiam a dispersar a interação. Esta teoria baseava-se nas seguintes suposições: (1) as moléculas têm uma configuração aleatória da cadeia, (2) interações solvente-soluto são menos significantes, (3) as forças interativas são distribuídas conforme a orientação da natureza do biopolímero, (4) não existe qualquer interação local específico entre as moléculas.

Mais recentemente, TAINAKA desenvolveu um modelo, aceito até hoje, para o entendimento da formação da coacervação complexa mais abrangente do que todas as teorias anteriores e aplicável a um grande número de sistemas contendo alta e baixa densidade de cargas. De acordo com TAINAKA, as forças motrizes para a separação de fases são a eletrostática e a força de atração entre os agregados, que se tornam mais fortes quando a densidade de carga e a massa molar dos polímeros são maiores. No entanto, tanto o aumento da massa molar e densidade de cargas tem um limite máximo e um mínimo, onde nesses casos não se verifica a formação de coacervados (TAINAKA, 1979; TAINAKA, 1980).

### **3.2. Coacervação**

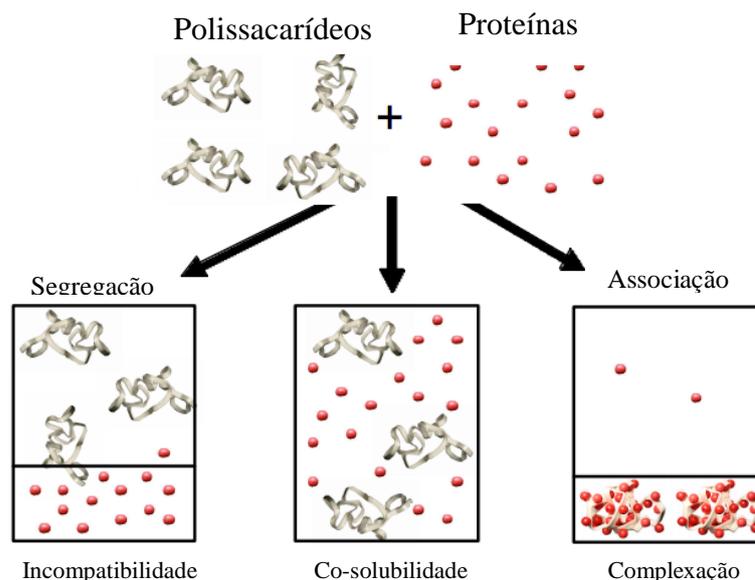
Coacervação é definido pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), (1997) como sendo uma separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas. A coacervação complexa é motivada pela força de atração de biopolímeros de cargas opostas, no qual uma fase diluída coloidal interage com uma fase coloidal mais concentrada (fase de coacervado), sendo a nova fase, formada após a interação, eletricamente neutra (SOUZA et al, 2013; ZHANG et al., 2013).

A interação entre biopolímeros são instáveis, já que na maioria das vezes são susceptíveis ao fenômeno de separação de fases. Como mostra a Figura 4 essa separação pode ocorrer através de duas formas: 1) incompatibilidade termodinâmica (segregação), também conhecida como separação de fase segregativa e 2) complexação (coacervação complexa), conhecida por separação de fases associativa (TOLSTOGUZOV, 1991; TURGEON et al., 2007).

A incompatibilidade entre os biopolímeros se dá pela predominância de repulsão de cargas entre os mesmos. Neste caso a dispersão apresenta duas fases, sendo uma rica em um biopolímero e a outra fase rica em outro biopolímero. Isso pode ocorrer tanto em altas concentrações quanto em elevada força iônica. Caso haja predomínio de atração entre os biopolímeros por meio interações eletrostáticas, ou seja, quando os biopolímeros apresentam cargas opostas, ocorre à separação de fases do tipo associativa, também conhecida como coacervação complexa, em que se verifica uma fase constituída essencialmente pelos biopolímeros e outra essencialmente pelo solvente (TURGEON et al., 2003, TURGEON et al., 2007, KRUIF et al., 2004).

A coacervação complexa se diferenciam por geralmente ocorrer em baixas concentrações de biopolímeros (< 3-4 massa total%), em baixa força iônica (< 0,4 mol/L) e quando as moléculas encontram-se carregadas opostamente (TOLSTOGUZOV, 2007). No caso das proteínas esses complexos coacervados ocorrem entre seus pI (TOLSTOGUZOV, 1997).

Os coacervados são partículas esféricas formado por um agregado de biopolímeros, com excelente propriedade interfacial, permitindo, após sua estabilização, serem utilizados como ingrediente para encapsulamento. Contudo, para isso é necessário que um estudo seja feito sobre seu comportamento frente às variações de pH, temperatura e concentração de sal dos sistemas alimentares onde podem ser utilizados (CAPITANI et al., 2006; NIU, et al, 2014).



**Figura 4:** Representação esquemática do comportamento de dispersões aquosas de misturas de polissacarídeos e proteínas (adaptado de TOLSTOGUZOV, 1991; WEINBRECK et al., 2004).

Os complexos coacervados obtidos a partir da interação entre proteínas e polissacarídeos são os mais amplamente estudados (TURGEON et al., 2007; VINAYAHAN et al., 2010; SOUZA et al., 2013; GULÃO et al., 2014; NIU et al., 2015). Entretanto estudos recentes têm demonstrado a formação de complexos coacervados também entre proteínas globulares opostamente carregadas.

### 3.3. Complexos Coacervados proteína-proteína

Interações proteína-proteína foram estudadas pela primeira vez em 1995, entre  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) e Lis (HOWELL et al., 1995). Eles observaram que as duas proteínas podiam formar complexos insolúveis, reversíveis, dependendo do pH, força iônica e concentração de proteína. Mais tarde, HOWELL e LI-CHAN, (1996) puderam confirmar que a interação ocorria em sua maior parte, por interações eletrostáticas, mas também por interações hidrofóbicas, que conferiam maior estabilidade no precipitado. Posteriormente, outros estudos foram feitos entre Lis e proteínas da clara provando a ocorrência da interação por cargas opostas em baixa força iônica (DAMODARAN et al., 1998). Em seguida, DESFOUGERES (2010) demonstrou, que a interação promovia a formação de microesferas. Atualmente um estudo maior e mais aprofundado tem sido feito entre esses complexos. ANEMA e KRUIF (2013) estudaram a formação de coacervados entre Lis e  $\beta$ -caseína, como maneira de agregar a ação antimicrobiana da lis em queijos maturados. Os mesmos autores, (2014) também estudaram a formação de complexos coacervados entre lactoferrina e (BLG) da mesma forma que YAN et al. (2013), e demonstraram a formação sob condições específicas de pH, razão, concentração e adição de sal. Apesar de não estudarem a aplicação desses complexos, já era sugerido sua possível utilização como material de parede para transporte e proteção de substâncias bioativas, bem como em mecanismo de liberação controlada, no caso de fármacos em certas condições controladas e específicas (NIGEN et al., 2007). Recentemente um estudo utilizando BLG e Lis relatou que interações eletrostáticas entre cargas opostas induziu a formação de microesferas capazes de serem utilizadas como veículo, à base de proteínas, para o encapsulamento de vitamina D<sub>3</sub>. Esse estudo inicial, pode servir como modelo para o utilização de complexos proteicos de origem alimentar para o encapsulamento de bioativos de interesse nutricional (DIARRASSOUBA et al., 2015).

## 4. ASPECTOS TERMODINÂMICOS

A energia envolvida na formação de complexo coacervados entre polissacarídeos e proteínas já tem sido alvo de muitos estudos por meio da utilização de duas técnicas calorimétricas: a calorimetria diferencial de varredura e a calorimetria de titulação isotérmica (TOLSTOGUZOV, 2002).

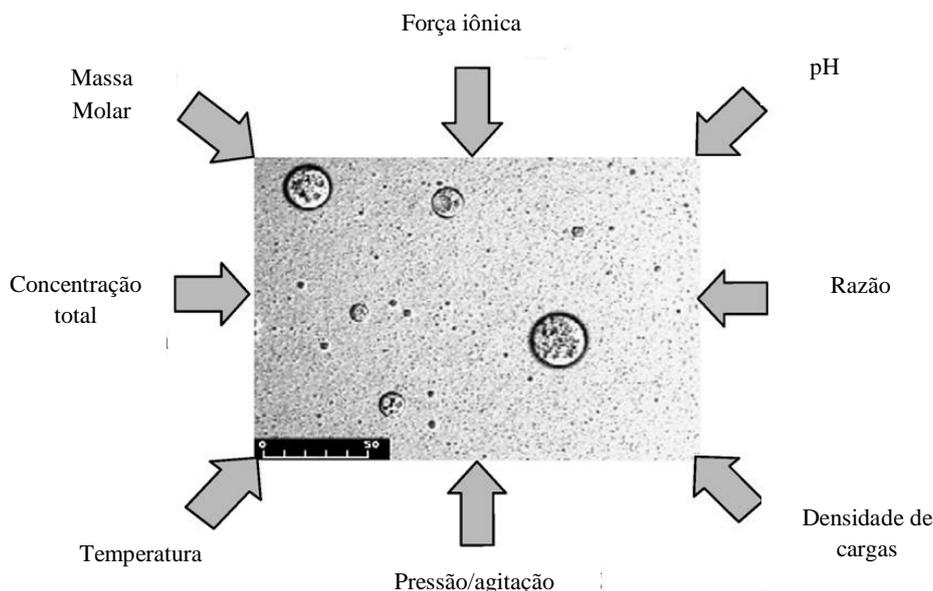
A calorimetria diferencial de varredura (DSC) estuda transições ou processos que ganham ou perdem calor em função da temperatura ou seja, quando uma substância é submetida a uma alteração de temperatura, processos endotérmico, em que há absorção de calor, ou exotérmico, quando há produção de calor podem ocorrer. Como a maioria das moléculas biológicas de interesse sofrem transformações quando submetidas a variações de temperatura, é possível utilizar o DSC para determinar a energia envolvida em tais processos (JOHNSON, 2013). A técnica calorimétrica é utilizada para determinar a temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) e a entalpia de desnaturação ( $\Delta H_d$ ) de proteínas após interação com polissacarídeos. Sua utilização, frente a interação entre proteínas, também visa caracterizar alterações na estabilidade térmica da proteína após processo de coacervação (YUAN et al., 2014; MAO et al., 2014)

Quando estudadas por YUAN et al. (2014), as interações entre as frações de proteína de soja e quitosana os processos endotérmicos foram revelados, indicando o ponto de desnaturação da proteína. Nesse caso, a interação com formação de coacervados aumentou a estabilidade térmica da proteína. Ao contrário de um estudo sobre o comportamento térmico de isolados de proteína de soro de leite (WPI), na ausência ou presença de pectina o qual foi verificado que a interação com um polissacarídeo (pectina) reduziu a estabilidade térmica do WPI (MAO et al., 2014).

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) mede a energia liberada durante as interações moleculares e é usado para a caracterização qualitativa e quantitativa dessas interações (HAPPI EMAGA, et al, 2012; OGNJENOVIC et al, 2014.) Sendo a única técnica que avalia as interações termodinâmicos, e fornece vários parâmetros termodinâmicos como a constante de afinidade,  $K$ , a estequiometria de ligação,  $n$ , variação de entalpia,  $\Delta H$ , variação de entropia,  $\Delta S$  e variação da energia livre de Gibbs,  $\Delta G$ , em uma única titulação. NIGEN et al. (2007) analisaram a interação entre  $\alpha$  lactoglobulina (sem cálcio) e Lis em diferentes temperaturas. Apesar da complexação ter sido exotérmica para todas as temperaturas estudadas, os autores verificaram diferenças nos perfis termodinâmicos do ITC e concluíram que diferentemente do que ocorre para coacervação entre proteínas e polissacarídeos e interações proteína-proteína são favorecidas por elevadas temperaturas. Ao estudar os complexos heteroproteicos entre  $\beta$  lactoglobulina e lactoferrina, FLANAGAM (2015) mostrou que a formação do complexo inicialmente foi endotérmica, mas uma grande exotermia estava relacionada com a formação dos coacervados.

## **5. PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS**

A formação dos complexos depende do equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas, ou seja, a interação entre dois biopolímeros com cargas opostas possibilita a formação do complexo em decorrência da neutralização mútua de cargas dos biopolímeros. Devido a isso, diversos parâmetros físico-químicos interferem no grau de interação, favorecendo ou suprimindo a formação do complexo coacervado. Na Figura 5 estão apresentados os principais fatores que influenciam a formação dos coacervados como o pH, força iônica, razão, concentração dos biopolímeros, temperatura e massa molar (NIGEN et al., 2009; YAN et al., 2013).



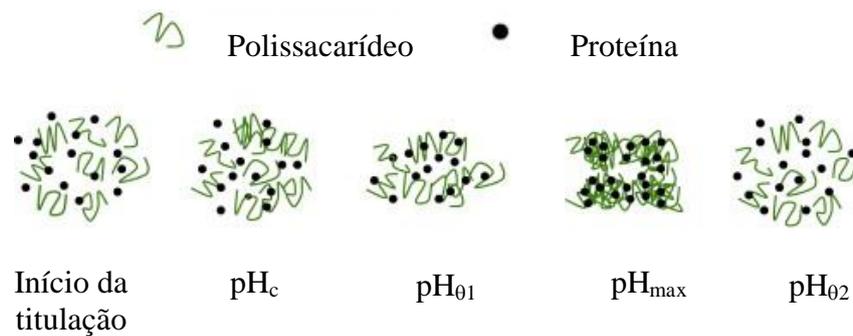
**Figura 5:** Parâmetros físico-químicos que influenciam a formação do complexo coacervados em sistemas de proteína / polissacarídeos (SCHMITT e TURGEON, 2011).

### 5.1. pH

A maior parte das interações que ocorrem no processo de coacervação complexa é do tipo eletrostática e, para que essa interação ocorra, os biopolímeros precisam estar com cargas opostas. Por influenciar o grau de dissociação dos grupos funcionais, o pH é portanto um fator de extrema relevância (CAPITANI et al., 2006). Isso porque para que as proteínas estejam carregadas e aconteça a interação, o pH da reação precisa estar ajustado entre seus pontos isoelétricos. A formação de complexos entre lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina se deu na região de pH 5-7,3, fortalecendo o que foi dito, já que o pI da lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina é de 8,3 e 4,8, respectivamente (ANEMA e KRUIF, 2014).

Apesar dos mecanismos que envolvem a formação dos complexos coacervados não esteja completamente elucidado, podem ser identificados os seguintes processos sequenciais, como ilustrado na Figura 6. Antes da titulação (pH não está entre os pI) as moléculas de proteínas encontram-se com a mesma carga o que promove repulsão eletrostática entre elas. Está repulsão impede que haja uma aproximação suficiente para sua associação. Com o início da titulação ocorre, primeiramente, devido a fraca associação a formação de complexos solúveis ( $pH_C$ ), que pelo pequeno tamanho ainda permitem a passagem de luz sendo portanto, observado como apenas um ligeiro aumento na turbidez. Em seguida, a associação passa a ser mais forte em decorrência do aumento de densidade de cargas opostas, verificada como um rápido aumento da turbidez em virtude do aumento do tamanho dos complexos ( $pH_{01}$ ). Estes complexos podem ser relativamente grandes podendo chegar a 10000 nm, o que justifica a não dispersão da luz e os consequentes altos valores de turbidez. Prosseguindo a titulação, a turbidez tenderá a um ponto máximo ( $pH_{max}$ ) quando a equivalência elétrica for alcançada entre os biopolímeros. Imediatamente após ser atingido o  $pH_{max}$  os complexos insolúveis começam a dissociar devido à protonação de grupos aniônicos ou deprotonação de grupos catiônicos, atingindo completa dissociação ( $pH_{02}$ ) quando os biopolímeros apresentarem a

mesma carga líquida (KRUIF e TUINIER, 2001; TURGEON et al., 2003; WEINBRECK, 2004).



**Figura 6:** Processos sequenciais envolvidos na formação de complexos coacervados. (adaptado de LIU et al., 2015)

## 5.2. Força iônica

A força iônica, geralmente influenciada pela concentração de sais, também é um outro fator capaz de reduzir a formação dos complexos. Isso porque em altas concentrações de sais, a densidade de íons transportada pelo biopolímero é reduzida pela interação com os íons presente no sal, resultando numa diminuição na atração eletrostática entre as macromoléculas e, conseqüentemente, diminui ou até mesmo suprime a formação de complexos coacervados (WEINBRECK et al., 2003; YE e SINGH, 2006). Em geral, estudos tem avaliado a influência da força iônica como uso de NaCl. Em um experimento com duas proteínas globulares,  $\beta$ -lactoglobulina e Lactoferrina foi demonstrado que o aumento da concentração de sal a cerca de 100 mmol/L de NaCl já foi capaz de reduzir a interação (ANEMA e KRUIF, 2014). Entre Lis /  $\alpha$ -lactoalbumina concentrações iônica acima de 124 mmol/L de NaCl suprimiu a formação de complexo, caracterizada pela ausência de turbidez (NIGEN et al., 2009).

## 5.3. Razão e concentração de proteína

A proporção de proteína no sistema altera o comportamento de formação dos complexos por influenciar o equilíbrio de carga dos complexos. Dessa forma, para que a complexação máxima ocorra é necessário conhecer a proporção exata de cada biopolímero a uma dada condição de pH (TAINAKA, 1980; KIZILAY et al., 2011). DIARASSOUBA, (2015) verificou ao estudar a interação entre Lis e BLG, que a turbidez da mistura contendo as duas proteínas aumentou a partir da razão de um BLG: Lis 30: 1-5: 1, atingindo um patamar entre as razões 3:1-1:1, e diminui quando a concentração de Lis estava em excesso. Foi sugerido pelos autores que a acentuada diminuição da turbidez quando Lis estava em excesso poderia ser explicada pela falta de BLG em solução para formar precipitados, assim como pela repulsão eletrostática positiva predominante.

A concentração total de proteínas no sistema também é um parâmetro importante a ser considerado tanto, que YAN et al. (2013) ao formar complexos coacervados por meio da interação entre lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina, observou que esta só ocorreu em concentrações de proteínas entre 10 e 60 g/L.

## 5.4. Temperatura

Alteração na temperatura podem provocar modificações na conformação estrutural das proteínas, além de facilitar a ocorrência de interações do tipo não eletrostáticas entre elas. Ligações de hidrogênio são favorecidas a baixas temperaturas, enquanto altas temperaturas favorecem ligações hidrofóbicas (SCHMITT et al., 1998; TOLSTOGUZOV, 2002). Estudos sobre o efeito da temperatura na estrutura resultante da interação entre  $\alpha$  lactoglobulina e Lis verificou formação de estruturas distintas, onde a coacervação ocorreu a temperatura de 45°C (NIGEN et al., 2007; SALVATORE et al., 2011).

## 5.5. Massa molar

A diferença de tamanho entre as proteína em estudo é um elemento chave que pode definir o pH ótimo e a razão molar para a formação dos complexos coacervados. Quando as duas moléculas de proteínas apresentam massa molar semelhante, o equilíbrio de cargas tende a se dar próximo a razão de 1:1. Essa afirmação se justifica pela interação entre  $\alpha$  lactoglobulina e lis na razão de 1:1, ambas com massa molar de 14 kDa. Diferentemente do que é verificado na interação entre avidina (67 kDa) e ovalbumina (45 kDa), tendo o equilíbrio de carga se dado na razão de 2:1, sendo a maior proteína a de maior concentração. Isso porque, quando uma proteína tem um tamanho maior que a outra, é necessário uma maior estequiometria para atingir o equilíbrio (DESFOUGERES et al., 2010). DIARRASSOUBA (2015) encontrou resultados semelhantes quando observou a maior turbidez a uma razão 2:1 de BLG (18 kDa) / Lis (14 kDa) com a menor proteína na concentração mais elevada.

## 6. APLICAÇÕES

Biopolímeros, como proteínas, estão presentes na estrutura de diferentes organismos vivos e são amplamente utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e biomédica pelas suas muitas propriedades funcionais. Como ingredientes de produtos alimentícios podem determinar a estabilidade, estrutura, viscoelasticidade e textura em virtude de suas propriedades nutricionais e funcionais (TOLSTOGUZOV, 2003).

A formação dos complexos coacervados tem por objetivo melhorar as características funcionais dos biopolímeros de origem. Desse modo, diversos segmentos industriais têm utilizado esses complexos insolúveis como uma alternativa tecnológica, principalmente para o encapsulamento de compostos bioativos e no desenvolvimento de novos ingredientes alimentares. (SCHMITT et al., 1998; WANG et al., 2014)

O encapsulamento de diversos ingredientes (aroma, sabor, vitaminas, antioxidantes) tem sido aplicado como uma forma de proteger algum ingrediente sensível contra fatores ambientais, tornando-o mais estável; como alternativa para mascarar sabores desagradáveis ou preservar sabor e aroma desejáveis; além de ser usado como mecanismo de liberação lenta de ingredientes alimentares e de liberação controlada na indústria farmacêutica (SCHMITT et al., 1998; NORI et al., 2011; QV et al., 2011; KROUPANTZIS et al., 2014 e ZHANG et al., 2011). Dentre os métodos de encapsulação de ingredientes alimentares está a coacervação. No entanto, além de outros métodos como spray drying, liofilização, revestimento em leito fluidizado, extrusão, alta pressão, co-cristalização, inclusão molecular tem sido utilizados (SHAHIDI e HAN, 1993; RAO e MCCLEMENTS, 2012). Apesar de alguns autores já terem

estudado o processo de coacervação entre duas proteínas, bem pouco tem estudado a sua aplicação. DIARRASSOUBA (2015) estudou a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lis e aplicou como material de material de parede na microencapsulação de vitamina D<sub>3</sub>. Os autores concluíram que a formação de microesferas podiam ser utilizadas como um produto comestível versátil como veículo de nutracêuticos, carecendo ainda de estudos referentes a estabilidade e caráter protetor das microesferas. Na Tabela 3 é apresentado algumas aplicações dos complexos coacervados em diferentes setores.

**Tabela 3:** Estudo sobre complexos coacervados e suas aplicações na microencapsulação de biomoléculas.

<b>Complexo Coacervado</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Setor</b>	<b>Referência</b>
$\beta$ lactoglobulina/lisozima	Microencapsulação de vitamina D <sub>3</sub>	Alimentício/farmacêutico	DIARRASSOUBA at al., 2015
Quitosana/goma arábica	Microencapsulação de aroma de baunilha	Alimentício	YANG et al., 2014
WPI/carragena	Microencapsulação de Probiótico	Alimentício/farmacêutico	HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014
Quitosa/carragena	Microencapsulação de óleo essencial de pimenta	Alimentício	DIMA, 2014
Colágeno/quitosana	Microencapsulação de óleo de lavanda	Cosméticos	OCAK, 2012
Gelatina/goma arábica	Microencapsulação de Aspartame	Alimentício	ROCHA-SELMÍ et al., 2013
Gelatina/goma arábica	Microencapsulação de ácido ascórbico	Alimentício/farmacêutico	COMUNIAN et al., 2013
Ácidohialurônico/ Proteína de mexilhão	Microencapsulação de osteoblastos	Medicina	HWANG et al., 2010

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMSON, G.K. **Physical chemistry of surface**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, p.664, 1982.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Efeito da temperatura e do período de armazenamento na qualidade do ovo nos teores de s-ovalbumina e nas propriedades funcionais das proteínas da clara do ovo, 1997. [Online]. Disponível:<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000120771>. [Acessado: 27-Jan-2016].

ALTING, A.C.; DE JONGH, H.H.J.; VISSCHERS, R.W.; SIMONS, J.-W.F.A. Physical and chemical interaction in cold gelation of food protein. **J Agric Food Chem**, v. 50, p.4682–9, 2002.

ALTSCHUL, A.M.; WILCKES, H. L. **New Protein Foods: Food Science and Technology**. Academic Press, Orlando, Florida, 1985.

ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. K. DE. Complex coacervates of lactotransferrin and  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.430, p.214–220, 2014.

ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. K. DE. Coacervates of lysozyme and  $\beta$ -casein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.398, p.255–261, 2013.

BOLONTRADE, A.J.; SCILINGO, A.A.; AÑÓN, M.C. Amaranth Proteins Foaming Properties: Adsorption Kinetics and Foam formation—Part 1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.105, p.319–327, 2013.

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? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n.1–2, p. 359–378, 2012.

BRYANT CM, MCCLEMENTS DJ. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat denatured whey. **Trends Food Sci Technol**, v.9, p.143–151, 1998.

BUJACZ, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr**, v. 68, n. 10, p. 1278–1289, 2012.

BUNGENBERG DE JONG, H. G.; KRUYT, H. R. Coacervation (Partial miscibility in colloid systems). **Proc. Koninkl. Med. Akad. Wettershap.**, v. 23, p. 849-856, 1929.

BUNGENBERG DE JONG, H. G. Complex colloid systems. In: KRUYT, H. R. (Ed.). **Colloid Science**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, v.II, cap. X, p.335-432, 1949.

CAMILO, K. F. B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados**. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.2007.

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.B.; PILOSOFF, A.M.; PÉREZ, O.E. Caracterização e Comportamento Dinâmico dos Complexos de Carboximetil Celulose com Proteínas do Soro de Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2006.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1123–1128, 2005.

CHOI, S.J.; LEE, S.E.; MOON T.W. Influence of Sodium Chloride and Glucose on Acid-Induced Gelation of Heat-Denatured Ovalbumin. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 313-322, 2008.

CHOI, S.; KIM, H.; PARK, K.; MOON, T. Molecular characteristics of ovalbumin-dextran conjugates formed through the Maillard reaction. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 93- 99, 2005.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release, **Food Research International**, v.52, n.1, p.373–379, 2013.

DAMODARAN, S., ANAND, K., & RAZUMOVSKY, L. Competitive adsorption of egg white proteins at the air water interface. Direct evidence for electrostatic complex formation between lysozyme and other egg proteins at the interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 872–876, 1998.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Artmed, Porto Alegre, p. 900. 2010.

DESFOUGERES, Y., CROGUENNEC, T., LECHEVALIER, V., BOUHALLAB, S., & NAU, F. Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.114, p.4138–4144, 2010.

DIARRASSOUBA et al. Self-assembly of b-lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v.173, p. 203–209, 2015.

DICKINSON, E. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, v.9, p. 305–312, 1999.

DICKINSON, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v.4, n.5, p. 932, 2008.

DIMA, C.; COTĂRLET, M.; ALEXE, P.; DIMA, S. Reprint of ‘Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimentadivica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.25, p. 97–105, 2014.

DONG, L.; CHEN, X.; HU, Z. Study of the effect of cal-red on the secondary structure of human serum albumin by spectroscopic techniques. **Journal of Molecular Structure**, V. 846, 2007.

DOSE, K. **Bioquímica**, Edusp, 1982.

FAO-DATABASE. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2015. Acesso em: 01 Fevereiro

FLANAGAN, S. E.; MALANOWSKI, A. J.; KIZILAY, E.; SEEMAN, D.; DUBIN, P. L.; DONATO-CAPEL, L.; BOVETTO, L.; SCHMITT, C. Complex Equilibria, Speciation, and Heteroprotein Coacervation of Lactoferrin and  $\beta$ -Lactoglobulin. **Langmuir**, v. 31, n. 5, p. 1776–1783, 2015.

GULÃO, E. DA S.; SOUZA, C. J. F.; SILVA, F. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; GARCIA-ROJA, E. E. Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum arabic: Formation and characterization. **Food Research International**, 2014.

HALL, G. M. **Methods of testing protein functionality**. 1. ed. London: Chapman e Hall. p.1-10, 1996.

HAPPI EMAGA, T.; GARNA, H.; PAQUOT, M.; DELEU, M., Purification of pectin from apple pomace juice by using sodium caseinate and characterisation of their binding by isothermal titration calorimetr., **Food Hydrocolloids**, v.29, p.211-218, 2012.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L.; LOBATO-CALLEROS, C.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; VERNON-CARTER, E. J. Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate:  $\kappa$ -carrageenan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v.36, p.181–188, 2014.

HOWELL, N., & LICHAN, E. Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p. 439–451, 1996.

HOWELL, N. K., YEBOAH, N. A., & LEWIS, D. F. V. Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with a-lactalbumin and b-lactoglobulin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 813–824, 1995.

HUANG, G.Q.; SUN, Y.T.; XIAO, J.X.; YANG, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chemistry**, v.135, p.534–539, 2012.

HUNTINGTON, J. A.; STEIN, P. E. Structure and properties of ovalbumin. **Journal of Chromatography**, A, v. 756, n. 1–2, p. 189–198, 2001.

HWANG, D. S.; WAITE, J. H.; TIRRELL, M. Promotion of osteoblast proliferation on complex coacervation - based hyaluronic acid – recombinant musselad hesive protein coatings on titanium. **Biomaterials**, v.31, n.6, p.1080–1084, 2010.

IUPAC, Compendium of Chemical Terminology. second ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.531, n.1–2, p.100–109, 2013.

JOHNSON, E. A.; LARSON, A. E. Lysozyme. In DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. (Eds.), **Antimicrobials in food** (3rd ed.). New York: Taylor & Francis Group, 2005.

KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 167, n. 1–2, p. 24-37, 2011.

- KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005.
- KOUPANTISIS, T.; PAVLIDOU, E.; PARASKEVOPOULOU, A. Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate type complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 134–142, 2014.
- KRUIF, C. G. DE; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, v.15, p.555-563, 2001.
- KRUIF, C. G. D.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. D. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 340 – 349, 2004.
- LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; MAINCENT, P. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 632–638, 2007.
- LANEUVILLE, S. I.; TURGEON, S. L., SANCHEZ, C.; PAQUIN, P. Gelation of native beta-lactoglobulin induced by electrostatic attractive interaction with xanthan gum. **Langmuir**, v. 22, n. 17, p. 7351–7357, 2006.
- LE, X. T. E TURGEON, S. L. Rheological and structural study of electrostatic cross-linked xanthan gum hydrogels induced by  $\beta$ -lactoglobulin. **Soft Matter**, v. 9, n. 11, p. 3063–3073, 2013.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2. ed., New York: Worth, P. 1993- 1013, 1993.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Biochemical basis for properties of egg white. **Crit. Rev.Poultry Biology**. v. 2, n. 1, p. 21-57, 1989.
- LIU, J.; SHIM, Y. Y.; WANG, Y.; REANEY, M. J. T. Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 95–103, 2015.
- MANGINO, M. E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2711-2722, 1984.
- MAO, L.; et al.Evaluation of volatile characteristics in whey protein isolate–pectin mixed layer emulsions under different environmental conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 79–85, 2014.
- MICKE, P.; BEEH, K.M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, v. 41, p. 12-18, 2002.

MULVIHILL, D. M.; KINSELLA, J. E. Gelation characteristics of whey proteins and  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Technology**, v.41, p.102-111, 1987.

NAKAMAE, I.J. (Ed.). **Anualpec 2004**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2004. p. 191-232.

NEVES, B.S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil**: qualidade e segurança alimentar. Juiz de Fora, MG, 2001. p.97-108.

NASCIMENTO, V. P.; SALLE, T. P. S. O ovo e Biologia das Aves. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds) **Manejo da Incubação**. 2.ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 35-50 e 163-179, 2003.

NGARIZE, S.; et al. Comparison of Changes in the Secondary Structure of Unheated, Heated, and High-Pressure-Treated  $\beta$ -Lactoglobulin and Ovalbumin Proteins Using Fourier Transform Raman Spectroscopy and Self-Deconvolution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, no. 21, p. 6470–6477, 2004.

NIGEN, M., CROGUENNEC, T., RENARD, D., & BOUHALLAB, S. Temperature affects the supramolecular structures resulting from  $\alpha$ -lactalbumin- lysozyme interaction. **Biochemistry**, v. 46, p. 1248–1255, 2007.

NIGEN, M.; et al. Formation and stability of  $\alpha$ -lactalbumin–lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.2, p. 510–518, 2009.

NIU, F.; SU, Y.; LIU, Y.; WANG, G.; ZHANG, Y.; YANG, Y. Ovalbumin–gum arabic interactions: Effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 477–482. 2014.

NIU, F.; et al. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin–gum arabic complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p.1-7, 2015.

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

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.

OGNJENOVIC, J.; et al. Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white. **Food Chemistry**, v. 164, p. 36–43, Dec. 2014.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERCO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 269-294, 2005.

ORNELLAS, C. B. D.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da Adição de NaCl sobre as propriedades funcionais do plasma bovino e de seus hidrolisados tríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 391-397, 2000.

OVERBEEK, J. T. G.; VOORN, M. J. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 49, p. 7-26, 1957.

PELEGRINE, D. H. G. e CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB, P.145-151, 2008.

PHILLIPS, L.G.; WHITEHEAD, D.M.; KINSELLA, J.E. Structure-function properties of food proteins. San Diego: Academic Press **Food Science and Technology International Series**, p. 271, 1994.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1596-1603, 2011.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 749-757, 2012.

ROCHA-SELMÍ, G. A.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; BOLINI, H. M. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 72-78, 2013.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p. 221-228, 2002.

SALVATORE, D.; CROGUENNEC, T.; BOUHALLAB, S.; FORGE, V.; NICOLAI, T. Kinetics and structure during self-assembly of oppositely charged proteins in aqueous solution. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1920-1926, 2011.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DEOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.

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

SGARBIERI, V. C. Physiological-functional properties of milk whey proteins. **Revista Nutrição**, v.17, p.397-409, 2004

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p.7-19, 1999.

- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**. São Paulo: Varela, p. 57-172, 1996.
- SINHA, S.S.; MITRA, R.K.; PAL, S.K. Temperature-dependent simultaneous ligand Binding in Human Serum Albumin. **J. Phys. Chem. B** , v.112, p. 4884-4891, 2008.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.
- SOUZA, C. J.F.; ROJAS, E. E. G.; MELO, N. R. G., LINS, J.F.C. Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 375-381, 2013.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4ª ed., Editora Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, 1996.
- STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**. Food Products Press, 1995.
- SUGAHARA, M.; NANGO, E.; SUZUKI, M. Crystal structure of hen egg-white lysozyme. **To be Published**, 2014.
- TAINAKA, K.-I. Effect of counterions on complex coacervation. **Biopolymers**, v. 19, p. 1289-1298, 1980.
- TAINAKA, K. Study of Complex Coacervation in Low Concentration by Virial Expansion Method. I. Salt Free Systems. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. Journal of the Physical Society of Japan, p. 1899-1906, 1979.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloid**, v. 4, p. 429-468, 1991.
- TOLSTOGUZOV, V.B. **Protein-Polysaccharide Interaction in Food Proteins and their Applications in Foods**, Damadoran, s. and Paraf, a. (ads.). Marcel Dekker Inc., New York. P. 171-198, 1997.
- TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic Aspects of Biopolymer Functionality in Biological Systems, Foods, and Beverages. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 89-174, 2002.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Some thermodynamic consideration in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v.17, p. 1-23, 2003.
- TOLSTOGUZOV, V.B. **Ingredients interactions in complex foods: aggregation and phase separation**. In **Understanding and controlling the microstructure of complex foods**, McClements, d. j. (ed.), Wood head Publishing, Cambridge. 2007.
- TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.8. p. 401-414. 2003.

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

VACLAVIK, V. A. **Fundamentos de ciencia de los alimentos**. Acribia editorial, P.140, 2002.

VINAYAHAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3367–3374, 2010.

VOJDANI, F. **Solubility. Methods of testing protein functionality**. In G. M. Hall (Ed.), London: Blackie Academic e Professional. p. 265, 1996.

WANG, B.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 158, p. 358–365, 2014.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. Complexation of Whey Proteins with Carrageenan. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 3550–3555, 2004.

WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C. G. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 293–303, 2003.

WIT, J.N. de. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 597–608, 1998.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos. Mecanismos y teoría**. Zaragoza: Acribia S. A. 1995.

YAMAMOTO, T. **Hens Eggs: Their Basic and Applied Science**. CRC Press, 1997.

YAMASAKI, M.; TAKAHASHI, N. Crystal Structure of S-ovalbumin as a Non-loop-inserted Thermostabilized Serpin Form. **Journal of Biology Chemica**, v. 278, n. 37, p. 35524–35530, 2003.

YAN, Y.; et al. Heteroprotein complex coacervation: bovine  $\beta$ -lactoglobulin and lactoferrin. **The ACS journal of surfaces and colloids**. v. 29, n. 50, p. 15614–15623, 2013.

YANG, Z.; et al. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. **Food Chemistry**, v. 145, p. 272–277, 2014.

YE, A.; SINGH, H. Heat stability of oil-in-water emulsions formed with intact or hydrolysed whey proteins: influence of polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 269–276, 2006.

YUAN, Y.; et al. Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength, **Food Research International**, v. 55, p. 207–214, Jan. 2014.

ZEIDLER, G. **Shell eggs and their nutritional value**. In: BELL, D.D.; WEAVER, W.D. *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. 5th ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, p. 1109-1128, 2002.

ZHAO, Y.; LI, F.; CARVAJAL, M.T.; HARRIS, M.T. Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 332, p. 345–353, 2009.

ZHANG, L. Y.; ZHANG, X. 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, p. 323-332, 2013.

ZHANG, Z. Q.; PAN, C-H; CHUNG, D. Tannic acid cross-linked gelatine-gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allylisothiocyanate: characterization and in vitro release study. **Food Research International**, v. 44, p. 1000-1007. 2011.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for u-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1120–1126, 2009.

# **CAPÍTULO I**

## **COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DA OVALBUMINA E LIPOZIMA: FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TERMODINÂMICA.**

## RESUMO

Interações entre biomoléculas tem tido crescente importância em diversas áreas por sua aplicabilidade como agente encapsulante e ingredientes alimentares. A formação de complexos coacervados obtidos pela interação da Ovalbumina, e Lisozima foi investigada por variação de pH usando análise turbidimétrica e potencial - zeta em diferentes razões e concentração de NaCl com o objetivo de identificar as melhores condições para formação de coacervados. Os complexos foram formados em uma ampla faixa de pH, sendo a razão  $r=1$  em pH 7,5 o que apresentou maior turbidez. A adição de NaCl não facilitou a interação mesmo em baixas concentrações, chegando a suprimi-la a 0,03 mol/L. Os dados do potencial zeta contribuíram por confirmar que a formação dos complexos coacervados ocorreu próximo a neutralidade de cargas e entre os pI das proteínas e os espectros de infravermelho sugeriram que a interação se deu por meio de interações eletrostáticas com participação de ligações de hidrogênio. Através do tamanho de partícula foi verificado a formação de estruturas com tamanho médio  $\sim 2 \mu\text{m}$  bem superior quando comparadas as proteínas isoladas e as imagens de microscopia revelaram que os complexos apresentaram estrutura globular, possibilitando assim, seu uso como encapsulantes. A calorimetria de titulação isotérmica demonstrou que a interação foi exotérmica e que ocorreu em duas etapas a primeira conduzida pela entropia e a segunda pela entalpia. Os complexos de Ovalbumina / Lisozima descritos aqui podem ser um potencial agente encapsulante para bioativos hidrossolúveis além de poderem ser utilizados como ingrediente alimentar como método de enriquecimento.

**Palavras chave:** Microencapsulante, infravermelho, Calorimetria de titulação isotérmica.

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas estão entre os principais ingredientes alimentares na dieta humana além de possuírem inúmeras propriedades funcionais e tecnológicas (HOWELL et al., 1995). O ovo, em especial a clara do ovo é um dos alimentos mais consumidos e rico em proteínas de alto valor nutricional e funcional. No entanto, o consumo dessas proteínas ainda tem se restringido, basicamente, pelo consumo de ovos (STADELMAN e COTTERILL, 1995; KOVACS-NOLAN et al., 2005).

A complexação entre proteínas é uma metodologia que pode agregar valor nutricional e funcional a um produto como também exercer função tecnológica quando esses complexos são utilizados como agente de microencapsulação (DIARRASSOUBA et al., 2015).

Coacervação é definido como sendo uma separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas (IUPAC, 1997). A coacervação complexa, conhecida por ser uma separação de fases associativa, é motivada pela força de atração de biopolímeros de cargas opostas, no qual uma fase diluída coloidal interage com uma fase coloidal mais concentrada (fase de coacervado) (TOLSTOGUZOV, 1991; TURGEON et al., 2007; SOUZA et al, 2013; ZHANG et al., 2013). O termo "complexo" inclui tanto a formação de complexos solúveis, onde não se verifica a separação de fase e "complexos coacervados", quando envolve a separação de duas fases uma contendo o solvente e outra o precipitado (WEINBRECK et al., 2003). As Interações eletrostática entre grupamentos opostamente carregados são as interações que prevalecem e controlam a formação dos complexos coacervados. Por esse motivo, alguns parâmetros como pH e força iônica exercem uma real influência na sua formação, já que são capazes de alterar a densidade de cargas superficial das moléculas (LI et al., 2012). No que se refere a influência

do pH, quatro processos sequenciais podem ser identificados durante a formação dos complexos: O  $pH_c$  que representa a formação de complexos solúveis entre os biopolímeros, dada pelo ligeiro aumento na turbidez durante a titulação; o  $pH_{01}$ , observada pelo rápido aumento na turbidez e significa a formação dos complexos insolúveis (coacervados);  $pH_{max}$ , ponto máximo de turbidez e representa o ponto de equivalência elétrica;  $pH_{02}$ , que ocorre logo após ser atingido o ponto máximo, observado pela redução da turbidez indicando a dissociação e portanto fim da complexação (DE KRUIF e TUINIER, 2001; TURGEON et al., 2003; LIU et al, 2015).

Inúmeros estudos já demonstraram a formação de complexos coacervados entre polissacarídeo e proteínas e sua potencial aplicação tecnológica (SOUZA e GARCIA-ROJAS, 2015; WATER et al., 2014). Estudos recentes tem se proposto a compreender os complexos coacervados formados a partir da interação entre duas proteínas (ANEMA e KRUIF, 2014; ANEMA e KRUIF, 2013) tendo se mostrado um versátil agente para a proteção e transporte de bioativos alimentares (DIARRASSOUBA et al., 2015).

A ovalbumina é o principal constituinte proteico da clara do ovo (média de 65%), tendo massa molar 45 kDa e ponto isoelétrico (pI) 4,5. Esse biopolímero tem sido um importante ingrediente empregado na indústria de alimentos devido a sua função estrutural e sua capacidade emulsificante e estabilizante de espuma (SGARBIERI, 1996; SEUNG JUN CHOI, 2005; NIU et al., 2014). A lisozima é uma glicoproteína com função enzimática de 14 kDa de massa molar e pI de 10,7, presente em maior concentração na clara do ovo (3,4%) e com inúmeras propriedades funcionais principalmente antimicrobianas (SGARBIERI, 1996).

Assim, a proposta deste presente trabalho é estudar a influência do pH, da concentração de NaCl, e da razão de massa total das proteínas no processo de formação dos complexos coacervados obtidos a partir da interação entre duas proteínas globulares provenientes da clara do ovo, a ovalbumina e a lisozima e seus aspectos morfológicos e termodinâmicos.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Lisozima (Lis, pureza  $\geq 90\%$ ) e Ovalbumina (Ova, Pureza  $\geq 90\%$ ) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Luis, EUA). Cloreto de sódio (NaCl, pureza  $> 99\%$ ), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquirido da VETEC<sup>®</sup> Ltda, (Rio de Janeiro, Brasil). Foi utilizado para o experimento água ultrapura com condutividade de 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Gehaka, Master-P&D, Brasil).

### **2.2. Formação dos complexos**

#### **2.2.1. Preparação dos complexos**

As concentrações de Lisozima e Ovalbumina no sistema foram fixada em 0,1% m/m. As soluções de Ova e Lis foram utilizadas como controle e foram estudadas sete razões (r) de Ova/Lis: 8 (8:1); 4 (4:1); 2 (2:1); 1 (1:1); 0,5 (1:2); 0,25 (1:4); 0,125 (1:8). A fim de avaliar a influência do NaCl na formação dos complexos cinco diferentes concentrações de NaCl (0

mol/L; 0,01 mol/L; 0,05 mol/L; 0,1 mol/L e 0,3 mol/L) foram estudadas para todas as razões de Ova/Lis. Para o preparo das soluções, as amostras foram pesadas utilizando uma balança analítica (Shimadzu, AY 220, Filipinas), e as soluções estudadas agitadas com auxílio de um agitador magnético (Novatecnica, NT101, Brasil) por 30 minutos para completa dissolução. O pH das soluções foi previamente ajustado com auxílio de um pHmetro de bancada (Tecnopon, mPA-210, Brasil) para 11,0 para posterior titulação turbidimétrica (Adaptada de GULÃO et al., 2014).

### **2.2.2. Titulação Turbidimétrica**

A transmitância das amostras foi mensurada a um comprimento de onda de 400 nm em uma cubeta de quartzo de 1 cm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom, Libra S12, Inglaterra). O equipamento foi calibrado para 100% de transmitância (T) com água ultrapura e a turbidez definida como  $100 - \%T$  (SOUZA e GARCIA-ROJAS, 2015). A solução contendo a definida razão de Ova/Lis e sua respectiva concentração de NaCl teve seu pH ajustado (11,0-2,0) com HCl e NaOH com o auxílio de um pHmetro e um agitador magnético. O pH das soluções foi monitorado e uma alíquota de 1 mL foi retirada para aferição do valor de transmitância. Todas as titulações foram aferidas em temperatura ambiente (~25 °C) com três repetições, sendo o intervalo entre as aferições de aproximadamente 1 min.

### **2.3. Potencial - Zeta**

O potencial-zeta das proteínas isoladas e das razões estudadas foi determinado pelo Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS, Reino Unido). As amostras (10 mL) a 0,1% (m/m) foram colocadas no titulador (Malvern Instruments, MPT-2, Reino Unido). O pH das soluções foi ajustado com o auxílio de 0,5 mol/L de HCl, 0,25 mol/L de NaOH e 0,025 mol/L de NaOH e as análises foram conduzidas em função do pH (2,0-11,0), no intervalo de  $0,5 \pm 0,1$ . O Potencial-  $\zeta$  foi calculado com base no modelo matemático de Smoluschwsky e cada amostra lida em triplicata a 25 °C.

### **2.4. Tamanho de partícula**

O diâmetro hidrodinâmico (d.nm) dos complexos obtidos de Ova/Lis e das proteínas, Ova e Lis, em solução foram determinadas a pH fixo pela técnica de DLS (Dynamic Light Scattering) utilizando o Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS, Reino Unido) equipado com laser He-Ne a um comprimento de onda de 632,8 nm e ângulo de detecção fixo em 90 °C. As amostras foram colocadas em cubetas de vidro e lidas em triplicata a 25 °C.

### **2.5. Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados**

Após preparada, a solução da razão  $r=1$  em pH 7,5 foi deixada em repouso a 4 °C durante a noite. Em seguida, a solução foi centrifugada (Reoterm, digicen 21 R, Brasil) a 500 g por 10 min a temperatura de 20 °C (ANEMA e KRUIF, 2014). O sobrenadante foi então descartado e o precipitado colocado no ultra freezer (Terroni, COLD 120, Brasil) a temperatura de -38 °C durante aproximadamente 24 h. Ao final, o precipitado foi rapidamente transferido para o liofilizador de bancada (Terroni, Enterprise I, Brasil) para secagem e armazenado em um dessecador com sílica gel até sua utilização.

### **2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros no infravermelho foram obtidos das amostras de Lis e Ova e dos complexos liofilizados da definida razão de Ova/Lis. As análises foram realizadas em um espectrômetro FTIR (Bruker, Vertex 70, Alemanha), utilizando KBr (Brometo de potássio) e lidas na faixa entre 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.5.2. Microscopia óptica**

Uma alíquota do complexo coacervado em solução a 0,1% (m/m), r=1 e pH 7,5 foi colocado entre lamina e lamínula e conduzido ao microscópio óptico Axioplan (Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplado a uma câmera AxioCam MRc (Zeiss, Gottingen, Alemanha) ampliado a 100x com óleo de imersão.

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

As micrografias dos complexos liofilizados (r=1 e pH 7,5) foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss, EVO MA10, Inglaterra) com filamento de tungstênio, operado em modo de elétrons secundários com a tensão de aceleração de 20 kV.

## **2.6. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)**

Para realização da análise termodinâmica por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi utilizado o equipamento Nano-ITC (TA Instruments, EUA). As soluções de Ova a 0,37 mmol/L e de Lis 1,44 mmol/L foram preparadas com tampão fosfato 10 mmol/L em pH 7,5 e agitadas por 1 hora. Após completa dissolução das soluções de proteínas, estas foram mantidas sob diálise contra tampão fosfato desgaseificado através de membranas de 3,5 kDa (Sigma-Aldrich, Midi 3500, EUA) até equilíbrio iônico e de pH ( $7,5 \pm 0,05$ ). Em seguida as soluções foram filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ) e desgaseificadas, sob vácuo, com auxílio do Degassing Station (TA Instruments, EUA). 250  $\mu\text{L}$  de Lis a 1,44 mmol/L foi titulado na célula da amostra contendo inicialmente 1250  $\mu\text{L}$  de 0,37 mmol/L de Ova e a célula de referência preenchida com água ultrapura. Depois do tempo de equilíbrio, Ova foi titulada com 25 sucessivas injeções de 10  $\mu\text{L}$  de Lis a temperatura constante de 25°C. O intervalo entre as titulações foi fixado em 400 s para completo equilíbrio termodinâmico e mantida uma agitação constante a 250 rpm para completa mistura das soluções. O branco foi obtido pela titulação da Lis na célula da amostra contendo apenas tampão. A energia de diluição foi subtraída dos dados brutos e analisada por meio do programa TA NanoAnalyze<sup>®</sup>.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Efeito do pH e da razão de massa total na formação dos complexos coacervados**

A Figura 1 representa o efeito do pH na variação de turbidez das proteínas Ova e Lis em solução e das misturas de Ova/Lis em diferentes razões.

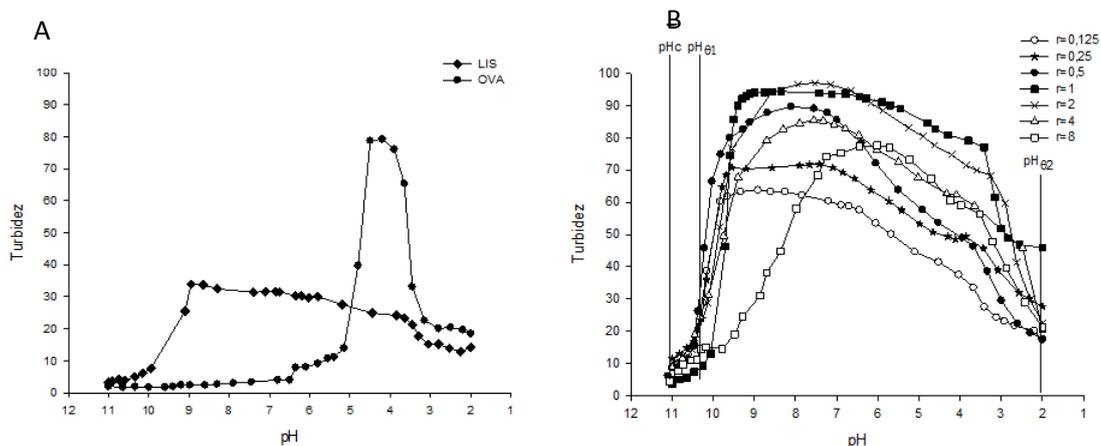
O efeito do pH (11,0-2,0) na variação de turbidez nas soluções de proteínas, Ova e Lis, sem adição de NaCl foi estudado como controle e está disposto na Figura 1A. Para a Ova foi observado um aumento considerável de turbidez entre o pH 4,0 e 5,0. A Lis apresentou comportamento semelhante, no entanto, apresentou apenas uma elevação discreta na turbidez a partir do pH 9,0. Isso ocorre porque em sistemas contendo uma única proteína é esperado que ocorra autoagregação e aumento de turbidez em pH próximo ao seu pI (QIN et al., 1998).

O efeito do pH na variação de turbidez também foi investigado em diferentes razões de Ova/Lis, sob as mesmas condições (Figura 1B). A partir do pH 11,0 foi observado um ligeiro aumento de turbidez seguido por um rápido aumento em uma ampla faixa de pH que vai de 10,0 até 5,0 exatamente entre os pI das duas proteínas. DIARRASSOUBA et al., (2015) também verificou que a interação com consequente aumento de turbidez na razão 2:1 entre  $\beta$ -lactoglobulina, e Lisozima, ocorreu entre pH 6,8 e 10 ou seja, entre seus pI.

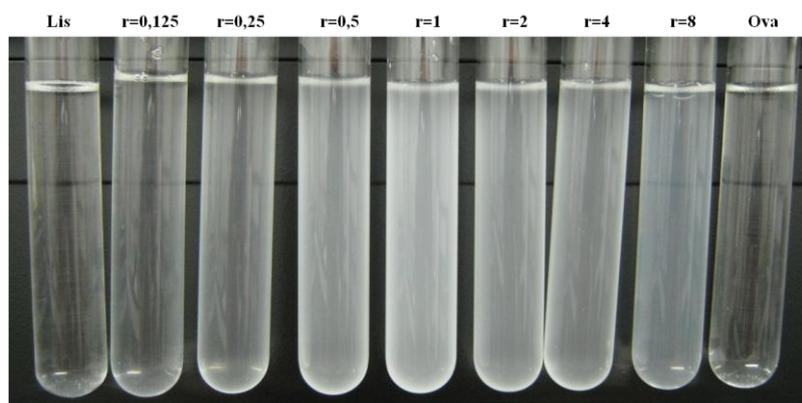
A atração eletrostática é a principal força envolvida na formação dos complexos coacervados Ova/Lis. Por esse motivo, o estudo do efeito do pH na interação de proteínas é crucial, pois além de influenciar na densidade de cargas de um biopolímero, determina também o intervalo de estabilidade e as melhores condições para a coacervação (LI et al., 2012; DIARRASSOUBA et al., 2015, SCHMITT et al., 1998). No caso de sistemas contendo duas proteínas, a interação com consequente formação de coacervados deve ocorrer entre seus pI, assim como observado por DIARRASSOUBA et al., (2015) e ANEMA e KRUIF (2014). No entanto, a ligeira elevação da turbidez observada antes mesmo do pI da Lis pode ser justificado pelo fato de que, durante o processo de coacervação, além das interações eletrostáticas, podem também estar envolvidas interações não eletrostáticas, principalmente ligações de hidrogênio que ocorrem em pH acima do pI da proteína e são favorecidas por uma baixa densidade de cargas (DE VRIES e COHEN STUART, 2006; JONES e MCCLEMENTS, 2010; SCHMITT e TURGEON, 2011; GIRARD et al., 2002; YOSHIDA et al. 1998).

Em função das diferentes razões estudadas foi observado na Figura 1B um deslocamento do ponto máximo de turbidez. Na razão  $r=1$  o ponto máximo de turbidez se deu próximo ao pH 7,5. No caso da razão  $r=8$  onde a Ova está em maior quantidade, o ponto máximo ocorreu mais próximo do seu pI (pH= 6,0), provavelmente devido a maior densidade de cargas negativas provenientes da Ova. Já na razão  $r=0,125$  o deslocamento do ponto máximo de turbidez foi próximo ao pI da Lis (pH= 9,0) devido a maior quantidade de Lis e, portanto, maior densidade de cargas positivas.

Ainda na Figura 1B, observa-se que as razões  $r=1$  e  $r=2$  foram as que apresentaram maior turbidez e conseqüentemente maior formação de complexos coacervados, indicando que entre essas razões houve completa interação entre os sítios de ligação das proteínas. Nesse caso, pode se concluir que a intensidade de turbidez também é influenciada pela razão por ser ela crítica para o balanço de cargas e, conseqüentemente, afeta a intensidade da formação de complexo (YE et al., 2006). Sugere-se portanto, que quando a concentração de uma das proteínas está em excesso, as moléculas que não estão associados ficam solúveis na solução, em maior quantidade do que as moléculas associadas (complexos) não sendo, portanto, capazes de contribuir para o aumento da turbidez (GULÃO et al., 2014). Isso pode ser confirmado ao ser observada a Figura 2, que ilustra a variação da intensidade de turbidez em diferentes razões a fixos valores de pH e força iônica. Verifica-se a um valor de pH fixo de 7,5, que a turbidez foi maior na razão  $r=1$  (Figura 2), tendo sido decrescente ao aumento de Ova ou de Lis nas misturas.



**Figura 1:** (A) Turbidez (100 - %T) em função do pH das proteínas, Ova e Lis isoladas sem adição de NaCl. (B) Turbidez (100 - %T) em função do pH do sistema contendo Ova/Lis, em diferentes razões sem adição de NaCl e as variações do  $pH_c$ ,  $pH_{01}$  e  $pH_{02}$



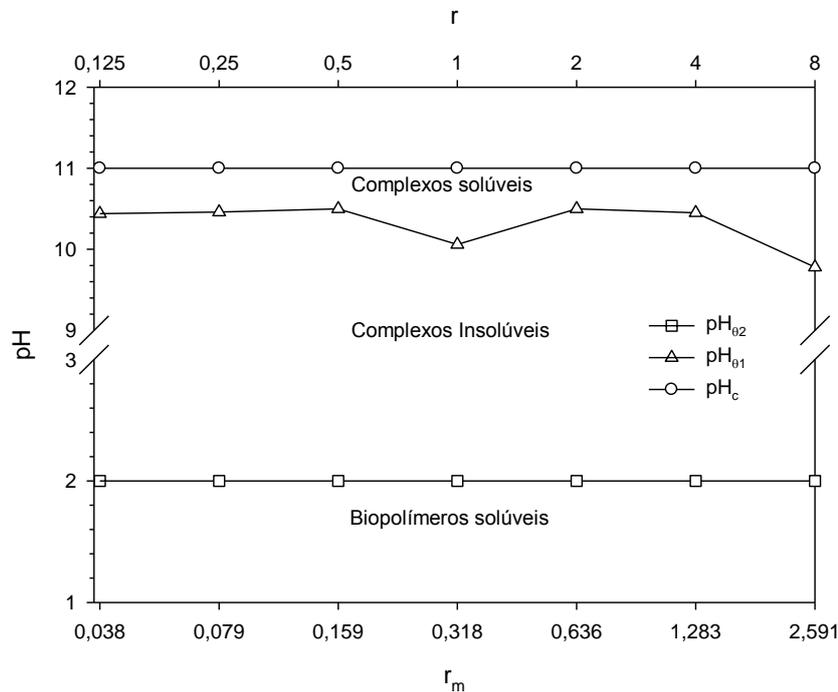
**Figura 2:** Variação da Turbidez nas diferentes razões ( $r$ ) em pH 7,5 e sem adição de NaCl.

Na curva obtida pela titulação turbidimétrica são identificados três processos sequenciais, demonstrados na Figura 1B. O  $pH_c$ , que indica o início da formação de complexos solúveis, observado como um aumento discreto na turbidez já a partir do pH 11,0. Neste estágio as interações começam a ocorrer porém de maneira mais fraca pela baixa densidade de cargas. O  $pH_{01}$ , verificado como um aumento rápido na turbidez, ocorreu em torno do pH 10,5 e se deve à formação de complexos insolúveis e consequente precipitação (complexos coacervados). O  $pH_{02}$  ocorreu logo após o ponto máximo de turbidez, e se deu próximo ao pH 2, correspondendo a dissociação dos complexos devido a repulsão eletrostática entre as proteínas, com consequente redução na turbidez (KRUIF e TUINIER, 2001; TURGEON et al., 2003).

Baseado nos valores de  $pH_c$ ,  $pH_{01}$  e  $pH_{02}$ , derivadas da Figura 1, foi construído um diagrama de fases dos sistemas contendo Ova/Lis em função da razão de massa total ( $r$ ), razão molar ( $r_m$ ), e pH (Figura 3). Na Figura 3 foram identificadas as 3 regiões mencionadas acima. Nota-se que uma extensa área de elevada turbidez foi formada entre os  $pH_{01}$  e  $pH_{02}$  correspondendo a formação dos complexos coacervados. Segundo LI et al. (2012), os valores de  $pH_{02}$  se mostram praticamente inalterados em função da variação da razão, porque a

dissociação dos complexos se deve somente a protonação da Ova (LI et al., 2012). Já o  $\text{pH}_{01}$ , apesar de ser dependente da razão, este se mostrou também bem semelhantes, em todas as razões estudadas e o  $\text{pH}_c$  não apresentou valores bem definidos.

Com relação a coacervação entre proteínas e polissacarídeos, SOUZA e GARCIA-ROJAS (2015), estudaram a interação entre Ova e pectina e verificaram que na razão de 1:1 e concentração de NaCl de 0,01 mol/L o ponto máximo de turbidez foi próximo ao pH 3,5 e os  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$  foi de 5,0 e 1,5 respectivamente. Coacervados entre Lis e ácido hialurônico, foram formados em pH 7,5 em condições de baixa força iônica (WATER et la., 2014).



**Figura 3:** Diagrama de fases das misturas contendo Ova/Lis (0,1%) em diferentes razões ( $r$ ) e a razão molar ( $r_m$ ) das misturas de Ova/Lis em função do pH.

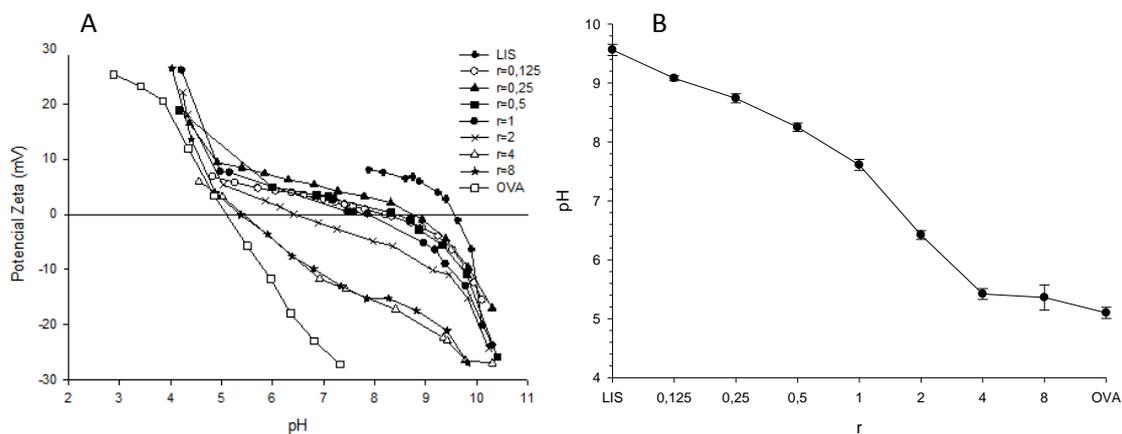
### 3.2. Potencial-Zeta

A influência da carga elétrica superficial de um biopolímero na formação e estabilidade dos complexos foi investigada e estão apresentadas na Figura 4. Para verificar a densidade de cargas das proteína isoladas (Ova e Lis) e dos complexos formados a diferentes razões ( $r$ ), o potencial- $\zeta$  (mV) em função do pH (2,0-11,0) foi determinado e os resultados estão apresentados na Figura 4A. O potencial- $\zeta$  da Ova isolada variou de 25 mV, próximo ao pH 3,0 até -30 mV próximo ao pH 7,5, com um carga elétrica zero, que indica seu pI, próximo ao pH 5,1, semelhante ao encontrado na literatura (SGARBIERI, 1996). O potencial- $\zeta$  da Lis teve uma variação na faixa de 10 mV à -20mV entre o pH 8 e 10,5 respectivamente, e uma carga elétrica zero em torno de pH 9,5 já tendo sido relatado na literatura por ANEMA e DE KRUIF (2013), valores de pI próximos a esse.

Embora próximo do pI, em pH 10,0, a Lis já apresente densidades de cargas negativas (Figura 4A) ela ainda pode apresentar alguma carga positiva (ANTON et al., 2009). Por esse motivo, o aumento de turbidez foi verificado antes mesmo do seu pI (Figura 1B). O mesmo acontece com a Ova, ou seja, mesmo antes do seu pI (em torno do pH 4) por ainda possui cargas negativas (Figura 4A) ainda se verifica elevada turbidez (Figura 1B).

Na Figura 4B pode ser observado que a formação dos complexos coacervados em todas as razões estudadas ocorreu entre os pontos isoelétricos das duas proteínas, isso significa que a interação ocorreu quando a Ova estava carregada negativamente e a Lis carregada positivamente, o que indica que interações do tipo eletrostática tenham conduzido a interação e que complexos coacervados tenham sido formados, já que em sua maior parte são estabilizados por interação eletrostática entre biopolímeros opostamente carregados. Além disso, os valores aproximados de pI coincidem com o ponto máximo de turbidez observada na Figura 1B, o que indica que a interação aconteceu de forma mais intensa quando houve neutralidade de cargas dos biopolímeros (LIU et al., 2015).

Observa-se também na Figura 4B que há uma diminuição do pI em torno da razão  $r=2$  seguida de valores de pI baixos e próximos a medida que a razão aumentou. Nesse caso, essa transição poderia identificar o ponto de saturação entre as cadeias de Ova e Lis, ou seja, quando a razão for maior que 2 ( $r>2$ ) a Ova estaria em excesso e a Lis saturada pela interação com Ova. Em contra partida, quando a razão for menor do que 2 ( $r<2$ ) a Lis estaria em excesso e a Ova em saturação.



**Figura 4:** Potencial  $\zeta$  (A) e pI (B) das proteínas isoladas (Ova e Lis) e das diferentes razões ( $r$ ) estudadas sem adição de NaCl.

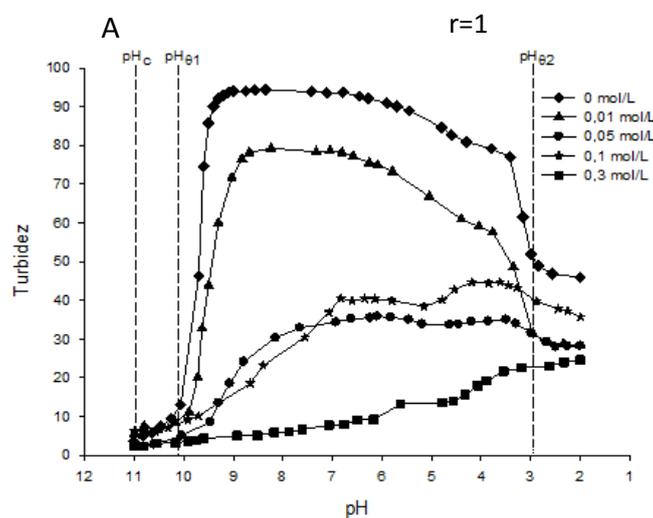
### 3.3. Efeito do NaCl na formação dos complexos coacervados

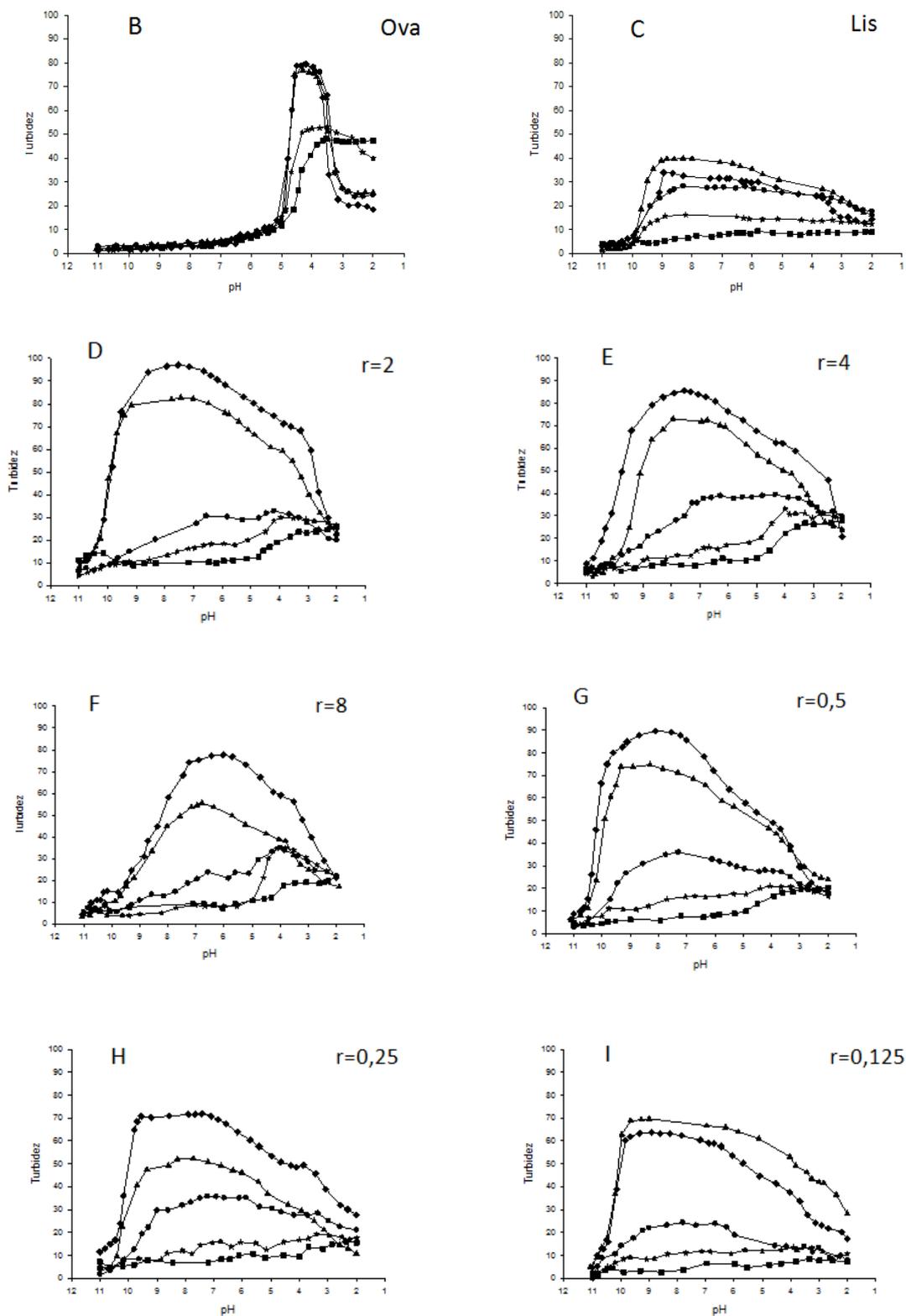
A influencia do NaCl na formação dos complexos coacervados de Ova/Lis foi estudada pela análise turbidimétrica em diferentes concentrações de NaCl para as diferentes razões estudadas, assim como mostra a Figura 5. Foi observado que a adição de NaCl influenciou de forma negativa a formação de complexos para quase todas as razões estudadas já em pequenas concentrações (0,01 mol/L), chegando a quase suprimir a interação em maiores concentrações (0,3 mol/L). Esse comportamento, também foi visualizado por ANEMA e KRUIF (2014) na complexação entre Lactoferrina e  $\beta$ -lactoglobulina, onde ao titularem 1 mol/L de NaCl em uma amostra com máxima turbidez, eles observaram que com o aumento da força iônica houve redução na turbidez. Estudos sobre a influencia de NaCl na formação de complexos entre proteínas e polissacarídeos também demonstraram sua influência negativa no processo de interação. SOUZA e GARCIA-ROJAS (2015) observaram que o aumento da concentração NaCl reduziu as interações eletrostáticas entre Ova e pectina e promoveu a autoagregação da proteína. Da mesma forma, NIU et al. (2014) verificou que a adição de NaCl de 1 mmol/L a 60 mmol/L reduziu a formação de complexos

entre Ova e goma arábica. Complexos entre lisozima e ácido hialurônico também foram dissociados em concentrações de NaCl acima de 100 mmol/L (WATER et al., 2014). A reduzida complexação se explica pois os íons  $\text{Na}^+$  em solução competem com sítios de ligação de carga positiva, se ligando aos sítios de carga negativa. Semelhantemente, os íons  $\text{Cl}^-$  competem com sítios de ligação de carga negativa e se ligam ao de carga positiva resultando na redução da interação entre as moléculas de proteína (SEYREK et al, 2003; KLASSEN et al 2011; LIU et al., 2015).

A adição de NaCl além de reduzir a turbidez também alterou os valores de  $\text{pH}_c$ ,  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$  e reduziu o intervalo de formação de complexos coacervados (Figura 5A). Supõe-se que o deslocamento do  $\text{pH}_{01}$  para valores de pH mais baixo tenha se dado devido a necessidade de uma maior protonação da Lis para formação dos complexos (0,01 - 0,05 mol/L). Do mesmo modo, o deslocamento do  $\text{pH}_{02}$  (0,01 mol/L), para um pH mais elevado se deva a necessidade de uma densidade de cargas negativas maior que ainda ocorresse a interação. Em maiores concentrações de NaCl (0,1 - 0,3 mol/L) o  $\text{pH}_{01}$ , que corresponde ao início da formação dos complexos coacervados, não foi claramente identificado sugerindo que a discreta elevação da curva em torno do pH 6,0 - 3,0 tenha se dado apenas pela autoagregação da Ova (Figura 5B).

Na Figura 5B observa-se que a autoagregação da Ova se mantém estável até a concentração de 0,05 mol/L de NaCl e a partir daí observa-se uma intensa redução nos valores de turbidez. Já a Lis apresentou maior agregação em concentração de NaCl de 0,01 mol/L do que sem adição de NaCl (Figura 5C). Diferentemente da demais razões estudadas, a razão  $r=0,125$  (Figura 5I) apresentou maior turbidez na concentração de 0,01 mol/L de NaCl, o que pode ser atribuída a influência do comportamento da Lis isolada (Figura 5C) e um deslocamento do ponto máximo de turbidez para próximo do pI da Lis, na concentração de 0,05 mol/L. Esses dados sugerem que por já estar em excesso na formação de complexos coacervados, a Lis também se autoagregou. A formação de autoagregados da Ova também pode ter influenciado pelo deslocamento do ponto máximo de turbidez da razão  $r=8$  (Figura 5F) para próximo do pI da Ova. Sugerindo que além da formação de complexos nessa razão, tenha ocorrido também autoagregação da Ova por estar em excesso no sistema. Além disso, a elevação de turbidez, verificado na concentração de NaCl de 0,1 mol/L próximo ao pI da Ova, tenha sido exclusivamente devido a autoagregação assim como SOUZA e GARCIA-ROJAS (2015), também observaram entre complexos coacervados formados entre Ova e Pectina.





**Figura 5:** Turbidez (100 - %T) em função do pH do sistema contendo as proteínas isoladas, Ova e Lis e das diferentes razões (r) de Ova/Lis em diferentes concentrações de NaCl  $\blacklozenge$  0 mol/L;  $\blacktriangledown$  0,01 mol/L;  $\bullet$  0,05 mol/L;  $\blackstar$  0,1 mol/L;  $\blacksquare$  0,3 mol/L.

### 3.4. Tamanho de partícula

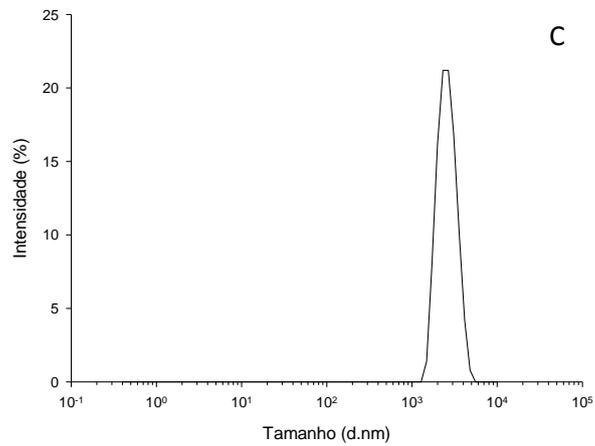
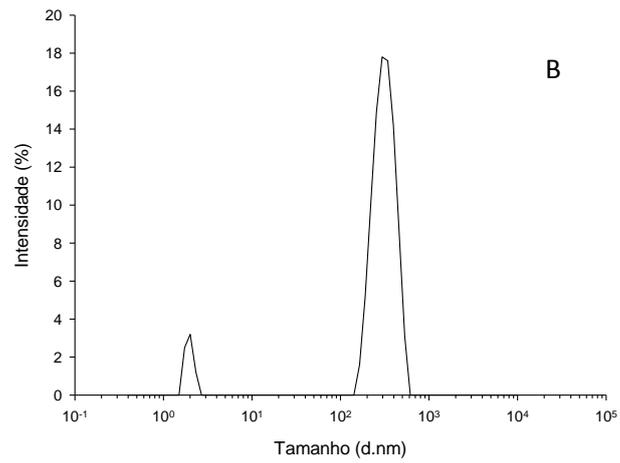
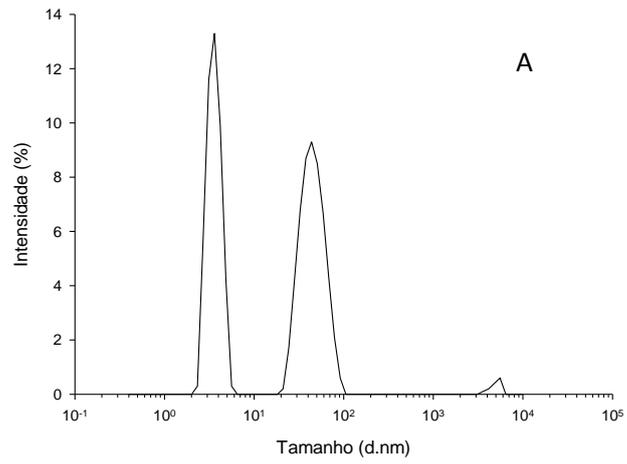
A distribuição de tamanho de partícula de Ova e Lis durante a formação de complexos coacervados foi monitorada por DLS para elucidar as interações entre biopolímeros como mostrado na Figura 6. Os perfis de intensidade em função do tamanho (d.nm) das soluções de Ova e Lis (0,1%, m / m), bem como a sua mistura  $r=1$  foram determinados em pH 7,5 sem adição de NaCl. É observado que a Ova (Figura 6A) apresentou três tamanhos diferentes, um de maior intensidade ( $55,7\% \pm 3,47$ ) com tamanho médio de  $45,0 \text{ d.nm} \pm 1,85$  um segundo ( $40,5\% \pm 4,43$ ) com tamanho médio de  $3,0 \text{ d.nm} \pm 0,54$  e um terceiro ( $3,8\% \pm 2,35$ ) com tamanho médio de  $3544 \text{ d.nm} \pm 94,7$ . O primeiro e o terceiro são referentes a autoagregação da proteína que ainda esta ocorrendo a esse pH (Figura 1A) ou ainda por impurezas presentes na solução, e o segundo tamanho médio observado ( $3,0 \text{ d.nm}$ ) se refere a Ova isolado, encontrado também por ERICKSON, (2009).

Na Figura 6B, referente a distribuição de tamanho da Lis, foram observados um tamanho médio de maior intensidade ( $92,8\% \pm 0,15$ ) na faixa de  $283,4 \text{ d.nm} \pm 39,1$  e um de menor intensidade ( $7,1\% \pm 0,15$ ) com tamanho médio de  $1,99 \text{ d.nm} \pm 0,06$ . Considerando que o primeiro tamanho observado seja em virtude da autoagregação, que já tem início nesse pH (Figura 1A) o tamanho médio do segundo está de acordo com o reportado na literatura (PARMAR e MUSCHOL, 2009; ANTONOV et al., 2015).

Quando analisado a solução contendo Ova/Lis em pH onde ocorreu maior formação de complexos coacervados (Figura 6C) não se observa os valores principais dos monômeros de proteínas mas sim, um tamanho médio de  $2265 \text{ d.nm} \pm 368$  e Pdi, índice de polidispersividade, baixo de  $0,153 \pm 0,09$  Um Pdi baixo também foi relatado por SCHMITT et al. (2005), em complexos formados entre  $\beta$ -lactoglobulina e goma arábica sugerindo que a saturação do polissacarídeo tenha ocorrido pela proteína na razão e pH estudados. Tendo como base a percentagem de polidispersividade (%Pd) calculada pela Equação 1, que considera polidispersa amostras com  $\% \text{ Pd} \geq 20\%$  e monodispersa amostras com  $\% \text{ Pd} \leq 20\%$ , apesar da amostra ter apresentado um único valor médio de tamanho, ela foi considerada polidispersa por apresentar %Pd de 39,1 (KHURSHID et al., 2014; ARZENŠEK et al., 2010).

$$\% \text{Pd} = (\text{PDI})^{1/2} \times 100 \quad (1)$$

Nota-se, que esses valor observado na solução de Ova/Lis é bem superior ao encontrado para as soluções contendo as proteínas isoladas. DIARRASSOUBA, (2015) ao estudar a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lisozima observou tamanhos de partículas semelhantes àqueles que encontrados em nosso estudo. Dessa forma, podemos sugerir que nas condições analisadas houve interação entre Ova e Lis e formação de estruturas relacionados a formação de complexos coacervados.



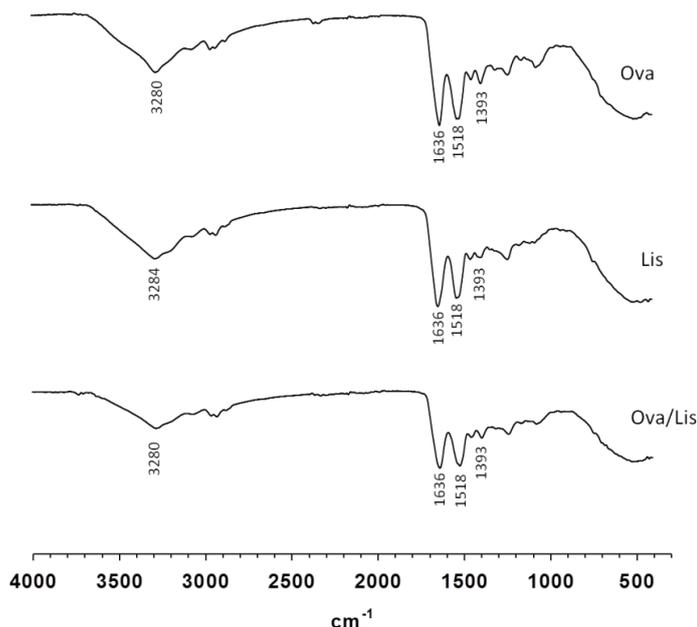
**Figura 6:** Tamanho de partícula (d.nm) em pH 7,5 da Ova (A), Lis (B) e do complexo coacervado formados por Ova / Lis na razão  $r=1$ .

### 3.5. Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados

#### 3.5.1. FTIR

As morfologias das proteínas isoladas e da mistura contendo 0,1% (massa total) e  $r=1$  são apresentados na Figura 7. As região mais sensível de espectros de FTIR associado com a estrutura de proteínas, são as amida I entre as bandas  $1625-1750\text{ cm}^{-1}$  formado pelo estiramento do grupo C=O (carboxil livre), amida II entre as bandas  $1475-1575\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento dos grupos N-H e a amida III entre as bandas  $1225-1425\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento dos grupos C-N e N-H (DONG et al., 1990; STUART, 2006; HUAG et al, 2006; SCHMIDT et al., 2005). Além das amidas, também podem ser identificados entre as bandas  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $3170\text{ cm}^{-1}$  o estiramento dos grupos N-H e O-H dos aminoácidos livres (BARTH e ZSCHERP, 2002).

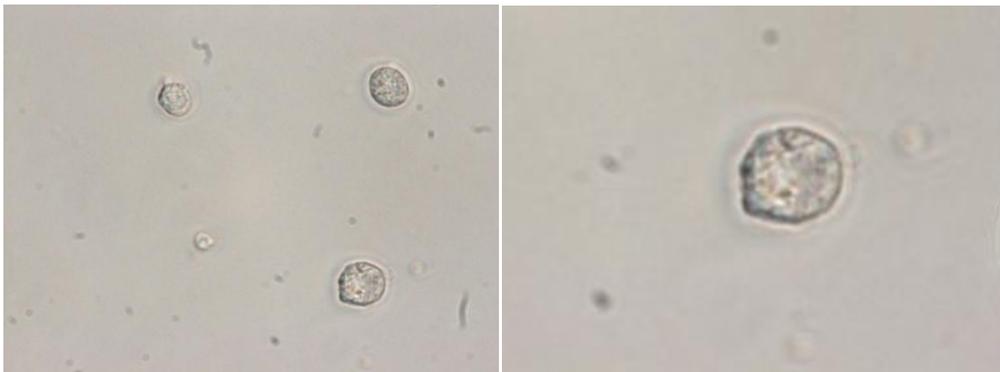
Os principais espectros de FTIR observados para Ova (Figura 7) e Lis (Figura 7) estão entre as bandas  $1390\text{ cm}^{-1}$  a  $1640\text{ cm}^{-1}$  representando as amidas I, II e III respectivamente e o estiramento dos grupos N-H e O-H próximo a faixa de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . No espectro de FTIR para os complexos de Ova/Lis (Figura 7) foram observados basicamente as mesmas estruturas, já que se tratam de duas proteínas, porém com menores intensidades. A redução nas bandas ( $1390\text{ cm}^{-1}$  a  $1640\text{ cm}^{-1}$ ) deve ser uma indicação de que durante o processo de complexação tenha ocorrido interações do tipo eletrostáticas entre os grupamentos  $-\text{COO}^-$  de uma proteína e os grupamentos  $-\text{NH}_3^+$  da outra. Além disso, a redução da intensidade na banda de  $3280\text{ cm}^{-1}$  que representa os grupos N-H e O-H de aminoácidos livres indica que a formação de complexos não só foi influenciada por interações eletrostática, em maior numero, mas também por ligações de hidrogênio (HUANG et al., 2012; BARTH e ZSCHERP, 2002).



**Figura 7:** Espectros do FTIR da Ova, Lis e Ova/Lis razão  $r=1$ . Os complexos foram preparados a pH 7,5 sem adição de NaCl.

### 3.5.2. Microscopia óptica

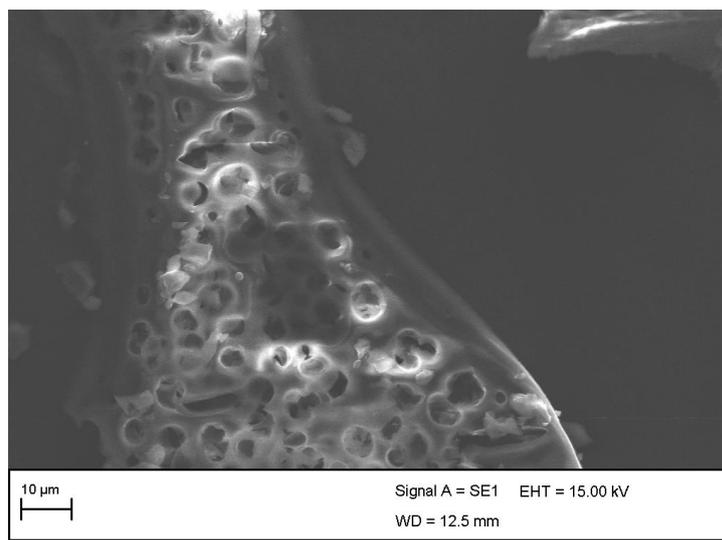
Para melhor entender a estrutura do complexo coacervado formado no estado natural, imagens dos complexos em pH 7,5 e  $r=1$  em solução podem ser vistas na Figura 8. A microscopia óptica (100x) revelou a formação de estruturas esféricas com conteúdo interno heterogêneo, assim como também relatado por DESFOUGÈRES et al., (2010). TURGEON e LANEUVILLE, (2009) tem descrito os coacervados como sendo vesículas que ao serem estabilizados podem ser utilizados no encapsulamento de diferentes ingredientes. Apesar da identificação dos biopolímeros ainda não esteja bem esclarecido, principalmente em complexos coacervados formados por proteínas, sugere-se que haja uma uniforme distribuição de proteínas no interior das esferas (DIARRASSOUBA et al., 2015)



**Figura 8:** Microscopia óptica dos complexos coacervados Ova/Lis em pH 7,5, razão  $r=1$

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

As imagens dos complexos coacervados formados pela Ova / Lis  $r=1$  e pH 7,5 revelam forma esférica semelhante a vesículas rompidas (Figura 9). Essa aparência se deve provavelmente ao fato das amostras terem sido submetidas a um processo de liofilização antes de serem analisadas pelo MEV. Na figura são observadas diversas vesícula de diferentes tamanhos. Algumas vesículas observados no MEV são relativamente maiores do que os valores médios fornecidos pelo DLS de 2,26  $\mu\text{m}$ , provavelmente devido a sobreposição das vesículas. DIARRASSOUBA et al., (2015) ao estudar a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lis verificou no MEV estruturas regulares e esféricas. Nesse caso, as amostras foram secas a temperatura ambiente antes de serem analisadas.



**Figura 9:** MEV dos complexos coacervados de Ova/Lis em pH 7,5, razão  $r=1$ .

### 3.6. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

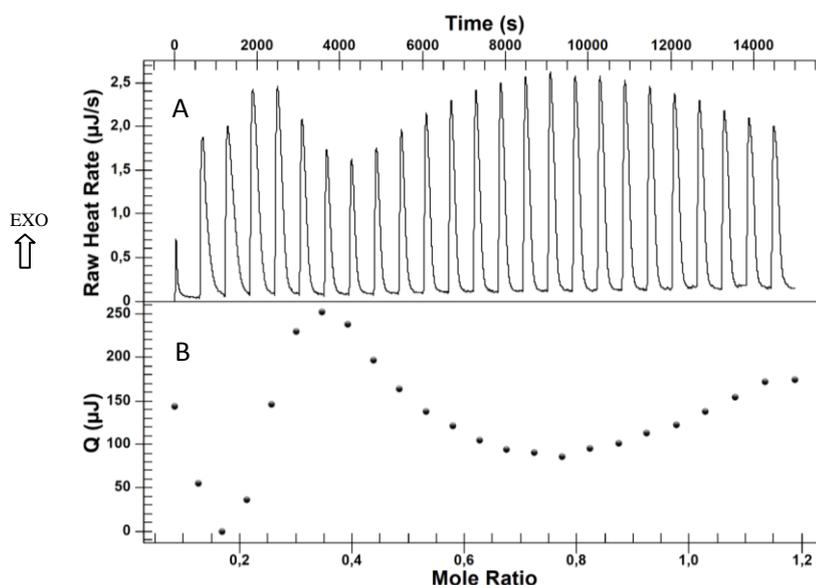
O ITC foi realizado a fim de obter uma melhor compreensão da natureza das interações entre Lis e Ova. O termograma da fluxo de calor em função do tempo e a representação gráfica da integral da área sob cada pico em função da razão molar estão representados na Figura 10. Para obtermos os valores de entalpia referentes somente ao processo de interação, determinamos primeiramente o calor de diluição da Lis em solução tampão. O valor  $C$  é adimensional, e calculado para verificar se a concentração utilizada na célula foi adequada. Ele é dado pelo produto da constante de ligação  $K_B$  ( $M^{-1}$ ) e a concentração molar de macromoléculas  $[M_T]$  a ser titulada, como na Equação 2 a seguir (PEROZZO et al., 2004):

$$C = K_B[M_T] \quad (2)$$

O valor de  $C$  encontrado foi de 88, o qual é considerado bom, já que estudos tem mostrado que as condições escolhidas devem levar a um valor de  $C$  no intervalo de 10-100 para que o  $K_B$  tenha uma determinação precisa (PEROZZO et al., 2004).

O fluxo de calor em função do tempo resultante das 25 titulação de Lis em Ova a temperatura de  $25^\circ$  e pH 7,5 estão apresentados na Figura 10A. O perfil de titulação da Lis na célula da amostra contendo Ova foi exotérmico para todas as injeções, o que pode ser atribuída à neutralização eletrostática das cargas opostas das duas proteínas (SCHMITT et al., 2005). A complexação entre  $\beta$ -lactoglobulina e pectina também foi considera exotérmica (GIRARD et al., 2003). Picos exotérmicos também foram observados em polieletrólitos fracos tendo sido argumentado que a complexação foi impulsionada principalmente pela contribuição entálpica da interação electrostática (SCHMITT et al., 2009).

O isoterma de ligação dos complexos Lis / Ova, mostrado na Figura 10B, foi obtida pela integral dos picos da titulação subtraídos dos valores de diluição da Lis na solução tampão. No pH estudado (7,5) os dados do ITC mostraram inflexões na curva, indicando que existiu uma interação exotérmica com redução na energia conforme o aumento da Lis até  $r_m < 0,2$ , seguido de um aumento da energia de  $0,2 < r_m < 0,4$  e novamente diminuiu até próximo a  $r_m 0,8$ .



**Figura 10:** (A) Termograma da fluxo de calor ( $\mu\text{J/s}$ ) em função do tempo (s) obtido durante a titulação de 1,44 mmol/L de Lisozima em 0,37 mmol/L de Ovalbumina em 10 mmol/L de tampão fosfato (pH 7,5) a 25°C. (B) Representação grafica da integral da área sob cada pico ( $\mu\text{J}$ ) em função da razão molar ( $r_m$ ) de Lis / Ova.

A constante de ligação,  $K$ , o numero de sitios de ligação,  $n$ , a variação de entalpia de ligação,  $\Delta H$ , a variação de entropia de ligação,  $\Delta S$ , e a variação da energia livre de Gibbs,  $\Delta G$ , foram determinadas pelo ITC, utilizando o software TA NanoAnalyze<sup>®</sup>, e estão apresentados na Tabela 1. Apesar do modelo de "múltiplos sitios de ligação" ter sido o que melhor se ajustou aos nossos dados a noção de dois sitios de ligação diferentes e independentes não é realista quando considerando a interação entre macromoléculas por sua natureza não especifica (ABERKANE et al., 2010). Em vez disso, consideramos que o modelo indicava a presença de duas etapas distintas durante a interação e substituímos o termo 2 sitios de ligação por 2 etapas de ligação. Estando de acordo com a teoria de TAINAKA, (1980) que diz que o processo de complexação ocorre em duas etapas indo de um estado molecular para um estado agregado. Quando utilizamos esta abordagem para os nossos dados na Tabela 1, nota-se que o numero de moléculas de Lis que interagiu com Ova foi maior na segunda etapa de interação ( $n_2$ ) do que na primeira ( $n_1$ ) apesar da afinidade de ligação,  $K$ , ter sido maior na primeira etapa de ligação ( $K_1$ ) do que na segunda ( $K_2$ ). Esse comportamento teria sido resultado de uma baixa quantidade de Lis na célula capaz de interagir com a Ova na primeira etapa contra uma elevada proporção de complexados formados Ova e Lis (GIRARD, 2003). Considerando os valores de  $n$ , 0,3 molécula de Lis interagiu com a Ova na primeira etapa ( $n_1$ ) e 0,9 moléculas de Lis para cada molécula de Ova na segunda etapa ( $n_2$ ), num total ( $n_1+n_2$ )  $\sim 1,2$  de moléculas de Lis para cada molécula de Ova ( $n_1+n_2$ ). O que significa dizer que apenas  $\sim 30\%$  da interação ocorreu na primeira etapa e  $\sim 70\%$  da interação ocorreu na segunda etapa.

**Tabela 1:** Parametros termodinâmicos da primeira e segunda fase de interação entre Lis e Ova obtidos a partir da titulação de Lis (1,44 mmol/L) em Ova (0,36mmol/L) em pH 7,5 a 25°C.

Etapas	T(K)	K <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> )	n <sub>1</sub>	ΔH <sub>1</sub> (kJ/mol)	TΔS <sub>1</sub> (kJ/mol)	ΔG <sub>1</sub> (kJ/mol)
<b>Etapa 1</b>	298,15	44,7 x 10 <sup>6</sup>	0,34	40,85	67,38	-26,53
<b>Etapa 2</b>	298,15	28,1 x 10 <sup>5</sup>	0,90	-113,1	-93,41	-19,69

Com relação a variação de entalpia e entropia, a primeira etapa foi positiva com a  $\Delta H$  desfavorável e  $\Delta S$  favorável e a segunda foi negativa com a  $\Delta H$  favorável ao passo que a  $\Delta S$  foi desfavorável. A  $\Delta H$  está relacionada com a energia envolvida nas interações moleculares e portanto reflecte o contribuição das ligação de hidrogénio, interações electrostáticas, e van der Waals e  $\Delta S$  reflecte uma alteração no grau de ordem do sistema e está relacionado com interações hidrofóbicas (PIRES et al, 2009;. BOU-ABDALLAH e TERPSTRA, 2012a) Dessa forma, a complexação entre Ova e Lis foi conduzido por uma entalpia negativa devido à interação electrostática entre as duas proteínas opostamente carregados e a entropia desfavorável teve origem principalmente pela perda conformacional do biopolímero após a associação (DICKINSON, 2008). Esses resultados também foram relatados por OU e MUTHUKUMAR (2006) quando estudaram a interação entre polieletrólitos opostamente carregados. Alguns trabalhos tem sugerido ainda que ligações de hidrogênio e Van Der Waals poderiam estar associadas também a valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  negativos, (BARRATT et al., 2005; SAKKA et al., 2003). Sendo assim, sugere-se que a complexação tenha ocorrido efetivamente durante a segunda etapa de interação e foi influenciada mais intensamente por interações moleculares em especial interações eletrostáticas. De acordo com a Equação 3 podemos, baseados nos valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$ , calcular a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) que indica o grau de espontaneidade da interação (PRIVALOV, 2015):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Nesse caso a  $\Delta G$  foi negativa para as duas fases indicando que a interação foi espontânea favorecendo assim as interações moleculares entre Ova / Lis (O'BRIEN et al., 2001; PEROZZO et al., 2004).

#### 4. CONCLUSÃO

Complexos insolúveis foram formados entre os pI das proteínas caracterizando que interação se deu por cargas opostas. Esses resultados, juntamente com o FTIR demonstraram que interações eletrostática tiveram predomínio na formação dos complexos, porém ligações de hidrogênio também participaram da interação. A adição de NaCl não favoreceu a interação, reduzindo visivelmente a interação já na concentração de 0,05 mol/L. O ITC revelou que a interação ocorreu em duas etapas sendo a primeira entropicamente e segunda entalpicamente dirigida. Nas condições estudadas foram observadas microesferas de tamanho médio de 2,2  $\mu\text{m}$  que permitiriam seu uso como agente microencapsulante. Esse estudo contribuiu para o entendimento da natureza da interação visando futuras aplicações dos complexos coacervados de Ova/Lis na microencapsulação de bioativos alimentares.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABERKANE, L.; JASNIEWSKI, J.; GAIANI, C.; SCHER, J.; SANCHEZ, C. Thermodynamic Characterization of Acacia Gum- $\beta$ -Lactoglobulin Complex Coacervation. **Langmuir**, v. 26, n. 15, p. 12523–12533, 2010.
- ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. Coacervates of lysozyme and  $\beta$ -casein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 398, p. 255–261, 2013.
- ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. K. DE. Complex coacervates of lactotransferrin and  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.430, p.214–220, 2014.
- ANTONOV, Y. A.; ZHURAVLEVA, I. L.; CARDINAELS, R.; MOLDENAERS, P.. Structural studies on the interaction of lysozyme with dextran sulfate. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p.71-80, 2015
- ANTON, M., NAU, F., & LECHEVALIER, V. Egg proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), **Handbook of hydrocolloids** v. 2, p. 359–382, 2009. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- ARZENŠEK, D; PODGORNIK, R; KUZMAN, D. **Dynamic light scattering and application to proteins in solutions**. University Ljubljana, Faculty of mathematics and physics, p.1-19, 2010
- BALL, V.; WINTERHALTER, M.; SCHWINTE, P.; LAVALLE, P.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P. Complexation Mechanism of Bovine Serum Albumin and Poly(allylamine hydrochloride). **J. Phys. Chem. B**, v. 106, n. 9, p. 2357–2364, 2002.
- BARRATT, E.; BINGHAM, R. J.; WARNER, D. J.; LAUGHTON, C. A.; PHILLIPS, S. E. V.; HOMANS, S. W. Van der Waals interactions dominate ligand-protein association in a protein binding site occluded from solvent water. **J. Am. Chem. Soc.**, v.127, p.11827-11834, 2005
- BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. **Q. Rev. Biophys.**, v. 35, n. 4, p. 369–430, 2002.
- BOU-ABDALLAH, F.; TERPSTRA, T. R. The thermodynamic and binding properties of the transferrins as studied by isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1820, n.3, p.318–325, 2012.
- DESFOUGÈRES, Y.; CROGUENNEC, T.; LECHEVALIER, V.; BOUHALLAB, S.; NAU, F. Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 12, p. 4138–4144, 2010.
- DE VRIES, R.; COHEN STUART, M. Theory and simulations of macroion complexation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 5, p. 295-301, 2006.

DONG, A., HUANG, P., CAUGHEY, W. S. Protein secondary structures in water from second derivative amide I infrared spectra. **Biochemistry**, v.29, p.3303-3308, 1990.

DIARRASSOUBA, F. G. R. et al. Self-assembly of  $\beta$ -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 173, p. 203–209, 2015.

DICKINSON, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. **Soft Matter**, v.4, p.932–942, 2008.

ERICKSON, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. **Biol Proced Online**, v. 11, p. 32–51, 2009.

FAO-DATABASE. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2015. Acesso em: 01 Fevereiro

GULÃO, E. D. S.; DE SOUZA, C. J. F.; DA SILVA, F. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; GARCIA-ROJA, E. E. Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum arabic: Formation and characterization. **Food Research International**, n. 0, 2014.

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, p. 585 - 591, 2002.

HOWELL, N. K., YEBOAH, N. A., & LEWIS, D. F. V. Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with a-lactalbumin and b-lactoglobulin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 813–824, 1995.

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

HUANG, C.Y.; BALAKRISHNAN, G.; SPIRO, T. G. Protein secondary structure from deep-UV resonance Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 1-3, p. 277-282, 2006.

IUPAC, **Compendium of Chemical Terminology**. second ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 374 - 397, 2010.

KHURSHID, S.; SARIDAKIS, E.; GOVADA, L.; CHAYEN, N. E. Porous nucleating agents for protein crystallization. **Nat Protoc**, v. 9, n. 7, p. 1621–1633, 2014.

KLASSEN, D. R.; ELMER, C. M.; NICKERSON, M. T. Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1094-1101, 2011.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005.

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, 2012.

LIU, J.; SHIM, Y. Y.; WANG, Y.; REANEY, M. J. T. Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 95–103, 2015.

NIU, F.; SU, Y.; LIU, Y.; WANG, G.; ZHANG, Y.; YANG, Y. Ovalbumin-gum arabic interactions: effect of pH, temperature, salt, biopolymers ratio and total concentration. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 113, p. 477–482, 2014.

O'BRIEN, R., LADBURY, J.E., CHOWDHRY, B.Z. **Isothermal titration calorimetry of biomolecules**. In: HARDING, S.E., CHOWDHRY, B.Z. Protein Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry. Oxford University Press, New York, 2001, p. 263–286.

OU, Z., E MUTHUKUMAR, M. Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, v.124, p.154902–154911, 2006.

PARMAR, A. S.; MUSCHOL, M. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic vs. kosmotropic ions. **Biophysical Journal**, v. 97, p. 590-598, 2009.

PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. **JOURNAL OF RECEPTORS AND SIGNAL TRANSDUCTION**, v. 24, p. 1-52, 2004.

PIRES, A. C. S. et al. Microcalorimetry a food science and engineering approach. In: COIMBRA, J.; TEIXEIRA, J.A. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 201-218.

PRIVALOV, P. L. Microcalorimetry of macromolecules: The physical basis of biological structures. **Journal of Solution Chemistry**, v.44, n.5, p.1141–1161, 2015.

QIN, B. Y., BEWLEY, M. C., CREAMER, L. K., BAKER, H. M., BAKER, E. N., & JAMESON, G. B. Structural basis of the Tanford transition of bovine b-lactoglobulin. **Biochemistry**, v.37, p.14014–14023, 1998.

SAKKA, K.; NAKANISHI, M.; SOGABE, M.; ARAI, T.; OHARA, H.; TANAKA, A.; KIMURA, T.; OHMIYA, K. Isothermal titration calorimetric studies on the binding of a family 6 carbohydrate-binding module of *Clostridium thermocellum* XynA with xlylooligosaccharides. **Biosci., Biotechnol., Biochem**, v.67, p.406-409, 2003

SCHMIDT, V. ; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v.87, p. 25–31, 2005

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

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHMITT, C.; ABERKANE, L.; SANCHEZ, C. In Handbook of Hydrocolloids; Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds.; Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, U.K., p. 420-476, 2009.

SCHMITT, C.; PALMA DA SILVA, T.; RAMI-SHOJAEI, C. B. S.; FROSSARD, P.; KOLODZIEJCZYK, E.; LESER, M. E. Effect of time on the interfacial and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. **Langmuir**, v.21, p.7786-7795, 2005.

SEUNG JUN CHOI, H. J. K. Molecular characteristics of ovalbumin–dextran conjugates formed through the Maillard reaction. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 93–99, 2005.

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.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradacoes-modificacoes**. Livraria Varela, 1996.

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

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E. Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes. **Food Hydrocolloids** , v. 47, n. 5, p. 124-129, 5. 2015

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**. Food Products Press, 1995.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy of Biological Applications: An Overview. In: (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

TAINAKA, K.I. Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers*, v.19, p.1289-1298, 1980.

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

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

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

TURGEON, S. L.; LANEUVILLE, S.I. CHAPTER 11 - Protein + Polysaccharide Coacervates And Complexes: From Scientific Background To Their Application As Functional Ingredients In Food Products. In: STEFAN, K.;IAN, T. N.;JOHAN B. UBBINKA2 - STEFAN KASAPIS, I. T. N. e JOHAN, B. U. (Ed.). **Modern Biopolymer Science**. San Diego: Academic Press, 2009. p.225-260.

VINAYAHAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3367–3374, 2010.

WATER, J. J.; SCHACK, M. M. ; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; MALTESEN, M. J.; VAN DE WEERT, M.; JORGENSEN, L. Complex coacervates of hyaluronic acid and lysozyme: effect on protein structure and physical stability. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 88, n. 2, p. 325–331, 2014.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complex Formation of Whey Proteins: Exocellular Polysaccharide EPS B40. **Langmuir**, v. 19, p. 9404-9410, 2003.

YE, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, p. 121-133, 2006.

YOSHIDA, K.; SOKHAKIAN, S; DUBIN, P.L. Binding of Polycarboxylic Acids to Cationic Mixed Micelles: Effect of Polymer Counterion Binding and Polyion Charge Distribution. *Jornal of Colloid and Interface Science*, v. 205, p. 257-264, 1998.

ZHANG, L. Y.; ZHANG, X. 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, p. 323-332, 2013.

## CAPÍTULO II

### **ESTUDO DA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS COACERVADOS OBTIDOS A PARTIR DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) E LISOZIMA.**

## RESUMO

A formação de complexos entre biopolímeros tem sido foco de diversos estudos por sua aplicabilidade como agente encapsulante e ingredientes alimentares. A formação de complexos coacervados obtidos a partir de duas proteínas, Albumina Sérica Bovina (BSA), e Lisozima foi investigada por variação de pH através da análise turbidimétrica e potencial - zeta em diferentes razões e concentração de NaCl a fim de verificar o mecanismo de interação e identificar as melhores condições de coacervação. Os complexos foram formados na faixa de pH entre 8,0 e 11,0, sendo a razão  $r=0,5$  em pH 9 o que apresentou maior complexação. A adição de NaCl diminuiu a interação em concentrações de 0,01 mol/L. Os dados do potencial - zeta contribuíram para identificar que os complexos coacervados foram formados próximo a neutralidade de cargas e entre os pI das proteínas. Os espectros de infravermelho sugeriram que ligações de hidrogênio também participaram do processo de coacervação. A calorimetria diferencial de varredura sugeriu que a interação deu origem a um novo biopolímero devido a formação de único ponto de desnaturação a 67°C. Através do tamanho de partícula foi verificado a formação de estruturas com tamanho médio  $\sim 1,7 \mu\text{m}$  bem superior quando comparadas as proteínas isoladas e as imagens de microscopia revelaram que os complexos apresentaram forma esférica. Os complexos de BSA / Lisozima podem ser um potencial agente encapsulante de bioativos, além de poderem ser utilizados como ingrediente alimentar.

**Palavras chave:** Microencapsulante, espectros no infravermelho, Calorimetria diferencia de varredura.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os ingredientes alimentares as proteínas, por suas propriedades funcionais e tecnológicas, são um dos mais indispensáveis (HOWELL et al., 1995). O ovo, em especial a clara é um dos alimentos mais consumidos e rico em proteínas de alto valor nutricional e funcional. No entanto, seu consumo tem se restringido basicamente a forma *in natura* (STADELMAN e COTTERILL, 1995; KOVACS-NOLAN et al., 2005; FAO-DATABASE, 2015). O soro do leite, obtido principalmente a partir da fabricação de queijos, são outra fonte rica em proteínas de alto valor nutricional, porém tem sido descartado principalmente em indústrias de laticínios de pequeno porte (PELEBRINE e CARRASQUEIRA, 2008).

A Albumina Sérica Bovina é um dos constituintes proteico do soro do leite, formada por cerca de 583 resíduos de aminoácidos, massa molar de 66 kDa e ponto isoelétrico (pI) em torno de 5,0. Ela tem sido uma das mais estudadas proteínas deste grupo, particularmente devido a sua semelhança estrutural com albumina de soro humano (HSA) (ZHAO et al., 2009). A lisozima é uma glicoproteína globular com ação enzimática de 14 kDa, pI de 10,7, presente em maior concentração na clara do ovo (3,4%) e com inúmeras propriedades funcionais principalmente antimicrobianas (SGARBIERI, 1996).

A complexação entre biopolímeros tanto pode agregar valor nutricional a um produto como exercer função tecnológica quando utilizada, como agente de microencapsulação (DIARRASSOUBA et al., 2015).

Coacervação é definido como sendo uma separação coloidal de sistemas em duas fases líquidas (IUPAC, 1997) e a coacervação complexa, conhecida por ser uma separação de fases

associativa, é motivada pela atração de biopolímeros carregados opostamente (TOLSTOGUZOV, 1991; TURGEON et al., 2007; SOUZA et al, 2013; ZHANG et al., 2013). Os complexos coacervados são formados principalmente por interação do tipo eletrostática e por esse motivo, sua formação tem sido influenciada por variações no pH e na força iônica, já que são capazes de alterar a densidade de cargas superficial das moléculas (LI et al., 2012). Ao se tratando do pH, 4 pontos podem ser identificados durante a formação dos complexos: O  $pH_c$  que representa a formação de complexos solúveis entre os biopolímeros, dada pelo ligeiro aumento na turbidez durante a titulação; o  $pH_{01}$ , observada pelo rápido aumento na turbidez e significa a formação dos complexos insolúveis (coacervados);  $pH_{max}$ , ponto máximo de turbidez e representa o ponto de equivalência elétrica;  $pH_{02}$ , ocorre logo após ser atingido o ponto máximo e é observado pela redução da turbidez indicando o fim da complexação (KRUIF e TUINIER, 2001; TURGEON et al., 2003; LIU et al, 2015).

Inúmeros estudos tem relatado a formação e sua potencial aplicação tecnológica de complexos coacervados entre polissacarídeo e proteínas (SOUZA e GARCIA-ROJAS, 2015; WATER et al., 2014). Mais recentemente, estudos tem se proposto a compreender os complexos coacervados formados a partir de duas proteínas (HOWELL et al., 1995; ANEMA e KRUIF, 2014; ANEMA e KRUIF, 2013). Já tendo se mostrado como um versátil agente para a proteção e transporte de bioativos alimentares como relatou DIARRASSOUBA et al. (2015).

A proposta deste presente trabalho é estudar a influência do pH, da concentração de NaCl, e da razão de massa total das proteínas no processo de formação dos complexos coacervados obtidos a partir da interação entre duas proteínas globulares provenientes do soro do leite, Albumina Sérica Bovina e da clara do ovo, a Lisozima além dos aspectos morfológicos e termodinâmicos.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Lisozima (Lis, pureza  $\geq 90\%$ ) e Albumina sérica bovina (BSA, Pureza  $\geq 96\%$ ) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Luis, EUA). Cloreto de sódio (NaCl, pureza  $> 99\%$ ), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquirido da VETEC<sup>®</sup> Ltda, (Rio de Janeiro, Brasil). Foi utilizado para o experimento água ultrapura com condutividade de  $0,05 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 0,01$  (Gehaka, Master-P&D, Brasil).

### **2.2. Formação dos complexos**

#### **2.2.1. Preparo das amostras**

As concentrações de Lisozima e BSA no sistema foram fixada em 0,1% m/m. As soluções de Ova e Lis foram utilizadas como controle e foram estudadas sete razões (r) de Ova/Lis: 8 (8:1); 4 (4:1); 2 (2:1); 1 (1:1); 0,5 (1:2); 0,25 (1:4); 0,125 (1:8). A fim de avaliar a influência do NaCl na formação dos complexos cinco diferentes concentrações de NaCl (0 mol/L; 0,01 mol/L; 0,05 mol/L; 0,1 mol/L e 0,3 mol/L) foram estudadas para a razão de BSA/Lis que apresentou maior turbidez. Para o preparo das soluções as proteínas foram pesadas utilizando uma balança analítica (Shimadzu, AY 220, Filipinas) e agitadas com

auxílio de um agitador magnético (Novatecnica, modelo NT101, Brasil) por 30 minutos. O pH das soluções foram previamente ajustados com auxílio de um pHmetro de bancada (mPA-210, Tecnoyon, Brasil) para 2,0 para posterior titulação turbidimétrica (Adaptada de GULÃO et al., 2014).

### 2.2.2. Titulação Turbidimétrica

A transmitância das amostras foi mensurada a um comprimento de onda de 400 nm em uma cubeta de quartzo de 1 cm usando um espectrofotômetro (Biochrom mod. Libra S12, Inglaterra). O equipamento foi calibrado para 100% de transmitância (T) com água ultrapura e a turbidez definida como  $\tau$  (cm)<sup>-1</sup> dada pela Equação 1, onde I é a intensidade de luz incidente e I<sub>0</sub> a intensidade de luz que atravessou a amostra (GULÃO et al., 2016). A solução contendo a definida razão de BSA/Lis e sua respectiva concentração de NaCl teve seu pH ajustado (2,0-12,0) com HCl e NaOH, com o auxílio de um pHmetro de bancada e um agitador magnético. O pH das soluções foi monitorado e uma alíquota de 1 mL foi retirada para aferição do valor de transmitância. Todas as titulações foram aferidas em temperatura ambiente (~25 °C) com quatro repetição, sendo o intervalo entre as aferições de aproximadamente 1 minuto.

$$\tau = -\ln (I/I_0) \quad (1)$$

### 2.3. Potencial-Zeta

O potencial-zeta das proteínas isoladas e das razões estudadas foi determinado pelo Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS, Reino Unido). As amostras (10 mL) a 0,1% (m/m) foram colocadas no titulador (Malvern Instruments, MPT-2, Reino Unido). O pH das soluções foi ajustado com o auxílio de 0,5 mol/L de HCl, 0,25 mol/L de NaOH e 0,025 mol/L de NaOH e as análises foram conduzidas em função do pH (2,0-12,0), no intervalo de 0,25 ± 0,1. O Potencial-  $\zeta$  foi calculado com base no modelo matemático de Smoluschwsky e cada amostra lida em triplicata a 25 °C.

### 2.4. Tamanho de partícula

O diâmetro hidrodinâmico (d.nm) dos complexos obtidos de BSA/Lis e das proteínas, BSA e Lis, em solução foram determinadas a pH fixo pela técnica de DLS (Dynamic Light Scattering) utilizando o Zetasizer (Malvern Instruments, Nano-ZS, Reino Unido) equipado com laser He-Ne a um comprimento de onda de 632,8 nm e ângulo de detecção fixo em 90 °C. As amostras foram colocadas em cubetas de vidro e lidas em triplicata a 25 °C.

### 2.5. Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados

Após preparada, a solução da razão r=0,5 em pH 9,0 foi deixada em repouso a 4 °C durante a noite. Em seguida, a solução foi centrifugada (Reoterm, digicen 21 R, Brasil) a 500 g por 10 min a temperatura de 20 °C (ANEMA e KRUIF, 2014). O sobrenadante foi então descartado e o precipitado colocado no ultra freezer (Terroni, COLD 120, Brasil) a temperatura de -38 °C durante aproximadamente 24 h. Ao final, o precipitado foi rapidamente

transferido para o liofilizador de bancada (Terroni, Enterprise I , Brasil) para secagem e armazenado em um dessecador com sílica gel ate sua utilização.

### **2.5.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros no infravermelho foram obtidos das amostras de BSA e Lis e dos complexos liofilizados da definida razão de BSA/Lis. As análises foram realizadas em um espectrômetro FTIR (Bruker, Vertex 70, Alemanha), utilizando pastilhas de KBr (Brometo de potássio) e lidas na faixa entre 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

### **2.5.2. Microscopia óptica**

Uma alíquota do complexo coacervado em solução a 0,1% (m/m),  $r=0,5$  e pH 9,0 foi entre lamina e lamínula e conduzido ao microscópico óptico Axioplan (Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplado a uma câmera AxioCam MRc (Zeiss, Gottingen, Alemanha) ampliado a 100x com óleo de imersão.

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

As micrografias dos complexos liofilizados da definida razão BSA/Lis ( $r=0,5$  e pH 9,0) foram colocados sob obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss, EVO MA10, Inglaterra) com filamento de tungstênio, operado em modo de elétrons secundários com a tensão de aceleração de 20 kV.

## **2.6. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

A análise de DSC foi realizada utilizando um calorímetro (TA Instruments, Q200, EUA). Padrões de índio (In) foram usados para calibrar energia e temperatura do equipamento e nitrogênio foi usado como gás de arraste. As amostras liofilizadas (~3 mg) foram pesados em cadinhos de alumínio do tipo hermético com o auxílio de uma balança de precisão (Mettler Toledo, Mx5, EUA), e adicionadas as amostra pelo menos o dobro de água para manter hidratação. Antes da análise, os cadinhos foram selados e mantidos à temperatura ambiente por pelo menos 2 h para serem equilibrados. As amostras foram analisadas durante um intervalo de temperatura de 25 a 120 ° C na taxa de 5 °C/min e um cadinho vazio e selado foi utilizado como referência (YUAN et al., 2014). A determinação da temperatura de transição no pico máximo, bem como a variação de entalpia foram analisadas pelo *software* Universal V4.5A<sup>®</sup> (TA Instruments, EUA). A temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) foi definido como o valor máximo do pico e a variação de entalpia de desnaturação ( $\Delta H_d$ ) foi obtida pela integral da área do pico. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

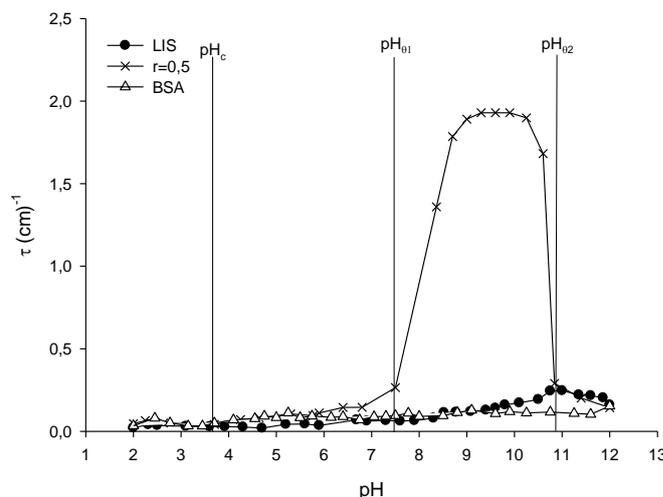
### **3.1. Efeito do pH e da razão na formação dos complexos coacervados**

O efeito do pH (2,0-12,0) na variação de turbidez das soluções de proteínas isoladas, BSA e Lis, e na razão  $r=1$  sem adição de NaCl estão apresentados na Figura 1. Durante a análise turbidimétrica da Lis, foi observado uma discreta elevação na turbidez a partir do pH

9,5 até pH 11,5. Isso ocorre porque na maioria dos sistemas contendo uma única proteína ocorre uma autoagregação com aumento de turbidez em pH próximo ao seu pI (QIN et al., 1998). No entanto, no que se refere a BSA, durante a variação de pH não foi possível verificar alteração de turbidez, sugerindo nesse caso, que a BSA não foi capaz de formar autoagregados de tamanho suficiente para que fossem detectados pelo espectrofotômetro no comprimento de onda estudado o que se deve a grande proporção de grupos hidrofílicos na superfície da molécula (DAMODARAN et al., 2010).

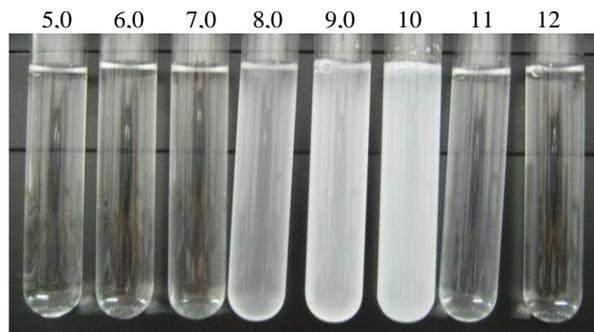
Quando o complexo coacervado BSA/Lis razão  $r=0,5$  na ausência de NaCl foi formado durante a variação de pH, três processos sequenciais puderam ser identificados como mostra a Figura 1. O primeiro ponto observado é o  $pH_c$ , que indica o início da formação de complexos solúveis, e foi observado como um discreto aumento na turbidez antes mesmo do pH 4,0. Neste estágio as interações começam a ocorrer porém de maneira mais fraca pela baixa densidade de cargas com formação de complexo solúveis que pelo pequeno tamanho não são detectados pelo comprimento de onda utilizado. O  $pH_{01}$ , verificado como um aumento rápido na turbidez, ocorreu em torno do pH 7,5 e se deve a formação de complexos insolúveis (complexos coacervados), maiores e mais detectáveis do que os complexos solúveis. O  $pH_{02}$  ocorreu logo após o ponto máximo de turbidez, e se deu antes do pH 11,0, correspondendo a dissociação dos complexos devido a repulsão eletrostática (VINAYAHAM et al., 2010; ORDÓÑEZ, 2005; SCARBIERI, 1996).

A Formação de coacervados na faixa de pH entre  $pH_{01}$  e  $pH_{02}$  se deve porque em pH abaixo do seu pI a Lis apresenta maior densidade de cargas positivas e a BSA quando em pH acima do seu pI apresenta maior densidade de cargas negativas, permitindo que nessa faixa ocorra interação por atração eletrostática. DIARRASSOUBA et al., (2015) também verificou que a interação com consequente aumento de turbidez na razão 2:1 entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lisozima ocorreu entre pH 6,8 e 10 e que em pH 5 e 11, próximo aos seus pI, não houve interação.



**Figura 1:** Variação da turbidez ( $cm^{-1}$ ) em função do pH sem adição de NaCl das proteínas, BSA e Lis e da razão  $r=0,5$  com a identificação do seu  $pH_c$ ,  $pH_{01}$  e  $pH_{02}$ .

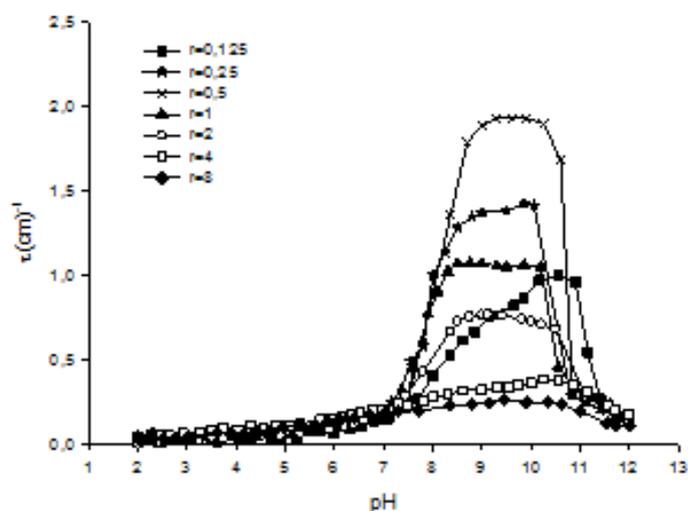
A Figura 2 ilustra de maneira clara a influência do pH (5,0 - 12,0) sobre a variação de turbidez na razão  $r=0,5$  de BSA/Lis. Na Figura é possível ver um súbito aumento na turbidez entre os pH 8,0-10,0 referente a formação de complexos insolúveis.



**Figura 2:**Variação da Turbidez em função do pH da definida razão  $r=0,5$  sem adição de NaCl.

A atração eletrostática é a principal força envolvida na formação dos complexos coacervados BSA/Lis. Por esse motivo, o estudo do efeito do pH na interação entre proteínas é um fator relevante pois além de influenciar a densidade de cargas do biopolímero também determina o intervalo de estabilidade do coacervado e as melhores condições para sua formação (LI et al., 2012; DIARRASSOUBA et al., 2015, SCHMITT et al., 1998). No entanto, a ligeira elevação da turbidez observada antes mesmo do pI da Lis pode se justificar pelo fato de que durante o processo de coacervação além das interações eletrostáticas podem também estar envolvidas interações não eletrostáticas, principalmente ligações de hidrogênio que ocorrem em pH acima do pI da proteína e são favorecidas por uma baixa densidade de cargas, assim como reportado na literatura (DE VRIES e COHEN STUART, 2006; JONES e MCCLEMENTS, 2010; SCHMITT e TURGEON, 2011; GIRARD et al., 2002; YOSHIDA et al.1998). LIU et al. (2015), estudou a influencia da ureia, capaz de quebrar ligações de hidrogênio, na complexação entre BSA e um polissacarídeo da linhaça. Os resultados revelaram que a adição de ureia reduziu a turbidez indicando que a complexação entre os biopolímeros estudados teve influencia não só de interação eletrostática como também de ligações de hidrogênio.

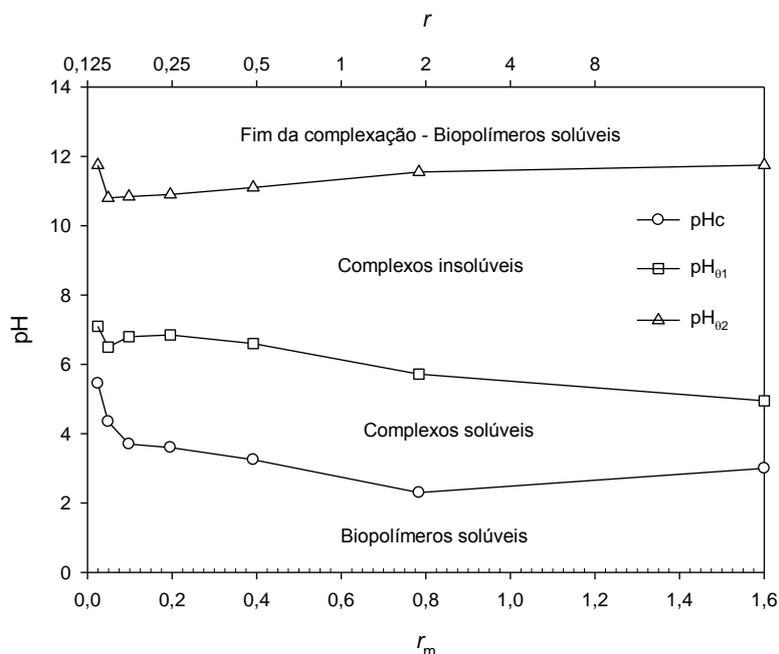
O efeito da razão na variação de turbidez foi investigado por meio de diferentes razões de BSA/Lis sob as mesmas condições como apresentado na Figura 4. Nesta Figura observa-se que próximo ao pH 5,0 já há um ligeiro aumento de turbidez com rápida elevação em torno do pH 7,0, onde se mantém até que reduz rapidamente antes do pH 11,0. Nota-se que maiores valores de turbidez foram registrados entre os pH 8,0 ao 10,0 para praticamente todas as razões estudadas. Dentre as razões estudadas a razão  $r=0,5$  se destacou por apresentar a maior turbidez provavelmente porque a essa razão houve uma completa neutralização das cargas. Nas demais razões, a diminuição nos valores de turbidez ocorreu, naturalmente, pelo excesso de Lis ou de BSA no sistema nesse caso, as moléculas que não estão associados ficam solúveis na solução, em maior quantidade do que as moléculas associadas (complexos) não sendo capazes de contribuir para o aumento da turbidez (GULÃO et al., 2014). Portanto, a intensidade na turbidez e consequente formação de complexos coacervados, também é influenciada pela razão por esta alterar o balanço de cargas nos sistemas, importante fator para que haja interação entre os biopolímeros (YE et al., 2006).



**Figura 3:** Variação da turbidez ( $\text{cm}^{-1}$ ) em função do pH dos sistema contendo Ova/Lis, em diferentes razões ( $r$ ) sem adição de NaCl.

Baseado nos dados de  $\text{pH}_c$ ,  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$ , derivadas da Figura 3, foi construído um diagrama de fases dos sistemas contendo BSA/Lis em função da razão de massa total ( $r$ ), razão molar ( $r_m$ ), e pH (Figura 4). O diagrama corresponde as fases de formação dos complexos com base na análise turbidimétrica durante a titulação básica nas misturas de BSA/Lis. Os valores de  $\text{pH}_{02}$  se mostram praticamente inalterados em função da variação da razão, isso ocorre porque a dissociação dos complexos se deve a protonação da BSA e não pela influencia da razão (LI et al., 2012). Já o  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_c$  por serem dependentes da razão apresentaram uma leve diminuição a medida que foram aumentadas as razões. Entre os  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$  foi formada uma extensa área correspondente a formação dos complexos coacervados. O que significa dizer, que entre os pH 8,0 e 10,0 houve formação de coacervados para todas razão estudadas, já que nessa região as duas proteínas se encontram opostamente carregadas.

Complexos solúveis foram formados na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, devido a baixa densidade de cargas pela proximidade do pI de BSA. Acima do pH 12,0 e abaixo do pH 2,0 não houve formação de complexos por estarem as duas com carga negativa e positiva, respectivamente.



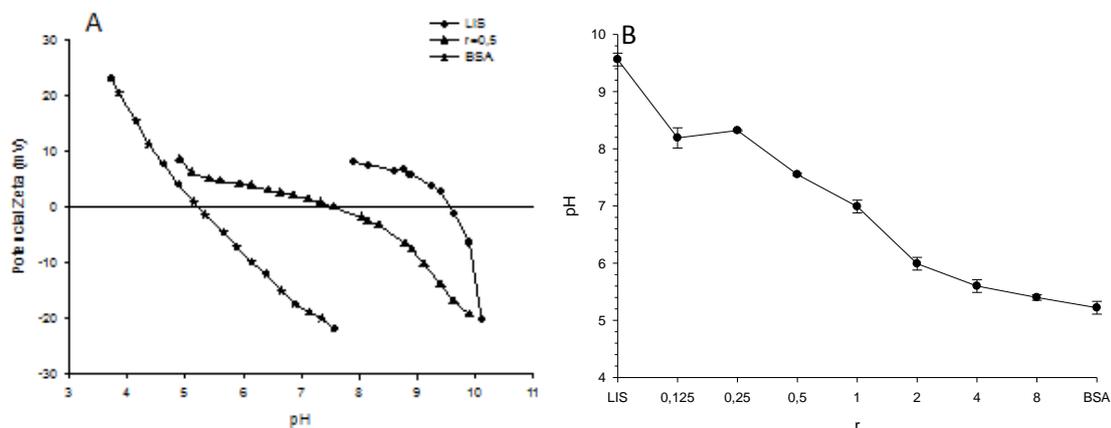
**Figura 4:** Diagrama de fases das misturas contendo BSA/Lis (0,1%) em diferentes razões mássica ( $r$ ) e razões molar ( $r_m$ ) em função do pH sem adição de NaCl.

### 3.2. Potencial -Zeta

A variação do potencial-zeta e dos pI na ausência de NaCl estão representada na Figura 5. Com o propósito de verificar a densidade de cargas das proteína isoladas (BSA e Lis) e do complexo formado na definida razão ( $r=0,5$ ) o potencial- $\zeta$  (mV) em função do pH (2,0-11,0) foi determinado e os resultados estão apresentados na Figura 5A. O potencial- $\zeta$  da BSA variou de 35,5 à -23,5 do pH 2,0 até pH 8,0 com uma carga elétrica zero (pI) de 5,2. De acordo com a literatura, o pI de BSA (0,05%, m/m), foi próximo de 5,0 (VINAYAHAM et al., 2010). LIU et al. (2015), encontrou resultados similares onde a variação de cargas se deu na faixa de -17,5 em pH em torno de 6,0 a 32,8 em pH próximo de 1,5. Os autores mencionaram que essa ocorrência se deve à protonação de amins ( $-NH_2^+$ ) e grupos carboxílicos ( $-COO^-$ ) de BSA. O potencial- $\zeta$  da Lis teve uma variação na faixa de 10mV à -20mV entre o pH 8 e 10,5, e pI em torno de pH 9,5 já tendo sido relatado na literatura por ANEMA e KRUIF (2013), valores de pI próximos a esse. O potencial- $\zeta$  do coacervado formado na razão  $r=0,5$  variou entre 8,7 a -19,3 durante a titulação do pH 5,0 a 10,0 tendo como pI o pH 7,55. É interessante notar que o pI do complexo se deu exatamente entre os pI das proteínas. Isso se explica porque como pode ser visto BSA acima do seu pI (5,22) encontra-se com carga negativa e a Lis abaixo do seu pI (9,5) encontra-se com carga positiva possibilitando assim, que haja interação por meio das cargas opostas das duas proteínas com consequente formação do coacervado.

Na Figura 5B apresenta-se os valores de pI das proteínas isoladas e das demais razões estudadas. Nota-se que as razões contendo mais BSA do que Lis ( $r=2; 4$  e  $8$ ) tiveram um pI mais próximo ao da BSA. Isso se deve pela presença de uma maior quantidade de carga negativa devido ao excesso de BSA no sistema que não foi neutralizada pela interação com Lis. Já nas razões contendo mais Lis do que BSA ( $r=0,5; 0,25$  e  $0,125$ ) o pI foi mais próximos ao da Lis pelo excesso de Lis no sistema que não interagiu com BSA

Ao compararmos os pI das razões BSA/Lis da Figura 5B com os valores de  $\text{pH}_{01}$  determinados pela análise turbidimétrica e que compõe o diagrama de fases da Figura 4 verificamos que há uma certa semelhança nos valores de pH. Isso indica, que a interação foi mais intensa quando a carga elétrica das misturas era neutra (pI). No entanto quando comparamos o pI da razão  $r=0,5$  que foi de 7,5 com a Figura 2, verificamos que a maior intensidade de turbidez se deu em pH 9,0 e 10,0 ou seja, acima do pI da referida razão porém entre os pI das duas proteínas isoladas.

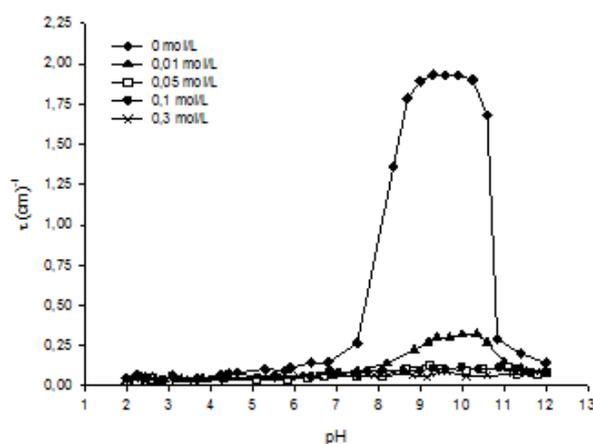


**Figura 5:** (A) Potencial- $\zeta$  das proteínas isoladas (BSA e Lis) e da razão  $r=0,5$  e o (B) pI das proteínas e das diferentes razões sem adição de NaCl

### 3.3. Efeito do NaCl na formação dos complexos coacervados

A influencia do NaCl para formação dos complexos coacervados de BSA/Lis na razão  $r=0,5$  foi estudada pela análise turbidimétrica como apresentado na Figura 6. Nesta Figura foi observado que a adição de NaCl influenciou de forma negativa a formação dos coacervados já em pequenas concentrações (0,01 mol/L), chegando a suprimi-la a partir de 0,05 mol/L. Além disso, na concentração de 0,01 mol/L pode-se verificar uma alteração nos valores de  $\text{pH}_c$ ,  $\text{pH}_1$  e  $\text{pH}_2$ , reduzindo não só a intensidade de turbidez, mas também a faixa de formação dos complexos.

Nossos resultados estão de acordo com os reportados pela literatura, como LI et al. (2012), que estudaram diferentes concentrações de NaCl e sua influência na formação de complexos entre BSA e pectina da beterraba. Eles observaram que a adição da NaCl a concentrações bem pequenas (de 1 até 200 mmol/L) favoreceu a formação de complexos. No entanto, quando aumentada a concentração de NaCl para  $\geq 500$  mmol/L houve redução na turbidez indicando que a complexação havia sido suprimida. LIU et al. (2015) avaliou a influencia de NaCl entre BSA e um polissacarídeo da goma da linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Eles observaram que a turbidez diminuiu, e que os valores de  $\text{pH}_c$ ,  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$  foram alterados com consequente redução no intervalo entre  $\text{pH}_{01}$  e  $\text{pH}_{02}$  nas duas concentrações de NaCl estudadas (50 mmol/L e 100 mmol/L) do que sem adição de NaCl. Uma redução na complexação pode ser explicada pela adição de NaCl devido a competição de íons  $\text{Na}^+$  em solução com sítios de ligação de carga positiva, se ligando aos sítios de carga negativa e a competição de íons  $\text{Cl}^-$  com sítios de ligação de carga negativa se ligando aos de carga positiva. Como resultado, tem-se uma redução da interação eletrostática entre as moléculas de proteína (SEYREK et al, 2003; KLASSEN et al 2011; LIU et al., 2015).



**Figura 6:** Turbidez (cm)<sup>-1</sup> em função do pH no sistema contendo BSA/Lis (r=0,5) sem adição de NaCl e em diferentes concentrações de NaCl

### 3.4. Tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula de BSA e Lis durante a formação de complexos coacervados foi monitorada por DLS para elucidar as interações entre biopolímeros. Os perfis de intensidade em função do tamanho (d.nm) das soluções de Ova e Lis (0,1%, m/m), bem como a sua mistura razão r=0,5 foram determinados em pH 9 sem adição de NaCl e estão representados na Figura 7.

É observado que a BSA (Figura 7A) apresentou três tamanhos diferentes, um de maior intensidade (67,0 % ± 1,3) com tamanho médio de 5,2 d.nm ± 0,13 um segundo (29,5% ± 1,0) com tamanho médio de 192,1 d.nm ± 10,3 e um terceiro (3,5% ± 1,2) com tamanho médio de 5360 d.nm ± 81,9. O segundo e o terceiro são atribuídos a presença de impurezas ou autoagregação (LIU et al., 2015). Já o primeiro tamanho médio observado (~5,0 d.nm) de BSA é consistente com o reportado pela literatura (VINAYAHAN et al., 2010; HIROSHI et al., 2007).

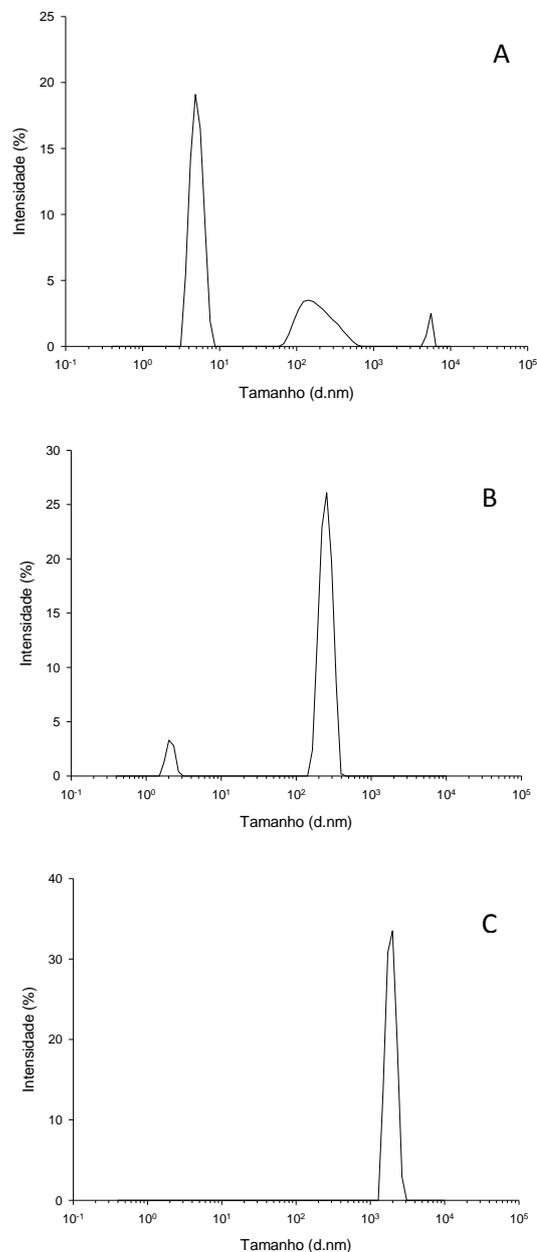
Na Figura 7B, referente a distribuição de tamanho da Lis, foram observados um tamanho médio de maior intensidade (91,8 % ± 0,5) na faixa de 279,5 d.nm ± 38,4 e um de menor intensidade (8,1% ± 0,5) com tamanho médio de 1,99 d.nm ± 0,16. Considerando que o primeiro tamanho observado seja em virtude da autoagregação, que está ocorrendo nesse pH (Figura 1) o tamanho médio do primeiro está de acordo com o reportado na literatura (PARMAR e MUSCHOL, 2009; ANTONOV et al., 2015).

Quando analisado a solução contendo BSA/Lis em pH 9,0, onde ocorreu maior formação de complexos coacervados (Figura 7C) os valores principais dos monômeros de proteínas não são observados mas sim, um tamanho médio de 1755 d.nm ± 167,7 (~100%) com Pdi (índice de polidispersividade) de 0,54 ± 0,18.

Tendo como base a percentagem de polidispersividade (%Pd) calculada pela Equação 2, que considera polidispersa amostras com % Pd ≥ 20% e monodispersa amostras com % Pd ≤ 20%, apesar da amostra ter apresentado um único valor médio de tamanho, ela foi considerada polidispersa por apresentar %Pd de 73,5 (KHURSHID et al., 2014; ARZENŠEK et al., 2010). O que talvez tenha se dado pela não saturação total dos sítios de ligação (SCHIMITT, 2005) ou pela agregação das partículas.

$$\%Pd = (PdI)^{1/2} \times 100 \quad (2)$$

Nota-se, que o valor médio de tamanho de partícula observado na solução de BSA/Lis é bem superior ao encontrado para as soluções contendo as proteínas isoladas sugerindo, que a essas condições estudadas tenha ocorrido interação entre cargas positivas e negativas das proteínas BSA e Lis com formação de complexos coacervados. DIARRASSOUBA, (2015) ao estudar a interação entre  $\beta$ -lactoglobulina e Lisozima observou tamanhos de partículas em torno de 2  $\mu$ m semelhantes ao que encontrados em nosso estudo.



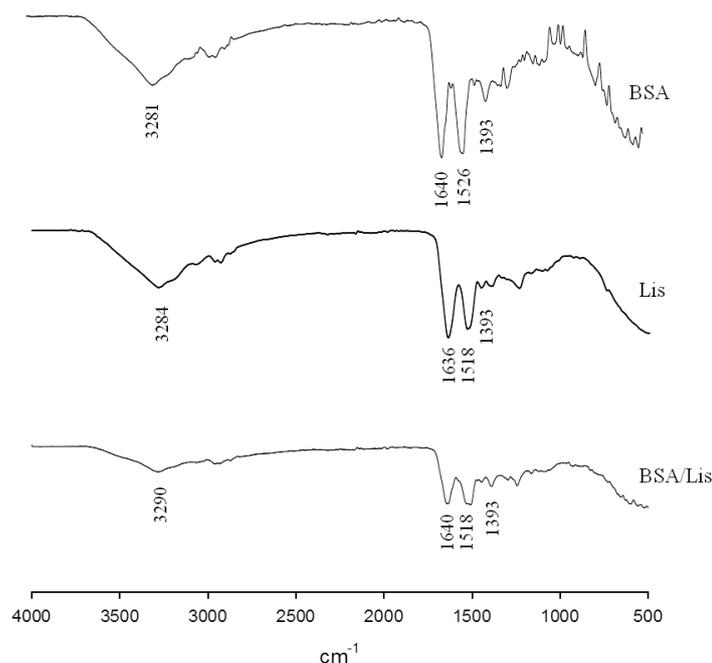
**Figura 7:** Tamanho de partícula (d.nm) em pH 9,0 sem adição de NaCl da (A) BSA, (B) Lis e do (C) complexo coacervado  $r=0,5$

### 3.5. Caracterização química e morfológica dos complexos coacervados

#### 3.5.1. FTIR

Os espectros no infravermelho das proteínas, BSA e Lis, e do complexo, BSA/Lis, contendo 0,1% (massa total) e razão  $r=0,5$  são apresentados na Figura 8. As região mais sensível de espectros de FTIR associado com a estrutura de proteínas, são as amida I, II e III. A amida I está entre as bandas  $1625-1750\text{ cm}^{-1}$  e são formadas pelo estiramento do grupo C=O (carboxil livre), a amida II se localiza entre as bandas  $1475-1575\text{ cm}^{-1}$  e se refere ao estiramento dos grupos N-H e a amida III entre as bandas  $1225-1425\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento dos grupos C-N e N-H (DONG et al., 1990; STUART, 2006; HUAG, 2006; SCHMIDT et al., 2005). Além das amidas, entre as bandas  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $3170\text{ cm}^{-1}$  podem ser identificados o estiramento dos grupos N-H e O-H dos aminoácidos livres (BARTH e ZSCHERP, 2002).

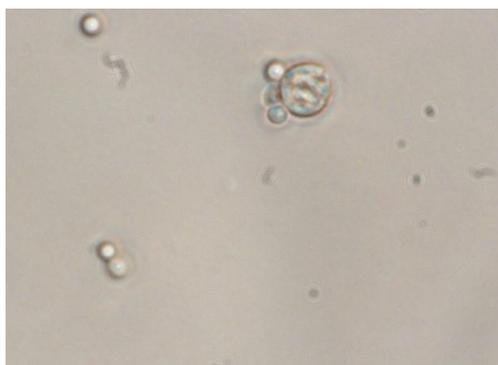
Os principais espectros de FTIR observados para BSA (Figura 8) e Lis (Figura 8) estão entre as bandas  $1300\text{ cm}^{-1}$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$  representando as amidas I, II e III respectivamente e o estiramento dos grupos N-H e O-H próximo a faixa de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . No espectro de FTIR para os complexos formados a partir de BSA e Lis (Figura 8) foram observados semelhantes estruturas, porém com menores intensidades. A formação de complexos por meio de interações eletrostática entre os grupamentos  $-\text{COO}^-$  (C=O) de uma proteína e os grupamentos  $-\text{NH}_3^+$  (N-H) da outra, justifica a redução verificada nas bandas referentes as amidas ( $1400\text{ cm}^{-1}$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ). Além disso, uma redução da intensidade na banda na faixa de  $3300\text{ cm}^{-1}$ , verificada no complexo (Figura 8) indicariam a formação de complexos não só por interações eletrostática, mas também por ligações do tipo hidrogênio (HUANG et al., 2012; BARTH e ZSCHERP, 2002).



**Figura 8:** Espectros do FTIR da BSA, Lis e BSA/Lis razão  $r=0,5$ . Os complexos foram preparados a pH 9 sem adição de NaCl.

### 3.5.2. Microscopia óptica

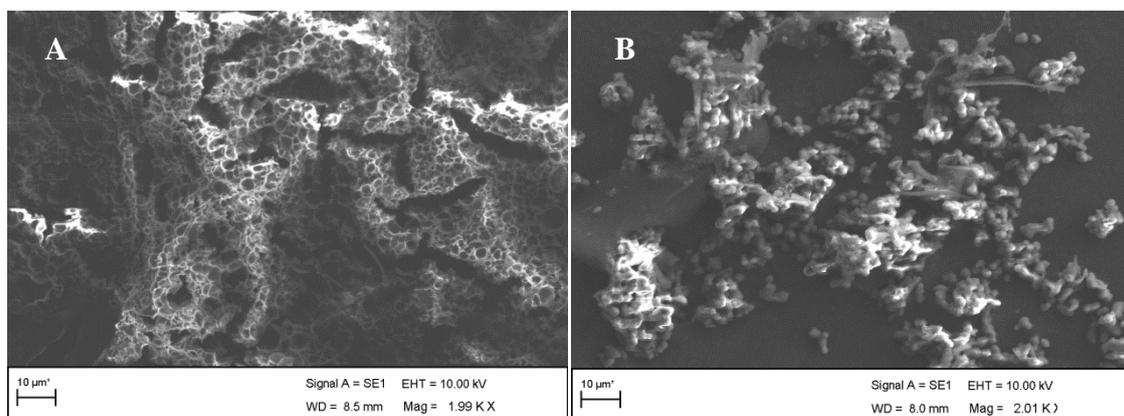
A microscopia óptica foi utilizada para melhor entender a estrutura do complexo coacervado formado no estado natural (em solução). Imagem dos complexos em pH 9,0 e razão  $r=0,5$  são apresentadas na Figura 9. A microscopia óptica (100x) revelou a presença de estruturas esféricas com conteúdo interno heterogêneo, assim como também relatado por DESFOUGÈRES, (2010). TURGEON e LANEUVILLE, (2009) tem descrito os coacervados como sendo vesículas que poderiam ser utilizados no processo de microencapsulação. Apesar da identificação dos biopolímeros ainda não esteja bem esclarecido, principalmente em complexos coacervados formados por proteínas, acredita-se que haja uma uniforme distribuição de proteínas no interior das esferas (DIARRASSOUBA et al., 2015)



**Figura 9:** Microscopia óptica dos complexos coacervados BSA/Lis  $r=0,5$  em pH 9,0

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

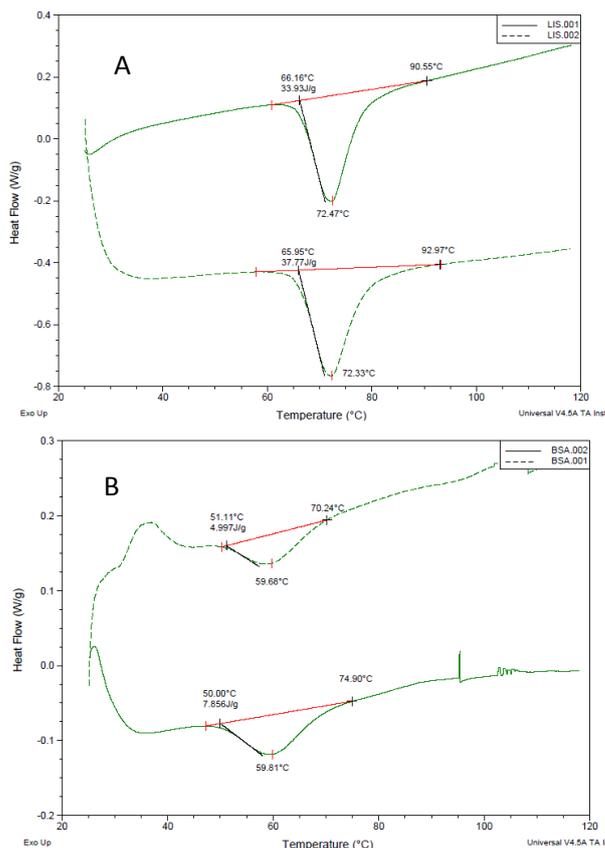
As imagens fornecidas pelo MEV mostram que os complexos coacervados obtidos por BSA / Lis razão  $r=0,5$  e pH 9,0 possuem estruturas semelhantes a vesículas rompidas, como apresentado na Figura 10A. Estruturas como essas se justificam pelo processo de liofilização sofrido pelas amostras antes da análise pelo MEV. Apesar de submetidas ao processo de liofilização, foram verificadas na mesma amostra estruturas de forma esférica (Figura 10B), bem semelhante as observadas por DIARRASSOUBA (2015), que as descreve como tendo uma estrutura regular e esférica.

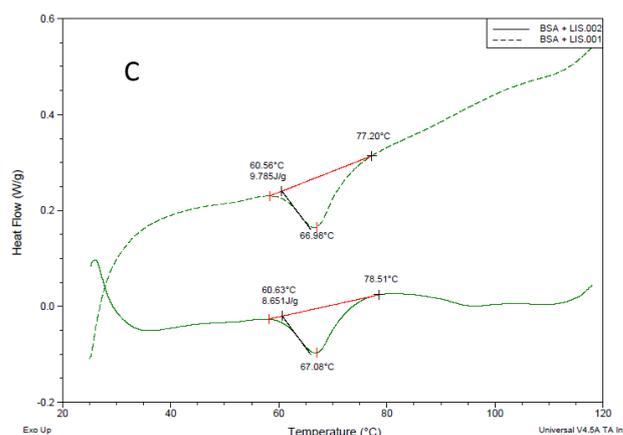


**Figura 10:** MEV dos complexos coacervados de BSA/Lis  $r=0,5$  em pH 9,0.

### 3.6. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Na Figura 11 são apresentados os termogramas das proteínas isoladas, Lis e BSA e do complexo coacervado formado em pH 9,0 e razão  $r=0,5$ . Todas as amostras analisadas exibiram um pico endotérmico característico do processo de desnaturação (YUAN et al., 2014). A temperatura de desnaturação ( $T_d$ ) média das proteínas isoladas foi de  $72,3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,07$  e  $59,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,09$  para Lis (Figura 11A) e BSA (Figura 11B), respectivamente, e estão de acordo com os valores reportados pela literatura (BYE e FALCONER, 2013; MICHNIK, 2003). No termograma do complexo (Figura 11C) foi verificado apenas um único pico endotérmico característico do processo de desnaturação. É interessante notar que nenhum outro pico referente ao ponto de desnaturação das proteínas isoladas foi observado, indicando provavelmente que um novo biopolímero tenha sido formado com características térmicas diferente das proteínas originais. A  $T_d$  média verificada para o complexo foi de  $67,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,07$  ou seja, entre a  $T_d$  média das duas proteínas. A variação de entalpia média de desnaturação ( $\Delta H_d$ ) de  $9,2 \pm 0,80$  do complexo também ficou entre os valores observados para Lis ( $35,8 \pm 2,71$ ) e BSA ( $6,4 \pm 2,03$ ). O aumento de  $\Delta H_d$  comparado aos valores de BSA indica que a interação entre Lis e BSA tenha sido induzida por interações eletrostáticas assim, como observado por YUAN et al. (2014) ao avaliar a estabilidade térmica da proteína de soja com quitosana. Os resultados obtidos, referente a característica térmica do complexo formado, é uma informação bastante relevante no que tange a aplicabilidade futura desses complexos em matrizes alimentares.





**Figura 11:** Termograma gerado pela análise de DSC das amostras de (A) Lis, (B) BSA e (C) do complexo coacervado BSA/LIS razão  $r = 0,5$  em pH 9,0.

## 4. CONCLUSÃO

Complexos insolúveis foram formados entre os pI das proteínas e próximo ao pI caracterizando, que a interação ocorreu por cargas opostas e foi máxima quando houve equilíbrio dessas cargas. Esses resultados, juntamente com o FTIR demonstraram que interações eletrostática tiveram predomínio na formação dos complexos, porém ligações de hidrogênio também participaram da interação. A adição de NaCl nas concentrações estudadas não teve efeito, positivo, reduzindo visivelmente a interação em concentrações de 0,01 mol/L. Nas condições estudadas foram observadas estruturas de forma esférica de tamanho médio de 1,7  $\mu\text{m}$  que permitiriam seu uso como agente microencapsulante. O DSC sugeriu que a interação deu origem há um novo biopolímero com temperatura de desnaturação intermediária a das duas proteínas. Esse estudo contribuiu para que futuras aplicações dos complexos coacervados de BSA/Lis sejam feitas visando o processo de microencapsulação de bioativos alimentares.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. Coacervates of lysozyme and  $\beta$ -casein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 398, p. 255–261, 2013.
- ANEMA, S. G.; KRUIF, C. G. K. DE. Complex coacervates of lactotransferrin and  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.430, p.214–220, 2014.
- ANTONOV, Y. A.; ZHURAVLEVA, I. L.; CARDINAELS, R.; MOLDENAERS, P.. Structural studies on the interaction of lysozyme with dextran sulfate. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p.71-80, 2015.
- ARZENŠEK, D; PODGORNIK, R; KUZMAN, D. **Dynamic light scattering and application to proteins in solutions**. University Ljubljana, Faculty of mathematics and physics, p.1-19, 2010

BARTH, A. & ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. **Q. Rev. Biophys.**, v. 35, n. 4, p. 369–430, 2002.

BYE, J. W.; FALCONER, R. J. Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. **Protein Sci**, v. 22, n. 11, p. 1563–1570, 2013.

CHAI, C.; LEE, J.; HUANG, Q. The effect of ionic strength on the rheology of pH-induced bovine serum albumin/ $\kappa$ -carrageenan coacervates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 356–360, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Artmed, Porto Alegre, p. 900. 2010.

DESFOUGÈRES, Y.; CROGUENNEC, T.; LECHEVALIER, V.; BOUHALLAB, S.; NAU, F. Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 12, p. 4138–4144, 2010.

DE VRIES, R.; COHEN STUART, M. Theory and simulations of macroion complexation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 5, p. 295-301, 2006.

DIARRASSOUBA, F. G. R. et al. Self-assembly of  $\beta$ -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v. 173, p. 203–209, 2015.

DONG, A., HUANG, P., CAUGHEY, W. S. Protein secondary structures in water from second derivative amide I infrared spectra. **Biochemistry**, v.29, p.3303-3308, 1990.

FAO-DATABASE. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2015. Acesso em: 01 Fevereiro

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, p. 585 - 591, 2002.

GULÃO, E. D. S.; DE SOUZA, C. J. F.; DA SILVA, F. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; GARCIA-ROJA, E. E. Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum arabic: Formation and characterization. **Food Research International**, n. 0, 2014.

GULÃO, E. DA S.; SOUZA, C. J. F. DE; ANDRADE, C. T.; GARCIA-ROJAS, E. E. Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: formation and characterization. **Food Chem**, v. 194, p. 680–686, 2016.

HIROSHI, M.A.; KIKUCHI, R.; OGAWA, K.; KOKUFUTA, E. Light scattering study of complex formation between protein and polyelectrolyte at various ionic strengths. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.56, p. 142–148, 2007.

HOWELL, N. K., YEBOAH, N. A., & LEWIS, D. F. V. Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with a-lactalbumin and b-lactoglobulin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p. 813–824, 1995.

HUANG, C.Y.; BALAKRISHNAN, G.; SPIRO, T. G. Protein secondary structure from deep-UV resonance Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 1-3, p. 277-282, 2006.

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

IUPAC, **Compendium of Chemical Terminology**. second ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 374 - 397, 2010.

KHURSHID, S.; SARIDAKIS, E.; GOVADA, L.; CHAYEN, N. E. Porous nucleating agents for protein crystallization. **Nat Protoc**, v. 9, n. 7, p. 1621–1633, 2014.

KLASSEN, D. R.; ELMER, C. M.; NICKERSON, M. T. Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1094-1101, 2011.

KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.555-563, 2001.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421-8431, 2005.

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, 2012.

LIU, J.; SHIM, Y. Y.; WANG, Y.; REANEY, M. J. T. Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 95–103, 2015.

MICHNIK, A. Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, n. 2, p. 509–519, 2003.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERCO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos: alimentos de origen animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 269-294, 2005.

PARMAR, A. S.; MUSCHOL, M. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic vs. kosmotropic ions. **Biophysical Journal**, v. 97, p. 590-598, 2009.

PELEGRINE, D. H. G. e CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Braz. J. Food Technol.*, VII BMCFB, P.145-151, 2008.

QIN, B. Y., BEWLEY, M. C., CREAMER, L. K., BAKER, H. M., BAKER, E. N., & JAMESON, G. B. Structural basis of the Tanford transition of bovine b-lactoglobulin. *Biochemistry*, v.37, p.14014–14023, 1998.

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.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**. São Paulo: Varela, p. 57-172, 1996.

SOUZA, C. J. F.; GARCIA-ROJAS, E. E. Effects of salt and protein concentrations on the association and dissociation of ovalbumin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids* , v. 47, n. 5, p. 124-129, 5. 2015

SCHMITT, C.; PALMA DA SILVA, T.; RAMI-SHOJAEI, C. B. S.; FROSSARD, P.; KOLODZIEJCZYK, E.; LESER, M. E. Effect of time on the interfacial and foaming properties of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, v.21, p.7786-7795, 2005.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998

SCHMIDT, V. ; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. *Polymer Degradation and Stability*, v.87, p. 25–31, 2005

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

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

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**. Food Products Press, 1995.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy of Biological Applications: An Overview. In: (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

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

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

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

TURGEON, S. L.; LANEUVILLE, S.I. CHAPTER 11 - Protein + Polysaccharide Coacervates And Complexes: From Scientific Background To Their Application As Functional Ingredients In Food Products. In: STEFAN, K.; IAN, T. N.; JOHAN B. UBBINKA2 - STEFAN KASAPIS, I. T. N. e JOHAN, B. U. (Ed.). **Modern Biopolymer Science**. San Diego: Academic Press, 2009. p.225-260.

VINAYAHAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3367–3374, 2010.

WATER, J. J.; SCHACK, M. M. ; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; MALTESEN, M. J.; VAN DE WEERT, M.; JORGENSEN, L. Complex coacervates of hyaluronic acid and lysozyme: effect on protein structure and physical stability. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 88, n. 2, p. 325–331, 2014.

WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complex Formation of Whey Proteins: Exocellular Polysaccharide EPS B40. **Langmuir**, v. 19, p. 9404-9410, 2003.

YANG, Y.; ANVARI, M.; PAN, C.H.; CHUNG, D. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v.135 p. 555–561, 2012.

YE, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, p. 121-133, 2006.

YOSHIDA, K.; SOKHAKIAN, S; DUBIN, P.L. Binding of Polycarboxylic Acids to Cationic Mixed Micelles: Effect of Polymer Counterion Binding and Polyion Charge Distribution. *Jornal of Colloid and Interface Science*, v. 205, p. 257-264, 1998

YUAN, Y.; WAN, Z.-L.; YANG, X.-Q. ; YIN, S.-W. Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength. **Food Research International**, v. 55, p. 207–214, 2014.

ZHANG, L. Y.; ZHANG, X. 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, p. 323-332, 2013.

ZHAO, Y.; LI, F.; CARVAJAL, M.T.; HARRIS, M.T. Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 332 , p. 345–353, 2009.

**CAPÍTULO III**  
**CALORIMETRIC TECHNIQUES APPLIED TO THE THERMODYNAMIC STUDY**  
**OF INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS AND POLYSACCHARIDES**

**LITERATURE REVIEW**

Aceito para publicação: SANTOS, M. B.; COSTA, B. S.; GARCIA ROJAS, E. E. Calorimetric techniques applied to the thermodynamic study of interactions between proteins and polysaccharides. **Ciencia Rural**.

## ABSTRACT

The interactions between biological macromolecules have been important for biotechnology, but further understanding is needed to maximize the utility of these interactions. Calorimetric techniques provide information regarding these interactions through the thermal energy that is produced or consumed during interactions. Notable techniques include differential scanning calorimetry, which generates a thermodynamic profile from temperature scanning, and isothermal titration calorimetry that provide the thermodynamic parameters directly related to the interaction. This review describes how calorimetric techniques can be used to study interactions between proteins and polysaccharides, and provide valuable insight into the thermodynamics of their interaction.

**Key words:** Isothermal titration calorimetry, Differential scanning calorimetry, Biomolecules.

## RESUMO

As interações entre macromoléculas biológicas, tem tido importante aplicação na biotecnologia, mas para sua devida utilização estudos mais detalhados são necessários. As técnicas calorimétricas permitem estudá-las ao serem capazes de fornecer informações referentes a essas interações através da energia térmica que é gerado ou absorvido durante o processo de interação. Dentre as técnicas que mais se destacam, a Calorimetria Exploratória Diferencial, que é capaz de fornecer um perfil termodinâmico a partir de uma varredura de temperatura, e a Calorimetria de Titulação Isotérmica, que fornece parâmetros termodinâmicos diretamente relacionados ao processo de interação. Nesta revisão, descrevemos como estas técnicas calorimétricas pode ser efetivamente aplicada no estudo das interações entre proteínas e polissacarídeos, com o propósito de obter informações valiosas sobre a termodinâmica da interação.

**Palavras-chave:** Calorimetria de titulação isotérmica, Calorimetria exploratória diferencial, Biomoléculas.

## 1. INTRODUCTION

Characterizing the interactions between macromolecules greatly enhances the understanding of biological systems and is useful for various applications in biotechnology. Macromolecular interactions can include bonds between substrates and enzymes, antigens and antibodies and smaller molecules like drugs and hormones linked to proteins carrier or receptors (ARMSTRONG et al., 2013; NADEMI et al., 2013; CAO et al., 2013; RÀFOLS et al., 2014). In addition, proteins and polysaccharides are increasingly used in technological applications to form new products (DIARRASSOUBA et al., 2015) and understanding how they interact will be critical to future technologies.

Almost all physical, chemical, or biological processes result in the production or consumption of thermal energy. Calorimetry, which means measuring heat, is the general term

that describe all experiments in which thermal energy is measured in function of time or temperature. (RUSSEL, et al., 2009; GAISFORD e BRUCKTON, 2001; WADSÖ, 1986; BROWN, 1998; IUPAC, 1994). Currently, the term microcalorimetry defines heat measurements in a microwatt range (RUSSEL, et al., 2009; IUPAC, 2014). The Measuring the heat flow in the calorimeter gives insight into the thermodynamic, chemical, and structural properties of a molecule (BROWN, 1998).

Calorimetric techniques are advantageous because they do not depend on the physical nature of the sample, rarely require any prior treatment, and are completely non-invasive. Furthermore, obtaining continuous and real-time data is an appealing aspect of these techniques. However, the high sensitivity and the non-specificity has both benefits and drawbacks because a improper sample preparations can cause incorrect interpretations of the results (WADSÖ, 1986; RUSSEL, et al., 2009; GAISFORD e BRUCKTON, 2001).

Calorimetric techniques that are well suited for the study of macromolecular interactions include isothermal titration calorimetry (ITC) and differential scanning calorimetry (DSC). ITC measures heat flow as a function of time and DSC measures heat flow as a function of temperature (GAISFORD e BRUCKTON, 2001). Table 1 shows different applications that use ITC and/or DSC to study interactions between proteins and polysaccharides. This review article describes each calorimetric technique and its application to understanding of interactions between proteins and polysaccharides in food systems.

**Table 1:** Application of calorimetric techniques in interactions between polysaccharides and proteins.

<b>Biomolecular interaction</b>	<b>Calorimetric technique</b>	<b>Thermodynamic parameters</b>	<b>Reference</b>
$\beta$ -lactoglobulin and Chitosan	ITC	$n$ e $\Delta H$	GUSEY e MCCLEMENTS, 2006
$\beta$ - lactoglobulin and Dextran Sulfate	DSC	$T_m$ e $\Delta H_m$	VARDHANABHUTI et al., 2009
WPI and Chitosan	ITC	$\Delta H$	BASTOS et al., 2010
Casein and Dextran	DSC	$T_g$	HERNANDEZ et al., 2011
$\beta$ - lactoglobulin and Gum Arabic	ITC	$K, \Delta H, n, \Delta S, \Delta G$ e $\Delta C_p$	ABERKANE et al., 2012
$\beta$ - lactoglobulin and Carrageenan	ITC	$n, K, \Delta H \Delta S$ e $\Delta G$	HOSSEINI et al., 2013.
Soy protein and Chitosan	DSC	$T_m$ e $\Delta H_m$	YUAN et al., 2014.
Pectin and WPI	DSC	$T_m$	MAO et al., 2014.
Hyaluronic Acid and Lysozyme	DSC e ITC	$T_m, K, \Delta H, \Delta S,$ $\Delta G$	WATER et al., 2014.
Soy protein and Gum Arabic	ITC	$n$ e $\Delta H$	DONG et al., 2015.

$\beta$ - lactoglobulin and Lactoferrin	ITC	$K, \Delta H, n, \Delta S, \Delta G$	TAVARES et al., 2015.
polysaccharides (carrageenan and CMC) and soy proteins	DSC	$T_m$ e $\Delta H_m$	SPADA et al., 2015

n: Stoichiometry;  $\Delta H$ : Enthalpy change;  $T_m$ : Melting temperature;  $\Delta H_m$ : Melting enthalpy change; K: Equilibrium binding constant;  $\Delta S$ : Entropy change;  $\Delta G$ : Gibbs free energy change;  $\Delta C_p$ : heat capacity change; Tg: Glass transition

## 2. Calorimetric technique

### 2.1. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 2014) defines thermal analysis as the study of the relationship between a property of the sample and its temperature when it is heated or cooled in a controlled manner. DSC is more than a calorimetric technique, it is also considered a thermal analysis, where the physical property being studied is heat (IUPAC, 1994). DSC studies transitions or processes that gain or lose heat as a function of temperature in other words, when a substance is subjected to a temperature change, endothermic (heat absorption) or exothermic (heat generation) processes may occur. As most biological molecules of interest undergo transformations when subjected to temperature variations, it is possible to use DSC to determine the energy involved in such processes (JOHNSON, 2013).

In a DSC analysis, the sample and reference are heated in a controlled way. As a result, the instrument measures the difference of heat capacity at constant pressure ( $C_p$ ) (HEERKLOTZ, 2004; WADSÖ, 1986). The  $C_p$  is defined as the ability of the sample to absorb or release energy without changing temperature.  $C_p$  is a fundamental property derived from other thermodynamic parameters such as enthalpy change ( $\Delta H$ ) and entropy change ( $\Delta S$ ), defined as follows (equations 1 by invoking the Kirchhoff equation) (PIRES et al., 2009; PRIVALOV, 2015):

$$\partial\Delta H/\partial T = \Delta C_p \quad (1)$$

The thermodynamic properties may be evaluated in accordance with the following standard relations (equations 2 to 4) (PRIVALOV, 2015):

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_t) - \Delta C_p(T_t - T) \quad (2)$$

$$\Delta S(T) = \Delta H(T_t)/T_t - \Delta C_p \ln(T_t/T) \quad (3)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (4)$$

Considering the equations above, when  $\Delta H$  is negative and  $\Delta S$  is positive, the free energy ( $\Delta G$ ) is negative and the interaction is spontaneous (O'BRIEN et al., 2001). DSC can provide a complete thermodynamic characterization of interactions induced by temperature. Regarding proteins, the literature has shown its application in determination the melting enthalpy change ( $\Delta H_m$ ) and melting temperature ( $T_m$ ) (CAO et al., 2008; DAMODARAN e

AGYARE 2013; TABILO-MUNIZAGA et al., 2014) and regarding polysaccharide measurements, DSC has been used to identify the melting point and glass transition ( $T_g$ ) (LIU et al., 2007; HOMER et al., 2014; HUANG et al., 2015). For biomolecular interactions, DSC can identify an increase or decrease in the denaturation temperature and glass transition after an interaction compared to isolated molecules (VARDHANABHUTI et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2011; HOMER et al., 2014; MAO et al., 2014)

Most recent equipment used in DSC are highly sensitive and also highly stable. They also have large dynamic measurement ranges (below 0 °C to over 100 °C, under pressure) (PRIVALOV e DRAGAN, 2007). In general, calorimeters control minimum temperature variation between the reference cell containing the buffer, and the sample cell containing the molecule of interest diluted with the buffer, both subjected to the same temperature program. As the changes temperature processes that generate or absorb energy (heat) occur in the sample cell and produce a temperature difference between the two cells. Heaters around the cells, to keep the difference between cells equal to zero, respond increasing the temperature in the reference cell when the process is exothermic and increasing the temperature of the sample cell when the process is endothermic. The amount of energy necessary to maintain thermal balance within the system is proportional to the energy change occurring in the sample (PIRES et al., 2009; JOHNSON, 2013).

There is also a heat flux DSC instrument that has a single heating system. For this instrument, the temperature difference between the sample and the reference cell is logged as the direct measure of the difference between heat flow rates (BROWN, 1998). However, this method overall is less accurate because the temperature measurement is less accurate than the energy input measurements (PIRES et al., 2009). To perform this calorimetric technique, all parameters such as heating rate, sample concentration, pH, presence of solutes, type of container and instrumentation must be well defined for results can be interpreted (MA e HARWALKAR, 1996; HOMER, KELLY e DAY, 2014).

Interactions between proteins and polysaccharides and their effect on the thermal stability of compounds have been the focus of many studies. However, results have shown variations according to the macromolecules used. VARDHANABHUTI et al. (2009) examined the thermal stability of  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) in the presence of dextran sulfate at different pH values over a temperature range of 25 to 110 °C changing at the rate of 1 °C / min. The study found that the interaction reduced thermal denaturation of protein at lower pH values. Another study evaluated the effect of dextran on casein and found that the glass transition value ( $T_g$ ) of dextran decreased while crystallization temperature increased in the presence of casein (HERNÁNDEZ et al., 2011). These phase transitions must be considered in food processing and storage.

When interactions between soy protein fractions (7S and 11S) and chitosan (CS) were studied during temperature increases from 30 to 120 °C at the rate of 5 °C / min, the measurements revealed endothermic processes indicating the denaturation point (YUAN et al., 2014). According to the authors, the interaction with formation of coacervates substantially increased  $\Delta H$  and  $T_m$  compared to the protein alone. This suggested that the coacervation between soy protein fractions and chitosan increased the thermal stability of the protein. In contrast, a different study on the thermal behavior of whey protein isolates (WPI) in the absence or presence of pectin found that molecular interactions reduced the stability of WPI (MAO et al., 2014).

SPADA et al., 2015 investigated of the interactions between different polysaccharides and soy proteins using a DSC, they observed that both position and the shape of the melting peak of the mixtures were remarkably dependent on the pH and soy protein/polysaccharide ratio. At the end of the study the authors concluded that although contributes to choose the

best condition under which, mixtures can be used in food formulations, this analysis could not been a good tool to detect the formation of coacervates.

## 2.2. Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC measures the energy released during molecular interactions and is used for the qualitative and quantitative characterization the interactions (HAPPI EMAGA, et al., 2012; OGNJENOVIĆ et al., 2014). A typical interaction system involves the vacant binding site, the free ligand, and the complex at some equilibrium in solution. Understanding the interaction requires knowing the equilibrium constant for the binding process ( $K$ ) and the binding stoichiometry ( $n$ ). Equations 5 through 8 illustrate the relevant thermodynamic relationships (FREREY e LEWIS, 2008).

$$K_{eq} = K = \left\{ \frac{[complex]}{[receptor]} \cdot [ligant] \right\}_{equilibrium} \quad (5)$$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (6)$$

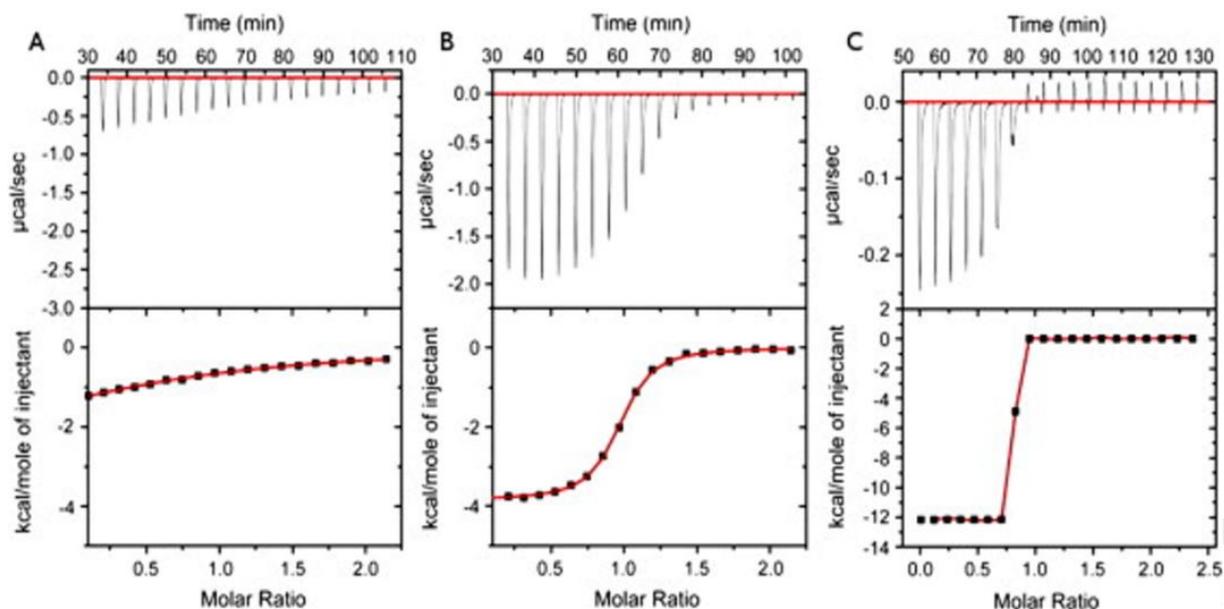
$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \left\{ \frac{[complex]}{[receptor]} \cdot x[ligant] \right\}_{actual} \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Where  $\Delta G^{\circ}$  is the standard Gibbs free energy change,  $R$  is the gas constant, and  $T$  is the temperature in Kelvin.

Among the techniques that evaluate the thermodynamic interactions, only ITC provides several thermodynamic parameters ( $K$ ,  $n$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ , and  $\Delta S$ ) in a single titration. It requires only small amounts of sample and does not need molecular marker which may generate interference (RAJARATHNAM e RÖSGEN, 2014; FREYER e LEWIS, 2008). Enthalpy change ( $\Delta H$ ) is related to the energy involved in molecular interactions and reflects the contribution of hydrogen bonding, electrostatic interactions, and Van der Waals forces. Entropy change ( $\Delta S$ ) reflects a change in the degree of order of the system and it is related to hydrophobic interactions and is the thermodynamic property that describes how the molecules are distributed in a system (PIRES et al., 2009; BOU-ABDALLAH e TERPSTRA, 2012).

A graphical representation of energy ( $\mu\text{cal}$ ) as a function of time (s) after 18 titrations by ITC is shown in Figure 1. At the beginning of the titration, the energy absorbed is greater due to interactions. Over time, the rate of energy decreases until complete saturation of binding sites is achieved. From each peak obtained in the titration, a function chart of molar ratio can also be constructed, which allows the variation of free energy ( $\Delta G$ ), equilibrium binding constant ( $K$ ), and the stoichiometry ( $n$ ) of reaction to be calculated. Greater slopes of the curve represent higher binding affinities ( $K$ ) (PIRES et al., 2009; CERVANTES et al., 2011).



**Figure 1:** Graphical representation of data generated by the ITC due to the increase in binding affinity. Low (A), moderate (B) and High affinity (C). (CERVANTES et al., 2011).

The instrument consists of two identical cells. One is a reference, which contains only buffer solution, and the other contains the macromolecules solutions. The cells are made of material that conduct heat exceptionally well and are thermally stable, with a constant temperature variation of approximately  $10^{-4}$  K (PIRES et al., 2009). Small aliquots of the titrant are injected through a syringe into the sample cell. When the reaction occurs, there is release (exothermic reaction) or absorption (endothermic reaction) of energy that the calorimeter detects (HEERKLOTZ e SEELIG, 2000). The number, volume, and time of injections, as well as the concentration of the samples, the cell temperature, and rotation speed must be properly adjusted. Furthermore, it is important that a control experiment is carried containing only buffer solution to correct for undesired thermal effects that are related to the energy changes during dilution and mixing (PIRES et al., 2009; BOU-ABDALLAH e TERPSTRA, 2012).

Most ITC calorimeters use the power compensation method that reduces temperature in the sample cell if the reactions are exothermic, and increases temperature if they are endothermic. The energy absorbed or released during the titration will be directly proportional to the interactions (BOU-ABDALLAH e TERPSTRA, 2012). The most modern equipment are called “nanocalorimeters” and can precisely measure very small energy changes ( $<0.2$  mJ) and maintain a baseline of  $\pm 0.1$  mW with a temperature stability of  $\pm 0.0001$  °C (BOU-ABDALLAH e TERPSTRA, 2012; GAISFORD e BRUCKTON, 2001).

Several studies have demonstrated that ITC used in the study of macromolecular interactions is both noninvasive and generates a set of thermodynamic parameters.

GUZEY e MCCLEMENTS (2006), showed an exothermic interaction between chitosan and  $\beta$ -LG in the pH range in where the polymers have opposite charge. The interaction was more exothermic at pH 6.0, with a molar ratio of about one  $\beta$ -LG molecule to six chitosan molecules. Similarly, interactions between chitosan and WPI were demonstrated to occur through electrostatic bonds and were dependent on pH, ionic strength, and molar ratio (BASTOS et al., 2010).

In another study, the interaction between  $\beta$ -LG and gum arabic in the presence of an antioxidant were identified. The study reported a two-step interaction, an exothermic step that

was mostly controlled by favorable enthalpy due to electrostatic interactions and a second endothermic step that was driven by entropy, likely due to the release of linked water molecules. In addition, this study evaluated the influence of temperature and concluded that the contribution of enthalpy or entropy were highly dependent on temperature (ABERKANE et al., 2012).

ITC has also been used to study the thermodynamic of complex of coacervates used in developing new products and encapsulation of bioactive compounds, such as omega-3 fatty acids and vitamin D<sub>3</sub> (WATER et al., 2014; DONG et al., 2015; DIARRASSOUBA et al., 2015; ERATTE et al., 2015). HOSSEINI et al. (2013) submitted  $\kappa$ -carrageenan biopolymer (KC) and  $\beta$ -LG in ultrasound. They found that KC-BLG interactions were exothermic with negative and favorable enthalpy and negative and unfavorable entropy. A significant reduction in the affinity constant of the formation of complex coacervates suggests a conformational change. Interactions between lactoferrin and  $\beta$ -LG isoforms were also identified. In this case, ITC revealed an exothermic interaction with contributions from both enthalpy and entropy contributions. The study also found that the interaction involved at least two steps requiring two independent binding sites (TAVARES et al., 2015).

The simultaneous use of DSC and ITC was performed by WATER et al. (2014). The authors evaluated the formation of complex coacervates between hyaluronic acid and lysozyme. They found using ITC, that the interaction was driven entropically, characterized by a slightly favorable binding enthalpy and a highly favorable entropic contribution. Nonetheless, DSC showed a reduction of  $T_m$  of about 1 °C after the complex was formed. Thus, formation of the complex did not affect the secondary structure of the protein and did not negatively impact its thermal stability.

### 3. CONCLUSION

Proteins and polysaccharides are part of most food matrices. Understanding the thermodynamic behavior and interactions with other macromolecules would be essential for food applications. We have presented examples of the efficiency and applicability of calorimetry in studies of the interactions between macromolecules and highlighted the importance of thermodynamic parameters in the interpretation of the obtained results. The simultaneous use of DSC and ITC are important tools that can provide a better understanding of the macromolecular interactions that occur during the processing and storage of food.

### 4. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq and FAPERJ for the financial support.

### 5. REFERENCES

- ABERKANE, L. et al. Structuration mechanism of  $\beta$ -lactoglobulin – acacia gum assemblies in presence of quercetin. **Food Hydrocolloids**, v.29, n.1, p.9–20, 2012.
- ARMSTRONG, A. et al. Structural and Thermodynamic Insights into the Recognition of Native Proteins by Anti-Peptide Antibodies. **Journal of Molecular Biology**, v.425, n.11, p.2027–2038, 2013.

BASTOS, D. S. et al. 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.

BOU-ABDALLAH, F.; TERPSTRA, T. R. The thermodynamic and binding properties of the transferrins as studied by isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1820, n.3, p.318–325, 2012.

BROWN, M. E. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry - Principles and Practice** v.1, p. 1-755, 2008. Elsevier Science B.V.

CAO Z., et al. Potential toxicity of sarafloxacin to catalase: Spectroscopic, ITC and molecular docking descriptions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.115, p.457–463, 2013.

CERVANTES, C. F. et al. The RelA nuclear localization signal folds upon binding to I $\kappa$ B $\alpha$ . **J. Molecular Biology**, v.405, n.3, p.754–764, 2011.

DAMODARAN, S.; AGYARE, K.K. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n.1, p.12–18, 2013.

DIARRASSOUBA, F. et al. Self-assembly of  $\beta$ -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. **Food Chemistry**, v.173, p.203–209, 2015.

DONG, D. et al. Mutual titration of soy proteins and gum arabic and the complexing behavior studied by isothermal titration calorimetry, turbidity and ternary phase boundaries. **Food Hydrocolloids**, v.46, p.28–36, 2015.

ERATTE, D. et al. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. **Journal of Functional Foods**.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. **Methods in Cell Biology**, v.84, p.79–113, 2008.

GAISFORD, S.; BUCKTON, G. Potential applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceuticals. **Thermochimica Acta**, v.380, n.2, p.185–198, 2001.

GUZEY, D. ; MCCLEMENTS, D. J. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v.20, n.1, p.124–131, 2006.

HAPPI EMAGA, T. et al. Purification of pectin from apple pomace juice by using sodium caseinate and characterisation of their binding by isothermal titration calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.29, p.211-218, 2012.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.69-85, 2000.

HEERKLOTZ, H. The microcalorimetry of lipids membranes. **Journal of Physics Condensed Matter**, v.16, n.15, p.441–467, 2004.

HERNÁNDEZ, G. H. S. et al. Phase Transitions of Dairy Proteins, Dextrans and Their Mixtures as a Function of Water Interactions. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.5, p.1311–18, 2011.

HOMER, S. et al. Determination of the thermo-mechanical properties in starch and starch/gluten systems at low moisture content – A comparison of DSC and TMA. **Carbohydrate Polymers**, v.108, p.1–9, 2014.

HOSSEINI, S. M. H. et al. Complex coacervation of  $\beta$ -lactoglobulin– $\kappa$ -Carrageenan aqueous mixtures as affected by polysaccharide sonication. **Food Chemistry**, v.141, n.1, p. 215–222, 2013.

HUANG, T.T. et al. Effect of debranching and heat-moisture treatments on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. **Food Chemistry**, v.187, p.218–224, 2015.

IUPAC. Nomenclature Of Thermometric And Enthalpimetric Methods In Chemical Analysis. STAHL, J. W. **Pure & Applied Chemistry**, v. 66, N. 12, p. 2487-2492, 1994.

IUPAC. ICTAC nomenclature of thermal analysis. LEVER, T. et al. **Pure & Applied Chemistry**, v.86, n.4, p.545–553, 2014.

JOHNSON, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.531, n.1–2, p.100–109, 2013.

LIU, Y. et al. Study of glass transition and enthalpy relaxation of mixtures of amorphous sucrose and amorphous tapioca starch syrup solid by differential scanning calorimetry (DSC). **Journal of Food Engineering**, v.81, n.3, p.599–610, 2007.

MA, C.; HARWALKAR, V. Effects of medium and chemical modification on thermal characteristics of  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Thermal Analysis**, v.47, p.1513–1525, 1996.

MAO, L. et al. Evaluation of volatile characteristics in whey protein isolate–pectin mixed layer emulsions under different environmental conditions. **Food Hydrocolloids**, v.41, p.79–85, 2014.

NADEMI, Z. et al. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. **Molecular Immunology**, v.54, n.2, p.227–232, 2013.

O'BRIEN, R., LADBURY, J.E., CHOWDHRY, B.Z. **Isothermal titration calorimetry of biomolecules**. In: HARDING, S.E., CHOWDHRY, B.Z. Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry. Oxford University Press, New York, 2001, p. 263–286.

OGNJENović, J. et al. Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg White. *Food Chemistry*, v.164, p.36–43, 2014.

PEROZZO, R. et al. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of receptor and signal transduction research*, v. 24, n.1-2, p. 1-52, 2004.

PIRES, A. C. S. et al. Microcalorimetry a food science and engineering approach. In: COIMBRA, J.; TEIXEIRA, J.A. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 201-218.

PRIVALOV, P. L. Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures. *Journal of Solution Chemistry*, v.44, n.5, p.1141–1161, 2015.

PRIVALOV, P. L.; DRAGAN, A. I. Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophysical Chemistry*, v.126, n.1–3, p.16–24, 2007.

RÀFOLS, C. et al. Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). *Talanta*, v.130, p.241–250, 2014.

RAJARATHNAM, K.; RÖSGEN, J. Isothermal titration calorimetry of membrane proteins — Progress and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1838, n.1, p.69–77, 2014.

RUSSEL, M. et al. Different technique of microcalorimetry and their applications to environmental sciences: A review. *The Journal of American Science*, (n.d.), 2009, p.194–208, 2009.

SPADA, J. C. et al. Interactions between soy protein from water-soluble soy extract and polysaccharides in solutions with polydextrose. *Carbohydrate Polymers*, v.134, p.119–127, 2015.

TABILO-MUNIZAGA, G. et al. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, v.155, p.214–220, 2014.

TAVARES, G. M. et al. Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, v.48, p.238–247, 2015.

THOMSON, J.A., LADBURY, J.E. Isothermal titration calorimetry: a tutorial. In: LADBURY, J.E., DOYLE, M.L. **Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences**. John Wiley and Sons, Chichester, 2004, p. 37–58.

VARDHANABHUTI, B. et al. Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and dextran sulfate at near neutral pH and their effect on thermal stability. *Food Hydrocolloids*, v.23, n.6, p.1511–1520, 2009.

WADSÖ, I. Bio-calorimetry. *Trends in Biotechnology*, v.4, n.2, p.45–51, 1986.

WATER, J. J. et al. Complex coacervates of hyaluronic acid and lysozyme: Effect on protein structure and physical stability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.88, n.2, p.325-331, 2014.

YUAN, Y. et al. Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength. **Food Research International**, v.55, p.207–214, 2014.

## CONCLUSÕES GERAIS

As interações com formação de complexos coacervados entre as proteínas estudadas Ovalbumina, Lisozima e Albumina sérica bovina (BSA), foram totalmente dependentes do pH e da razão, bem como sofreram influencia da força iônica. A coacervação ocorreu entre os pI das proteínas, próximo a neutralidade de cargas, sugerindo que interações eletrostáticas dirigiram a interação. No entanto, foi revelado pelo espectro no infravermelho que ligações de hidrogênio também participam no processo de interação. A formação de complexos insolúveis entre Ovalbumina e Lisozima se deu em uma ampla faixa de pH de 10,0 a 4,0 e a maior turbidez foi verificada na razão  $r=1$  e entre BSA e Lisozima a coacervação ocorreu entre pH 8,0 e 10,5 e a razão  $r=0,5$  apresentou maior formação. A complexação entre BSA e Lisozima foi mais sensível as adições de NaCl tendo reduzido significativamente a interação na concentração de 0,01 mol/L diferente de Ovalbumina e Lisozima que apresentou uma acentuada redução de turbidez a partir de 0,05 mol/L. Os complexos coacervados formados apresentaram tamanho de partícula em torno de 2  $\mu\text{m}$  e microscopicamente apresentaram formato esférico e aspecto vesicular. O ITC revelou que a interação entre Ovalbumina e Lisozima foi exotérmicas tendo ocorrido em duas etapas e o DSC revelou que complexos entre BSA e Lisozima tiveram estabilidade térmica intermediária a das proteínas isoladas. Esse estudo demonstrou que a formação de complexos coacervados entre proteínas de mesma origem assim como de origens diferentes é possível e que as estruturas formadas poderiam ter uma aplicação futura na indústria de alimentos como agente microencapsulante de bioativos alimentares como vitaminas e pigmentos.