



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARTIN DANIEL AYA RODRIGUEZ

**IMPACTO DA ESTRUTURA DA β -LACTOGLOBULINA EM SUA
COACERVAÇÃO COMPLEXA COM A GELATINA DO TIPO A**

**IMPACT OF THE PROTEIN STRUCTURE OF β -LACTOGLOBULIN ON ITS
COMPLEX COACERVATION WITH TYPE A GELATIN**

CAMPINAS

2021

MARTIN DANIEL AYA RODRIGUEZ

**IMPACTO DA ESTRUTURA DA β -LACTOGLOBULINA EM SUA
COACERVAÇÃO COMPLEXA COM A GELATINA DO TIPO A**

**IMPACT OF THE PROTEIN STRUCTURE OF β -LACTOGLOBULIN ON ITS
COMPLEX COACERVATION WITH TYPE A GELATIN**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Dissertation presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in FOOD SCIENCE.

Orientador: Prof. Dr. GUILHERME MIRANDA TAVARES

**ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSAL FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
MARTIN DANIEL AYA RODRIGUE, ORIENTADO
PELO PROF. DR. GUILHERME MIRANDA TAVARES.**

CAMPINAS

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano – CRB 8/5816

Ay11i Aya Rodriguez, Martin Daniel, 1994-
Impacto da estrutura da Beta-lactoglobulina em sua coacervação complexa com a Gelatina do tipo A / Martin Daniel Aya Rodriguez. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Guilherme Miranda Tavares.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Coacervação complexa. 2. Proteínas. 3. Encapsulação. 4. Luteína.
I. Tavares, Guilherme Miranda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Impact of the protein structure of Beta-lactoglobulin on its complex coacervation with type A Gelatin

Palavras-chave em inglês:

Complex
coacervation
Proteins
Encapsulation
Lutein

Área de concentração: Ciência de Alimentos
Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Guilherme Miranda Tavares
[Orientador]
Naaman Francisco
Nogueira Silva
Raphaela de Araújo
Montovani

Data de defesa: 04-11-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4724-7049>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7408066498599287>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. Guilherme Miranda Tavares
ORIENTADOR – DCAN/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Naaman Francisco Nogueira Silva
UFSCAR

Dra. Raphaela de Araújo Mantovani
DCAN/FEA/UNICAMP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de vir ao Brasil para fazer o mestrado e conhecer uma nova cultura, aos meus pais, minhas irmãs e meu vovô que sempre me motivaram para ser uma melhor pessoa e profissional, sem importar a distância estiveram dia a dia do meu lado para me apoiar a continuar com essa etapa tão importante em minha vida.

À Maria Paula, por ser essa pessoa motivadora e por ser a pessoa que mais me ajudou nos momentos difíceis, com palavras de motivação, com sua energia positiva e sua boa companhia para me animar e que eu pudesse continuar nessa hermosa aventura, porque sem ela não teria conseguido terminar, agradeço por sempre acreditar em mim.

A meus dois melhores amigos (o Jean e o Oscar) e minha família da Colômbia que dia a dia me ajudaram desde a distância e me enviaram sempre o carinho e apoio desde lá.

Ao professor Guilherme M. Tavares por sempre ter a melhor disposição para me ajudar com sua orientação e me ensinar com seu conhecimento.

A Rose e a Ana pela colaboração na realização das análises neste trabalho.

A todos meus amigos e colegas do mestrado, me sinto muito afortunado de ter conhecido vocês, principalmente, ao Lucas, Weysser e Willliara que me ajudaram sempre, sobretudo nos primeiros momentos para me adaptar no Brasil, conseguir estudar, entender as disciplinas, além disso, pela sua amizade incondicional.

Aos amigos do laboratório: Alane, Laisa, Livia, Danilo, Lauane, Ernane, Raphaela e Mariana por todas as coisas que me ensinaram, os momentos compartilhados e o crescimento tanto pessoal como profissional que tive ao lado de vocês.

Finalmente, agradeço ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela bolsa de mestrado (número de processo 131782/2019-3) e à FAPESP (número de processo 2017/09214-4). Agradeço ao Laboratório de Química de Alimentos e à FAPESP pelo uso dos Equipamentos Multiusuários (2018/03822-5 e 2018/23752-1). Além disso, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A coacervação complexa heteroproteica (HPCC) é caracterizada pela interação entre proteínas de cargas opostas, desencadeando um equilíbrio entre uma fase líquida rica em proteínas (fase coacervada) e outra fase líquida pobre em proteínas (solução de equilíbrio). Diversos fatores intrínsecos e / ou extrínsecos do meio reacional afetam a HPCC, incluindo a natureza das proteínas envolvidas e o seu estado conformacional. Apesar da existência de generalidades no processo de HPCC, a forma como cada variável impacta o processo é dependente das proteínas envolvidas. Neste trabalho foi avaliado o processo de HPCC entre a gelatina do tipo A (GA) e a β -lactoglobulina (β -LG) apresentando diferentes estados estruturais. A β -LG foi obtida a partir do isolado proteico de soro de leite e posteriormente submetida a desnaturação termoinduzida (β -LG (TT)). O processo de HPCC entre GA e β -LG e entre GA e β -LG-TT foi avaliado em função do pH, força iônica e razão mássica das proteínas envolvidas para determinar as condições ideais de complexação. Complementarmente, os diferentes coacervados complexos foram avaliados quanto a sua eficiência de encapsulação (EE) da luteína. O tratamento térmico ocasionou a exposição dos grupos hidrofóbicos e sulfidrilas livres na estrutura da β -LG. As condições ideais de coacervação complexa entre GA e β -LG e entre GA e β -LG-TT foram identificadas em pH 6,5; mínima força iônica e razão mássica GA: β -LG de 2,5:1. O tratamento térmico aplicado à β -LG afetou negativamente o rendimento de coacervação complexa com a GA, em comparação à β -LG. Os coacervados complexos entre GA e β -LG e entre GA e β -LG (TT) exibiram uma elevada EE de luteína.

Palavras-chave: coacervação complexa, proteínas, encapsulação, luteína

ABSTRACT

Heteroprotein complex coacervation (HPCC) is characterized by the interaction between oppositely charged proteins, triggering equilibrium between a protein-rich liquid phase (coacervate phase) and another protein-poor liquid phase (equilibrium solution). Several intrinsic and/or extrinsic factors affect HPCC, including the nature of the proteins involved and their structural aspects. In this work, the HPCC process between type A gelatin (GA) and β -lactoglobulin (β -LG) displaying different structural states was evaluated. β -LG was obtained from whey protein isolate and subsequently subjected to thermo-induced denaturation (β -LG (TT)). The HPCC between GA and β -LG and between GA and β -LG (TT) was evaluated as a function of pH, ionic strength and mass ratio of the involved proteins to determine the ideal conditions for complexation. In addition, the different complex coacervates were evaluated for their lutein encapsulation efficiency (EE). The heat treatment promoted the exposure of hydrophobic and free sulfhydryl groups of the β -LG structure. The ideal conditions for complex coacervation between GA and β -LG and between GA and β -LG (TT) were identified at pH 6.5; minimum ionic strength and GA: β -LG mass ratio of 2.5:1. The heat treatment applied to β -LG negatively affected its complex coacervation yield with GA compared to the one observed before heat treatment. The complex coacervates between GA and β -LG and between GA and β -LG (TT) exhibited a high lutein EE.

Keywords: complex coacervation, proteins, encapsulation, lutein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese das principais técnicas analíticas aplicadas na caracterização da coacervação complexa heteroproteica, com a indicação de sua aplicação em diferentes etapas do processo. Abreviações: Titulação calorimétrica isotérmica (ITC); Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); Dicroísmo Circular (CD); Espalhamento dinâmico de luz (DLS); Microscopia de força atômica (AFM); Microscopia eletrônica de transmissão/varredura (TEM/SEM); Microscopia de campo claro (BFM); Microscopia de contraste de fase (PCM); Microscopia confocal de varredura laser (CLSM) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Figura 2: Estrutura da β -LG (PDB: 1GX8), com a indicação de potenciais sítios de interação de moléculas de caráter hidrofóbico.

Figura 3: Possíveis ordens de organização das cadeias α para a conformação da gelatina (adaptado de (Guo et al., 2003)).

Figura 4: Etapas principais da coacervação complexa. (i) mistura de dispersões de polímeros, (ii) mistura turva e formação de estruturas supramoleculares, (iii) associação dos complexos e separação de fases.

Figura 5: Representação esquemática do mecanismo HPCC entre apo α -LA e LYS. Adaptado: (Salvatore et al., 2011). Autorização de uso apresentada nos anexos.

Figura 6: Determinação do desenvolvimento da complexação entre proteínas através das medições de turbidez em função de diferentes fatores. (A) Turbidez dos sistemas β -LG + LYS e β -LG + Napin de colza (NAP) em função do pH e razão molar de mistura (Ainis et al., 2019). (B) Turbidez e potencial-zeta de misturas entre as gelatinas do tipo A e do B em função do pH (Tiwari et al., 2008). (C) Cinética da evolução da turbidez de misturas contendo β -LG e LF com diferentes concentrações de ANS (Tavares et al., 2017). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

Figura 7: Avaliações coacervação complexa entre proteínas através do potencial (ζ). A) Sistema ilustrativo do potencial (ζ); B) Determinação do potencial zeta das gelatinas do tipo A e B e seus complexos na razão mássica de 3:2 (Tiwari et al., 2008). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

Figura 8: Termogramas de ITC obtidos no estudado da interação entre proteínas. A) Esquema da montagem da titulação calorimétrica isotérmica; B) Modelo dos termogramas do ITC, superior: dados brutos, inferior: dados integrados de entalpia versus razão entre as moléculas (Zheng et al., 2020). C) e D) Termogramas da complexação de β -LG / LYS e β -

LG / NAP, respectivamente, superior: dados brutos e inferior: entalpia e turbidez dos complexos em função da razão molar (Ainis et al., 2019). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

Figura 9: Caracterização da polidispersidade do sobrenadante da coacervação complexa entre as gelatinas do tipo A e do tipo B em função do tempo (Tiwari et al., 2008). A autorização de uso da figura está apresentada nos Anexos.

Figura 10: Imagens de microscopias de estruturas supramoleculares heteroproteicas. (A) Morfologia dos coacervados complexos formados entre GA e Cas, observados através da microscopia de campo claro (Zhao et al., 2020). (B) Caracterização de agregados amorfos da mistura entre β -LG e LYS por microscopia de campo claro (Ainis et al., 2019). (C) e (D) Avaliação da morfologia dos complexo entre LF e β -LG em presença da vitamina B9 por meio da microscopia de contraste de fase (Chapeau et al., 2016). (E) e (F) Morfologia e distribuições das proteínas da HPCC de β -LG / LF e de GA / LYS, respectivamente, avaliados por CLSM (Antonov et al., 2017; Kizilay et al., 2014). (G) e (H) Imagens de SEM e TEM da HPCC entre β -LG e LYS carregando Vitamina D3 (Diarrassouba et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

Figura 11: (A) Termograma ilustrativo do desdobramento (desnaturação) de uma proteína; (B) Esquema ilustrativo da montagem do sistema de DSC; (C) Termogramas dos complexo formados entre β -caseína e LYS em diferentes razões molares (de 0 a 2) por DSC (Wu et al., 2011); (D) Caracterização de água estrutural em coacervados complexos formados por β -LG e LF, por DSC (Du et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas no Anexos.

Figura 12: Caracterização de proteínas tanto individualmente quando participando de coacervados complexos, através do FTIR e CD. (A): Espectros do FTIR de β -LG, BSA e o sobrenadante de BSA / GB / β -LG, utilizados para determinar o conteúdo de β -LG no sobrenadante (Pathak et al., 2015); (B): Espectros do FTIR de isolado proteico de soja (SPI), LF e seus complexo, utilizados para avaliar as mudanças estruturais das proteínas decorrentes de sua interação (Zheng et al., 2020); (C) Conteúdo estimado de α -hélices obtidos através de dados de CD para misturas de BSA / GB e β -LG / GB em diferentes razões de mistura (Pathak et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas no Anexos.

Figura 13: (A) e (B) estudo do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') dos coacervados complexos formados entre β -LG e LF, em função do pH e frequência (ω), respectivamente (Kizilay et al., 2014). (C) e (D) investigação da dependência dos módulos (G') e (G'') dos complexos de GA e GB em função da frequência (ω) (Tiwari et al., 2008).

Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras da Gelatina do tipo A.

Figura 15: Índice de hidrofobicidade superficial (S_0) da β -lactoglobulina antes (β -LG) e após o tratamento térmico de 70 °C por 5 min (β -LG (TT)).

Figura 16: Concentração de grupos SH totais e superficiais da β -LG e da β -LG (TT).

Figura 17: Perfil cromatográfico da β -LG (linha contínua) e da β -LG (TT) (linha pontilhada). A) Cromatografia de Exclusão de Tamanho; B) Cromatografia Líquida em Fase Reversa.

Figura 18: Potencial (ζ) das proteínas individualmente e suas misturas em função do pH, na faixa de 6,0 a 7,0. Linha azul Contínua: GA; Linha cinza continua: β -LG (TT); Linha cinza pontilhada: β -LG; Linha cinza continua com quadrados: GA + β -LG (TT) e Linha cinza pontilhada com esferas: GA + β -LG. Todas as misturas foram feitas na razão 2,5:1 de GA: β -LG.

Figura 19: Medições de turbidez variando o pH de 6,0 a 7,0. A) turbidez dos complexos de GA + β -LG em diferentes razões mássicas; B) turbidez das misturas de GA + β -LG (TT) testando várias razões mássicas. Linhas azuis R = 2,5, linhas vermelhas R = 2,5:1, linhas verdes R = 2,8:1, linhas roxas R = 3:1, linhas azuis claras R = 3,2:1, e linhas laranjas R = 3,5:1.

Figura 20: Cinética de turbidez das misturas de proteínas. A) Misturas entre GA + β -LG; B) Misturas de GA + β -LG (TT).

Figura 21: Influência da força iônica na complexação entre GA + β -LG e entre GA + β -LG (TT) na razão mássica de 2,5:1 e pH 6,5. Linha cinza pontilhada GA + β -LG e linha cinza continua GA + β -LG (TT).

Figura 22: Imagens de microscopia óptica na ampliação de 800 x das misturas GA + β -LG e GA + β -LG (TT) na razão mássica de 2,5:1. A) GA + β -LG em pH 6,25; B) GA + β -LG (TT) a pH 6,25; C) GA + β -LG a pH 6,5; e D) GA + β -LG (TT) a pH 6,5.

Figura 23: Rendimentos de recuperação proteica nos coacervados variando a razão mássica das proteínas nas misturas. A) rendimentos a pH 6,5; e B) rendimentos a pH 6,25 da GA com β -LG com ou sem TT. (*) Rendimento significativamente maior que os demais rendimentos observados. (**) Ausência de diferença significativa entre os dados.

Figura 24: Espectro de absorção (a e b) e de fluorescência (A e B) da proteína (1 μ M), pH 6,5 na presença de concentrações crescentes de luteína (0 a 8 μ M). A,a) β -LG / Luteína; e, B,b) β -LG (TT) / Luteína.

Figura 25: Relação de Stern-Volmer da interação entre (A) β -LG / lutein; e entre (B) β -LG (TT) / lutein. β -LG, em pH 6,5.

Figura 26: Rendimento da luteína encapsulada na fase coacervada formada por GA/ β -LG e GA/ β -LG (TT).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições reacionais ideais (pH, força iônica e estequiometria de proteínas) de HPCC envolvendo gelatinas e/ou β -LG.

Tabela 2. Parâmetros de interação entre luteína e β -LG e entre luteína e β -LG (TT).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REVISÃO BIBLOGRÁFICA	21
3.1	Prefácio	22
3.2	Características das proteínas de interesse: β -LG e GA.....	23
3.3	Coacervação Complexa Heteroproteica (HPCC)	26
3.3.1	Mecanismo da coacervação complexa.....	27
3.3.2	Influência dos parâmetros reacionais na HPCC	29
3.4	Principais técnicas analíticas para a caracterização da HPCC.....	33
3.4.1	Turbidimetria	33
3.4.2	Potencial zeta (ζ).....	35
3.4.3	Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)	37
3.4.4	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	39
3.4.5	Caracterização morfológica das estruturas supramoleculares por diferentes técnicas de microscopia	40
3.4.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	43
3.4.7	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada Fourier (FTIR) e Dicroísmo Circular (CD).....	44
3.4.8	Reologia dos coacervados complexos heteroproteico	46
3.5	Potenciais aplicações da HPCC	48
3.5.1	HPCC para a encapsulação de compostos bioativos	48
3.5.2	Aplicações emergentes da HPCC	49
3.6	Referências	50

4	IMPACTO DA ESTRUTURA DA BETA-LACTOGLOBULINA EM SUA COACERVAÇÃO COMPLEXA COM A GELATINA DO TIPO A, E NA HABILIDADE DOS COACERVADOS FORMADOS EM ENCAPSULAR LUTEÍNA	65
4.1	Introdução	67
4.2	Material e métodos	69
4.2.1	Materiais	69
4.2.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	69
4.2.3	Purificação e modificação estrutural da β -LG	69
4.2.4	Determinação hidrofobicidade superficial.....	70
4.2.5	Determinação da concentração de grupos sulfidril livre (SH).....	70
4.2.6	Cromatografia de exclusão de tamanho.....	71
4.2.7	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase-reversa.....	71
4.2.8	Preparação das soluções mãe e dos coacervados complexos	71
4.2.9	Medições de potencial zeta (ζ).....	72
4.2.10	Turbidimetria das misturas	72
4.2.11	Microscopia óptica dos complexos.....	72
4.2.12	Quantificação do rendimento da coacervação complexa.....	73
4.2.13	<i>Quenching</i> de fluorescência entre luteína e β -LG e entre luteína e β -LG (TT).....	73
4.2.14	Eficiência de encapsulação da luteína pelos coacervados complexos.....	74
4.2.15	Análise Estatística.....	75
4.3	Resultados e discussão.....	75
4.3.1	Caracterização da gelatina do tipo A (GA) por SDS-PAGE	75
4.3.2	Caracterização e efeito do tratamento térmico na estrutura da β -LG	76
4.3.3	Potencial zeta (ζ) das proteínas individualmente e em mistura	79
4.3.4	Avaliação turbidimétrica das misturas GA: β -LG e GA: β -LG (TT): efeito do pH, cinética de complexação e força iônica	81
4.3.5	Microscopia óptica das estruturas supramoleculares formadas.....	84
4.3.6	Recuperação proteica da fase “coacervada”	85

4.3.7	Interação molecular da luteína com a β -LG e com a β -LG-TT	86
4.3.8	Rendimento de encapsulação da luteína nos coacervados complexos	89
4.4	Conclusão	90
4.5	Agradecimentos	91
4.6	Referências	91
5	Conclusão geral	94
5.1	Conclusão geral	95
6	referências	96
6.1	Referências	97
7	ANEXOS.....	112
7.1	Anexos de autorização de uso das figuras	113
7	ANEXOS.....	112
7.1	Anexos de autorização de uso das figuras	113

1 INTRODUÇÃO

Proteínas são biopolímeros versáteis e de grande relevância na indústria de alimentos, sobretudo por sua importância nutricional, capacidade de modular a textura de produtos e de estabilizar emulsões e espumas (Ach et al., 2015; Bouyer et al., 2011; Jones et al., 2010; Matalanis et al., 2011). Em complemento à sua relevância tecnológica, tais polímeros vêm sendo comumente aplicados pela comunidade científica no desenvolvimento de estruturas supramoleculares inovadoras como filmes inteligentes, nanotubos e coacervados (Krebs et al., 2008; McManus et al., 2016; Mezzenga & Fischer, 2013; Tiwari et al., 2008). Os coacervados, por exemplo, tem sido propostos para a encapsulação de compostos bioativos, purificação de moléculas e produção de formulações para alimentação parenteral (Donald, 2008; Pathak et al., 2015; Wang et al., 2014; Weinbreck et al., 2003). Dentre as aplicações sugeridas para a coacervação complexa entre proteínas, a encapsulação de compostos bioativos de interesse se destaca pelo potencial de tais estruturas em proteger, estabilizar, transportar e liberar de forma controlada esses compostos (Chapeau et al., 2016).

A coacervação consiste em um fenômeno de equilíbrio em um sistema coloidal caracterizado pela formação de duas fases líquidas distintas, uma com maior concentração de coloide, denominada fase coacervada, e outra menos concentrada, conhecida como solução de equilíbrio (McNaught & Wilkinson., 1997). Quando a formação dessas duas fases é desencadeada pela interação entre coloides de cargas opostas, o fenômeno é denominado coacervação complexa (McNaught & Wilkinson., 1997).

Apesar da coacervação complexa entre diferentes coloides apresentar um mecanismo genérico, a coacervação complexa heteroproteica (HPCC) apresenta certas peculiaridades. Em complemento aos parâmetros reacionais clássicos que condicionam a coacervação complexa, tais como concentração de coloides, pH e força iônica, na HPCC também é afetada por variações sutis do sistema. A título de exemplo, a modificação de poucos aminoácidos na estrutura da proteína, pode desencadear a transição de um regime de coacervação complexa para a formação de agregados amorfos (equilíbrio líquido-sólido) e / ou a formação de complexos moleculares solúveis (Croguennec et al., 2017). Portanto, compreender como os fatores adjacentes ditam as interações entre as proteínas é determinante para a elucidação do seu mecanismo de coacervação complexa (Tavares et al., 2015).

No estudo da HPCC, a β -lactoglobulina (β -LG) se destaca por ser uma das proteínas alimentares melhor caracterizadas do ponto de vista estrutural (Sarwar, 1997), e por ser largamente aplicada em trabalhos sobre HPCC (Tavares et al., 2015)(Yan et al., 2013). A gelatina, por sua vez, é uma proteína obtida pela hidrólise parcial do colágeno (Duconseille et al., 2015), sendo a principal proteína utilizada na microencapsulação de compostos de

interesse por coacervação complexa (Wang et al., 2014). No entanto, não existem relatos na literatura sobre a coacervação complexa entre a β -LG e a gelatina do tipo A (GA), que é obtida por meio da hidrólise ácida do colágeno.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou o processo de HPCC entre a GA e a β -LG apresentando diferentes estados estruturais. Para isso, a β -LG foi obtida a partir de isolado proteico de soro de leite (WPI) comercial pelo método de *salting out*, e então foi submetida a tratamento térmico para indução de mudanças estruturais. O processo de coacervação complexa entre GA e a β -LG antes e depois do tratamento térmico foi avaliado em função da razão proteica, do pH e força iônica. Os coacervados complexos obtidos foram igualmente avaliados quanto ao seu potencial em encapsular a luteína, um carotenoide com potencial de modular positivamente a saúde dos olhos (Giordano & Quadro, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com o intuito de produzir informações relevantes quanto ao impacto da estrutura terciária de proteínas globulares na HPCC e nas propriedades dos coacervados obtidos, o presente projeto avaliou o processo de HPCC entre a GA e a β -LG em diferentes estados estruturais. Em complemento, os coacervados obtidos foram avaliados quanto ao seu potencial em encapsular a luteína.

2.2 Objetivos específicos

Para a execução do presente projeto, três diferentes etapas foram conduzidas: (i) Obtenção, modificação estrutural e caracterização da β -LG; (ii) Determinação das condições ideais e caracterização do processo de coacervação complexa entre a GA e as diferentes formas estruturais da β -LG, e (iii) Avaliação do potencial dos coacervados obtidos para encapsular a luteína.

A β -LG foi obtida a partir do isolado proteico de soro de leite comercial (WPI) por meio da técnica de *Salting Out*, e então submetida a tratamento térmico em via líquida para permitir sua desnaturação parcial, porém sem a formação de agregados insolúveis (70°C / 5min) β -LG (TT). A β -LG antes do tratamento térmico (β -LG) e a β -LG (TT) foram caracterizadas por cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP), hidrofobicidade de superfície e concentração de grupos sulfidril livres superficiais e totais.

O processo de HPCC da GA com a β -LG e com β -LG (TT) foi caracterizado pela determinação da faixa de pH e de força iônica permitindo a formação de coacervados complexos. O impacto da razão mássica entre as diferentes proteínas na morfologia das estruturas formadas, bem como no rendimento de coacervação complexa foi igualmente avaliado.

Por fim, a interação molecular entre a β -LG e a β -LG (TT) com a luteína foi caracterizada por *Quenching* de Fluorescência e a eficiência de encapsulação de luteína pelos coacervados complexos formados por GA / β -LG e GA / β -LG (TT) foi determinada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Prefácio

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos afetam o processo de coacervação complexa entre proteínas (HPCC). Além das interações eletrostáticas, que são o principal motor da associação entre as proteínas para a coacervação complexa, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas também estão frequentemente implicadas na formação dessas estruturas supramoleculares. A natureza, o tamanho e a conformação das proteínas envolvidas, assim como as condições reacionais de concentração proteica, força iônica e pH são capazes de modular o processo de HPCC. Nessas circunstâncias, a diversidade e a complexidade dos fatores envolvidos tornam a caracterização dos processos de HPCC uma tarefa desafiadora.

Este capítulo de *Revisão Bibliográfica* abordará, inicialmente, as características estruturais das proteínas de interesse neste trabalho: β -LG e GA. Em seguida será discutido o processo de HPCC abordando os principais mecanismos envolvidos e a importância dos fatores reacionais na determinação de suas condições ideais. Na sequência, o fundamento das principais técnicas analíticas aplicadas para a avaliação da HPCC, bem como suas vantagens e limitações foram revisadas. A sumarização das técnicas analíticas discutidas neste capítulo de *Revisão Bibliográfica* está apresentada na Fig. 1. Por fim, as potenciais aplicações da HPCC em diferentes campos serão debatidas.

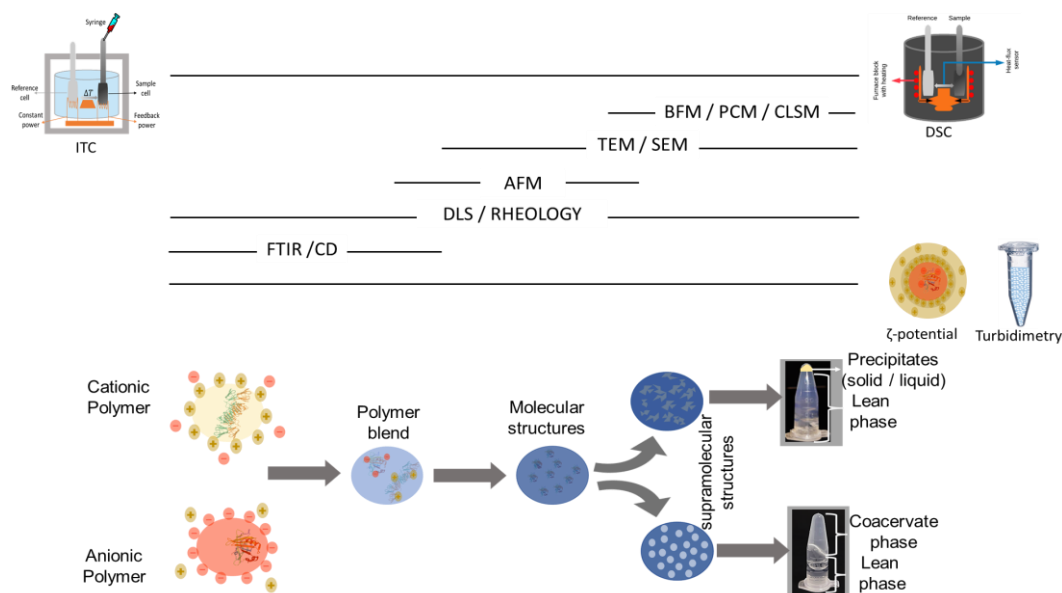


Figura 1: Síntese das principais técnicas analíticas aplicadas na caracterização da coacervação complexa heteroproteica, com a indicação de sua aplicação em diferentes etapas do processo. Abreviações: Titulação calorimétrica isotérmica (ITC); Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); Dicroísmo Circular (CD); Espalhamento

dinâmico de luz (DLS); Microscopia de força atômica (AFM); Microscopia eletrônica de transmissão/varredura (TEM/SEM); Microscopia de campo claro (BFM); Microscopia de contraste de fase (PCM); Microscopia confocal de varredura laser (CLSM) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3.2 Características das proteínas de interesse: β -LG e GA

As proteínas são constituintes importantes da dieta dos seres humanos para o fornecimento de aminoácidos que serão fundamentais na síntese de novas proteínas que contribuirão, por exemplo, com a manutenção da massa muscular, respostas imunes, sinalização celular e catálise de reações (Henley et al., 2010). Além disso, no contexto da indústria de alimentos, ingredientes ricos em proteínas são importantes para a formulação de produtos, por exemplo, por promoverem a melhoria de certas características sensoriais e por poderem ser utilizadas na encapsulação de diferentes compostos bioativos. Entre as diferentes fontes de proteínas utilizadas pela indústria de alimentos, as proteínas do soro do leite e as gelatinas merecem destaque.

As proteínas do soro de leite são proteínas globulares que possuem elevado valor biológico. Essas proteínas são amplamente comercializadas na forma de concentrados e / ou isolados proteicos para aplicações diversas em produtos formulados (Hoffman & Falvo, 2004). A β -LG é a proteína majoritária do soro de leite bovino. Esta é uma proteína ácida, composta por 162 resíduos de aminoácidos organizados de modo a apresentar cerca de 10% de α -hélices, aproximadamente 43% folhas- β e em torno de 47% de estruturas não ordenadas em sua estrutura nativa (Brownlow et al., 1997). Além disso, esta proteína apresenta cinco resíduos de cisteína (Cys): quatro deles envolvidos na formação de duas ligações dissulfeto e um resíduo de Cys possui seu grupo tiol livre, porém oculto no interior da estrutura nativa da proteína (Qin et al., 1998). A presença das duas ligações dissulfeto é importante na estabilidade da estrutura nativa da proteína, que apresenta uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 75 °C (Croguennec, O’Kennedy, et al., 2004).

A β -LG possui duas isoformas principais: β -LG A e β -LG B, cujas massas moleculares (Mw) são 18.362 Da e 18.277 Da, respectivamente (Tavares et al., 2015). Estas duas isoformas se diferem uma da outra apenas pela substituição de dois resíduos de aminoácidos: o resíduo 64 que corresponde ao ácido aspártico na β -LG A, enquanto corresponde a uma glicina na β -LG B; por sua vez o resíduo 118 é uma valina na β -LG A e uma alanina na β -LG B (Qin et al., 2008). Tal modificação ocasiona alterações nas propriedades físico-químicas da β -LG. A β -LG A, por exemplo, é ligeiramente mais

hidrofóbica e mais negativamente carregada (p.I=5,1) do que a β -LG B (p.I=5,2) (Kizilay et al., 2014; Müller, 2013; Qin et al., 2008).

Em solução, a β -LG existe como dímeros não covalentes em equilíbrio com suas formas monoméricas. Esse equilíbrio pode ser afetado pela concentração de proteínas, pH, força iônica e mudanças de temperatura (Croguennec et al., 2017). Além de apresentar excelentes tecno-funcionalidades, como sua elevada solubilidade, boas propriedades gelificantes, emulsificantes e espumantes, a estrutura terciária β -LG tem sido reportada por ser capaz de se ligar a uma série de compostos bioativos (Chatterton et al., 2006; Couto et al., 2021). Três sítios preferenciais de ligações com compostos bioativos hidrofóbicos foram identificados na estrutura da proteína (Fig. 2), o que possibilita a potencial encapsulação, transporte e proteção destas moléculas (El-Salam & El-Shibiny, 2012; Chatterton et al., 2006; Couto et al., 2021; Madureira et al., 2007).

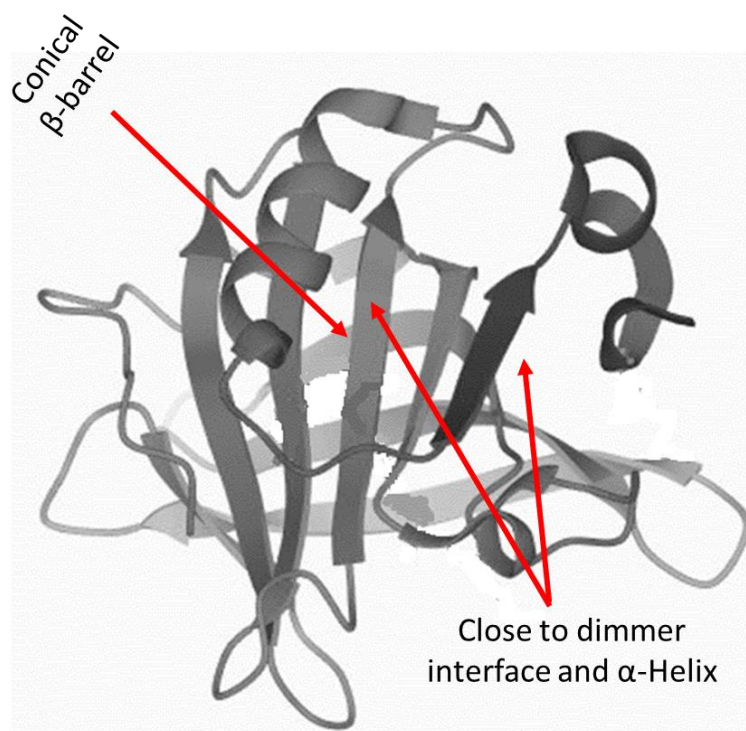


Figura 2: Estrutura da β -LG (PDB: 1GX8), com a indicação de potenciais sítios de interação de moléculas de caráter hidrofóbico.

As gelatinas, por sua vez, estão entre os principais agentes gelificantes utilizados pela indústria de alimentos (Wang et al., 2014). As gelatinas são polímeros naturais obtidos pela degradação hidrolítica parcial do colágeno. Segundo as condições de hidrólise do

colágeno, dois tipos de gelatina podem ser obtidos: (i) gelatina do tipo A (GA), cujo pI é em torno de 9,2, é obtida pelo processo de hidrólise em condições ácidas do colágeno que normalmente apresenta menor complexidade estrutural, encontrado na pele de porco; e (ii) a gelatina do tipo B (GB), cujo pI é aproximadamente 5,0, é obtida pela hidrólise em condições alcalinas do colágeno que comumente apresenta maior complexidade estrutural, encontrado da pele bovina (Lv et al., 2019; Sahoo et al., 2015). No processo de hidrólise em condições alcalinas há um favorecimento da desamidação dos resíduos de asparagina e glutamina formando ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente, portanto, a proporção de ácido glutâmico e ácido aspártico é maior na GB em comparação com a GA (Duconseille et al., 2015; Singh et al., 2002; Taheri et al., 2009). Em complemento, as moléculas de GB apresentam formas mais estendidas em comparação com as moléculas de GA (Croguennec et al., 2017; Veis & Cohen, 1958).

As fontes mais abundantes para a produção das gelatinas são coprodutos de origem animal. A principal matéria prima utilizada, responsável por 46 % do total, é a pele de porco, seguida pelo couro bovino com 29,4 % e dos ossos suínos e bovinos com 23,1 % do total (Alipal et al., 2021; Gómez-Guillén et al., 2009; Sultana et al., 2018). A gelatina oriunda de peixes tem uma participação de apenas 1,5% da produção total de gelatinas (Alipal et al., 2021; Gómez-Guillén et al., 2009; Sultana et al., 2018). Segundo Farris et al., (2010) na gelatina extraída da pele suína, cerca de 66,15 % de todos os seus resíduos de aminoácidos correspondem à glicina, prolina, alanina e hidroxiprolina, enquanto os demais 33,85% se dividem nos outros resíduos de aminoácidos presentes. Em contrapartida, as gelatinas não são consideradas proteínas completas pela deficiência de aminoácidos essenciais (ex. triptofano).

A estrutura química das gelatinas compreende um conjunto de cadeias polipeptídicas. Como apresentado na Fig. 3, as cadeias α são o resultado da hidrólise do colágeno, sendo cadeias polipeptídicas únicas e possuem uma massa molecular por volta de 100 kDa, correspondendo a uma cadeia de primeira ordem. As interações covalentes entre as cadeias α dão origem às cadeias β e γ (Alipal et al., 2021; Mariod & Adam, 2013). Por consequência, as cadeias β são compostas por duas cadeias α covalentemente ligadas, com uma massa molecular cerca de 200 kDa, sendo denominadas cadeias de segunda ordem. Por sua vez, as cadeias γ são o resultado da reticulação de três cadeias α através de interações covalentes, gerando uma estrutura de terceira ordem com um massa molecular de aproximadamente 300 kDa (Díaz et al., 2011; Gomez-Guillen et al., 2011; Taheri et al., 2009). A distribuição dessas estruturas podem ser influenciadas pelos rearranjos espaciais entre as cadeias e por suas diferentes interações (Duconseille et al., 2015; Guo et al., 2003).

Adicionalmente, segundo Elharfaoui et al., (2007) podem existir outras estruturas de gelatinas com maior massa molecular, que são denominadas microgéis, embora não formem géis verdadeiros.

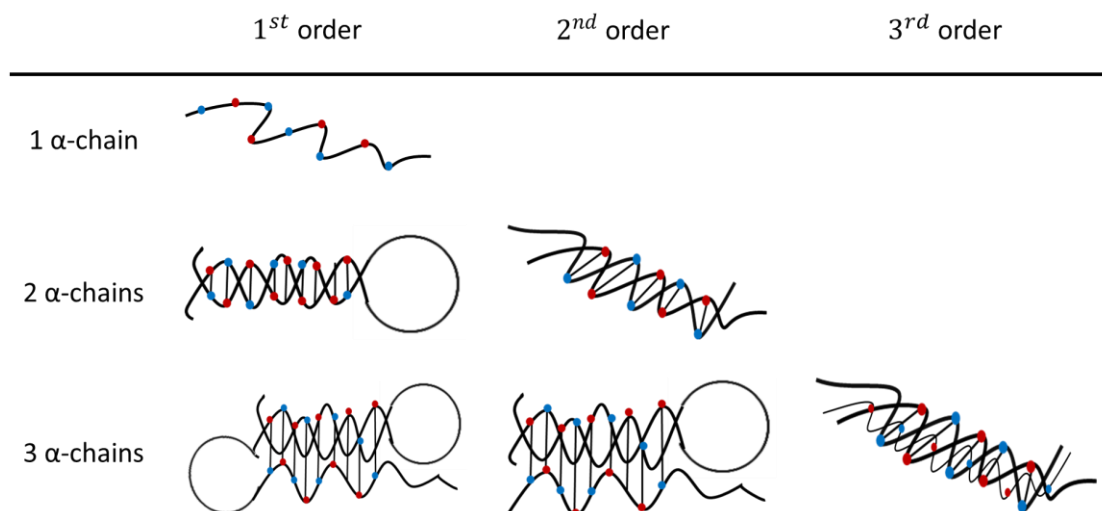


Figura 3: Possíveis ordens de organização das cadeias α para a conformação da gelatina (adaptado de (Guo et al., 2003)).

Assim como a β -LG, as gelatinas também apresentam ótimas propriedades tecnofuncionais. Como baixa concentração crítica de gelificação, alta dispersibilidade em sistemas aquosos, capacidade de retenção da água, de formação de hidrogéis, de formação de filmes de revestimento. Além de sua habilidade para encapsular, proteger e transportar compostos bioativos (Calvarro et al., 2016; Gomez-Guillen et al., 2011; Nur et al., 2014; Ramos et al., 2016). Na indústria de alimentos, de cosméticos e farmacêutica, as gelatinas têm sido amplamente aplicadas como agentes gelificantes, estabilizantes e clarificantes (Elgadir et al., 2013; Alipal et al., 2021; Ma et al., 2016; Mariod & Adam, 2013).

3.3 Coacervação Complexa Heteroproteica (HPCC)

A coacervação é um fenômeno de equilíbrio de um sistema coloidal caracterizado pela formação de duas fases líquidas distintas. Uma com maior concentração de coloide denominada como fase coacervada, e outra menos concentrada conhecida como solução em equilíbrio (McNaught and Wilkinson., 1997). Em função do número de polímeros diferentes envolvidos no processo, a coacervação pode ser classificada em coacervação simples e / ou coacervação complexa (Nairn, 1995). A coacervação simples baseia-se na formação de coacervados contendo um único polímero por desidratação ou déficit de água devido à adição de um sal ou álcool (Bachtsi & Kiparissides, 1996). Em contraponto, quando essa separação

de fases é induzida pela interação de coloides com cargas opostas, o fenômeno é chamado de coacervação complexa (McNaught and Wilkinson., 1997).

Apesar das interações eletrostáticas ditarem os passos iniciais do mecanismo de coacervação complexa, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e outras interações não covalentes podem estar envolvidas. A concentração dos polímeros, sua razão molar e a temperatura do meio reacional têm, igualmente, papel importante na formação dos complexos (Newton & Tarcha, 1991; Xiao et al., 2014). A coacervação complexa entre proteínas e polissacarídeos tem sido extensivamente estudada (Kayitmazer et al., 2013; Kizilay et al., 2011; Schmitt & Turgeon, 2011). Porém, a coacervação complexa entre proteínas (HPCC) é consideravelmente menos descrita na literatura, embora um grande número de grupos de pesquisa tenham começado a se interessar neste fenômeno (Croguennec et al., 2017). A HPCC tem atraído a atenção, principalmente, devido a suas aplicações potenciais como na encapsulação e transporte de compostos bioativos (Chapeau et al., 2016; Tavares et al., 2014).

3.3.1 Mecanismo da coacervação complexa

Assim como em outros sistemas de coacervação complexa, a HPCC também é regida inicialmente por interações eletrostáticas, portanto o processo pode ser afetado pelo aumento da força iônica (Nigen et al., 2007). Normalmente, a HPCC entre proteínas globulares acontece em fraca força iônica e em uma faixa estreita de pH, entre o pI das proteínas envolvidas (Croguennec et al., 2017). Em complemento, outro fator importante na HPCC é a estequiometria entre as proteínas. Diferentemente de outros modelos de coacervação complexa, a HPCC entre proteínas globulares é dependente de uma compensação de carga e tamanho entre as proteínas envolvidas (Desfougères et al., 2010). Segundo Sliwka, (1975), na coacervação complexa, primeiramente, os polímeros opostamente carregados formam complexos a nível molecular. Esses complexos se associam levando a formação de micropartículas da fase coacervada, causando aumento na turbidez da mistura. Após determinado tempo, as micropartículas sofrem um efeito de coalescência e decantam, gerando um modelo bifásico distintamente visível como apresentado na Fig. 4. As mesmas etapas podem ser verificadas na HPCC.

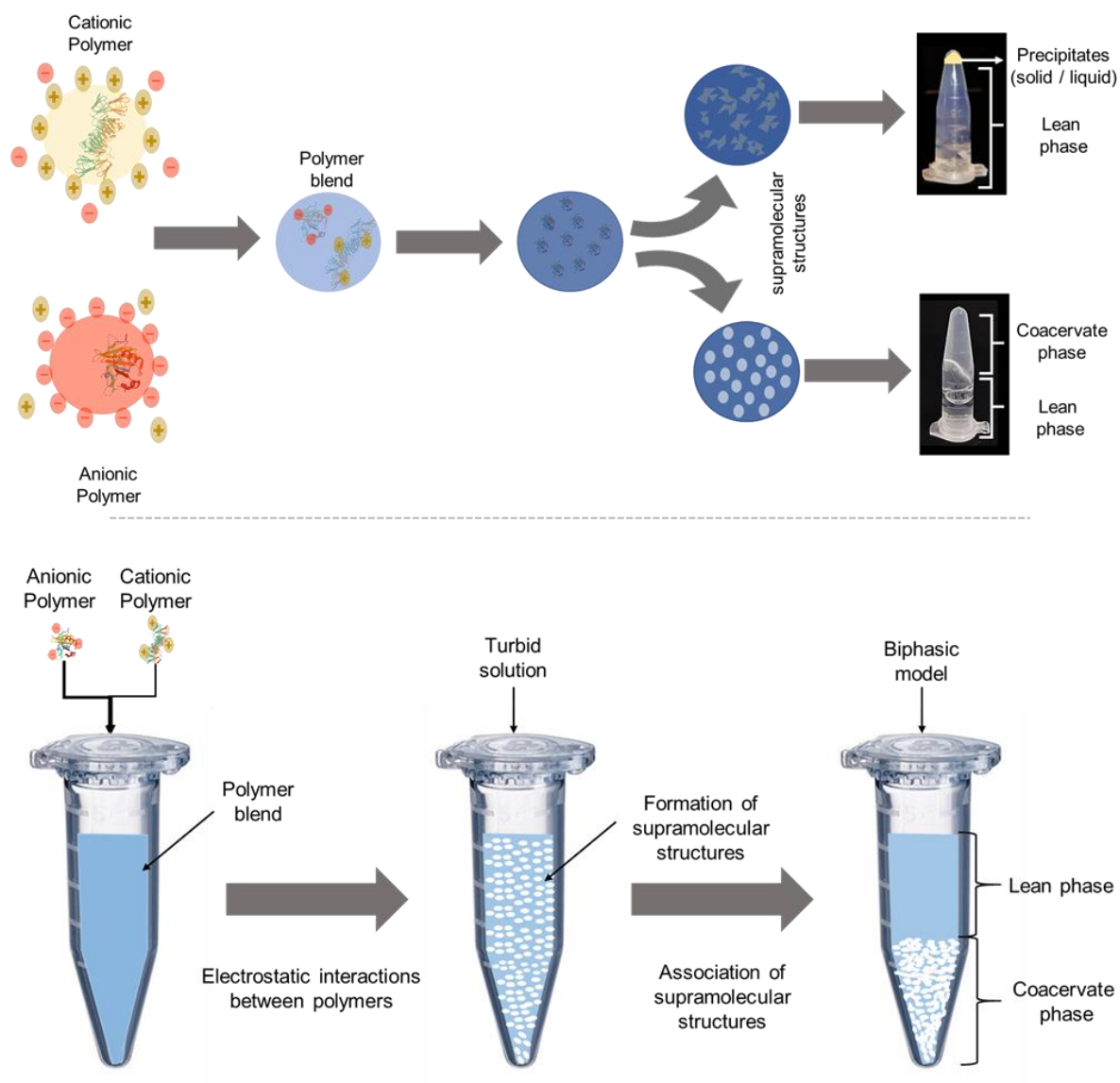


Figura 4: Etapas principais da coacervação complexa. (i) mistura de dispersões de polímeros, (ii) mistura turva e formação de estruturas supramoleculares, (iii) associação dos complexos e separação de fases.

Entre os mecanismos de HPCC apresentados na literatura, a HPCC entre apo α -lactalbumina (α -LA) e a Lisozima (LYS) descrito por Salvatore et al., (2011) é sem dúvidas o melhor elucidado. Como apresenta a Fig. 5, a formação dos complexos moleculares entre α -LA e LYS é feita por meio de interações em sítios específicos na superfície das proteínas para a formação de heterodímeros. A formação de tetrâmeros pela associação de heterodímeros requer sítios de interação adicionais na superfície das proteínas. No caso dos complexos entre apo α -LA e LYS, a ausência do átomo de cálcio na estrutura da α -LA expõe outro sítio eletronegativo na superfície da proteína que é determinante para a formação de tetrâmeros.

Nos tetrâmeros, a maioria das regiões carregadas na superfície das proteínas está indisponível, porém interações hidrofóbicas permitem a formação de novas estruturas supramoleculares pela interação entre os tetrâmeros (Salvatore et al., 2011)(Nigen et al., 2007).

Além disso, neste caso, outro fator importante é a temperatura. Quando o processo de interação entre as duas proteínas é realizado em temperaturas inferiores à temperatura de desnaturação da apo α -LA (30 °C), os tetrâmetros se associam formando agregados amorfos. Em contrapartida, em temperatura igual ou (ligeiramente) superior à 30 °C, os tetrâmeros se associam para formação de coacervados. Dessa forma, o aumento da mobilidade da apo α -LA acima de 30°C garante o acesso a regiões hidrofóbicas no interior da proteína, necessárias para a formação dos coacervados. Apesar da holo α -LA poder formar heterodímeros com a LYS, esse sistema não permite a formação de tetrâmeros e, portanto, não leva à formação de coacervados.

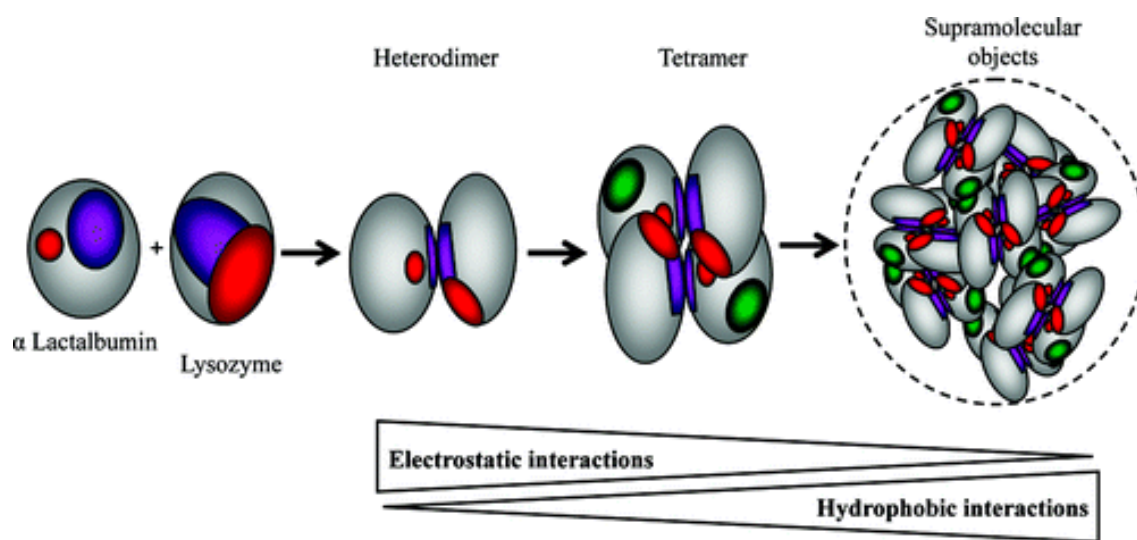


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo HPCC entre apo α -LA e LYS. Adaptado: (Salvatore et al., 2011). Autorização de uso apresentada nos anexos.

3.3.2 Influência dos parâmetros reacionais na HPCC

O principal fator desencadeante da coacervação complexa é a diminuição da energia eletrostática livre por meio das interações entre os coloides de cargas opostas (Schmitt & Turgeon, 2011). No entanto, na HPCC certos fatores reacionais podem afetar mais intensamente os fenômenos de interação molecular, comparativamente a outros processos de coacervação complexa, entre eles o pH, a força iônica, a concentração de proteínas, a razão

entre as proteínas e a temperatura (Croguennec et al., 2017). A Tabela 1 apresenta uma compilação das condições reacionais ideais utilizadas em estudos sobre HPCC envolvendo β -LG ou GA. É digno de nota, que não há na literatura descrição do processo de coacervação complexa entre a β -LG e a GA. Cada um dos principais parâmetros reacionais serão discutidos na perspectiva de evidenciar como podem impactar tanto de forma negativa quanto de forma positiva no processo de HPCC.

Tabela 1: Condições reacionais ideais (pH, força iônica e estequiometria de proteínas) de HPCC envolvendo gelatinas e/ou β -LG.

Biopolímeros		Faixa de pH	Força iônica máxima (mM)	Razão molar ou razão mássica dos coacervados	Referências
β -LG A		5,5-6,0	< 30	$4 < \beta\text{-LG/LF} < 8$	(Tavares et al., 2015)
β -LG B		5,0-7,3	<100	$\beta\text{-LG/LF} = 3$	(Anema & de Kruif, 2014)
β -LG B	LF	5,5-6,0	< 30	$4 < \beta\text{-LG/LF} < 8$	(Tavares et al., 2015)
β -LG		6,0	—	$\beta\text{-LG/LF} = 2:1$	(Kizilay et al., 2014)
β -LG AB		7,0-6,2	< 20	$\beta\text{-LG/LF} = 4$	(Flanagan et al., 2015; Yan et al., 2013)
β -LG	LF-B9	5,5	—	$(\beta\text{-LG/LF}) / B9 = 11:2$	(Chapeau et al., 2016)
β -LG		7,5	=10	$\beta\text{-LG/LYS} = 1:2$	(Ainis et al., 2019)
β -LG	LYS	7,5	—	$\beta\text{-LG/LYS} = 2:1$	(Diarrassouba et al., 2015)
β -LG					
β -LG	GB	5,5-6,0	0	$\beta\text{-LG} / \text{GB} = 0,75:1$	(Pathak et al., 2015)
GA	GB	6,3	<50	$\text{GA} / \text{GB} = 3:2$	(Tiwari et al., 2008)
GA	Cas	6,0	—	$\text{GA} / \text{Cas} = 2:1$	(Zhao et al., 2020)
GA	LYS	7,0	=10 mM	$\text{GA} / \text{LYS} = 1,47$	(Antonov et al., 2017)

(*) LYS: Lisozima; (*) Cas: Caseinato de sódio; (*) B9: Vitamina B9

Efeito do pH: O pH é uma variável fundamental para a formação de coacervados complexos entre proteínas, por impactar na carga superficial das proteínas envolvidas no

processo, e consequentemente na atração / repulsão eletrostática entre elas (Rabelo et al., 2019; Weinbreck et al., 2003). Os coacervados complexos entre proteínas usualmente são formados em faixas de pH bastantes estreitas, entre o pI das proteínas envolvidas (Schmitt et al., 1998; Siow, 2012). Frequentemente, os complexos moleculares formados entre as diferentes proteínas, que evoluirão para a formação dos coacervados complexos, atingem uma carga próxima à neutralidade (Yan et al., 2013). Em complemento, durante a interação das proteínas, a liberação de contra-íons pode levar a uma variação do pH do meio reacional, que dependerá também da razão da mistura entre as proteínas (Flanagan et al., 2015). Por exemplo, Tavares et al., (2015) descrevem que a coacervação complexa entre Lactoferrina (LF) e β -LG A e entre LF e β -LG B ocorreu na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, no entanto, o pH ideal para a HPCC da LF com a β -LG A foi de 5,5 enquanto com a β -LG B foi de 5,75. Em contrapartida, Yan et al., (2013) relatam que a formação de coacervados complexos entre LF e β -LG (contendo as isoformas A e B) ocorre na faixa de 5,7-6,2, tendo um pH ideal de 6,0. Em pH inferiores a 6,0, as misturas entre LF e β -LG apresentaram elevado grau de auto agregação da β -LG (proximidade do pI desta proteína, entre 5,1 e 5,2).

Em adição, a formação de complexos entre GA e GB ocorreu na faixa de pH entre 5,5 e 6,5, com condição ideal em pH 6,3 (Tiwari et al., 2008). No entanto, a coacervação complexa entre GA e GB em presença da goma acácia levou a uma modificação das condições ideais de formação dos complexos para uma faixa de pH entre 3,5 e 4,5, em razão da participação desta goma nos complexos obtidos (Siow, 2012).

Efeito da força iônica: O aumento da força iônica do meio reacional leva a um enfraquecimento das interações eletrostáticas entre as proteínas, e por esta razão, a resistência do processo de HPCC ao aumento da força iônica é importante na caracterização do seu mecanismo (Kruif et al., 2004; Tavares et al., 2015). Como as interações eletrostáticas são essenciais nas primeiras etapas da coacervação complexa, quando se trabalha com concentrações elevadas de sal, os íons interagem nas regiões carregadas das proteínas e “blindam” os sítios de interação necessários para a coacervação complexa (Rabelo et al., 2019; Zheng et al., 2020). Nessa perspectiva, Pathak et al., (2014); Pathak et al., (2015) relataram que o processo de coacervação complexa entre LF e β -LG apresenta elevada sensibilidade a forças iônicas superiores a 25 mM. Em adição, para misturas entre GA e GB, bem como, entre gelatinas e outras proteínas como a BSA e a β -LG não há dados na literatura quanto ao valor mínimo de força iônica capaz de impedir a formação de coacervados (Tiwari et al., 2008).

O aumento progressivo da força iônica do sistema reacional leva a uma diminuição da taxa de formação dos coacervados complexos (Nigen et al., 2009). Em geral, os estudos disponíveis na literatura limitam-se à influência do NaCl na turbidez e no tamanho das estruturas supramoleculares formadas. Entretanto, a natureza do sal e os efeitos de *Hofmeister*, impactam de forma diferente no processo de HPCC (Zheng et al., 2020). Esses comportamentos podem estimular reações diferentes, por exemplo, Priftis & Tirrell, (2012) observaram que a concentrações ideais de *NaCl* podem converter precipitados sólidos em coacervados complexos, pelo enfraquecimento das interações eletrostáticas.

Efeito da concentração de proteínas: A concentração proteica total é um fator importante para a formação de coacervados, pois uma elevada concentração de proteína pode levar a uma transição entre regimes de coacervação e agregação.

A alteração na concentração das proteínas afeta sua distância intermolecular, causando alterações na cinética de associação e o potencial de energia necessário para a interação entre as proteínas (Yan et al., 2013). De acordo com Yan et al., (2013), em um mesmo pH, a mistura entre LF e β -LG pode levar à formação de agregados em uma concentração de 50 g / L. Em compensação, a formação de coacervados complexos pode ser observada em concentrações entre 10 a 40 g / L, entretanto, em uma concentração da ordem de 1 g / L não é possível observar a formação de estruturas supramoleculares. Concentrações proteicas muito pequenas, podem não ser o suficiente para garantir que os complexos moleculares formados possam evoluir para a formação de coacervados, como descrito por Tavares et al., (2015), igualmente no caso da coacervação complexa entre LF e β -LG.

Efeito da razão entre as proteínas: A razão molar de mistura entre os coloides de cargas opostas apresenta maior influência no rendimento de coacervação complexa do que na coacervação em si (Weinbreck et al., 2003). Dessa forma, as alterações da razão de mistura podem diminuir o rendimento de coacervação por desequilibrar as cargas positivas e negativas do sistema. De acordo com Anema & Kruif, (2014), para a formação dos coacervados complexos, os complexos moleculares formados entre LF e β -LG deveriam ter uma razão molar de 1:3. Em contrapartida, Yan et al., (2013), descrevem uma estequiometria ideal para a formação de coacervado entre LF e β -LG de 1:1 (m / m), equivalendo a uma razão molar de 1:4.

Para estudos envolvendo gelatinas, encontra-se uma estequiometria de ligação ideal de 3:2 (m / m) na complexação entre GA e GB, sem maiores descrições do processo

(Tiwari et al., 2008). Em outros estudos envolvendo GB e BSA (Pathak et al., (2014)) e GB e β -LG (Pathak et al., (2015)), os autores relatam que a coacervação foi possível com uma razão superior de BSA ou β -LG do que GB. No entanto, quando a BSA ou β -LG tiveram a mesma proporção da GB, ou seja, com uma razão mássica de 1:1, não houve a formação de coacervados.

Temperatura: A influência da temperatura na coacervação complexa tem sido mais associada ao processo de HPCC, do que para outros coloides, sendo igualmente bastante da dependente natureza de cada proteína (Blocher & Perry, 2017). Para Salvatore et al., (2011) a mistura entre apo α -LA e LYS apresentou a formação de coacervados complexos em uma temperatura igual ou ligeiramente superior à temperatura de desnaturação da apo α -LA. No entanto, abaixo dessa temperatura a formação de agregados amorfos foi descrita. Em contraste, no sistema heteroproteico contendo LF e β -LG, conforme descrito por Anema & de Kruif, (2014), pequenas variações de temperatura não afetaram significativamente a intensidade de espalhamento de luz (tamanho) das estruturas supramoleculares formadas.

3.4 Principais técnicas analíticas para a caracterização da HPCC

O processo de HPCC é viabilizado pela combinação de diversos fatores como diferentes tipos de interações de curto e longo alcance, condições reacionais específicas, além das diferentes particularidades estruturais de cada proteína envolvida. Variações sutis nesses diferentes parâmetros podem acarretar grandes variações nos parâmetros termodinâmicos da HPCC. Neste contexto, várias ferramentas e técnicas analíticas têm sido aplicadas para estudar e compreender as diferentes facetas do processo de HPCC. Dessa forma, nesta seção serão relatadas as principais ferramentas e técnicas analíticas que são usualmente empregadas na caracterização do processo de HPCC. Será discutido qual o fundamento das técnicas e como elas podem ser aplicadas no estudo da interação das proteínas para a formação de coacervados complexos.

3.4.1 Turbidimetria

A turbidimetria é baseada na técnica de espectrofotometria, com a capacidade de medir a turbidez de uma solução através da redução de transmitância da luz incidida sobre ela, dentro da região da luz visível (em geral 600 nm). Esta é uma das técnicas mais aplicadas para estudar o processo de formação de estruturas supramoleculares entre proteínas em função de alterações da força iônica, temperatura, razão de mistura e pH do meio reacional, auxiliando

na identificação de condições ideais para a HPCC (Croguennec et al., 2017). A Fig. 6 apresenta diferentes exemplos da aplicação da turbidimetria na caracterização da HPCC entre diferentes proteínas. Ainis et al., (2019) avaliaram a interação entre a β -LG com LYS e com Napin de colza (NAP) através da turbidez das misturas em função das razões molares e do pH, em uma concentração total de proteína de 0,1 mM (Fig. 6A). Os autores observaram que as misturas entre β -LG e LYS apresentaram a máxima turbidez em pH 7,5, e uma razão molar de 0,67 de β -LG / LYS. Entretanto, o sistema β -LG + NAP não mostrou alterações na turbidez em nenhuma das condições testadas, sugerindo a não formação de estruturas supramoleculares entre as proteínas.

A Fig. 6B mostra a evolução da turbidez, bem como do potencial-zeta em função do pH, da mistura de GA e GB na razão mássica de 3:2. A máxima turbidez foi atingida ao redor do ponto onde o potencial-zeta da mistura se aproximou de zero. À medida que o potencial-zeta se distanciou deste valor, houve uma diminuição na turbidez, associada à ruptura dos complexos heteroproteicos (Tiwari et al., 2008). Em complemento, o acompanhamento da cinética da turbidez pode trazer elementos importantes no estudo da influência de diferentes fatores reacionais nas estruturas supramoleculares formadas durante a mistura de proteínas de cargas opostas (Anema & Kruif, 2016; Nigen et al., 2009; Tavares et al., 2017; Zheng et al., 2020). A Fig. 6C mostra como a presença de uma pequena molécula de caráter hidrofóbico (sonda ANS) em concentrações crescentes afetou o perfil da cinética de turbidez de misturas contendo 0,5 mM de β -LG e 0,05 mM de LF a pH 5,5. Em menores concentrações de ANS, onde a formação de coacervados complexos foi observada, a turbidez máxima foi atingida no início do processo e tendeu a diminuir durante o período de 60 min em razão da coalescência e decantação dos mesmos. Em contraste, a mistura com a maior concentração de ANS, onde agregados amorfos foram formados, teve um comportamento atípico comparada às demais, começando com uma baixa turbidez que aumentou durante o período de avaliação (Tavares et al., (2017).

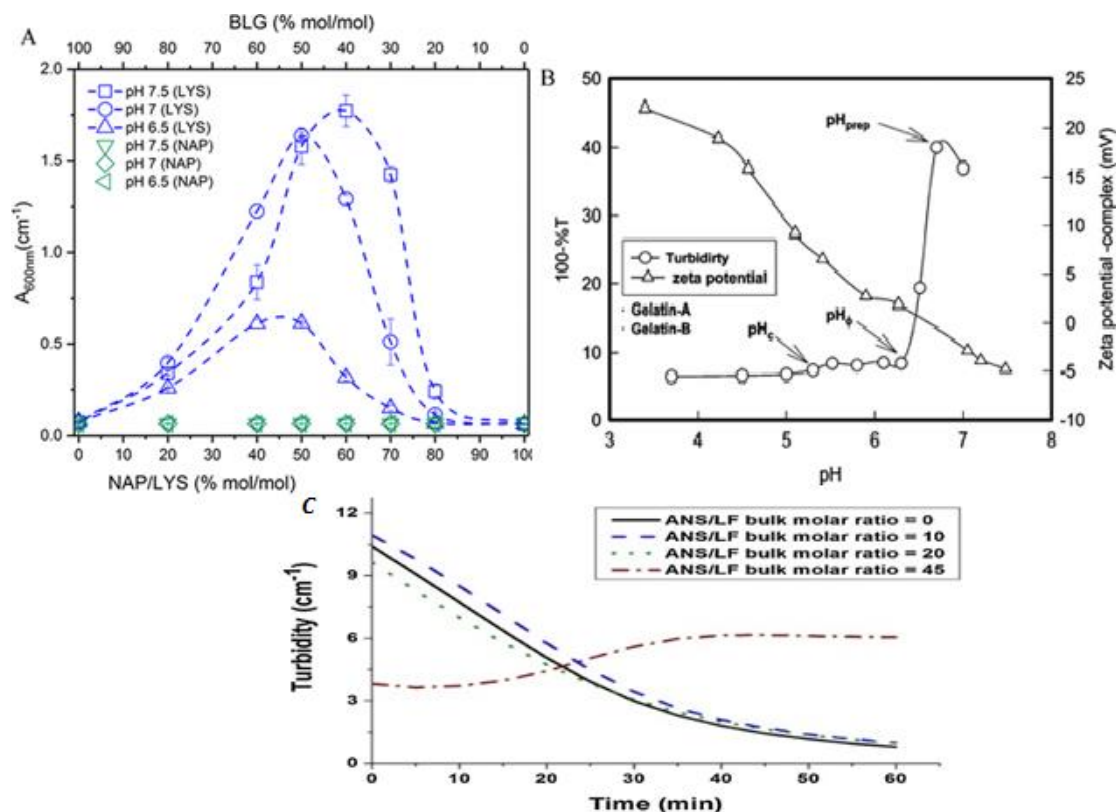


Figura 6: Determinação do desenvolvimento da complexação entre proteínas através das medições de turbidez em função de diferentes fatores. (A) Turbidez dos sistemas β -LG + LYS e β -LG + Napin de colza (NAP) em função do pH e razão molar de mistura (Ainis et al., 2019). (B) Turbidez e potencial-zeta de misturas entre as gelatinas do tipo A e do B em função do pH (Tiwari et al., 2008). (C) Cinética da evolução da turbidez de misturas contendo β -LG e LF com diferentes concentrações de ANS (Tavares et al., 2017). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

3.4.2 Potencial zeta (ζ)

A determinação do potencial ζ das proteínas individualmente e em mistura permite gerar informações sobre a magnitude da repulsão ou da atração eletrostática entre elas. Sendo um parâmetro fundamental para a determinação da estabilidade dos coloides. Em torno de uma partícula carregada há uma primeira camada, chamada de camada de Stern seguida de uma camada difusa (fase dispersa ou plano de cisalhamento), como mostra a Fig. 7A. O potencial de Stern é o potencial elétrico no limite da camada de Stern. Com o afastamento da superfície do coloide há uma diminuição da densidade de carga. O potencial zeta é aquele apresentado no limite dessa camada difusa (Cano et al., 2018; Lowry et al., 2016; Olivier, 1965).

Na HPCC, as proteínas opostamente carregadas interagem entre si, para formar primeiramente complexos moleculares que evoluem para os coacervados complexos, dependendo do mecanismo e condições reacionais envolvidas. O entendimento das interações eletrostáticas na formação dos complexos moleculares é primordial para elucidar os mecanismos de HPCC (Cano et al., 2018; Zheng et al., 2020). Durante a formação de coacervados complexos heteroproteicos, espera-se que o potencial ζ dos complexos moleculares formados seja zero, no entanto, esse potencial na maioria dos casos não é atingido em razão da anisotropia de carga e do impedimento estérico nas proteínas envolvidas (Missana & Adell, 2000). Uma das técnicas mais comumente aplicadas para a determinação do potencial ζ é através da eletroforese de laser doppler, que mede a velocidade de deslocamento das moléculas em um líquido pela aplicação de um campo elétrico. Essa mobilidade eletroforética está diretamente relacionada com a protonação e desprotonação dos grupos ionizáveis da molécula, conforme a equação de Henry (Olivier, 1965; Rabelo et al., 2019; Zheng et al., 2020).

$$\frac{U}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta F(Ka)}{3\eta} \quad (1)$$

Onde: U / E é a mobilidade ou velocidade eletroforética ($m^2V^{-1}s^{-1} * 10^{-8}$); ε é a constante dielétrica (adimensional); ζ é o potencial zeta (mV); η é a viscosidade (cP); e $F(Ka = 1,5)$ é a função de Henry.

O potencial ζ das proteínas, pode ser afetado por diversas condições reacionais como o pH, a força iônica e mesmo a concentração de proteína. Nos estudos de HPCC é comum a determinação do potencial ζ das proteínas individualmente e em mistura em função do pH do meio reacional para a triagem de condições de coacervação favoráveis (Zheng et al., 2020). Tiwari et al., (2008) no estudo da HPCC entre GA e GB, avaliaram o potencial ζ das proteínas individualmente e em mistura (Fig. 7B) A GA, que apresenta um pI de 9, apresentou um potencial ζ positivo abaixo de seu pI e negativo acima dele. A GB, por sua vez, apresenta um pI de 5, e apresentou um potencial ζ positivo abaixo deste pH e negativo acima dele. Os complexos obtidos pela mistura das proteínas apresentaram um potencial ζ próximo à zero no pH de 6,5, condição em que os autores reportaram a coacervação complexa entre as proteínas.

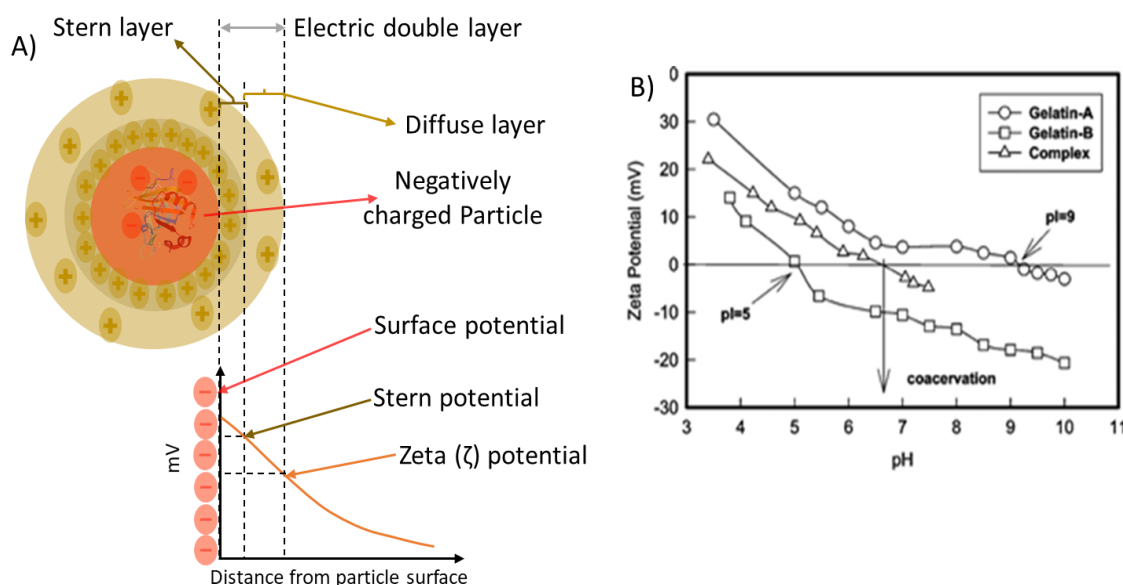


Figura 7: Avaliações coacervação complexa entre proteínas através do potencial (ζ). A) Sistema ilustrativo do potencial (ζ); B) Determinação do potencial zeta das gelatinas do tipo A e B e seus complexos na razão mássica de 3:2 (Tiwari et al., 2008). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

3.4.3 Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)

A ITC é uma técnica experimental que permite a determinação de diferentes parâmetros termodinâmicos como entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia de Gibbs (ΔG), além da constante de afinidade do processo de interação entre diferentes moléculas (Zheng et al., 2020). Desta maneira, os resultados de ITC podem fornecer informações importantes sobre a formação de complexos moleculares entre proteínas de cargas opostas, úteis na compreensão da HPCC (Priftis et al., 2012). Por esta razão, essa técnica é muito utilizada em estudos de coacervação complexa entre proteínas. Para este fim, o princípio da técnica se fundamenta em colocar uma das proteínas na cela de amostra do equipamento, enquanto a outra proteína é injetada progressivamente na cela de amostra. Enquanto há o monitoramento de qualquer mudança de energia entre a cela de referência e a cela da amostra a cada injeção, por meio da medição da potência necessária para manter a temperatura igual entre as duas celas (Fig. 8A) (Kayitmazer, 2017). Na cela de referência usualmente é adicionado à solução tampão utilizada no preparo das amostras.

Como esquematizado na Fig. 8A, acoplado à cela de amostra encontra-se uma seringa que é utilizada para adicionar nela um determinado número de alíquotas da segunda proteína em intervalos de tempo controlados e sob agitação constante. No momento de contato entre as moléculas, quando há interação entálpicamente não nula, uma diferença de

temperatura entre as celas é observada. Sendo posteriormente convertida em potência necessária para manter as temperaturas idênticas, traduzidas pelo equipamento como os picos que aparecem na parte superior dos termogramas das Fig. 8B, 8C e 8D. O calor gerado ou consumido à cada uma das injeções é correlacionado à quantidade de moléculas injetadas e plotado versus à razão entre as moléculas na cela à cada injeção (painéis inferiores Fig. 8B, 8C e 8D) (Zheng et al., 2020). Para a determinação da entalpia da interação (ΔH) deve ser feita a correção atrelada ao calor de diluição dos experimentos controle no qual o solvente presente na seringa é titulado na molécula presente na cela de amostra e igualmente, a molécula presente na seringa é titulada na cela de amostra contendo apenas o tampão de preparo das amostras (Kayitmazer, 2017).

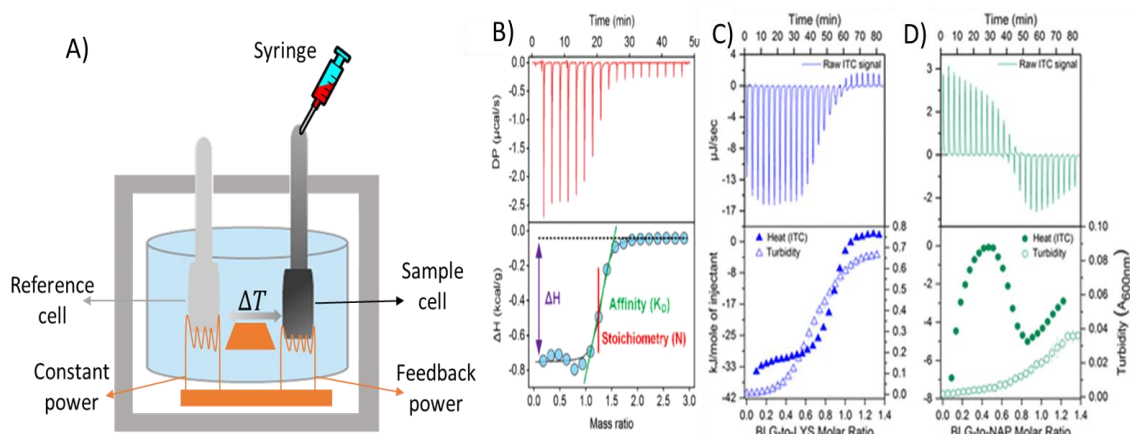


Figura 8: Termogramas de ITC obtidos no estudo da interação entre proteínas. A) Esquema da montagem da titulação calorimétrica isotérmica; B) Modelo dos termogramas do ITC, superior: dados brutos, inferior: dados integrados de entalpia versus razão entre as moléculas (Zheng et al., 2020). C) e D) Termogramas da complexação de β -LG / LYS e β -LG / NAP, respectivamente, superior: dados brutos e inferior: entalpia e turbidez dos complexos em função da razão molar (Ainis et al., 2019). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

O ajuste de modelos aos termogramas pode permitir a obtenção de parâmetros importantes da interação como a constante de dissociação (Kd), a estequiometria de ligação (N) e outros parâmetros termodinâmicos, conforme equações (2) a (5)

$$Kd = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (2)$$

$$\Delta G = -RT \ln (Kd) \quad (3)$$

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

$$\Delta Cp = d(\Delta H)/dT \quad (5)$$

Ainis et al., (2019) estudaram as interações entre β -LG / LYS e β -LG / NAP por meio de ITC e obtiveram termogramas apontando comportamentos diferentes para os dois sistemas (Fig. 8C e D). Na interação entre β -LG / LYS (Fig. 8C), foi observado um perfil exotérmico, com maiores intensidades nas primeiras injeções, por outro lado, a interação entre β -LG / NAP (Fig. 8D), teve um comportamento mais complexo, com um perfil inicialmente endotérmico, que se torna exotérmico durante a titulação.

3.4.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de DLS é frequentemente utilizada na determinação do tamanho de partículas em suspensão. A luz espalhada pelas partículas em suspensão possibilita a extrapolação da sua distribuição de tamanho, através da equação de Stokes-Einstein (Eq. 6) (Stetefeld et al., 2016).

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_p} \quad (6)$$

Onde: D é o coeficiente de difusão; k é a constante de Boltzmann; T é a temperatura, η é a viscosidade da solução; d_p é o diâmetro hidrodinâmico.

A confiabilidade dos resultados de DLS é determinada pela intensidade de luz espalhada e o tamanho médio Z que é fornecida pelas diferentes formas e tamanhos de partículas na amostra. Dessa forma, as moléculas de maior tamanho têm maior espalhamento de luz comparativamente às moléculas de menor tamanho, por isso em geral, são preponderantes no tamanho médio Z . Além do tamanho médio das partículas, o índice de polidispersidade gerado na análise é útil na caracterização de interações moleculares (Anema & Kruif, 2016; Bourbon et al., 2015; Monteiro et al., 2016). Tiwari et al., (2008) estudaram o tamanho médio Z e a polidispersidade das partículas da solução de equilíbrio obtida na coacervação complexa entre GA e GB em função do tempo. Esses autores relataram que inicialmente as partículas na solução de equilíbrio apresentaram um diâmetro médio em torno de 400 nm e uma polidispersidade de aproximadamente 27%. Depois de um período de 10 h, as partículas atingiram um diâmetro médio de 900 nm com uma polidispersidade de 35%, conforme apresentado na Fig. 9. Essa evolução, tanto de diâmetro médio quanto de

polidispersidade foi atribuída à formação de novas estruturas pela interação entre os complexos moleculares inicialmente formados.

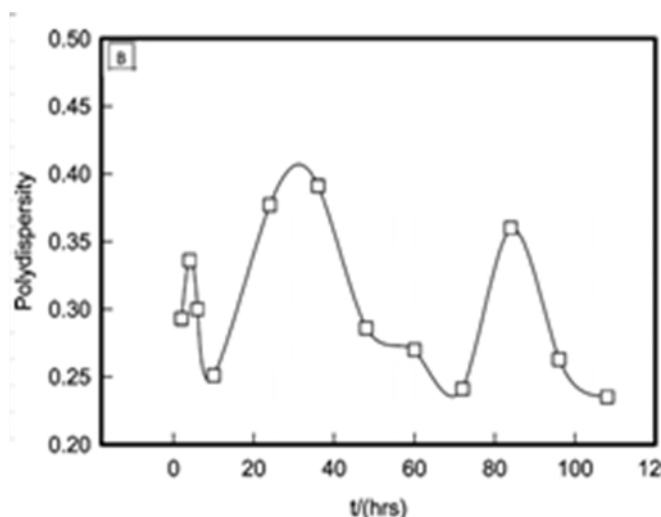


Figura 9: Caracterização da polidispersidade do sobrenadante da coacervação complexa entre as gelatinas do tipo A e do tipo B em função do tempo (Tiwari et al., 2008). A autorização de uso da figura está apresentada nos Anexos.

3.4.5 Caracterização morfológica das estruturas supramoleculares por diferentes técnicas de microscopia

Diferentes estruturas supramoleculares podem ser obtidas pela interação entre proteínas de cargas opostas. Os agregados amorfos, por exemplo, são estruturas formadas em um equilíbrio solido-líquido, tendo uma morfologia desordenada, já os coacervados complexos são formados em um líquido-líquido e, em geral, apresentam uma morfologia esférica e uniforme. Nesses termos, a aplicação de diferentes técnicas de microscopia é de grande relevância na caracterização morfológica dos sistemas contendo proteínas de cargas opostas. Entre as técnicas de microscopia mais comumente empregadas na caracterização de sistemas contendo proteínas opostamente carregadas estão a microscopia de campo claro e a microscopia de contraste de fase (Fig. 10A, 10B, 10C e 10D). A microscopia de campo claro é a microscopia óptica mais simples, baseada na passagem de luz através da amostra, permitindo que as áreas mais densas gerem um contraste na observação. No entanto, essa técnica de microscopia apresenta limitações para a observação de amostras quase transparentes ou de baixo contraste (Wang & Fang, 2012). Por sua vez, a microscopia de contraste de fase, soluciona certas dessas limitações, pois utiliza o diferencial de fase

ocasionado pelas diferentes de densidade e índice de refração, conseguindo projetar o contraste entre as fases mais escuras e claras (Burch & Stock, 1942).

A Fig. 10A mostra a morfologia tipicamente encontra em coacervados complexos, obtida para as interações entre GA e caseinato de sódio (Zhao et al., 2020). Em contraponto, a Fig. 10B mostra agregados amorfos obtidos para mistura contendo β -LG e LYS quando as condições ideais de HPCC são alteradas (Ainis et al., 2019). Similarmente, As Fig. 10C e 10D apresentam estruturas típicas de coacervados complexos (equilíbrio líquido-líquido) e de agregados amorfos (equilíbrio líquido-sólido) para misturas de LF e β -LG carreando vitamina B9, observadas por microscopia de contraste de fase (Chapeau et al., 2016).

A Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM), por sua vez, tem recebido bastante atenção para a caracterização da morfologia de partículas de sistemas alimentares, notadamente, de estruturas supramoleculares formadas por proteínas, como os coacervados. Na CLSM a fonte de luz convencional é substituída por um laser, e a unidade de varredura e o orifício confocal permite uma resolução axial do plano focal, assim, eliminando a luz encontrada fora do foco, ou a luz que interfere na qualidade da imagem (Dürrenberger et al., 2001; Trinh & Fraser, 2015). Usualmente, para a CLSM, os materiais são preparados sondas fluorescentes, que são excitadas pelo laser do microscópio, emitindo fluorescência (Canette & Briandet, 2014). Nesse sentido, a CLSM tem sido empregada na área de HPCC, além da caracterização morfológica das estruturas supramoleculares obtidas, para estudar a dinâmica das proteínas que compõem tais estruturas (Canette & Briandet, 2014; Zheng et al., 2020). Para tanto, a CLSM pode ser utilizada de forma integrada a técnicas como a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) e a recuperação da fluorescência depois da fotodegradação (FRAP). No FRET, a energia e excitação de um cromóforo doador transferida por meio do acoplamento dipolo-dipolo à um acceptor é monitorada, possibilitando a compreensão das interações moleculares (Kö et al., 2006). No FRAP, por sua vez, monitora-se o restabelecimento da fluorescência pela mobilidade das moléculas fluorescentes na escala microscópica, após fotobranqueamento irreversível de uma determinada área (Braeckmans et al., 2007).

Kizilay et al., (2014) aplicaram CLSM na caracterização da morfologia dos complexos formados entre β -LG e LF, com auxílio da sonda fluorescente, FITC. Conforme evidenciado na Fig. 10E, esses autores observaram a formação de estruturas esféricas e uniformes. Por outro lado, Antonov et al., (2017) estudaram a distribuição da GA e da LYS nos coacervados complexos formados por essas duas proteínas, ligando covalentemente sondas fluorescentes diferentes em cada uma delas. Conforme aponta a Fig. 10F esses autores

mostram uma co-localização entre as proteínas nos coacervados. Apesar do grande potencial da CLSM na caracterização de complexos formados entre proteínas, a necessidade de utilização de sondas fluorescentes no preparo das amostras, pode alterar o equilíbrio de interação entre elas (Zheng et al., 2020). Em complemento, outras técnicas microscopias não ópticas tem sido aplicadas na caracterização morfológica de complexos formados entre proteínas opostamente carregadas, como a microscopia eletrônica de varredura (SEM), a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e a microscopia de força atômica (AFM).

A SEM e a TEM são microscopias que fornecem imagens com melhor resolução quando comparadas à CLSM, no entanto, a complexidade de preparo das amostras pode diminuir a precisão dos resultados. Dessa forma, como ilustrado nas Figuras 10G e 10H a SEM e a TEM são empregadas na caracterização de estruturas agregadas ou redes de gel constituídas pelos agregados (Goldstein et al., 2017; Marc, 2003). A AFM, no entanto, proporciona imagens com excelente resolução para caracterização morfológica de complexos proteicos, produzindo informações de tamanho e características da superfície das estruturas supramoleculares obtidas (García & Pérez, 2002; Zheng et al., 2020).

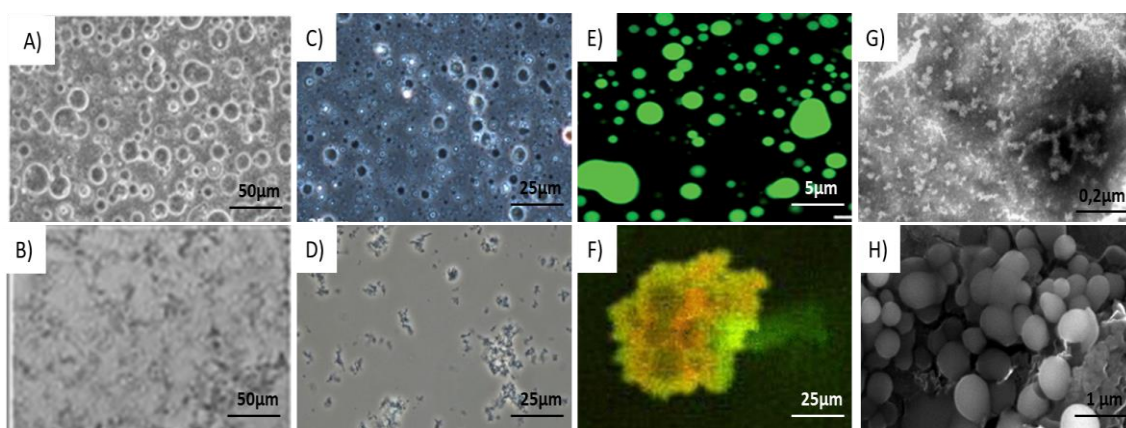


Figura 10: Imagens de microscopias de estruturas supramoleculares heteroproteicas. (A) Morfologia dos coacervados complexos formados entre GA e Cas, observados através da microscopia de campo claro (Zhao et al., 2020). (B) Caracterização de agregados amorfos da mistura entre β -LG e LYS por microscopia de campo claro (Ainis et al., 2019). (C) e (D) Avaliação da morfologia dos complexo entre LF e β -LG em presença da vitamina B9 por meio da microscopia de contraste de fase (Chapeau et al., 2016). (E) e (F) Morfologia e distribuições das proteínas da HPCC de β -LG / LF e de GA / LYS, respectivamente, avaliados por CLSM (Antonov et al., 2017; Kizilay et al., 2014). (G) e (H) Imagens de SEM e TEM da

HPCC entre β -LG e LYS carregando Vitamina D3 (Diarrassouba et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas nos Anexos.

3.4.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

DSC é um método analítico frequentemente aplicado para determinar propriedades físicas de diversas moléculas, tais como suas temperaturas de transição estruturais, como fusão de cristais e transição vítrea. Em complemento, DSC permite a obtenção de informações termodinâmicas, como a entalpia, de alterações estruturais termicamente não nulas (Schick, 2009). No contexto do estudo de proteínas, a técnica de DSC permite monitorar o processo de desnaturação termo induzida da molécula, e determinar sua temperatura de desnaturação (T_m), de modo que quanto maior for a estabilidade da molécula às mudanças estruturais induzidas pelo calor, maior será sua temperatura de desnaturação. Além disso, conforme esquematizado na Fig. 11A, pela integração do pico característico do processo de desnaturação proteica, é possível determinar a entalpia da desnaturação (ΔH), que por sua vez, é usada para definir a variação da capacidade calórica da desnaturação (ΔC_p).

O princípio da técnica se assemelha ao ITC, onde a diferença de energia necessária para a manutenção da mesma temperatura entre uma célula de referência e uma célula de amostra é monitorada (Fig. 11B). Durante a análise de DSC, o dispositivo é programado para manter as células na mesma temperatura, durante a aplicação de uma rampa de aquecimento. A célula de referência, normalmente, é preenchida com o tampão utilizado no preparo da amostra ou com materiais inertes, enquanto a célula de amostra é preenchida com uma solução contendo a(s) proteína(s) de estudo (ou outros colóides) (Malvern, 2021; Menczel & Jose, 2009).

Um das aplicações da DSC no estudo de interações entre proteínas opostamente carregadas, assim como no processo de HPCC, é monitorar o impacto da interação na estabilidade das moléculas envolvidas, levando em consideração sua desnaturação térmica (Ibarra et al., 2016; Johnson, 2013). Wu et al., (2011), por exemplo, mostram que a formação de complexos moleculares entre β -caseína e LYS desencadeia uma desnaturação parcial da LYS quando a razão molar entre as proteínas é superior à 0,7 (Fig. 11C). Outra potencial aplicação desta técnica analítica é na compreensão da dinâmica de moléculas de água nos coacervados complexos, através do monitoramento simultâneo da fusão de cristais de gelo e de moléculas de água não congeláveis nos coacervados complexos e nas proteínas não coacervadas. Neste sentido, Du et al., (2015) mostraram que a interação água-proteína na coacervação complexa entre LF e β -LG aumentou, em comparação com os controles não

coacervados, dado o aumento da proporção de moléculas de água não congeláveis presentes nos coacervados (Fig. 11D).

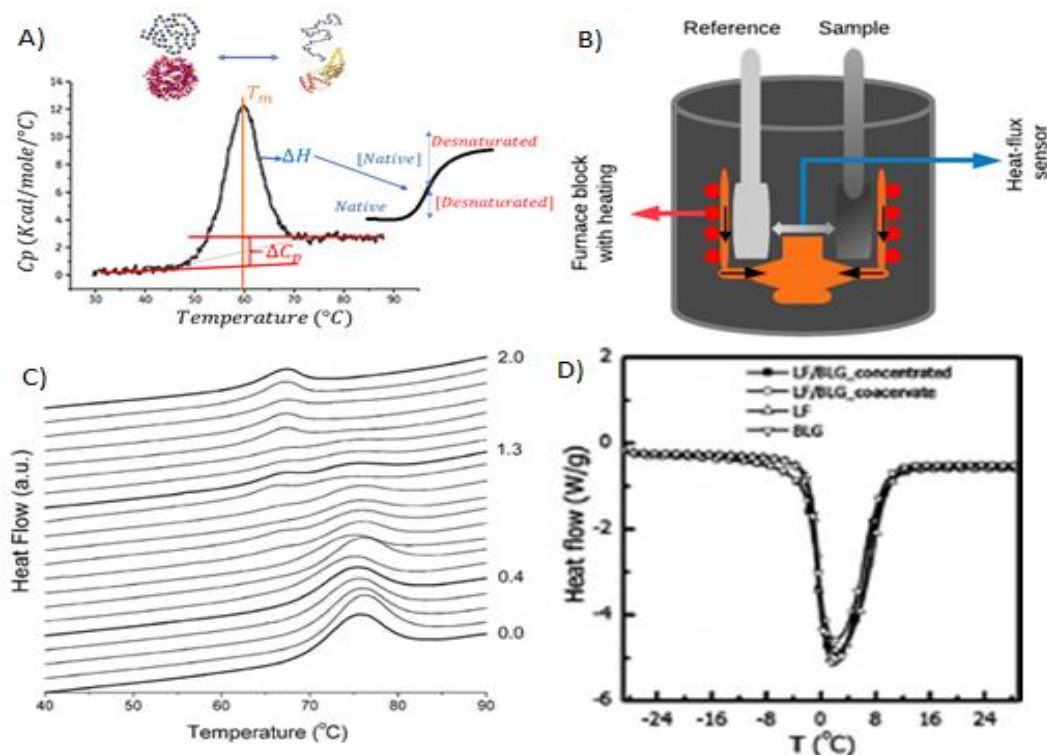


Figura 11: (A) Termograma ilustrativo do desdobramento (desnaturação) de uma proteína; (B) Esquema ilustrativo da montagem do sistema de DSC; (C) Termogramas dos complexo formados entre β -caseína e LYS em diferentes razões molares (de 0 a 2) por DSC (Wu et al., 2011); (D) Caracterização de água estrutural em coacervados complexos formados por β -LG e LF, por DSC (Du et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas no Anexos.

3.4.7 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada Fourier (FTIR) e Dicroísmo Circular (CD)

A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier (FTIR) pode ser útil para monitorar alterações na configuração dos grupamentos químicos desencadeadas pela interação entre proteínas. Em complemento, a análise de dicroísmo circular permite monitorar o impacto da interação molecular das proteínas em suas estruturas secundárias. A partir da interpretação dos espectros de FTIR é possível observar as interações entre os polímeros e suas mudanças estruturais (Bacsik et al., 2007; Marsac et al., 2014; Zheng et al., 2020). Como as interações eletrostáticas na HPCC, geralmente acontecem entre

os grupos amina ($-NH^{3+}$) de uma proteína e os grupos carboxila ($-COO^-$) da outra proteína, produzindo um alongamento ou deslocamento desses grupos, a técnica de FTIR têm sido frequentemente aplicadas para monitorar tais alterações.

Durante a interação dos grupos ($-COO^-$) e ($-NH^{3+}$) é possível observar o alongamento e/ou deslocamentos das bandas de amidas (I, II e III) no espectro FTIR (Fig. 12A e 12B), acarretado pelo alongamento no plano da ligação $C=O$, pela curvatura das ligações $N-H$ e alongamento das interações $C-N$. Em complemento, é possível observar os alongamentos dos grupos $N-H$ e $O-H$ livres, devido a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais das proteínas e as moléculas da água circundante, durante a complexação das proteínas (Santos et al., 2018; Santos et al., 2018; Zheng et al., 2020; Zhu et al., 2019).

Por sua vez, a técnica de CD tem como princípio a absorção diferencial da luz circularmente polarizadas pela amostra, sendo muito útil para a avaliação da estrutura secundária e da estabilidade térmica (desnaturação) das proteínas (Kelly et al., 2005). Além disso, por deconvolução dos espectros obtidos é possível estimar o conteúdo de α -hélice e folhas- β da estrutura proteica. Na Fig. 12C estão apresentados os dados de variação do conteúdo estimado de α -hélice da BSA e da β -LG em função da razão de mistura com GB. Os autores concluíram que a interação molecular com a GB tem maior efeito na alteração no conteúdo de α -hélice da BSA, comparativamente ao conteúdo de α -hélice da β -LG (Pathak et al., 2015).

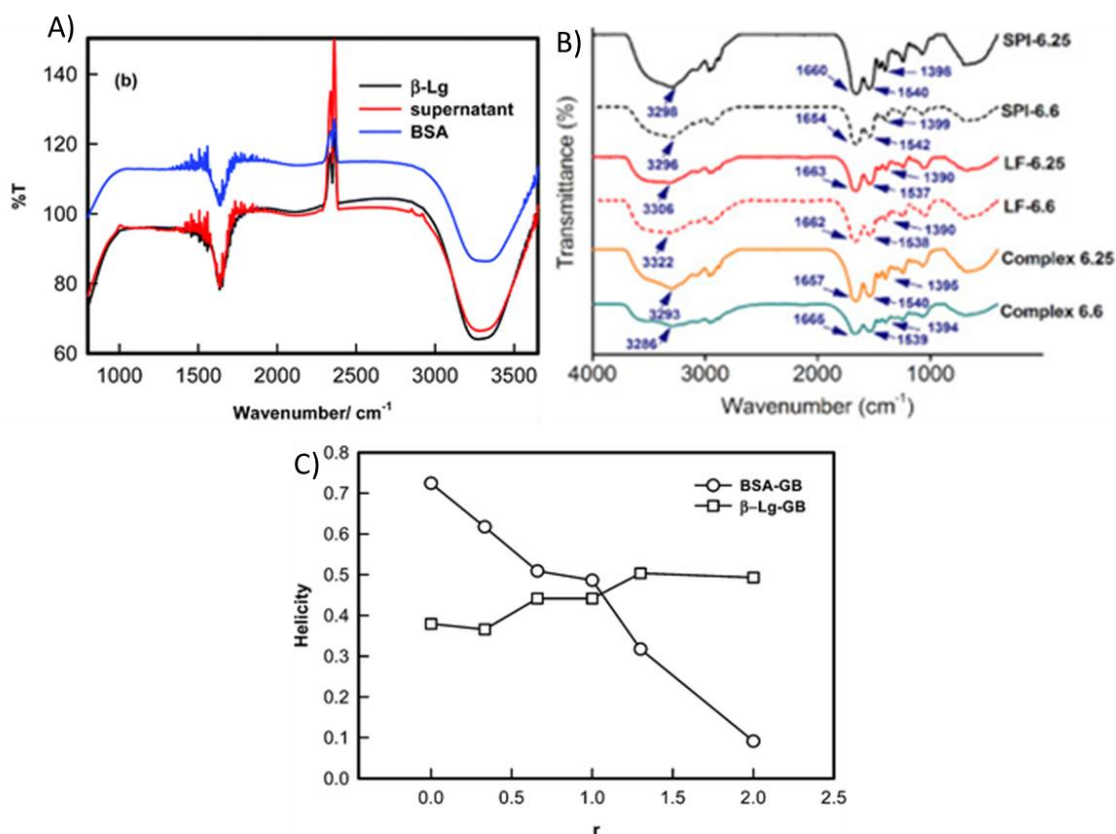


Figura 12: Caracterização de proteínas tanto individualmente quando participando de coacervados complexos, através do FTIR e CD. (A): Espectros do FTIR de β -LG, BSA e o sobrenadante de BSA / GB / β -LG, utilizados para determinar o conteúdo de β -LG no sobrenadante (Pathak et al., 2015); (B): Espectros do FTIR de isolado proteico de soja (SPI), LF e seus complexo, utilizados para avaliar as mudanças estruturais das proteínas decorrentes de sua interação (Zheng et al., 2020); (C) Conteúdo estimado de α -hélices obtidos através de dados de CD para misturas de BSA / GB e β -LG / GB em diferentes razões de mistura (Pathak et al., 2015). As autorizações de uso das figuras estão apresentadas no Anexos.

3.4.8 Reologia dos coacervados complexos heteroproteico

A reologia estuda o fluxo e a deformação de materiais, e têm sido bastante aplicada no estudo da coacervação complexa entre proteínas com o objetivo de fornecer informações sobre as propriedades mecânicas e funcionais dos coacervados (Kruif et al., 2004; Sing & Perry, 2020). Além disso, têm sido igualmente aplicada na determinação das condições reacionais ideais do meio reacional para permitir HPCC, bem como para avaliar o efeito da variação de tais parâmetros na fase coacervada (Priftis et al., 2015).

Kizilay et al., (2014) investigaram o comportamento de escoamento dos coacervados complexos formados entre β -LG e LF através da determinação dos módulos de

armazenamento (viscoso (G'')) e módulo de perda (elástico (G')) em função do pH e da frequência. Esses autores observaram que o módulo viscoso dos complexos apresenta um valor baixo em $\omega = 0,1 \text{ rad s}^{-1}$, no entanto, mostra um aumento em pH abaixo de 6, especialmente na maior frequência $\omega = 20 \text{ rad s}^{-1}$ (Fig. 13A). Por outro lado, em frequências $\omega > 25 \text{ rad s}^{-1}$ os autores evidenciaram grande sobreposição dos dados em função do pH (Fig. 13B). Segundo os autores, o comportamento desses coacervados complexos é viscoelástico, compatível com fluidos altamente viscosos. Em adição, Tiwari et al., (2008) determinaram os parâmetros viscoelásticos da mistura entre GA e GB com ou sem encapsulamento de bioativos, através da varredura de frequência. Na Fig. 13C e 13D estão apresentados os valores do módulo viscoso e do módulo de elástico, respectivamente, onde é possível observar maiores valores para o módulo elástico em comparação com o módulo viscoso, indicando que a mistura comporta-se como uma rede bem estruturada. Em complemento, foi possível identificar uma queda dos valores do módulo G' conforme foi adicionado o bioativo, em contrapartida, os valores de G'' aumentaram com a participação do composto encapsulado, determinando um ganho na fluidez da amostra.

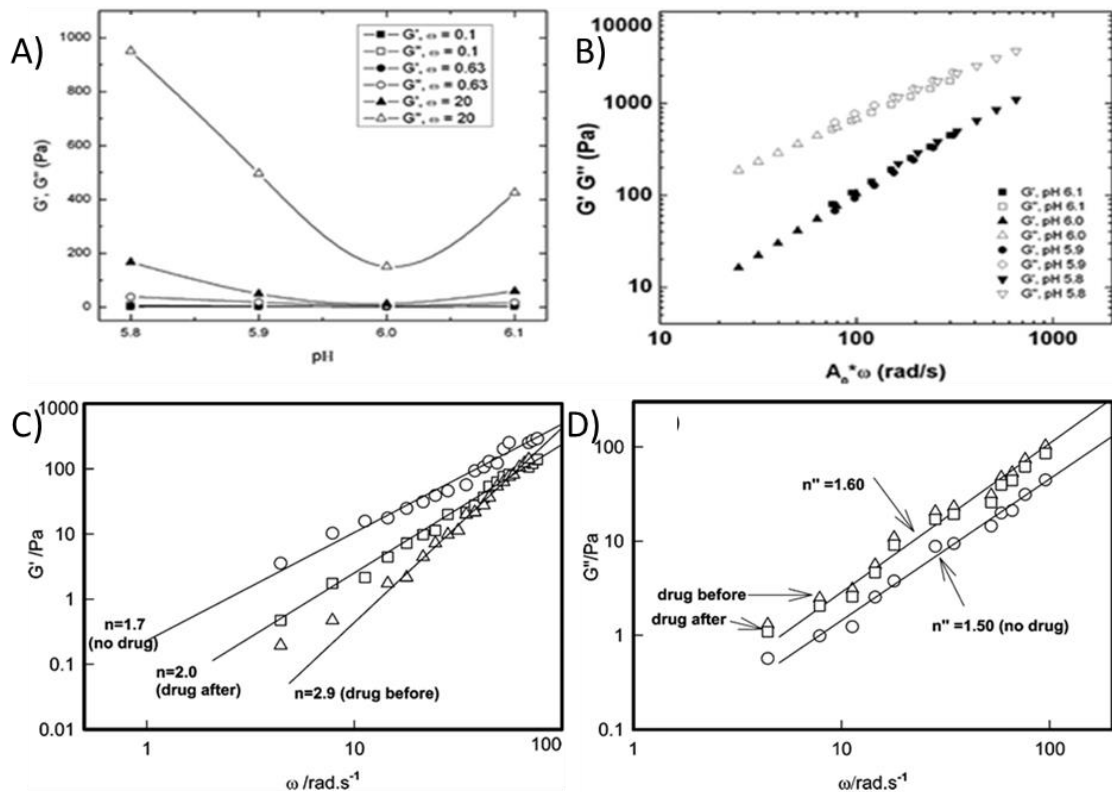


Figura 13: (A) e (B) estudo do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') dos coacervados complexos formados entre β -LG e LF, em função do pH e frequência (ω), respectivamente

(Kizilay et al., 2014). (C) e (D) investigação da dependência dos módulos (G') e (G'') dos complexos de GA e GB em função da frequência (ω) (Tiwari et al., 2008).

3.5 Potenciais aplicações da HPCC

Diversos grupos de pesquisa têm se interessado na HPCC, devido à baixa demanda energética para a formação dos coacervados complexos, por ser um processo espontâneo, nas condições reacionais ideais. Em complemento, as estruturas supramoleculares formadas na HPCC têm demonstrado grande potencial para encapsular e transportar compostos bioativos, para estabilizar emulsões, na formação de nanogéis e na separação e purificação de proteínas. Esta seção abordará brevemente o potencial da HPCC para cada uma das aplicações mencionadas.

3.5.1 HPCC para a encapsulação de compostos bioativos

A HPCC apresenta um alto potencial de encapsulação de moléculas hidrofílicas, como a vitamina B9, de moléculas hidrofóbicas como a vitamina D3, fucoxantina (FX), salbutamol e também de microrganismos probióticos, como o *Lactobacillus reuteri*. Além do potencial em encapsular compostos de interesse, essas estruturas supramoleculares também têm apresentado uma eficácia em sua entrega direcionada. Diarrassouba et al., (2015) estudaram o potencial dos coacervados complexos de β -LG e LYS para encapsular a vitamina D3, atingindo uma taxa de encapsulação da ordem de 90 %. Por sua vez, Chapeau et al., (2016) estudaram o rendimento de formação de complexos entre β -LG e LF na presença de vitamina B9 e atingiram simultaneamente um rendimento de coacervação da ordem de 95 % e uma taxa de encapsulação da vitamina B9 de 90 %. Esse mesmo grupo de pesquisa validou a escalabilidade do processo de encapsulação da vitamina B9 pelos coacervados complexos de β -LG e LF, da escala de microlitros para 1-2 L por meio de um processo de misturas estáticas com um fluxo de 300 mL / min, com rendimento de coacervação de 65% e eficiência de encapsulação de 98% (Chapeau et al., 2017). Em complemento, a vitamina B9 encapsulada pelos coacervados complexos de β -LG e LF apresentou maior estabilidade comparativamente à vitamina B9 não encapsulada, e propiciou igualmente sua maior biodisponibilidade em ensaios *in vivo* (Chapeau et al., 2017).

Zhu et al., (2019) aplicaram a coacervação complexa entre WPI e LYS para a encapsulação de FX. Os autores descreveram um rendimento de encapsulação de aproximadamente 82 %. Esses mesmos autores demonstraram que a encapsulação da FX aumentou sua resistência à degradação termo induzida (75 °C por 2 horas) e propiciou sua

liberação controlada em condições intestinais simuladas (intestino delgado). Por sua vez, Zhao et al., (2020) observaram que a coacervação complexa entre GA e caseinato de sódio (Cas) para encapsular células de *Lactobacillus reuteri*, foi mais eficiente no aumento da taxa de sobrevivência da bactéria ao processo de atomização, comparativamente às células encapsuladas com coacervados complexos de GA e goma arábica.

3.5.2 Aplicações emergentes da HPCC

A HPCC tem ainda potencial para a estabilização de emulsões do tipo pickering e na formação de hidrogéis. Wei et al., (2019) que utilizaram coacervados complexos de ovotransferrina (OVT) e LYS para estabilizar emulsões contendo curcumina e atingiram uma estabilidade de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Por sua vez, Bourbon et al., (2015) descreveram a produção de hidrogéis pela interação entre LF e glicomacropéptido (GMP) e posterior gelificação térmica (80 °C por 20 minutos) do complexo, obtendo estruturas estáveis. Outra aplicação potencial é a separação e purificação de proteínas através de suas interações seletivas durante a coacervação complexa. Conforme relatado por Pathak et al., (2015) em um sistema ternário composto por BSA / β -LG / GB, há uma seletividade de coacervação entre BSA e GB que podem ser recuperadas na fase coacervada e posteriormente separadas por desolvatação, enquanto o β -LG permanece na solução de equilíbrio.

3.6 Referências

- A. Antonov, Y., Zhuravleva, I., Volodine, A., Moldenaers, P., & Cardinaels, R. (2017). Effect of the Helix–Coil Transition in Bovine Skin Gelatin on Its Associative Phase Separation with Lysozyme. *Langmuir*, 33(47), 13530–13542. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01477>
- A. D. McNaught and A. Wilkinson. (1997). *the “Gold Book”* (2nd ed). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology and Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2012). Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00737.x>
- Abd Elgadir, M., Mirghani, M. E. S., & Adam, A. (2013). Fish gelatin and its applications in selected pharmaceutical aspects as alternative source to pork gelatin. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(1), 73–79.
- Ach, D., Briançon, S., Dugas, V., Pelletier, J., Broze, G., & Chevalier, Y. (2015). Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 367–374. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2015.06.006>
- Ainis, W. N., Boire, A., Solé-Jamault, V., Nicolas, A., Bouhallab, S., & Ipsen, R. (2019). Contrasting Assemblies of Oppositely Charged Proteins. *Langmuir*, 35(30), 9923–9933. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01046>
- Alipal, J., Mohd Pu’ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. ., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Anema, S. G., & (Kees) de Kruif, C. G. (2016). Phase separation and composition of coacervates of lactoferrin and caseins. *Food Hydrocolloids*, 52, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.011>
- Anema, S. G., & de Kruif, C. G. (Kees). (2014). Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 430, 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2014.05.036>
- B. Salvatore, D., Duraffourg, N., Favier, A., A. Persson, B., Lund, M., Delage, M.-M., Silvers, R., Schwalbe, H., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Forge, V. (2011). Investigation at Residue Level of the Early Steps during the Assembly of Two Proteins into Supramolecular Objects. *Biomacromolecules*, 12(6), 2200–2210.

- <https://doi.org/10.1021/bm200285e>
- Bachtisi, A. R., & Kiparissides, C. (1996). Synthesis and release studies of oil-containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, 38(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00099-2)
- Bacsik, Z., Mink, J., & Keresztury, G. (2007). *FTIR Spectroscopy of the Atmosphere. I. Principles and Methods*. <https://doi.org/10.1081/ASR-200030192>
- Blocher, W. C., & Perry, S. L. (2017). Complex coacervate-based materials for biomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 9, 1442. <https://doi.org/10.1002/wnan.1442>
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Pereira, R. N., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Development and characterization of lactoferrin-GMP nanohydrogels: Evaluation of pH, ionic strength and temperature effect. *Food Hydrocolloids*, 48, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.026>
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Potier, I. Le, Kerdaniel, T. du F. de, Grossiord, J.-L., Rosilio, V., & Agnely, F. (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(2), 467–477. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2010.11.019>
- Braeckmans, K., Remaut, K., Vandenbroucke, R. E., Lucas, B., De Smedt, S. C., & Demeester, J. (2007). Line FRAP with the confocal laser scanning microscope for diffusion measurements in small regions of 3-D samples. *Biophysical Journal*, 92(6), 2172–2183. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099838>
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C., & Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution — still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481–495. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00205-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00205-0)
- C R Burch and J P P Stock. (1942). Phase-Contrast Microscopy On Phase-Contrast Testing with a Slit Source E H Linfoot-Recent citations. *Journal of Scientific Instruments*, Volume 19, Number 5, 19(5).
- Calvarro, J., Perez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2016). Modification of gelatin functionality for culinary applications by using transglutaminase. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 5–6, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.11.001>
- Canette, A., & Briandet, R. (2014). Microscopy: Confocal Laser Scanning Microscopy. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 676–683). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00214-7>
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M.,

- Figuerola-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., Alamilla-Beltrán, L., García, H. S., & Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Chapeau, A.-L., Tavares, G. M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.02.003>
- Chapeau, A. L., Bertrand, N., Briard-Bion, V., Hamon, P., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2017). Coacervates of whey proteins to protect and improve the oral delivery of a bioactive molecule. *Journal of Functional Foods*, 38, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.009>
- Chapeau, A. L., Hamon, P., Rousseau, F., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2017). Scale-up production of vitamin loaded heteroprotein coacervates and their protective property. *Journal of Food Engineering*, 206, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.005>
- Chapeau, A. L., Tavares, G. M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.003>
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 11, pp. 1229–1240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.001>
- Croguennec, T., Mollé, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β -lactoglobulin monomers. *Protein Science*, 13(5), 1340–1346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1110/ps.03513204>
- Croguennec, T., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14(5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2003.09.005>
- Croguennec, T., Tavares, G. M., & Bouhallab, S. (2017). Heteroprotein complex coacervation: A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 115–126. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2016.06.009>
- D’Onofre Couto, B., Novaes da Costa, R., Castro Laurindo, W., Moraes da Silva, H., Rocha

- da Silva, C., Sélia dos Reis Coimbra, J., Barbosa Mageste, A., de Cássia Dias, S., & José Boggione Santos, I. (2021). Characterization, techno-functional properties, and encapsulation efficiency of self-assembled β -lactoglobulin nanostructures. *Food Chemistry*, 356, 129719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129719>
- David W. Newton, & Peter J. Tarcha. (1991). Chapter 4. Coacervation: Principles and applications. In *Polymers for controlled drug delivery* (pp. 67–81).
- Davies B.H. (1976). *Carotenoids*, in: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press , Londres.
- Dawson, J. M., & Heatlie, P. L. (1984). Lowry method of protein quantification: Evidence for photosensitivity. *Analytical Biochemistry*, 140(2), 391–393. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90183-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90183-0)
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340–349. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2004.09.006>
- Desfougères, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S., & Nau, F. (2010). Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(12), 4138–4144. <https://doi.org/10.1021/jp9090427>
- Diarrassouba, F., Remondetto, G., Garrait, G., Alvarez, P., Beyssac, E., & Subirade, M. (2015). Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. *Food Chemistry*, 173, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.009>
- Díaz, P., Opez, D. L. ´, Matiacevich, S., Osorio, F., & Enrione, J. (2011). State diagram of salmon (*Salmo salar*) gelatin films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, 2558–2565. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4451>
- Donald, A. M. (2008). Aggregation in β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 4(6), 1147–1150. <https://doi.org/10.1039/b800106e>
- Du, X., Seeman, D., L. Dubin, P., & A. Hoagland, D. (2015). Nonfreezing Water Structuration in Heteroprotein Coacervates. *Langmuir*, 31(31), 8661–8666. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01647>
- Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., & Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 43, 360–376. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.06.006>
- Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., & Escher, F. (2001). Visualization of

- Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science and Technology*, 34(1), 11–17. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0739>
- E. Flanagan, S., J. Malanowski, A., Kizilay, E., Seeman, D., L. Dubin, P., Donato-Capel, L., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2015). Complex Equilibria, Speciation, and Heteroprotein Coacervation of Lactoferrin and β -Lactoglobulin. *Langmuir*, 31(5), 1776–1783. <https://doi.org/10.1021/la504020e>
- Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Babel, W. (2007). Molecular Weight Influence on Gelatin Gels: Structure, Enthalpy and Rheology Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Babel, W. *Macromolecular Symposia*, 256, 149–157. <https://doi.org/10.1002/masy.200751017>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 70–77.
- Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>
- García, R., & Pérez, R. (2002). Dynamic atomic force microscopy methods. In *Surface Science Reports* (Vol. 47, Issues 6–8, pp. 197–301). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0167-5729\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/s0167-5729(02)00077-8)
- Giordano, E., & Quadro, L. (2018). Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 647, pp. 33–40). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.008>
- Goldstein, Joseph I . Newbury, Dale E. Michael, Joseph R. Ritchie, Nicholas W.M. Scott, John H. Joy, D. C. (2017). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis* (Springer (ed.); Fourth Edi). https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=D0I_DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=scanning+electron+microscopy&ots=36MF2lGkon&sig=ENVphhYlkTaOT8XsfzWhs5QlkAM#v=onepage&q=scanning electron microscopy&f=false
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 25, Issue 8, pp. 1813–1827). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 3–

- 16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Guo, L., H. Colby, R., P. Lusignan, C., & H. Whitesides, T. (2003). Kinetics of Triple Helix Formation in Semidilute Gelatin Solutions. *Macromolecules*, 36(26), 9999–10008. <https://doi.org/10.1021/ma034264s>
- Haihong Wang, Mary D. Pato, P. J. S. (2005). Biochemical Properties of Natural Actomyosin Extracted from Normal and Pale, Soft, and Exudative Pork Loin After Frozen Storage H H H H HAIHONG AIHONG AIHONG ABSTRA ABSTRA ABSTRA ABSTRA ABSTRACT CT CT CT CT. In *JOURNAL OF FOOD SCIENCE C313 Published on Web* (Vol. 70). www.ift.org
- Hempel, J., Schädle, C. N., Leptihn, S., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 317, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.10.024>
- Henley, E. C., Taylor, J. R. N., & Obukosia, S. D. (2010). The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 21–52. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60002-2)
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein - Which is best? *Journal of Sports Science and Medicine*, 3(3), 118–130.
- Ibarra-Molero, B., Naganathan, A. N., Sanchez-Ruiz, J. M., & Muñoz, V. (2016). Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry. In *Methods in Enzymology* (Vol. 567, pp. 281–318). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.027>
- Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 531, Issues 1–2, pp. 100–109). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.008>
- Jones, O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 239–248. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2009.10.001>
- Kayitmazer, A. B. (2017). Thermodynamics of complex coacervation. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 239, pp. 169–177). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.07.006>
- Kayitmazer, A. B., Seeman, D., Minsky, B. B., Dubin, P. L., & Xu, Y. (2013). Protein-

- polyelectrolyte interactions. *Soft Matter*, 9(9), 2553–2583. <https://doi.org/10.1039/c2sm27002a>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1751, Issue 2, pp. 119–139). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kizilay, E., Kayitmazer, A. B., & Dubin, P. L. (2011). Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 24–37. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2011.06.006>
- Kizilay, E., Seeman, D., Yan, Y., Du, X., Dubin, P. L., Donato-Capel, L., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2014). Structure of bovine β -lactoglobulin-lactoferrin coacervates. *Soft Matter*, 10(37), 7262–7268. <https://doi.org/10.1039/c4sm01333f>
- Kö Nig, P., Krasteva, G., Tag, C., Kö Nig, I. R., Arens, C., & Kummer, W. (2006). FRET-CLSM and double-labeling indirect immunofluorescence to detect close association of proteins in tissue sections. *Laboratory Investigation*, 86, 853–864. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700443>
- Krebs, M. R. H., Domike, K. R., Cannon, D., & Donald, A. M. (2008). Common motifs in protein self-assembly. *Faraday Discussions*, 139, 265–274. <https://doi.org/10.1039/b715879c>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Communications*, 227(5259), 680–685.
- Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media.
- LAKOWICZ, J. R. (Ed. . (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Laligant, A., Dumay, E., Valencia, C. C., Cuq, J. L., & Cheftel, J. C. (1991). Surface Hydrophobicity and Aggregation of β -Lactoglobulin Heated near Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(12), 2147–2155. <https://doi.org/10.1021/jf00012a009>
- Liang, L., Tremblay-Hébert, V., & Subirade, M. (2011). Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. *Food Chemistry*, 126(3), 821–826. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.029>
- Lowry O H, Rosebrough N J, F. A. L. & R. R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951. *Journal of Biological Chemistry*, 193,

- 265–275. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0753-5_100521
- Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., Nobbmann, U., Sayre, P., & Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, 5, 953–965. <https://doi.org/10.1039/c6en00136j>
- Lv, L. C., Huang, Q. Y., Ding, W., Xiao, X. H., Zhang, H. Y., & Xiong, L. X. (2019). Fish gelatin: The novel potential applications. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 63, p. 103581). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>
- Ma, K., Huang, D., Cai, J., Cai, X., Gong, L., Huang, P., Wang, Y., & Jiang, T. (2016). Surface functionalization with strontium-containing nanocomposite coatings via EPD. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.036>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 10, pp. 1197–1211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Malvern Panalyti. (2021). *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry>
- Mantovani, Raphaela A., Rasesa, M. L., Vidotto, D. C., Mercadante, A. Z., & Tavares, G. M. (2021). Binding of carotenoids to milk proteins: Why and how. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.088>
- Mantovani, Raphaela Araujo, Hamon, P., Rousseau, F., Tavares, G. M., Mercadante, A. Z., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2020). Unraveling the molecular mechanisms underlying interactions between caseins and lutein. *Food Research International*, 138, 109781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109781>
- Marc De Graef. (2003). *Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy* (Cambridge university press (ed.); First). 2003. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=jrwByYIK0QAC&oi=fnd&pg=PR1&dq=transmission+electron+microscopy&ots=ZaAksSbLHH&sig=nZ8APQ2OU9KmVJf3BskJqXZYWDM#v=onepage&q=transmission electron microscopy&f=false>
- Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(2), 135–147.

- Marsac, P., Piérard, N., Porot, L., Van, W., Grenfell, J., Mouillet, V., Pouget, S., Besamusca, J., Farcas, F., Gabet, T., Hugener, M., Marsac, P., Farcas, F., Gabet, Á. T., Gabet, T., Piérard, N., Porot, L., Van, W., Grenfell, J., ... Hugener, M. (2014). Potential and limits of FTIR methods for reclaimed asphalt characterisation. *Materials and Structures*, 47, 1273–1286. <https://doi.org/10.1617/s11527-014-0248-0>
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865–1880. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.04.014>
- MATÉ, J. I., & KROCHTA, J. M. (1994). β -Lactoglobulin Separation from Whey Protein Isolate on a Large Scale. *Journal of Food Science*, 59(5), 1111–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08203.x>
- McManus, J. J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., & Asherie, N. (2016). The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 22, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.02.011>
- Menczel, J. D., & Jose, S. (2009). *THERMAL ANALYSIS OF POLYMERS Fundamentals and Applications EDITED BY R. BRUCE PRIME* (Issue 978). www.wiley.com/go/permission. www.wiley.com.
- Mezzenga, R., & Fischer, P. (2013). The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports on Progress in Physics*, 76(4). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/4/046601>
- Missana, T., & Adell, A. (2000). On the applicability of DLVO theory to the prediction of clay colloids stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 230(1), 150–156. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7003>
- Monteiro, A. A., Monteiro, M. R., Pereira, R. N., Diniz, R., Costa, A. R., Malcata, F. X., Teixeira, J. A., Teixeira, Á. V., Oliveira, E. B., Coimbra, J. S., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2016). Design of bio-based supramolecular structures through self-assembly of α -lactalbumin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 58, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.009>
- Müller, M. (2013). *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II Application Aspects*.
- Nairn, J. G. (1995). 3 Coacervation-phase separation technology. *Advances in Pharmaceutical Sciences*, 7, 93–219. [https://doi.org/10.1016/S0065-3136\(06\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3136(06)80005-1)
- Nigen, M., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2009). Formation and stability of α -lactalbumin-

- lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.005>
- Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., & Bouhallab, S. (2007). Temperature affects the supramolecular structures resulting from α -lactalbumin - Lysozyme interaction. *Biochemistry*, 46(5), 1248–1255. <https://doi.org/10.1021/bi062129c>
- Nikoo, M., Benjakul, S., Bashari, M., Alekhorshied, M., Cissouma, A. I., Yang, N., & Xu, X. (2014). Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. *Food Bioscience*, 5, 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2013.10.004>
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>
- Olivier, J. P. (1965). Colloidal Dispersions, Electrokinetic Effects, and the concept of zeta potential. *Industrial and Engineering Chemistry*, 57(8), 32–50. <https://doi.org/10.1021/ie50668a007>
- Pathak, J., Rawat, K., Aswal, V. K., & Bohidar, H. B. (2014). Hierarchical surface charge dependent phase states of gelatin-bovine serum albumin dispersions close to their common pI. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(38), 11161–11171. <https://doi.org/10.1021/jp5068846>
- Pathak, J., Rawat, K., Aswal, V. K., & Bohidar, H. B. (2015). Interactions in globular proteins with polyampholyte: coacervation route for protein separation †. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c4ra13133a>
- Pathak, J., Rawat, K., & Bohidar, H. B. (2015). Charge heterogeneity induced binding and phase stability in β -lacto-globulin-gelatin B gels and coacervates at their common pI. *RSC Advances*, 5(82), 67066–67076. <https://doi.org/10.1039/c5ra07195j>
- Priftis, D., Laugel, N., & Tirrell, M. (2012). Thermodynamic Characterization of Polypeptide Complex Coacervation. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la302729r>
- Priftis, D., Leon, L., Song, Z., Arah, S., Perry, L., Margossian, K. O., Tropnikova, A., Cheng, J., & Tirrell, M. (2015). Self-Assembly of α -Helical Polypeptides Driven by Complex Coacervation. *Angewandte Chemie*, 127. <https://doi.org/10.1002/anie.201504861>
- Priftis, D., & Tirrell, M. (2012). Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions †. *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/c2sm25604e>
- Qin, B. Y., Jameson, G. B., Bewley, M. C., Baker, E. N., & Creamer, L. K. (2008). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -

- lactoglobulin. *Protein Science*, 8(1), 75–83. <https://doi.org/10.1110/ps.8.1.75>
- Rabelo, R. S., Tavares, G. M., Prata, A. S., & Hubinger, M. D. (2019). Complexation of chitosan with gum Arabic, sodium alginate and κ -carrageenan: Effects of pH, polymer ratio and salt concentration. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115120. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115120>
- Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. C. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
- Sahoo, N., Sahoo, R. K., Biswas, N., Guha, A., & Kuotsu, K. (2015). Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 317–331. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.08.006>
- Sai-Ut, S., Jongjareonrak, A., & Rawdkuen, S. (2012). Re-extraction, Recovery, and Characteristics of Skin Gelatin from Farmed Giant Catfish. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0408-3>
- Salvatore, D. B., Duraffourg, N., Favier, A., Persson, B. A., Lund, M., Delage, M. M., Silvers, R., Schwalbe, H., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Forge, V. (2011). Investigation at residue level of the early steps during the assembly of two proteins into supramolecular objects. *Biomacromolecules*, 12(6), 2200–2210. <https://doi.org/10.1021/bm200285e>
- Santos, M. B., Costa, A. R. da, & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme: Formation and thermodynamic characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1323–1329. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.132>
- Santos, M. B., de Carvalho, C. W. P., & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 74, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.016>
- Sarwar, G. (1997). The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 758–764. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.758>
- Sava, N., Van Der Plancken, I., Claeys, W., & Hendrickx, M. (2005). The Kinetics of Heat-Induced Structural Changes of β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1646–1653. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(05\)72836-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(05)72836-8)
- Schick, C. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers.

- Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6). <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3169-y>
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.10.001>
- Shen, X., Fang, T., Gao, F., & Guo, M. (2017). Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. *Food Hydrocolloids*, 63, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003>
- Sing, C. E., & Perry, S. L. (2020). Recent progress in the science of complex coacervation. *Cite This: Soft Matter*, 16, 2885. <https://doi.org/10.1039/d0sm00001a>
- Singh, S., Rao, K. V. R., Venugopal, K., & Manikandan, R. (2002). Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations: A review of the problem, test methods, and solutions. *Pharmaceutical Technology North America*, 26(4), 36–58.
- Siow, L.-F. (2012). Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *Journal of Food Processing & Technology*, 04(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000199>
- Sliwka, B. W. (1975). *Microencapsulation*. 14, 539–550.
- Stetefeld, J., Mckenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Sultana, S., Hossain, M. A. M., Zaidul, I. S. M., & Ali, M. E. (2018). Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products. *LWT - Food Science and Technology*, 92, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.019>
- Taheri, A., Abedian Kenari, A. M., Gildberg, A., & Behnam, S. (2009). Extraction and physicochemical characterization of greater lizardfish (*Saurida tumbil*) skin and bone gelatin. *Journal of Food Science*, 74(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01106.x>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food*

- Science and Technology*, 37(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.008>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48, 238–247. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.02.027>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2017). How the presence of a small molecule affects the complex coacervation between lactoferrin and β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.007>
- Tiwari, A., Bindal, S., & B. Bohidar, H. (2008). Kinetics of Protein–Protein Complex Coacervation and Biphasic Release of Salbutamol Sulfate from Coacervate Matrix. *Biomacromolecules*, 10(1), 184–189. <https://doi.org/10.1021/bm801160s>
- Trinh, L. A., & Fraser, S. E. (2015). Imaging the Cell and Molecular Dynamics of Craniofacial Development. Challenges and New Opportunities in Imaging Developmental Tissue Patterning. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 115, pp. 599–629). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.09.002>
- Veis, A., & Cohen, J. (1958). The role of cross-linkages in the solubilization of insoluble collagen. *Journal of Physical Chemistry*, 62(4), 459–462. <https://doi.org/10.1021/j150562a022>
- Wang, B., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158, 358–365. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.02.135>
- Wang, G., & Fang, N. (2012). Detecting and tracking nonfluorescent nanoparticle probes in live cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 504, pp. 83–108). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00004-5>
- Wei, Z., Cheng, Y., & Huang, Q. (2019). Heteroprotein complex formation of ovotransferrin and lysozyme: Fabrication of food-grade particles to stabilize Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 96, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.024>
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., & G. de Kruif, C. (2003). Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4(2), 293–303. <https://doi.org/10.1021/bm025667n>
- Wu, F.-G., Luo, J.-J., & Yu, Z.-W. (2011). Unfolding and refolding details of lysozyme in the presence of β -casein micelles. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 13, 3429–3436. <https://doi.org/10.1039/c0cp01184c>
- Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Domingos, L. D., & Viotto, W. H. (2012).

- Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Quimica Nova*, 35(10), 2057–2062. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000028>
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1482–1494. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6491>
- Y. Qin, B., C. Bewley, M., K. Creamer, L., M. Baker, H., N. Baker, E., & B. Jameson, G. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 37(40), 14014–14023. <https://doi.org/10.1021/bi981016t>
- Yan, Y., Kizilay, E., Seeman, D., Flanagan, S., L. Dubin, P., Bovetto, L., Donato, L., & Schmitt, C. (2013). Heteroprotein Complex Coacervation: Bovine β -Lactoglobulin and Lactoferrin. *Langmuir*, 29(50), 15614–15623. <https://doi.org/10.1021/la4027464>
- Yi, J., Fan, Y., Yokoyama, W., Zhang, Y., & Zhao, L. (2016). Characterization of milk proteins–lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. *Food Chemistry*, 200, 91–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.035>
- Zhang, Y., & Zhong, Q. (2013). Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. *Food Chemistry*, 139(1–4), 611–616.
- Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105, 105790. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105790>
- Zheng, J., Gao, Q., Tang, C. he, Ge, G., Zhao, M., & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex formation of soy protein isolate and lactoferrin: Thermodynamic formation mechanism and morphologic structure. *Food Hydrocolloids*, 100, 105415. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105415>
- Zheng, J., Tang, C. he, Ge, G., Zhao, M., & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex of soy protein isolate and lysozyme: Formation mechanism and thermodynamic characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, 105571. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105571>
- Zheng, J., Tang, C. he, & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex coacervation: Focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 284, p. 102268). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102268>

- Zhu, J., Li, H., Xu, Y., & Wang, D. (2019a). Construction of Fucoxanthin Vector Based on Binding of Whey Protein Isolate and Its Subsequent Complex Coacervation with Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 2980–2990. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06679>
- Zhu, J., Li, H., Xu, Y., & Wang, D. (2019b). Construction of Fucoxanthin Vector Based on Binding of Whey Protein Isolate and Its Subsequent Complex Coacervation with Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 2980–2990. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06679>

**4 IMPACTO DA ESTRUTURA DA BETA-LACTOGLOBULINA EM SUA
COACERVAÇÃO COMPLEXA COM A GELATINA DO TIPO A, E NA
HABILIDADE DOS COACERVADOS FORMADOS EM ENCAPSULAR
LUTEÍNA**

O material apresentado neste capítulo será submetido para publicação na revista “Química Nova”.

RESUMO

A coacervação complexa heteroproteica (HPCC) tem atraído a atenção de grupos de pesquisa de diversas áreas por suas diversas aplicações potenciais, como a encapsulação de compostos bioativos. No entanto, o processo de HPCC é bastante sensível aos diversos fatores reacionais e altamente dependente das proteínas envolvidas e do seu estado conformacional. Nesse sentido, o presente trabalho caracterizou o processo de HPCC entre a gelatina do tipo A (GA) e a β -lactoglobulina (β -LG) antes e depois de tratamento térmico a 70 °C/5 min (β -LG-TT), bem como, avaliou o potencial dos coacervados complexos obtidos para encapsular a luteína. A β -LG-TT apresentou uma maior hidrofobicidade superficial e uma maior concentração de grupos SH livres superficiais, em comparação à β -LG. As condições ideais de coacervação complexa entre GA e β -LG e entre GA e β -LG-TT foram observadas em pH 6,5; mínima força iônica e razão mássica GA: β -LG de 2,5:1. O tratamento térmico aplicado permitiu o desdobramento da β -LG, o que afetou negativamente o rendimento de coacervação. A eficiência de encapsulação de luteína nos coacervados complexos formados entre GA e β -LG foi de 79,6 % $\pm$ 0,8 %, superior àquela observada nos coacervados complexos formados entre GA e β -LG-TT (68,9 % $\pm$ 0,6 %). Ainda assim, os coacervados complexos entre GA e as diferentes β -LG exibiram um grande potencial de aplicação para encapsular a luteína.

Palavras-chave: coacervação complexa, proteínas, encapsulação, luteína.

4.1 Introdução

A Coacervação Complexa Heteroproteica (HPCC) apresenta diversas aplicações potenciais, como por exemplo, a estabilização de emulsões, a separação e purificação de proteínas, a formação de nanogéis e a encapsulação e transporte de compostos bioativos (Bourbon et al., 2015; Tavares et al., 2015; Wei et al., 2019). A eficiente encapsulação e o transporte de compostos bioativos, torna a HPCC uma solução para proteger moléculas altamente sensíveis às diferentes condições reacionais (Zhao et al., 2020). A luteína, por exemplo, que é uma xantofila (hidroxicarotenoide) bioativa bastante importante por modular positivamente a saúde dos olhos, possui grande sensibilidade à luz, oxigênio e calor, podendo se beneficiar pela encapsulação (Giordano & Quadro, 2018).

A β -lactoglobulina (β -LG) está entre as proteínas alimentares mais frequentemente aplicadas nos estudos de HPCC. Esta proteína do soro de leite apresenta uma cavidade hidrofóbica, disponibilizando três sítios preferenciais para facilitar o carregamento de moléculas hidrofóbicas. Além disso, apresenta ótimas tecno-funcionalidades, como boa solubilidade e excelentes propriedades emulsificante, espumante e gelificante (Chatterton et al., 2006; Couto et al., 2021). A β -LG apresenta 162 resíduos de aminoácidos, sua estrutura terciária é composta por aproximadamente 10 % de α -hélices, cerca de 43 % de folhas- β e em torno de 47 % de estruturas não ordenadas (Brownlow et al., 1997). Em complemento, contém 5 resíduos de cisteína (Cys), quatro deles formando duas ligações dissulfeto, o que tem forte contribuição na estabilidade estrutural da proteína (Qin et al., 1998). Em complemento, a gelatina do tipo A (GA) também apresenta excelentes propriedades tecno-funcionais, como boa força de gel em pequenas concentrações, capacidade de retenção de água e alta dispersibilidade em sistemas aquosos. A GA está entre as principais proteínas com aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, por sua capacidade de formar hidrogéis, filmes de revestimento, além de apresentar a capacidade de encapsular e transportar compostos bioativos (Elgadir et al., 2013; Alipal et al., 2021; Ma et al., 2016; Mariod & Adam, 2013; Calvarro et al., 2016; Gomez et al., 2011; Nur et al., 2014; Ramos et al., 2016). A estrutura da GA é alargada e em espiral (tríplice hélice) formada por cinco frações proteicas, sendo duas α , uma β e duas γ (Alipal et al., 2021; Mariod & Adam, 2013). Esta proteína também figura entre aquelas frequentemente aplicadas em estudos de HPCC.

Vários grupos de pesquisa têm-se interessado em elucidar as peculiaridades do processo de HPCC. Além da participação de interações de curto e longo alcance, como interações eletrostáticas, hidrofóbicas e forças de van der Waals, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos afetam o processo de HPCC (Schmitt et al., 2011)(Missana et al., 2000). Os

efeitos das condições reacionais como força iônica, pH, concentração proteica e razão mássica/molar são frequentemente abordadas durante a caracterização do processo de coacervação complexa em duas proteínas (Croguennec et al., 2017; Zheng, Tang, & Sun, 2020). Apesar disso, poucos abordam o impacto da estrutura terciária das proteínas em seu processo de HPCC.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a caracterização do processo da HPCC entre a GA e a β -LG apresentando diferentes estados estruturais, em função do pH, força iônica e razão proteica. E por fim, os coacervados complexos obtidos foram igualmente avaliados quanto ao seu potencial de encapsular a luteína.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Materiais

A GA (Bloom=300, 98,0 % de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA). O isolado proteico de soro de leite (WPI, com uma composição segundo o fabricante: 94,0 % m / m de proteína; 0,9 % m / m de gordura; 2,0 % m / m de lactose e 0,4 % m / m de minerais) foi obtida de uma fonte comercial confidencial. Reagente de Folin, albumina de soro bovino (BSA) e Tris (hidroximetil) aminometano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA). Ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfônico (ANS) foi adquirido da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, EUA). Os demais produtos químicos foram comprados da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

4.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A caracterização das frações proteicas presentes na GA foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecilsulfato de sódio- (SDS-PAGE) em condições redutoras, de acordo com (Laemmli, 1970) com algumas modificações. As dispersões de GA (2 % m / v) foram misturadas com tampão Laemmli sob condições redutoras utilizando β -mercaptoetanol como agente redutor e incubadas a 95 °C por 5 min. Para a separação foram utilizados géis de poliacrilamida a 12 % e o equipamento Mini-Protean Tetra Cell System (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) operando a 110 V e 3,0 A. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o marcador de massa molecular utilizado foi o Precision Plus *Protein*TM Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) na faixa de 10 a 250 kDa.

4.2.3 Purificação e modificação estrutural da β -LG

A β -LG foi obtida a partir do WPI comercial através do método de *salting out* proposto por Maté & Kochta (1994). Brevemente, o WPI foi diluído em água a uma concentração de 15,0 % de proteína, depois o pH da dispersão foi ajustado para 2,0 e a mesma foi suplementada com 7,0 % de NaCl. Em seguida, a dispersão foi centrifugada a 24000 g por 2 min a uma temperatura 20 °C, para a ocorrência da separação das proteínas precipitadas. O sobrenadante contendo a β -LG foi diafiltrado contra água deionizada para a retirada do sal e posteriormente foi liofilizado e estocado à -20°C até uso. Para induzir mudanças estruturais à proteína, a β -LG foi submetida a um tratamento térmico a 70 °C por 5 min, em uma concentração proteica de 4 % (m / m) e pH 7,0, em seguida foi rapidamente resfriada em

banho de gelo, obtendo a β -LG (TT). O tratamento térmico aplicado foi definido de modo a induzir a desnaturação parcial da β -LG, mas minimizando a formação de agregados (sem alteração de turbidez da dispersão). Para cada uma das replicatas conduzidas, o tratamento térmico foi realizado de forma independente.

4.2.4 Determinação hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial da β -LG e da β -LG (TT) foi determinada utilizando uma sonda fluorescente 1-anilino-8-naftalenossulfonato (ANS) como descrito por (Wang & Pato, 2005). As amostras foram diluídas com tampão fosfato 10 mM a pH 7, para obter concentrações de 0,0025 % até 0,02 % (m / m) de proteína, com intervalos de 0,0025 % (m / m). Para as medições, 20 μ L da sonda ANS preparada no mesmo tampão a uma concentração de 8 mM foram adicionados a 4 mL da solução de proteína. As dispersões foram mantidas por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi medida com excitação em 390 nm e o espectro de emissão foi coletado de 390 a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, EUA). Os controles foram realizados com as soluções de proteínas sem ANS e tampão com ANS. O índice de hidrofobicidade superficial (H_0) foi obtido pelo coeficiente angular da regressão linear dos dados de fluorescência pela concentração proteica. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.5 Determinação da concentração de grupos sulfidrila livre (SH)

A concentração de grupos SH livres totais e superficiais das dispersões de β -LG e β -LG (TT) foram determinados usando 5-5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), seguindo a metodologia de Shen et al., (2017). À 0,5 mL de cada dispersão de proteína foi adicionado 2,5 mL de tampão Tris-glicina (0,086 M de Tris, 0,09 M de glicina, 0,004 M de EDTA, pH 8,0) para a determinação das sulfidrilas livres superficiais. O mesmo procedimento com adição de 8 M de uréia ao tampão foi realizado para a quantificação dos SH livres totais. Posteriormente, foi adicionado 20 μ L de reagente Ellman para cada uma das soluções, e a absorbância das dispersões foi determinada em 412 nm utilizando o leitor Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, EUA) após 15 min. O experimento foi realizado em triplicata, e os teores de SH livres superficiais e totais foram calculados conforme equação abaixo.

$$\mu\text{mol SH/g} = (73,53 * A_{412} * D)/C$$

Onde: A_{412} é a absorvância a 412 nm; C = Concentração de proteína $C = (9,2 \text{ mg.mL}^{-1})$; D = fator de diluição e 73,53 é de $10^6 / (1,36 * 10^4)$; $1,36 * 10^4$ = constante de absorvidade molar ($(M^{-1}.cm^{-1})$) (Ellman, 1959).

4.2.6 Cromatografia de exclusão de tamanho

A cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) foi realizada para a caracterização das dispersões de β -LG e β -LG (TT), a uma concentração de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína em tampão fosfato 20 mM em pH 6,5. Antes da injeção, as dispersões foram centrifugadas a 10000 g por 15 min a 25 °C (centrifuga Allegra 64R Beckman Coulter Inc. CA, USA). As amostras foram injetadas em uma coluna Biosep SEC-s3000 e a eluição isocrática com tampão fosfato 20 mM em pH 6,5 a $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ foi assegurada pelo cromatógrafo AKTA Pure (GE HealthCare Bioscience AB, Rosenberg, SE, USA) e monitorada com detector UV a 280 nm.

4.2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase-reversa

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase-reversa foi igualmente realizada para a caracterização das dispersões de β -LG e β -LG (TT), a uma concentração de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteína. Antes da injeção, as dispersões foram centrifugadas a 10000 g por 10 min a 25 °C (centrifuga Allegra 64R Beckman Coulter Inc. CA, USA). As amostras foram injetadas em uma coluna PLRP-S (Varian Inc., Shropshire, UK) e eluídas com um gradiente de água/acetonitrila acidificadas com ácido trifluoracético em HPLC-DAD (High Efficiency Liquid Chromatography, Shimadzu Prominence). A eluição foi monitorada por leitura UV a 280 nm.

4.2.8 Preparação das soluções mãe e dos coacervados complexos

As soluções mães da β -LG foram preparadas a 4 % (m / v) de proteína, a partir da solubilização do pó liofilizado de β -LG em água milli Q com agitação constante durante 3 h a temperatura ambiente para permitir sua hidratação. Utilizando a solução mãe de β -LG, a solução mãe de β -LG (TT) foi obtida conforme descrito no tópico “Purificação e modificação estrutural da β -LG”. A solução mãe da GA foi preparada a 2 % (m / v) de proteína, a solubilização foi realizada conforme descrito anteriormente, diferindo somente a temperatura (40 °C). As soluções foram ajustadas para diferentes pHs (de 6,0 a 9,0) utilizando HCl ou NaOH 1 mol L⁻¹.

Os complexos foram formados a partir da mistura das soluções mãe, seguindo uma ordem de mistura GA- β -LG ou GA- β -LG (TT). Foram testadas razões mássicas GA: β -LG ou GA: β -LG (TT) de 2:1, 2,5:1, 2,8:1, 3:1, 3,2:1, 3,5:1. Além disso, foi analisada a influência da força iônica na coacervação complexa entre as proteínas e para isso, as proteínas foram misturadas na presença de concentrações crescentes de NaCl, 5, 10 e 20 mM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.9 Medições de potencial zeta (ζ)

O potencial ζ dos complexos de GA + β -LG e GA + β -LG (TT) na razão mássica 2,5:1, bem como das proteínas individualmente, foi determinado em função do pH usando um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As dispersões foram diluídas a 0,1 %, e as amostras foram colocadas nas células de mobilidade eletroforética e após 2 minutos de equilíbrio na temperatura de 25 °C, um potencial de 150 V foi aplicado. A mobilidade eletroforética das dispersões foi convertida em potencial ζ pelo software Malvern através da equação de Henry, com a aproximação de Smoluchowski ($F(Ka) = 1,5$). A constante dielétrica, o índice de refração foram fixados em 78,5, 1,333, respectivamente.

4.2.10 Turbidimetria das misturas

A complexação entre as proteínas GA + β -LG e GA + β -LG (TT) foi monitorada através de medições de absorbância a 600 nm (A_{600nm}) utilizando equipamento Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, EUA). As medidas de absorbância foram convertidas em medidas de turbidez pela equação:

$$T = (2,303 * A_{600nm})/l$$

Onde T = turbidez (cm^{-1}), e l = caminho ótico (1 cm).

GA e β -LG ou GA e β -LG (TT) foram misturadas nesta ordem diretamente nos poços da microplaca. As medições de absorbância foram realizadas logo após a mistura e a cada 30 minutos, durante o período de 150 min.

4.2.11 Microscopia óptica dos complexos

As misturas entre GA + β -LG e GA + β -LG (TT) foram observadas em microscopia ótica para verificação da formação de coacervados complexos, agregados amorfos ou ausência de formação de estruturas supramoleculares. As observações foram realizadas usando um microscópio óptico (Digilab DI-136M) com ampliação de 800x. Nas

dispersões controle (proteínas individuais nas mesmas condições dos complexos) não foi observada a formação de nenhuma estrutura supramolecular.

4.2.12 Quantificação do rendimento da coacervação complexa

O rendimento de formação de coacervados complexos entre de GA e β -LG e entre GA e β -LG (TT) foi determinado pela relação entre o teor de proteínas inicial e o teor de proteínas remanescente na solução de equilíbrio (sobrenadante de centrifugação) através do método de Lowry (Dawson & Heatlie, 1984; Lowry & Rosebrough, 1951). Para a determinação do teor inicial de proteína (γ_I), as amostras foram analisadas imediatamente após a mistura, respeitando as diferentes razões mássicas descritas no tópico “Preparação das soluções mãe das proteínas e seus coacervados”. Complementarmente, após 90 min de preparo das misturas nas mesmas condições descritas anteriormente, elas foram centrifugadas a 19800 g por 10 min a 25 °C para a separação da fase coacervada (maior densidade) da solução de equilíbrio (sobrenadante). Então o teor de proteína do sobrenadante foi determinado (γ_S).

O rendimento de coacervação complexa foi calculado pela seguinte relação:

$$\gamma_C (\%) = 1 - (\gamma_S / \gamma_I)$$

Onde $\gamma_C(\%)$ corresponde ao rendimento total coacervação; γ_S corresponde ao teor de proteínas remanescente no sobrenadante e γ_I corresponde ao teor de proteínas inicial em cada uma das diferentes misturas.

Na aplicação do método de Lowry, albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada para construção de curva padrão (0 a 0,3 mg/mL) e a determinação de absorbância a 660 nm (A_{660nm}) foi realizada utilizando equipamento Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas independentes.

4.2.13 Quenching de fluorescência entre luteína e β -LG e entre luteína e β -LG (TT)

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) entre luteína e β -LG e entre luteína e β -LG (TT) foi determinada por *quenching* de fluorescência de acordo com (Mantovani et al., 2020) com modificações, utilizando equipamento Synergy Mx (Biotek instruments, Winooski, EUA). As dispersões de proteína a 1 μ M foram preparadas em tampão fosfato 10 mM a pH 6,5. A solução-estoque de luteína a 170 μ M foi preparada em etanol. Para a realização do *quenching* de fluorescência, ao volume de 2 mL de cada uma das dispersões de proteínas foram adicionadas quantidades crescentes da solução-estoque de luteína para uma varredura de razões molares de luteína / β -LG variando de 0 a 8. Cada relação molar estudada

foi preparada de forma independente das demais, e para todas as determinações do ensaio, a concentração final de etanol de 5 % foi fixada. As leituras de fluorescência foram realizadas após 15 min de equilíbrio ao abrigo da luz com um comprimento de onda de excitação de 280 nm e a coleta de um espectro de emissão entre 300 e 450 nm. Para a correção do efeito de filtro interno, o espectro de absorbância entre 250 e 600 nm para cada uma das razões luteína/ β -LG analisadas, foi coletado (Lakowicz, 2006). As constantes de dissociação foram determinadas pela aplicação da relação de Stern-Volmer. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.14 Eficiência de encapsulação da luteína pelos coacervados complexos

Para verificar o potencial dos coacervados complexos na encapsulação de carotenoides, foram preparadas misturas de GA+ β -LG e GA+ β -LG (TT) na razão mássica de 2,5:1 em pH de 6,5, contendo uma concentração de 8 μ M de luteína. As diferentes misturas foram mantidas em repouso por 90 min ao abrigo da luz e então, foram centrifugadas a 19800 g a 25 °C por 10 min, para a separação da fase coacervada e da solução de equilíbrio (sobrenadante). O sobrenadante foi descartado e a luteína foi extraída da fase coacervada com tetraidrofurano (THF) e solução aquosa de NaCl 10 % de acordo com (Xavier et al., 2012), com algumas modificações. Brevemente, 5 mL de THF foi adicionado à fase coacervada, após agitação suave a mistura foi centrifugada a 19800 g durante 5 min para permitir a separação das fases aquosa e orgânica. Esta última foi coletada e para garantir a recuperação da luteína restante, o procedimento foi repetido quatro vezes. Os extratos orgânicos foram secos em um evaporador rotativo e sucessivamente ressuspensos em um volume conhecido de etanol.

O conteúdo de luteína encapsulada foi, então, determinado por medições de absorbância a 445 nm (Synergy Mx, Biotek instruments, Winooski, EUA) utilizando o coeficiente de extinção da luteína em etanol, $E_{1\%1\text{ cm}} = 2550$ (Davies, 1976) A eficiência de encapsulação (% EE) foi calculado pela equação:

$$\% EE = (L_E/L_I) * 100$$

Onde % EE corresponde à eficiência de encapsulação; L_E corresponde à massa de luteína encapsulada na fase coacervada e L_I corresponde à massa de luteína inicialmente presente na mistura. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.15 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com aplicação teste de comparação de médias ou ANOVA com *post-test* de Tukey utilizando *software* estatístico R. Diferentes letras indicam diferenças significativas em um nível de confiança de 95 %.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização da gelatina do tipo A (GA) por SDS-PAGE

A literatura descreve a presença de três principais frações proteicas nas gelatinas, as cadeias α (α_1 e α_2), β e γ , das quais as duas primeiras costumam ser as mais relevantes (Nikoo et al., 2014). A Fig. 14 apresenta o perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida da GA empregada neste estudo. Conforme evidenciado no gel, a GA apresentou duas cadeias α com massa molecular correspondente a 100-150 kDa; uma cadeia β com massa molecular de aproximadamente 200 kDa e uma cadeia γ apresentando massa molecular superior a 250 kDa, sendo as cadeias α e γ , as frações proteicas mais relevantes. Essa variabilidade da distribuição da massa molecular das principais frações presentes nas diferentes gelatinas pode ser explicada pelos diferentes processos de transformação do colágeno nas gelatinas, gerando diferentes cadeias polipeptídicas com massas variáveis (Sai-Ut et al., 2012; Alipal et al., 2021; Mariod & Adam, 2013).

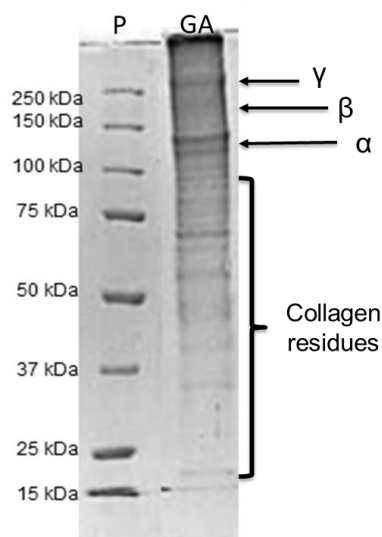


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras da Gelatina do tipo A.

4.3.2 Caracterização e efeito do tratamento térmico na estrutura da β -LG

A β -LG contém uma elevada proporção de resíduos de aminoácidos com carácter hidrofóbico, cujas cadeias laterais se direccionam para o interior da estrutura globular (Laligant et al., 1991). Quando esta proteína é submetida a tratamento térmico, o desdobramento da molécula acarreta uma exposição de tais cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e, consequentemente, um aumento na sua hidrofobicidade superficial. Em razão do tempo e intensidade do tratamento térmico, a hidrofobicidade superficial das moléculas pode, posteriormente, diminuir em razão da agregação proteica. Como a sonda ANS exhibe uma baixa fluorescência na água, mas se torna bastante fluorescente em ambientes não polares, portanto, a maior exposição de sítios hidrofóbicos acessíveis na superfície da proteína pode ser acompanhada pelo aumento na intensidade de fluorescência desta sonda. A Fig. 15 apresenta o índice de hidrofobicidade superficial (S_0) da β -LG antes e após o tratamento térmico de 70 °C por 5 min (β -LG (TT)). Um aumento significativo de S_0 pode ser observado em consequência do tratamento térmico, indicando o desdobramento da proteína, conforme discutido mencionado anteriormente.

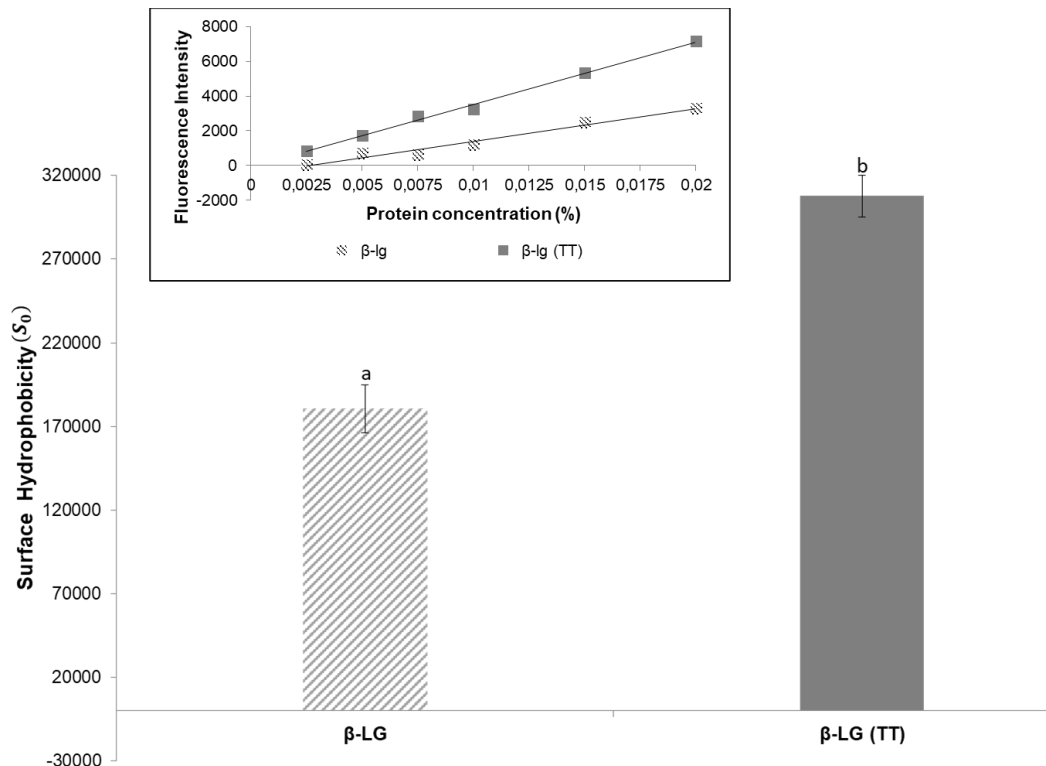


Figura 15: Índice de hidrofobicidade superficial (S_0) da β -lactoglobulina antes (β -LG) e após o tratamento térmico de 70 °C por 5 min (β -LG (TT)).

Dos cinco resíduos de cisteína na estrutura nativa da β -LG, quatro estão envolvidos na formação de duas ligações dissulfeto (cistina) e um possui o grupo SH livre. A concentração dos grupos SH totais e superficiais da β -LG e da β -LG-TT estão apresentados na Fig. 16. A β -LG apresentou uma concentração de grupos SH totais em torno de 45 $\mu\text{mol (SH) / g}$, coerente com o relatado na literatura para essa proteína (Sava et al., 2005). Após o tratamento térmico (β -LG (TT)), a concentração de SH totais não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) comparativamente à proteína antes do tratamento térmico, indicando que o tratamento térmico aplicado não alterou a relação cistina/cisteína da proteína. No que concerne à concentração de grupo SH superficiais (acessíveis), a β -LG apresentou 16 $\mu\text{mol (SH) / g}$, no entanto, um aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado após o tratamento térmico aplicado (β -LG (TT) = 19 $\mu\text{mol (SH) / g}$). Desta forma, apesar da não indução de formação de novas ligações dissulfeto, o tratamento térmico aplicado ocasionou uma maior exposição dos grupos SH previamente não acessíveis. Esse resultado corrobora o efeito do tratamento térmico aplicado na indução do desdobramento da proteína conforme discutido em razão do aumento do índice de hidrofobicidade superficial.

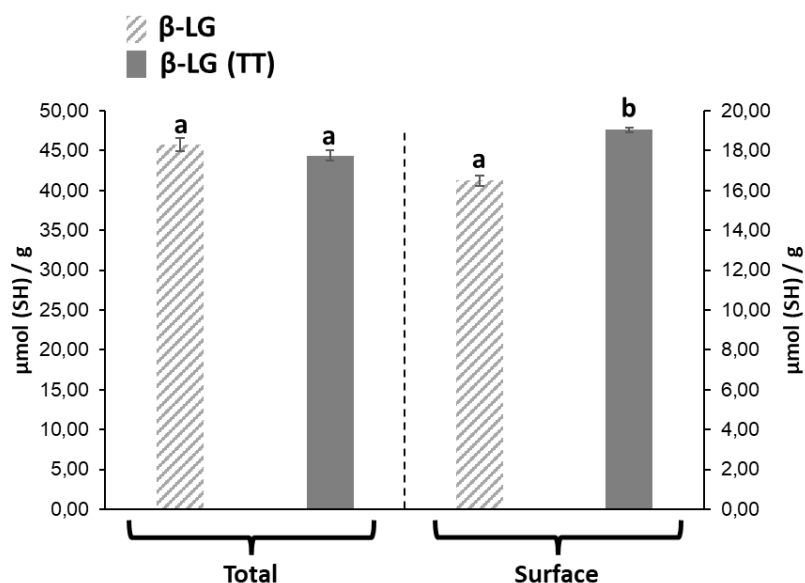


Figura 16: Concentração de grupos SH totais e superficiais da β -LG e da β -LG (TT).

As Fig. 17A e 17B apresentam os perfis cromatográficos das dispersões de β -LG e de β -LG (TT) analisados em cromatografia de exclusão de tamanho e cromatografia líquida em fase reversa, respectivamente. Na cromatografia de exclusão de tamanho, ambas as dispersões exibiram um pico majoritário centrado em torno de 18 min (Fig. 17A), o qual

corresponde à β -LG monomérica. Na amostra previamente ao tratamento térmico essa população corresponde à $91,29\% \pm 1,02\%$ da área do cromatograma, enquanto para no cromatograma da amostra β -LG (TT), essa população representa $62,35\% \pm 2,15\%$ da área total. Essa significativa diferença ($p < 0,05$) se deve à indução da formação de uma população de oligômeros e/ou agregados solúveis após o tratamento térmico (entre 11 e 17 min). Endossado pelo aumento do índice de hidrofobicidade superficial das proteínas após o tratamento térmico, mas uma manutenção da concentração de grupos SH livres totais, é razoável inferir uma participação relevante de interações hidrofóbicas na estabilização dos oligômeros e/ou agregados solúveis observados após o tratamento térmico aplicado.

Em contraponto, nenhuma diferença significativa pode ser evidenciada no perfil de cromatografia líquida em fase reversa entre a proteína antes e após o tratamento térmico Fig. 17B, como mostrado por (Tavares et al., 2015). A isoforma B da proteína apresentou uma proporção de $36,97\% \pm 0,54\%$ e $37,57\% \pm 0,048\%$ da área total dos cromatogramas para as amostras de β -LG e β -LG (TT), respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a isoforma A, que apresentou proporções de $34,23\% \pm 0,05\%$ e $34,70\% \pm 0,105\%$ da área total do cromatograma respectivamente para as amostras de β -LG e β -LG (TT). Por sua vez, o “ombro” observado antes do pico correspondente à isoforma B da proteína apresentou proporção de área ligeiramente maior para a β -LG (TT), sendo de $11,3\% \pm 0,78\%$, comparativamente à β -LG ($9,9\% \pm 0,062\%$).

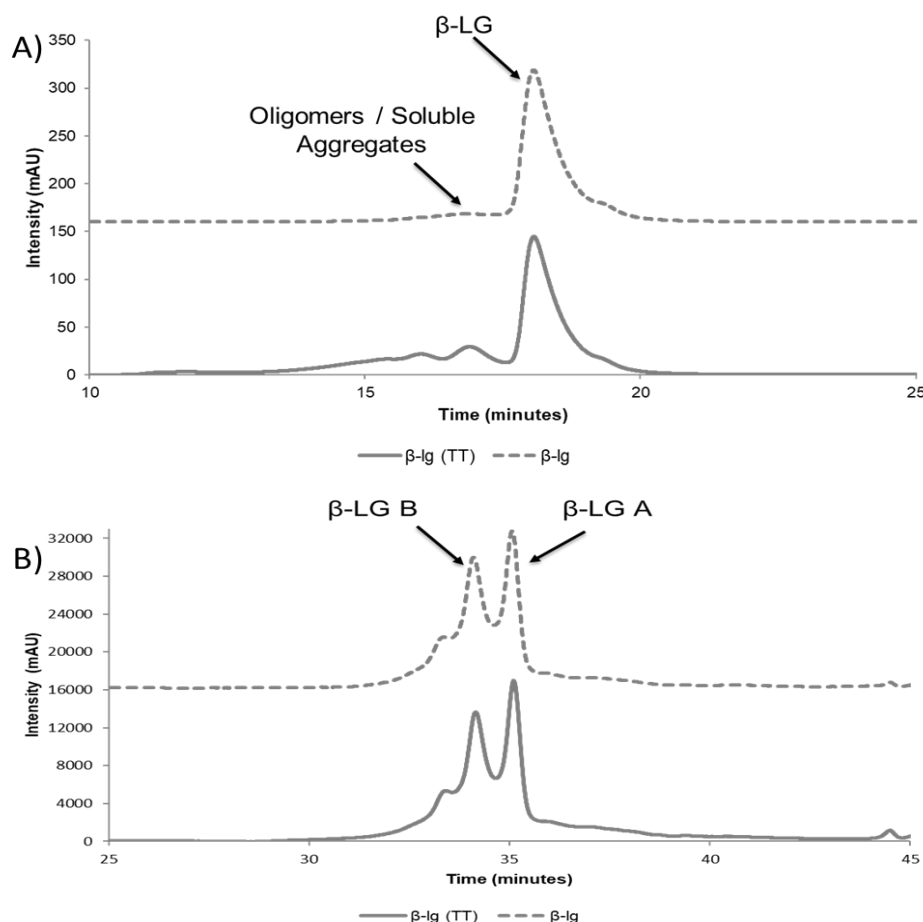


Figura 17: Perfil cromatográfico da β -LG (linha contínua) e da β -LG (TT) (linha pontilhada). A) Cromatografia de Exclusão de Tamanho; B) Cromatografia Líquida em Fase Reversa.

4.3.3 Potencial zeta (ζ) das proteínas individualmente e em mistura

O potencial (ζ) das proteínas individualmente e suas misturas foi avaliado em função do pH, na faixa de 6,0 a 7,0, para avaliar seu comportamento de complexação molecular, como ilustrado na Fig. 18. O potencial (ζ) da GA foi sempre positivo em toda a faixa de pH avaliada, diminuindo com o aumento do pH. O comportamento observado foi condizente com o esperado para esta proteína básica, conforme descrito por Tiwari et al., (2008), que relataram a redução do potencial (ζ) da GA com o aumento do pH, até um potencial (ζ) nulo em seu ponto isoelétrico (pI) (pH 9,0). O potencial (ζ) da β -LG e da β -LG (TT) foi negativo em toda a faixa de pH avaliada, coerente com o pI da β -LG, reportado entre 5,1 e 5,2 (Kizilay et al., 2014; Müller, 2013; Qin et al., 2008). O tratamento térmico favoreceu a desprotonação dos grupos ionizáveis desta proteína, e, portanto, a β -LG (TT) apresentou um potencial (ζ) significativamente menor ($p < 0,05$), em toda a faixa de pH, em comparação com a β -LG.

A diferença do potencial (ζ) entre a GA em relação a β -LG e β -LG (TT) pode facilitar a complexação entre as proteínas a nível molecular por interação eletrostática. Nesse sentido, podemos observar na Fig. 18 que os complexos entre a GA e as diferentes formas da β -LG tiveram um potencial (ζ) muito próximo ao zero, em toda a faixa de pH avaliada, na razão mássica de 2,5:1 GA: β -LG. Esse comportamento dos complexos formados é causada pela interação dos grupos ionizáveis protonados da GA com os grupos ionizáveis desprotonados das β -LG. Apesar da diferença de potencial (ζ) observada entre β -LG e β -LG(TT), na presença de GA, nenhuma diferença pôde ser observada em relação ao potencial (ζ) dos complexos formados. Durante a complexação eletrostática de diferentes coloides, e em especial proteínas, a participação de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio na estabilização dos complexos, permite sua formação mesmo mantendo um desequilíbrio de cargas superficiais (Missana & Adell, (2000).

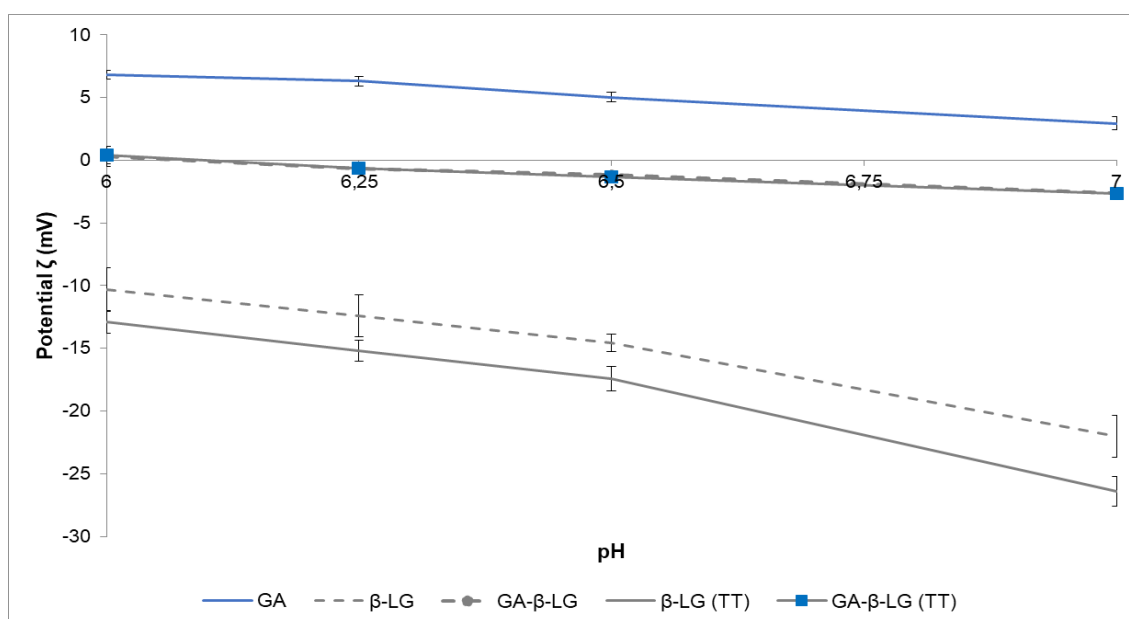


Figura 18: Potencial (ζ) das proteínas individualmente e suas misturas em função do pH, na faixa de 6,0 a 7,0. Linha azul Contínua: GA; Linha cinza contínua: β -LG (TT); Linha cinza pontilhada: β -LG; Linha cinza contínua com quadrados: GA + β -LG (TT) e Linha cinza pontilhada com esferas: GA + β -LG. Todas as misturas foram feitas na razão 2,5:1 de GA: β -LG.

4.3.4 Avaliação turbidimétrica das misturas GA:β-LG e GA:β-LG (TT): efeito do pH, cinética de complexação e força iônica

Para avaliar o efeito do pH na complexação entre GA + β-LG e entre GA + β-LG (TT), as proteínas foram misturadas em diferentes razões mássicas variando entre 2:1 e 3,5:1 (GA:β-LG) em função do pH (de 6,0 a 7,0). Para o cálculo da turbidez, a leitura da absorbância a 600 nm das diferentes amostras foi realizada 1,5 h após a mistura e os dados estão apresentados na Fig. 19A e 19B, respectivamente para GA + β-LG e GA + β-LG (TT). Em todos os casos as soluções-mãe das proteínas não apresentaram turbidez detectável. Os valores de turbidez observados para as misturas GA + β-LG foram sistematicamente maiores em comparação com a mistura GA + β-LG (TT), para uma mesma condição de pH e razão mássica. Para a mistura GA + β-LG, o maior valor de turbidez foi observado na razão mássica 2,5:1 em pH 6,5, sendo este estaticamente diferente ($p < 0,05$) das demais razões mássicas. Entretanto, para as misturas GA + β-LG (TT), o maior valor de turbidez foi observado na mistura de razão mássica 2:1 e pH 6,25. No entanto, a turbidez observada nesta condição não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com aquelas observadas na mistura de razão mássica 2,5:1 nos pHs de 6,25 e 6,5.

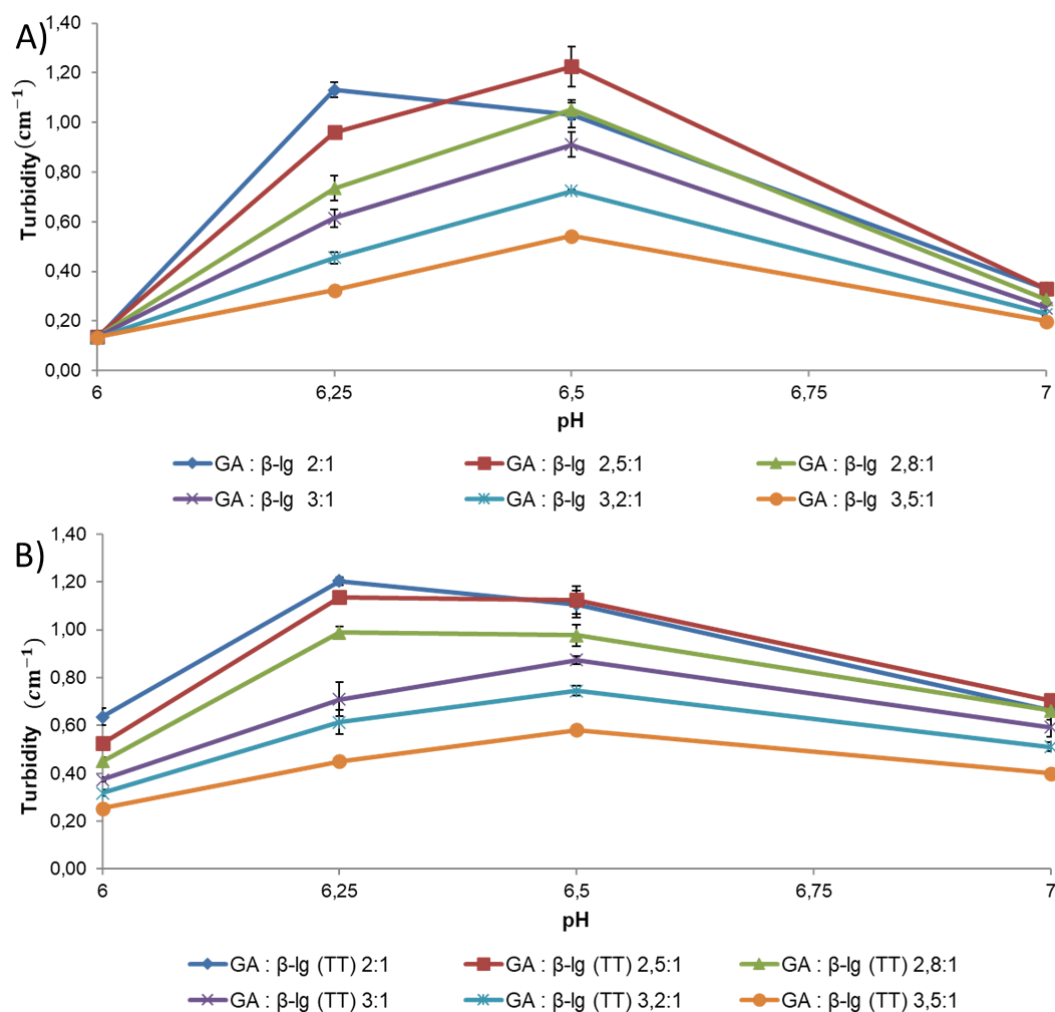


Figura 19: Medições de turbidez variando o pH de 6,0 a 7,0. A) turbidez dos complexos de GA + β-LG em diferentes razões mássicas; B) turbidez das misturas de GA + β-LG (TT) testando várias razões mássicas. Linhas azuis R = 2:1, linhas vermelhas R = 2,5:1, linhas verdes R = 2,8:1, linhas roxas R = 3:1, linhas azuis claras R = 3,2:1, e linhas laranjas R = 3,5:1.

Para a avaliação da cinética de formação dos complexos GA + β-LG e GA + β-LG (TT), a evolução da turbidez das diferentes misturas foi monitorada durante 3 h em um condição fixa de pH (6,5), estabelecida em razão dos resultados apresentados na Fig 19A e 19B. Conforme apontado na Fig. 20, independentemente da razão mássica testada, tanto nas misturas GA + β-LG (Fig. 20A) quando nas misturas GA + β-LG (TT) (Fig. 20B), pouca alteração de turbidez é evidenciada durante a primeira hora após a mistura inicial, no entanto, um aumento considerável foi observado após 1,5 h de mistura, e depois disto houve a tendência de formação de um *plateau*. Este comportamento pode estar relacionado com um

fenômeno similar à “nucleação e crescimento”, onde nos momentos iniciais após a mistura há a formação de complexos moleculares entre as proteínas que pouco impactam na turbidez do meio, mas que se associam ao longo do tempo formando estruturas supramoleculares capazes de alterar a turbidez do sistema (Tiwari et al., 2008; Zheng et al., 2020).

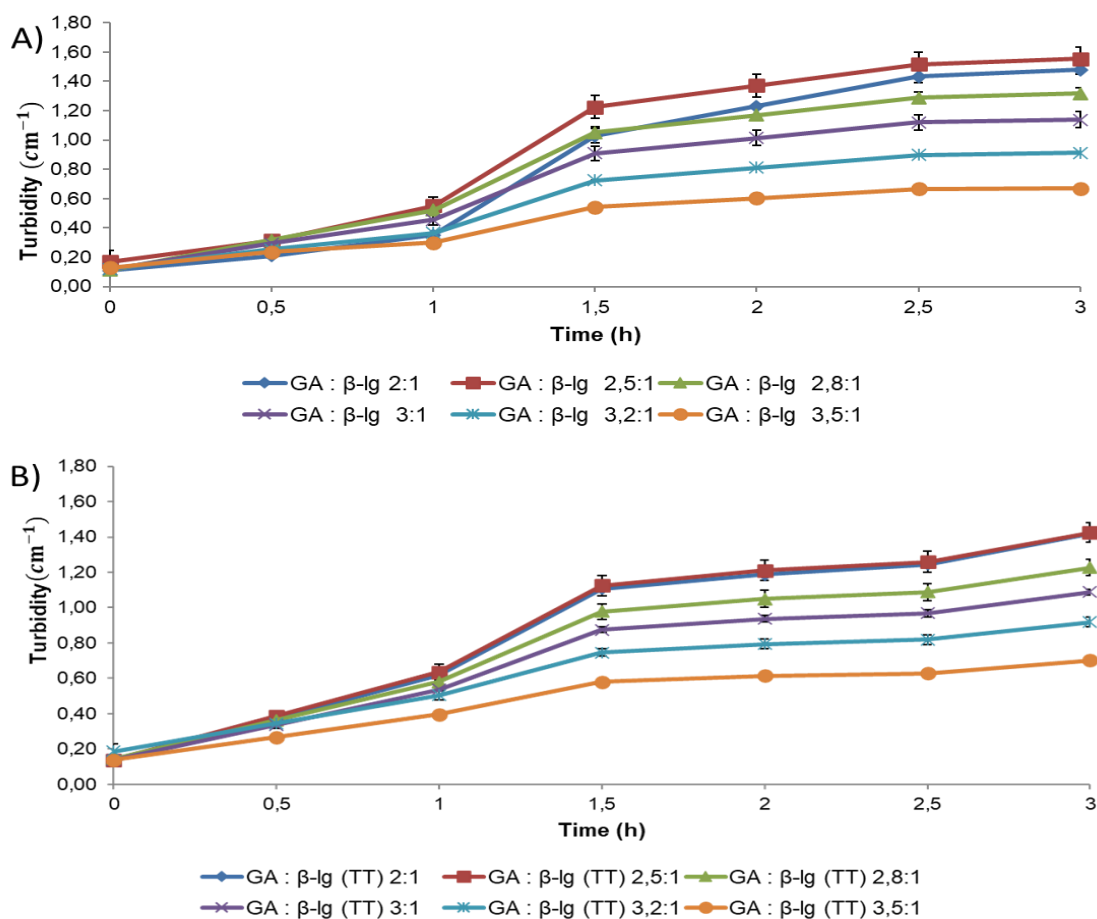


Figura 20: Cinética de turbidez das misturas de proteínas. A) Misturas entre GA + β -LG; B) Misturas de GA + β -LG (TT).

Em complemento, para avaliar a sensibilidade do processo de complexação entre GA + β -LG e entre GA + β -LG (TT) o aumento da força iônica do sistema, a turbidez das misturas entre as proteínas na razão mássica de 2,5:1 e pH 6,5 foi avaliada após 1,5h em concentrações crescentes de NaCl. A Fig. 21 mostra uma diminuição abrupta da turbidez de ambos os sistemas estudados apenas com o incremento de 5 mM de NaCl e na concentração de 20 mM de NaCl a turbidez das misturas foi negligenciável. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no comportamento observado para as misturas GA + β -LG e GA + β -LG (TT), indicando elevada sensibilidade do sistema estudado ao aumento força iônica.

Como as interações eletrostáticas são apontadas por desencadearam a formação de estruturas supramoleculares em misturas de proteínas de cargas opostas, em geral, aumentos sutis de força iônica apresentam um grande impacto negativo em sua formação, entretanto, o grau de susceptibilidade é dependente da natureza das proteínas envolvidas (Croguennec et al, 2017).

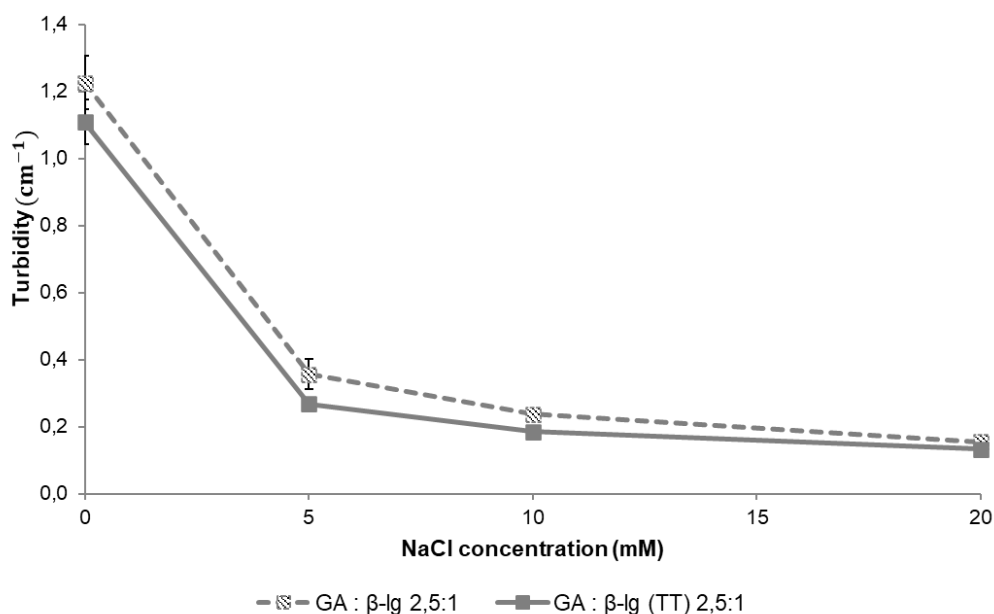


Figura 21: Influência da força iônica na complexação entre GA + β-LG e entre GA + β-LG (TT) na razão mássica de 2,5:1 e pH 6,5. Linha cinza pontilhada GA + β-LG e linha cinza contínua GA + β-LG (TT).

4.3.5 Microscopia óptica das estruturas supramoleculares formadas

Para a caracterização das estruturas supramoleculares formadas entre GA + β-LG e entre GA + β-LG (TT), as misturas na razão mássica 2,5:1 e em pHs 6,25 e 6,5 foram avaliadas por microscopia óptica 1,5 h após a mistura das proteínas e centrifugação para obtenção da fase concentrada em proteínas (fase densa), conforme Fig. 22. Para a mistura GA + β-LG em pH 6,25 (Fig. 22A) a separação de fases no eppendorf não foi tão distinta quando nas demais amostras avaliadas. Estruturas supramoleculares esféricas típicas de coacervados complexos foram observados nas misturas GA + β-LG em pH 6,25 (Fig. 22A), GA + β-LG (TT) em pH 6,25 (Fig. 22B), GA + β-LG em pH 6,5 (Fig. 22C) e GA + β-LG (TT) em pH 6,5 (Fig. 22D). A descrição de estruturas supramoleculares de morfologia esférica e uniforme é amplamente relatada como típica da formação de coacervados

heteroproteicos para diferentes misturas de proteínas (Chapeau et al., 2016; Diarrassouba et al., 2015; Tavares et al., 2015; Zhao et al., 2020).

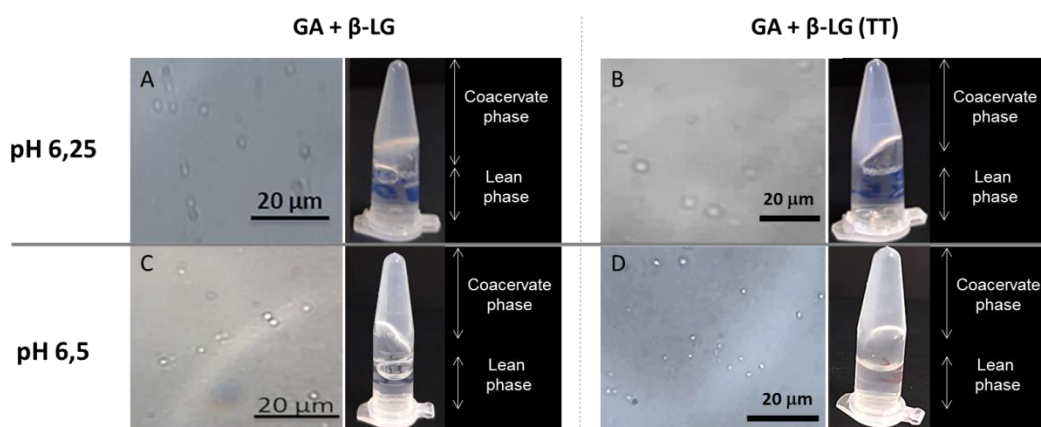


Figura 22: Imagens de microscopia óptica na ampliação de 800 x das misturas GA + β -LG e GA + β -LG (TT) na razão mássica de 2,5:1. A) GA + β -LG em pH 6,25; B) GA + β -LG (TT) a pH 6,25; C) GA + β -LG a pH 6,5; e D) GA + β -LG (TT) a pH 6,5.

4.3.6 Recuperação proteica da fase “coacervada”

Com o intuito de entender melhor as diferenças nos comportamentos de complexação e formação de estruturas supramoleculares entre a GA + β -LG e entre GA + β -LG (TT), em função do pH e razão mássica, o rendimento de recuperação proteica na fase densa da centrifugação foi determinado. A Fig. 23A apresenta os rendimentos de proteína recuperada na fase densa das diferentes misturas proteicas preparadas em pH 6,5, enquanto, a Fig. 23B mostra aqueles relativos às misturas preparadas em pH 6,25. Os maiores rendimentos de recuperação proteica na fase densa foram obtidos para as misturas de razão mássica 2,5:1 em pH 6,5 para ambos os sistemas proteicos avaliados. Conforme discutido anteriormente, essas condições se caracterizam pela formação de estruturas supramoleculares tipicamente observadas em um regime de coacervação complexa. Nessas condições reacionais, o rendimento de coacervação observado na mistura GA + β -LG foi de $64\% \pm 2\%$, significativamente maior ($p < 0,05$) comparativamente ao observado para a mistura de GA com β -LG (TT), que apresentou um rendimento de $57\% \pm 1,1\%$. Em complemento aos resultados discutidos anteriormente, as alterações estruturais induzidas à β -LG pelo tratamento térmico aplicado teve um impacto negativo em sua coacervação complexa com a GA.

Apesar de inferiores àqueles observados na razão mássica 2,5:1 em pH 6,5, em pH 6,25 (Fig 23B) o rendimento de recuperação proteica na fase densa para as misturas entre

GA + β -LG e entre GA + β -LG (TT) foi maior para as razões mássicas de 2:1 e 2,5:1. Nestas condições reacionais, não houveram diferenças significativa ($p < 0,05$) nos rendimentos de recuperação proteica observados, independentemente da razão mássica e do estado estrutural da β -LG. Neste sentido, o potencial de aplicação dos coacervados complexos formados entre GA + β -LG e entre GA + β -LG (TT) para encapsular a luteína foram conduzidos nas condições reacionais ideais para maximização do rendimento de recuperação proteica na fase coacervada: pH 6,5, razão mássica de 2,5:1 e força iônica nula.

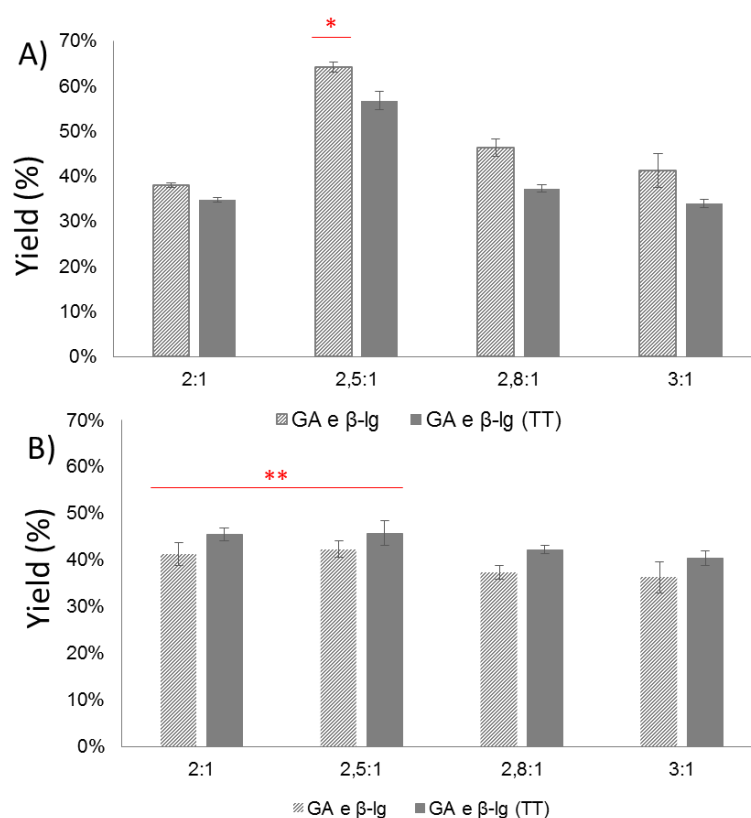


Figura 23: Rendimentos de recuperação proteica nos coacervados variando a razão mássica das proteínas nas misturas. A) rendimentos a pH 6,5; e B) rendimentos a pH 6,25 da GA com β -LG com ou sem TT. (*) Rendimento significativamente maior que os demais rendimentos observados. (**) Ausência de diferença significativa entre os dados.

4.3.7 Interação molecular da luteína com a β -LG e com a β -LG-TT

Carotenoides são pigmentos naturais de caráter hidrofóbico, que, em meio aquoso, tendem a formar agregados (Hempel et al., 2016). A luteína, especificamente, tende a formar agregados do tipo-H, que são caracterizados por uma forte ligação entre as moléculas devido a participação de ligações de hidrogênio na estabilização dos agregados (Mantovani et al., 2021). A Fig. 24 (a e b) apresenta os espectros de absorvância das dispersões de β -LG e β -LG

(TT) com concentrações crescentes de luteína, em condições similares das aplicadas para a determinação do *quenching* de fluorescência. Para a realização da análise de *quenching* de fluorescência, a solução-mãe de luteína foi preparada em etanol para garantir sua completa solubilidade, no entanto com a adição de luteína no sistema predominantemente aquoso um pico de absorbância máximo entre 380-390 nm, característico da formação de agregados tipo-H de luteína foi observado, conforme descrito por outros autores (Mantovani et al., 2020). A intensidade do pico observados entre 380-390 nm aumenta progressivamente com o aumento da concentração de luteína, e nenhuma diferença de comportamento pôde ser evidenciada comparando os espectros obtidos em presença das duas diferentes formas da β -LG.

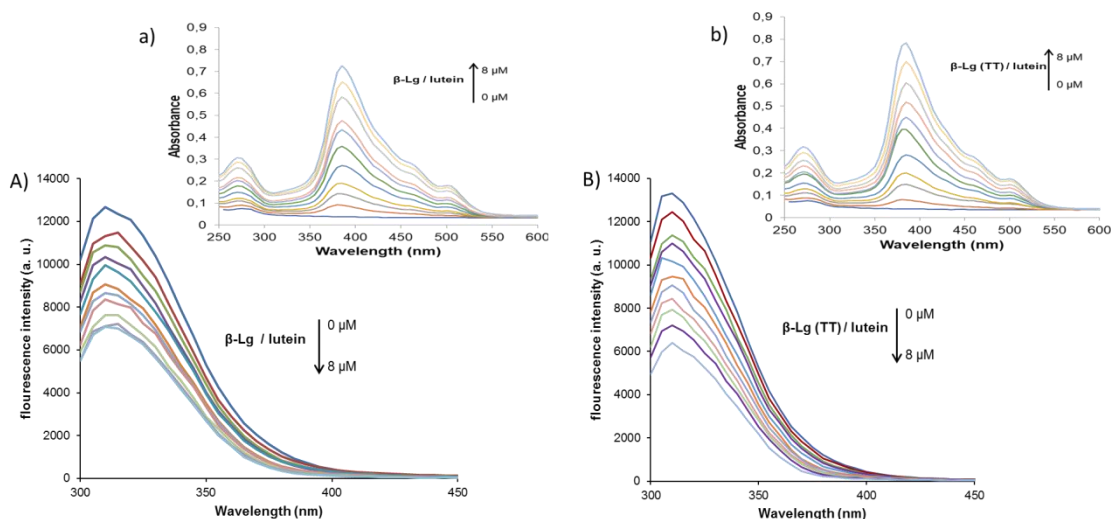


Figura 24: Espectro de absorção (a e b) e de fluorescência (A e B) da proteína ($1 \mu M$), pH 6,5 na presença de concentrações crescentes de luteína (0 a $8 \mu M$). A,a) β -LG / Luteína; e, B,b) β -LG (TT) / Luteína.

Para a realização do *quenching* de fluorescência, os espectros de emissão de fluorescência entre 300 e 450 nm, após excitação em 280 nm das dispersões de β -LG e β -LG (TT) a pH 6,5 com incrementos progressivos na concentração de luteína foram obtidos (Fig. 24A e B). Nestas condições, a fluorescência da proteína é condicionada pela quantidade dos resíduos de triptofanos (Trp) e sua exposição. A β -LG contém dois resíduos de triptofano, Trp 61 e Trp 19, sendo esse último responsável por aproximadamente 80 % da fluorescência total da proteína (Croguennec, Mollé, et al., 2004; Liang et al., 2011; Yi et al., 2016). A modificação da intensidade da fluorescência da proteína com a adição de concentrações progressivas de ligante indicam que a interação molecular entre o ligante a proteína afeta o

microambiente dos resíduos de triptofano. Por meio da relação entre a intensidade de supressão (*quenching*) da fluorescência e a concentração de ligante adicionada, é possível avaliar a afinidade da interação.

Os dados do *quenching* fluorescência foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

onde F_0 representa a intensidade de fluorescência na ausência do *quencher* e F na presença do *quencher*, k_q é a constante biomolecular de *quenching*, $[Q]$ é a concentração total do *quencher* e finalmente K_{SV} é a constante de Stern-Volmer.

Em razão do aumento da absorbância das dispersões nos comprimentos de onda de excitação e emissão, com o aumento da concentração de luteína, o efeito de filtro interno (*inner-filter effect*) foi corrigido conforme descrito por (Mantovani et al., 2020). A Fig. 25 apresenta os gráficos de Stern-Volmer para a análise do *quenching* de fluorescência entre luteína / β -LG e entre luteína / β -LG (TT) e a Tabela 2 apresenta os valores de K_{SV} e k_q para as interações. Como o valor de k_q das interações excedem o valor limite de controle difusional da interação ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), isso indica uma interação com mecanismo estático entre as moléculas. Embora o K_{SV} da interação entre β -LG (TT) e luteína tenha sido numericamente superior àquele da interação entre β -LG e luteína, ambos permaneceram na mesma ordem de grandeza de (10^4 M^{-1}), indicando uma interação molecular de afinidade moderada e de mesma magnitude entre as moléculas (Lakowicz, 2013; Mantovani et al., 2021; Zhang & Zhong, 2013; Zhu et al., 2019).

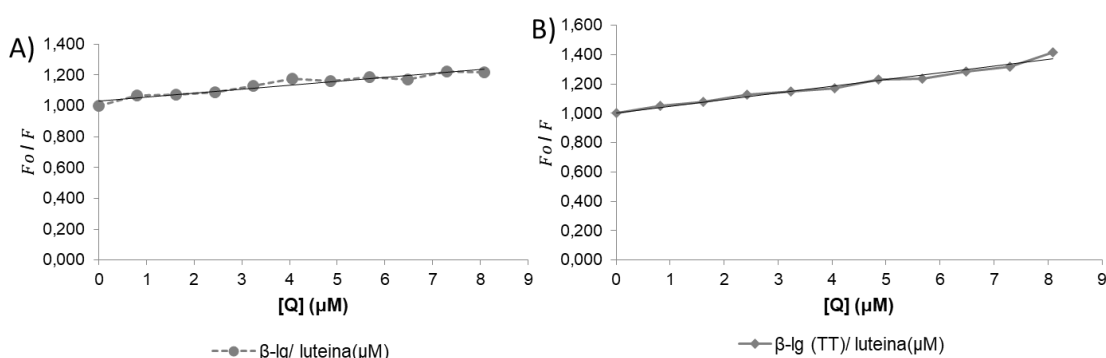


Figura 25: Relação de Stern-Volmer da interação entre (A) β -LG / lutein; e entre (B) β -LG (TT) / lutein. β -LG, em pH 6,5.

Tabela 2: Parâmetros de interação entre luteína e β -LG e entre luteína e β -LG (TT).

Sample	K_{sv} ($10^4 M^{-1}$)	K_q ($10^{12} M^{-1} s^{-1}$)
β -lg / lutein	2,53 $\pm$ 0,407	2,53 $\pm$ 0,407
β -lg (TT) / lutein	4,59 $\pm$ 0,157	4,59 $\pm$ 0,157

4.3.8 Rendimento de encapsulação da luteína nos coacervados complexos

Como as condições ideais para maximização do rendimento de recuperação proteica na fase coacervada para ambos os sistemas foi definida em pH 6,5, razão mássica de 2,5:1 e força iônica nula, estas condições foram reproduzidas para avaliar o potencial dos coacervados complexos em encapsular a luteína. A Fig. 26 apresenta a porcentagem da luteína inicialmente incorporada na mistura que foi extraída da fase coacervado de cada um dos diferentes sistemas proteicos. O rendimento da luteína encapsulada pelo coacervados complexos de GA + β -LG foi de 79,6 % $\pm$ 0,8 %, significativamente maior do que o observado para os coacervados complexos de GA + β -LG (TT) (68,9 % $\pm$ 0,6 %). Essa diferença na porcentagem de encapsulação da luteína entre os dois sistemas pode ser explicada pelo maior rendimento de formação de coacervados complexos (recuperação proteica) observado para GA + β -LG em comparação com GA + β -LG (TT). Apesar disso, o presente estudo indica que os coacervados complexos formados tanto por GA + β -LG quanto por GA + β -LG (TT) apresentam grande potencial para encapsular luteína.

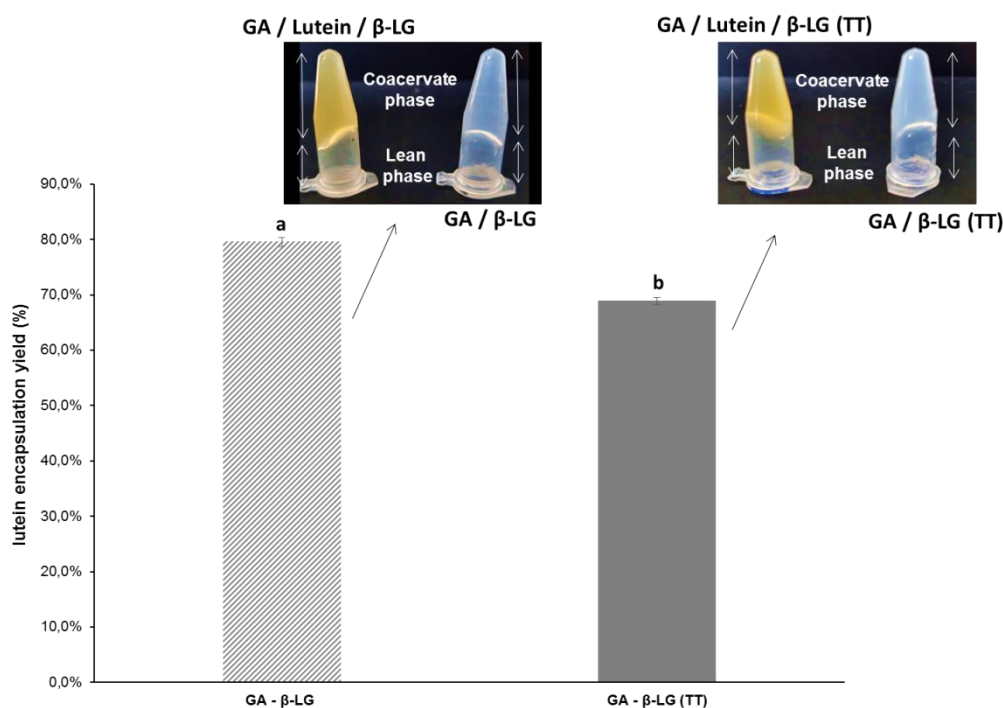


Figura 26: Rendimento da luteína encapsulada na fase coacervada formada por GA/β-LG e GA/β-LG (TT).

4.4 Conclusão

O tratamento térmico aplicado à β-LG induziu o desdobramento das moléculas, causando mudanças na estrutura proteica. Apesar das alterações estruturais, notadamente o aumento da hidrofobicidade superficial, a magnitude da interação molecular entre luteína e β-LG e entre luteína e β-LG (TT) permaneceu na mesma ordem de grandeza. No entanto, tais alterações estruturais impactaram negativamente no rendimento de coacervação complexa entre a β-LG (TT) e a GA, comparativamente com a β-LG e a GA. Esses resultados mostram a dependência da estrutura proteica em seu comportamento de interação molecular. Consequentemente, quando aplicados para a encapsulação de luteína, uma menor quantidade do carotenoide foi encapsulada pelos coacervados complexos formados entre GA + β-LG (TT), em comparação com os coacervados complexos formados entre GA + β-LG. Porém, ambos os sistemas estudados apresentaram alto potencial de aplicação para encapsular luteína. Mais estudos são necessários para explorar o potencial destes sistemas na proteção, transporte e liberação controlada deste carotenoide.

4.5 Agradecimentos

Agradecimento ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela bolsa de mestrado (número de processo 131782/2019-3) e à FAPESP (número de processo 2017/09214-4). Agradecimento ao Laboratório de Química de Alimentos e à FAPESP pelo uso dos Equipamentos Multiusuários (2018/03822-5 e 2018/23752-1).

4.6 Referências

Alipal, J., Mohd Pu'ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. ., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>

Chapeau, A.-L., Tavares, G. M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.02.003>

Croguennec, T., Mollé, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β -lactoglobulin monomers. *Protein Science*, 13(5), 1340–1346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1110/ps.03513204>

Diarrassouba, F., Remondetto, G., Garrait, G., Alvarez, P., Beyssac, E., & Subirade, M. (2015). Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. *Food Chemistry*, 173, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.009>

Hempel, J., Schädle, C. N., Leptihn, S., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 317, 161–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.10.024>

Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media.

Laligant, A., Dumay, E., Valencia, C. C., Cuq, J. L., & Cheftel, J. C. (1991). Surface Hydrophobicity and Aggregation of β -Lactoglobulin Heated near Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(12), 2147–2155. <https://doi.org/10.1021/jf00012a009>

Liang, L., Tremblay-Hébert, V., & Subirade, M. (2011). Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. *Food Chemistry*, 126(3), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.029>

Mantovani, Raphaela A., Rasera, M. L., Vidotto, D. C., Mercadante, A. Z., & Tavares, G. M. (2021). Binding of carotenoids to milk proteins: Why and how. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.088>

Mantovani, Raphaela Araujo, Hamon, P., Rousseau, F., Tavares, G. M., Mercadante, A. Z., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2020). Unraveling the molecular mechanisms underlying interactions between caseins and lutein. *Food Research International*, 138, 109781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109781>

Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(2), 135–147.

Missana, T., & Adell, A. (2000). On the applicability of DLVO theory to the prediction of clay colloids stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 230(1), 150–156. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7003>

Nikoo, M., Benjakul, S., Bashari, M., Alekhorshied, M., Cissouma, A. I., Yang, N., & Xu, X. (2014). Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. *Food Bioscience*, 5, 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2013.10.004>

Sai-Ut, S., Jongjareonrak, A., & Rawdkuen, S. (2012). Re-extraction, Recovery, and Characteristics of Skin Gelatin from Farmed Giant Catfish. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0408-3>

Sava, N., Van Der Plancken, I., Claeys, W., & Hendrickx, M. (2005). The Kinetics of Heat-Induced Structural Changes of β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1646–1653. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(05\)72836-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(05)72836-8)

Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48, 238–247. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.02.027>

Tiwari, A., Bindal, S., & B. Bohidar, H. (2008). Kinetics of Protein–Protein Complex Coacervation and Biphasic Release of Salbutamol Sulfate from Coacervate Matrix. *Biomacromolecules*, 10(1), 184–189. <https://doi.org/10.1021/bm801160s>

Yi, J., Fan, Y., Yokoyama, W., Zhang, Y., & Zhao, L. (2016). Characterization of milk proteins–lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. *Food Chemistry*, 200, 91–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.035>

Zhang, Y., & Zhong, Q. (2013). Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. *Food Chemistry*, 139(1–4), 611–616.

Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105, 105790. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105790>

Zhu, J., Li, H., Xu, Y., & Wang, D. (2019). Construction of Fucoxanthin Vector Based on Binding of Whey Protein Isolate and Its Subsequent Complex Coacervation with Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 2980–2990. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06679>

5 CONCLUSÃO GERAL

5.1 Conclusão geral

A HPCC é um processo espontâneo nas condições reacionais ideais, demandando pouca energia para a formação dos complexos supramoleculares. No entanto, o processo da HPCC pode ser afetado por diversos fatores extrínsecos e / ou intrínsecos, por exemplo, pH, força iônica, concentração de proteínas, razão entre as proteínas envolvidas, tempo e temperatura. Tanto a GA como a β -LG têm sido empregadas em vários processos de HPCC, no entanto, o processo de HPCC entre essas duas proteínas ainda não havia sido relatado na literatura. As condições ideais para a formação de coacervados complexos entre GA e β -LG foram a pH 6,5 em uma força iônica mínima e uma razão mássica de 2,5:1. Nessas condições, o máximo rendimento de recuperação de proteína nos coacervados complexos de GA + β -LG foi de $64\% \pm 2\%$. O presente estudo, demonstrou igualmente a dependência de sutis modificações estruturais nas proteínas no seu comportamento de coacervação complexa. A desnaturação, ainda que parcial, β -LG quando submetida à tratamento térmico (β -LG (TT)) provocou uma redução significativa no rendimento de coacervação proteica em condições ideais para $57\% \pm 1,1\%$. A alteração estrutural da β -LG não afetou a magnitude da interação molecular entre esta proteína e a luteína, e os coacervados complexos formados entre essas proteínas e GA apresentaram elevado potencial para encapsular o carotenoide. Uma eficiência de encapsulação de $79,6\% \pm 0,8\%$ foi observado para os coacervados complexos GA + β -LG e de $68,9\% \pm 0,6\%$ para aqueles formados por GA + β -LG (TT).

6 REFERÊNCIAS

6.1 Referências

- A. Antonov, Y., Zhuravleva, I., Volodine, A., Moldenaers, P., & Cardinaels, R. (2017). Effect of the Helix–Coil Transition in Bovine Skin Gelatin on Its Associative Phase Separation with Lysozyme. *Langmuir*, 33(47), 13530–13542. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01477>
- A. D. McNaught and A. Wilkinson. (1997). *the “Gold Book”* (2nd ed). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology and Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2012). Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00737.x>
- Abd Elgadir, M., Mirghani, M. E. S., & Adam, A. (2013). Fish gelatin and its applications in selected pharmaceutical aspects as alternative source to pork gelatin. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(1), 73–79.
- Ach, D., Briançon, S., Dugas, V., Pelletier, J., Broze, G., & Chevalier, Y. (2015). Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 481, 367–374. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2015.06.006>
- Ainis, W. N., Boire, A., Solé-Jamault, V., Nicolas, A., Bouhallab, S., & Ipsen, R. (2019). Contrasting Assemblies of Oppositely Charged Proteins. *Langmuir*, 35(30), 9923–9933. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01046>
- Alipal, J., Mohd Pu’ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. ., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Anema, S. G., & (Kees) de Kruif, C. G. (2016). Phase separation and composition of coacervates of lactoferrin and caseins. *Food Hydrocolloids*, 52, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.011>
- Anema, S. G., & de Kruif, C. G. (Kees). (2014). Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 430, 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2014.05.036>
- B. Salvatore, D., Duraffourg, N., Favier, A., A. Persson, B., Lund, M., Delage, M.-M., Silvers, R., Schwalbe, H., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Forge, V. (2011). Investigation at Residue Level of the Early Steps during the Assembly of Two Proteins

- into Supramolecular Objects. *Biomacromolecules*, 12(6), 2200–2210. <https://doi.org/10.1021/bm200285e>
- Bachtsi, A. R., & Kiparissides, C. (1996). Synthesis and release studies of oil-containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release*, 38(1), 49–58. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00099-2)
- Bacsik, Z., Mink, J., & Keresztury, G. (2007). *FTIR Spectroscopy of the Atmosphere. I. Principles and Methods*. <https://doi.org/10.1081/ASR-200030192>
- Blocher, W. C., & Perry, S. L. (2017). Complex coacervate-based materials for biomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 9, 1442. <https://doi.org/10.1002/wnan.1442>
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Pereira, R. N., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Development and characterization of lactoferrin-GMP nanohydrogels: Evaluation of pH, ionic strength and temperature effect. *Food Hydrocolloids*, 48, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.026>
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Potier, I. Le, Kerdaniel, T. du F. de, Grossiord, J.-L., Rosilio, V., & Agnely, F. (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(2), 467–477. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2010.11.019>
- Braeckmans, K., Remaut, K., Vandenbroucke, R. E., Lucas, B., De Smedt, S. C., & Demeester, J. (2007). Line FRAP with the confocal laser scanning microscope for diffusion measurements in small regions of 3-D samples. *Biophysical Journal*, 92(6), 2172–2183. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.099838>
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C., & Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution — still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5(4), 481–495. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00205-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00205-0)
- C R Burch and J P P Stock. (1942). Phase-Contrast Microscopy On Phase-Contrast Testing with a Slit Source E H Linfoot-Recent citations. *Journal of Scientific Instruments*, Volume 19, Number 5, 19(5).
- Calvarro, J., Perez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2016). Modification of gelatin functionality for culinary applications by using transglutaminase. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 5–6, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.11.001>
- Canette, A., & Briandet, R. (2014). Microscopy: Confocal Laser Scanning Microscopy. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 676–683). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00214-7>

- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., Alamilla-Beltrán, L., García, H. S., & Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Chapeau, A.-L., Tavares, G. M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.02.003>
- Chapeau, A. L., Bertrand, N., Briard-Bion, V., Hamon, P., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2017). Coacervates of whey proteins to protect and improve the oral delivery of a bioactive molecule. *Journal of Functional Foods*, 38, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.009>
- Chapeau, A. L., Hamon, P., Rousseau, F., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2017). Scale-up production of vitamin loaded heteroprotein coacervates and their protective property. *Journal of Food Engineering*, 206, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.005>
- Chapeau, A. L., Tavares, G. M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.003>
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. In *International Dairy Journal* (Vol. 16, Issue 11, pp. 1229–1240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.001>
- Croguennec, T., Mollé, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β -lactoglobulin monomers. *Protein Science*, 13(5), 1340–1346. <https://doi.org/https://doi.org/10.1110/ps.03513204>
- Croguennec, T., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14(5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2003.09.005>
- Croguennec, T., Tavares, G. M., & Bouhallab, S. (2017). Heteroprotein complex coacervation: A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 115–126. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2016.06.009>

- D'Onofre Couto, B., Novaes da Costa, R., Castro Laurindo, W., Moraes da Silva, H., Rocha da Silva, C., Sélia dos Reis Coimbra, J., Barbosa Mageste, A., de Cássia Dias, S., & José Boggione Santos, I. (2021). Characterization, techno-functional properties, and encapsulation efficiency of self-assembled β -lactoglobulin nanostructures. *Food Chemistry*, 356, 129719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129719>
- David W. Newton, & Peter J. Tarcha. (1991). Chapter 4. Coacervation: Principles and applications. In *Polymers for controlled drug delivery* (pp. 67–81).
- Davies B.H. (1976). *Carotenoids*, in: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, Londres.
- Dawson, J. M., & Heatlie, P. L. (1984). Lowry method of protein quantification: Evidence for photosensitivity. *Analytical Biochemistry*, 140(2), 391–393. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90183-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90183-0)
- de Kruif, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 340–349. <https://doi.org/10.1016/J.COCIS.2004.09.006>
- Desfougères, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S., & Nau, F. (2010). Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(12), 4138–4144. <https://doi.org/10.1021/jp9090427>
- Diarrassouba, F., Remondetto, G., Garrait, G., Alvarez, P., Beyssac, E., & Subirade, M. (2015). Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals. *Food Chemistry*, 173, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.009>
- Díaz, P., Opez, D. L. ´, Matiacevich, S., Osorio, F., & Enrione, J. (2011). State diagram of salmon (*Salmo salar*) gelatin films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, 2558–2565. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4451>
- Donald, A. M. (2008). Aggregation in β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 4(6), 1147–1150. <https://doi.org/10.1039/b800106e>
- Du, X., Seeman, D., L. Dubin, P., & A. Hoagland, D. (2015). Nonfreezing Water Structuration in Heteroprotein Coacervates. *Langmuir*, 31(31), 8661–8666. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01647>
- Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., & Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 43, 360–376. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.06.006>

- Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., & Escher, F. (2001). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science and Technology*, 34(1), 11–17. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0739>
- E. Flanagan, S., J. Malanowski, A., Kizilay, E., Seeman, D., L. Dubin, P., Donato-Capel, L., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2015). Complex Equilibria, Speciation, and Heteroprotein Coacervation of Lactoferrin and β -Lactoglobulin. *Langmuir*, 31(5), 1776–1783. <https://doi.org/10.1021/la504020e>
- Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Babel, W. (2007). Molecular Weight Influence on Gelatin Gels: Structure, Enthalpy and Rheology Elharfaoui, N., Djabourov, M., & Babel, W. *Macromolecular Symposia*, 256, 149–157. <https://doi.org/10.1002/masy.200751017>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 70–77.
- Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>
- García, R., & Pérez, R. (2002). Dynamic atomic force microscopy methods. In *Surface Science Reports* (Vol. 47, Issues 6–8, pp. 197–301). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0167-5729\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/s0167-5729(02)00077-8)
- Giordano, E., & Quadro, L. (2018). Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 647, pp. 33–40). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.04.008>
- Goldstein, Joseph I . Newbury, Dale E. Michael, Joseph R. Ritchie, Nicholas W.M. Scott, John H. Joy, D. C. (2017). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis* (Springer (ed.); Fourth Edi). https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=D0I_DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=scanning+electron+microscopy&ots=36MF2lGkon&sig=ENVphhYlkTaOT8XsfzWhs5QlkAM#v=onepage&q=scanning+electron+microscopy&f=false
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. In *Food Hydrocolloids* (Vol. 25, Issue 8, pp. 1813–1827). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active

- biodegradable films. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 3–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Guo, L., H. Colby, R., P. Lusignan, C., & H. Whitesides, T. (2003). Kinetics of Triple Helix Formation in Semidilute Gelatin Solutions. *Macromolecules*, 36(26), 9999–10008. <https://doi.org/10.1021/ma034264s>
- Haihong Wang, Mary D. Pato, P. J. S. (2005). Biochemical Properties of Natural Actomyosin Extracted from Normal and Pale, Soft, and Exudative Pork Loin After Frozen Storage H H H H HAIHONG AIHONG AIHONG ABSTRA ABSTRA ABSTRA ABSTRA ABSTRACT CT CT CT CT. In *JOURNAL OF FOOD SCIENCE C313 Published on Web* (Vol. 70). www.ift.org
- Hempel, J., Schädle, C. N., Leptihn, S., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2016). Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 317, 161–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.10.024>
- Henley, E. C., Taylor, J. R. N., & Obukosia, S. D. (2010). The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 21–52. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60002-2)
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein - Which is best? *Journal of Sports Science and Medicine*, 3(3), 118–130.
- Ibarra-Molero, B., Naganathan, A. N., Sanchez-Ruiz, J. M., & Muñoz, V. (2016). Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry. In *Methods in Enzymology* (Vol. 567, pp. 281–318). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.027>
- Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 531, Issues 1–2, pp. 100–109). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.008>
- Jones, O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 239–248. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2009.10.001>
- Kayitmazer, A. B. (2017). Thermodynamics of complex coacervation. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 239, pp. 169–177). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.07.006>

- Kayitmazer, A. B., Seeman, D., Minsky, B. B., Dubin, P. L., & Xu, Y. (2013). Protein-polyelectrolyte interactions. *Soft Matter*, 9(9), 2553–2583. <https://doi.org/10.1039/c2sm27002a>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1751, Issue 2, pp. 119–139). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kizilay, E., Kayitmazer, A. B., & Dubin, P. L. (2011). Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 24–37. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2011.06.006>
- Kizilay, E., Seeman, D., Yan, Y., Du, X., Dubin, P. L., Donato-Capel, L., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2014). Structure of bovine β -lactoglobulin-lactoferrin coacervates. *Soft Matter*, 10(37), 7262–7268. <https://doi.org/10.1039/c4sm01333f>
- Kö Nig, P., Krasteva, G., Tag, C., Kö Nig, I. R., Arens, C., & Kummer, W. (2006). FRET-CLSM and double-labeling indirect immunofluorescence to detect close association of proteins in tissue sections. *Laboratory Investigation*, 86, 853–864. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700443>
- Krebs, M. R. H., Domike, K. R., Cannon, D., & Donald, A. M. (2008). Common motifs in protein self-assembly. *Faraday Discussions*, 139, 265–274. <https://doi.org/10.1039/b715879c>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Communications*, 227(5259), 680–685.
- Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media.
- LAKOWICZ, J. R. (Ed. . (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Laligant, A., Dumay, E., Valencia, C. C., Cuq, J. L., & Cheftel, J. C. (1991). Surface Hydrophobicity and Aggregation of β -Lactoglobulin Heated near Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(12), 2147–2155. <https://doi.org/10.1021/jf00012a009>
- Liang, L., Tremblay-Hébert, V., & Subirade, M. (2011). Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. *Food Chemistry*, 126(3), 821–826. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.029>
- Lowry O H, Rosebrough N J, F. A. L. & R. R. J. (1951). Protein measurementwith the Folin

- phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0753-5_100521
- Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., Nobbmann, U., Sayre, P., & Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, 5, 953–965. <https://doi.org/10.1039/c6en00136j>
- Lv, L. C., Huang, Q. Y., Ding, W., Xiao, X. H., Zhang, H. Y., & Xiong, L. X. (2019). Fish gelatin: The novel potential applications. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 63, p. 103581). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>
- Ma, K., Huang, D., Cai, J., Cai, X., Gong, L., Huang, P., Wang, Y., & Jiang, T. (2016). Surface functionalization with strontium-containing nanocomposite coatings via EPD. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.036>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 10, pp. 1197–1211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Malvern Panalyti. (2021). *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry>
- Mantovani, Raphaela A., Rasesa, M. L., Vidotto, D. C., Mercadante, A. Z., & Tavares, G. M. (2021). Binding of carotenoids to milk proteins: Why and how. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.088>
- Mantovani, Raphaela Araujo, Hamon, P., Rousseau, F., Tavares, G. M., Mercadante, A. Z., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2020). Unraveling the molecular mechanisms underlying interactions between caseins and lutein. *Food Research International*, 138, 109781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109781>
- Marc De Graef. (2003). *Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy* (Cambridge university press (ed.); First). 2003. <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=jrwByYIK0QAC&oi=fnd&pg=PR1&dq=transmission+electron+microscopy&ots=ZaAksSbLHH&sig=nZ8APQ2OU9KmVJf3BskJqXZYWDM#v=onepage&q=transmission+electron+microscopy&f=false>
- Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial

- applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(2), 135–147.
- Marsac, P., Piérard, N., Porot, L., Van, W., Grenfell, J., Mouillet, V., Pouget, S., Besamusca, J., Farcas, F., Gabet, T., Hugener, M., Marsac, P., Farcas, F., Gabet, Á. T., Gabet, T., Piérard, N., Porot, L., Van, W., Grenfell, J., ... Hugener, M. (2014). Potential and limits of FTIR methods for reclaimed asphalt characterisation. *Materials and Structures*, 47, 1273–1286. <https://doi.org/10.1617/s11527-014-0248-0>
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865–1880. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.04.014>
- MATÉ, J. I., & KROCHTA, J. M. (1994). β -Lactoglobulin Separation from Whey Protein Isolate on a Large Scale. *Journal of Food Science*, 59(5), 1111–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08203.x>
- McManus, J. J., Charbonneau, P., Zaccarelli, E., & Asherie, N. (2016). The physics of protein self-assembly. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 22, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.02.011>
- Menczel, J. D., & Jose, S. (2009). *THERMAL ANALYSIS OF POLYMERS Fundamentals and Applications EDITED BY R. BRUCE PRIME* (Issue 978). www.wiley.com/go/permission. www.wiley.com.
- Mezzenga, R., & Fischer, P. (2013). The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. *Reports on Progress in Physics*, 76(4). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/76/4/046601>
- Missana, T., & Adell, A. (2000). On the applicability of DLVO theory to the prediction of clay colloids stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 230(1), 150–156. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7003>
- Monteiro, A. A., Monteiro, M. R., Pereira, R. N., Diniz, R., Costa, A. R., Malcata, F. X., Teixeira, J. A., Teixeira, Á. V., Oliveira, E. B., Coimbra, J. S., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2016). Design of bio-based supramolecular structures through self-assembly of α -lactalbumin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 58, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.009>
- Müller, M. (2013). *Polyelectrolyte Complexes in the Dispersed and Solid State II Application Aspects*.
- Nairn, J. G. (1995). 3 Coacervation-phase separation technology. *Advances in Pharmaceutical Sciences*, 7, 93–219. [https://doi.org/10.1016/S0065-3136\(06\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3136(06)80005-1)

- Nigen, M., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2009). Formation and stability of α -lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.005>
- Nigen, M., Croguennec, T., Renard, D., & Bouhallab, S. (2007). Temperature affects the supramolecular structures resulting from α -lactalbumin - Lysozyme interaction. *Biochemistry*, 46(5), 1248–1255. <https://doi.org/10.1021/bi062129c>
- Nikoo, M., Benjakul, S., Bashari, M., Alekhorshied, M., Cissouma, A. I., Yang, N., & Xu, X. (2014). Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. *Food Bioscience*, 5, 19–26. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2013.10.004>
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>
- Olivier, J. P. (1965). Colloidal Dispersions, Electrokinetic Effects, and the concept of zeta potential. *Industrial and Engineering Chemistry*, 57(8), 32–50. <https://doi.org/10.1021/ie50668a007>
- Pathak, J., Rawat, K., Aswal, V. K., & Bohidar, H. B. (2014). Hierarchical surface charge dependent phase states of gelatin-bovine serum albumin dispersions close to their common pI. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(38), 11161–11171. <https://doi.org/10.1021/jp5068846>
- Pathak, J., Rawat, K., Aswal, V. K., & Bohidar, H. B. (2015). Interactions in globular proteins with polyampholyte: coacervation route for protein separation †. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c4ra13133a>
- Pathak, J., Rawat, K., & Bohidar, H. B. (2015). Charge heterogeneity induced binding and phase stability in β -lacto-globulin-gelatin B gels and coacervates at their common pI. *RSC Advances*, 5(82), 67066–67076. <https://doi.org/10.1039/c5ra07195j>
- Priftis, D., Laugel, N., & Tirrell, M. (2012). Thermodynamic Characterization of Polypeptide Complex Coacervation. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la302729r>
- Priftis, D., Leon, L., Song, Z., Arah, S., Perry, L., Margossian, K. O., Tropnikova, A., Cheng, J., & Tirrell, M. (2015). Self-Assembly of α -Helical Polypeptides Driven by Complex Coacervation. *Angewandte Chemie*, 127. <https://doi.org/10.1002/anie.201504861>
- Priftis, D., & Tirrell, M. (2012). Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions †. *Soft Matter*. <https://doi.org/10.1039/c2sm25604e>
- Qin, B. Y., Jameson, G. B., Bewley, M. C., Baker, E. N., & Creamer, L. K. (2008).

- Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Science*, 8(1), 75–83. <https://doi.org/10.1110/ps.8.1.75>
- Rabelo, R. S., Tavares, G. M., Prata, A. S., & Hubinger, M. D. (2019). Complexation of chitosan with gum Arabic, sodium alginate and κ -carrageenan: Effects of pH, polymer ratio and salt concentration. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115120. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115120>
- Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. C. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings*, 6(4), 41. <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
- Sahoo, N., Sahoo, R. K., Biswas, N., Guha, A., & Kuotsu, K. (2015). Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 317–331. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.08.006>
- Sai-Ut, S., Jongjareonrak, A., & Rawdkuen, S. (2012). Re-extraction, Recovery, and Characteristics of Skin Gelatin from Farmed Giant Catfish. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0408-3>
- Salvatore, D. B., Duraffourg, N., Favier, A., Persson, B. A., Lund, M., Delage, M. M., Silvers, R., Schwalbe, H., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Forge, V. (2011). Investigation at residue level of the early steps during the assembly of two proteins into supramolecular objects. *Biomacromolecules*, 12(6), 2200–2210. <https://doi.org/10.1021/bm200285e>
- Santos, M. B., Costa, A. R. da, & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme: Formation and thermodynamic characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1323–1329. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.132>
- Santos, M. B., de Carvalho, C. W. P., & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 74, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.016>
- Sarwar, G. (1997). The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 758–764. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.758>
- Sava, N., Van Der Plancken, I., Claeys, W., & Hendrickx, M. (2005). The Kinetics of Heat-Induced Structural Changes of β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1646–1653. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(05\)72836-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(05)72836-8)

- Schick, C. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6). <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3169-y>
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753. <https://doi.org/10.1080/10408699891274354>
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.10.001>
- Shen, X., Fang, T., Gao, F., & Guo, M. (2017). Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. *Food Hydrocolloids*, 63, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003>
- Sing, C. E., & Perry, S. L. (2020). Recent progress in the science of complex coacervation. *Cite This: Soft Matter*, 16, 2885. <https://doi.org/10.1039/d0sm00001a>
- Singh, S., Rao, K. V. R., Venugopal, K., & Manikandan, R. (2002). Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations: A review of the problem, test methods, and solutions. *Pharmaceutical Technology North America*, 26(4), 36–58.
- Siow, L.-F. (2012). Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *Journal of Food Processing & Technology*, 04(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000199>
- Sliwka, B. W. (1975). *Microencapsulation*. 14, 539–550.
- Stetefeld, J., Mckenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Sultana, S., Hossain, M. A. M., Zaidul, I. S. M., & Ali, M. E. (2018). Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products. *LWT - Food Science and Technology*, 92, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.019>
- Taheri, A., Abedian Kenari, A. M., Gildberg, A., & Behnam, S. (2009). Extraction and physicochemical characterization of greater lizardfish (*Saurida tumbil*) skin and bone gelatin. *Journal of Food Science*, 74(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01106.x>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Milk proteins as

- encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 37(1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.008>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2015). Selective coacervation between lactoferrin and the two isoforms of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 48, 238–247. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.02.027>
- Tavares, G. M., Croguennec, T., Hamon, P., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2017). How the presence of a small molecule affects the complex coacervation between lactoferrin and β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.007>
- Tiwari, A., Bindal, S., & B. Bohidar, H. (2008). Kinetics of Protein–Protein Complex Coacervation and Biphasic Release of Salbutamol Sulfate from Coacervate Matrix. *Biomacromolecules*, 10(1), 184–189. <https://doi.org/10.1021/bm801160s>
- Trinh, L. A., & Fraser, S. E. (2015). Imaging the Cell and Molecular Dynamics of Craniofacial Development. Challenges and New Opportunities in Imaging Developmental Tissue Patterning. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 115, pp. 599–629). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.09.002>
- Veis, A., & Cohen, J. (1958). The role of cross-linkages in the solubilization of insoluble collagen. *Journal of Physical Chemistry*, 62(4), 459–462. <https://doi.org/10.1021/j150562a022>
- Wang, B., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158, 358–365. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.02.135>
- Wang, G., & Fang, N. (2012). Detecting and tracking nonfluorescent nanoparticle probes in live cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 504, pp. 83–108). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391857-4.00004-5>
- Wei, Z., Cheng, Y., & Huang, Q. (2019). Heteroprotein complex formation of ovotransferrin and lysozyme: Fabrication of food-grade particles to stabilize Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 96, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.024>
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., & G. de Kruif, C. (2003). Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4(2), 293–303. <https://doi.org/10.1021/bm025667n>
- Wu, F.-G., Luo, J.-J., & Yu, Z.-W. (2011). Unfolding and refolding details of lysozyme in the presence of β -casein micelles. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 13, 3429–3436. <https://doi.org/10.1039/c0cp01184c>

- Xavier, A. A. O., Mercadante, A. Z., Domingos, L. D., & Viotto, W. H. (2012). Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Quimica Nova*, 35(10), 2057–2062. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000028>
- Xiao, Z., Liu, W., Zhu, G., Zhou, R., & Niu, Y. (2014). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1482–1494. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6491>
- Y. Qin, B., C. Bewley, M., K. Creamer, L., M. Baker, H., N. Baker, E., & B. Jameson, G. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin,. *Biochemistry*, 37(40), 14014–14023. <https://doi.org/10.1021/bi981016t>
- Yan, Y., Kizilay, E., Seeman, D., Flanagan, S., L. Dubin, P., Bovetto, L., Donato, L., & Schmitt, C. (2013). Heteroprotein Complex Coacervation: Bovine β -Lactoglobulin and Lactoferrin. *Langmuir*, 29(50), 15614–15623. <https://doi.org/10.1021/la4027464>
- Yi, J., Fan, Y., Yokoyama, W., Zhang, Y., & Zhao, L. (2016). Characterization of milk proteins–lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. *Food Chemistry*, 200, 91–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.035>
- Zhang, Y., & Zhong, Q. (2013). Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. *Food Chemistry*, 139(1–4), 611–616.
- Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., Nishinari, K., & Fang, Y. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105, 105790. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105790>
- Zheng, J., Gao, Q., Tang, C. he, Ge, G., Zhao, M., & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex formation of soy protein isolate and lactoferrin: Thermodynamic formation mechanism and morphologic structure. *Food Hydrocolloids*, 100, 105415. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105415>
- Zheng, J., Tang, C. he, Ge, G., Zhao, M., & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex of soy protein isolate and lysozyme: Formation mechanism and thermodynamic characterization. *Food Hydrocolloids*, 101, 105571. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105571>
- Zheng, J., Tang, C. he, & Sun, W. (2020). Heteroprotein complex coacervation: Focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications. In *Advances in Colloid and*

Interface Science (Vol. 284, p. 102268). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102268>

Zhu, J., Li, H., Xu, Y., & Wang, D. (2019a). Construction of Fucoxanthin Vector Based on Binding of Whey Protein Isolate and Its Subsequent Complex Coacervation with Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 2980–2990.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06679>

Zhu, J., Li, H., Xu, Y., & Wang, D. (2019b). Construction of Fucoxanthin Vector Based on Binding of Whey Protein Isolate and Its Subsequent Complex Coacervation with Lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(10), 2980–2990.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06679>

7.1 Anexos de autorização de uso das figuras



Investigation at Residue Level of the Early Steps during the Assembly of Two Proteins into Supramolecular Objects

Author: Delphine B. Salvatore, Nicolas Duraffourg, Adrien Favier, et al

Publication: Biomacromolecules

Publisher: American Chemical Society

Date: Jun 1, 2011

Copyright © 2011, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)



Contrasting Assemblies of Oppositely Charged Proteins

Author: William Nicholas Ainis, Adeline Boire, Véronique Solé-Jamault, et al

Publication: Langmuir

Publisher: American Chemical Society

Date: Jul 1, 2019

Copyright © 2019, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Kinetics of Protein-Protein Complex Coacervation and Biphasic Release of Salbutamol Sulfate from Coacervate Matrix



Author: Ananya Tiwari, Sonal Bindal, H. B. Bohidar

Publication: Biomacromolecules

Publisher: American Chemical Society

Date: Jan 1, 2009

Copyright © 2009, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW



How the presence of a small molecule affects the complex coacervation between lactoferrin and β -lactoglobulin

Author: Guilherme M. Tavares, Thomas Croguennec, Pascaline Hamon, Antônio F. Carvalho, Said Bouhallab

Publication: International Journal of Biological Macromolecules

Publisher: Elsevier

Date: September 2017

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas – Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5155570644385

[Printable Details](#)

License date Sep 24, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Elsevier
 Licensed Content Publication International Journal of Biological Macromolecules
 Licensed Content Title How the presence of a small molecule affects the complex coacervation between lactoferrin and β -lactoglobulin
 Licensed Content Author Guilherme M. Tavares, Thomas Croguennec, Pascaline Hamon, Antônio F. Carvalho, Said Bouhallab
 Licensed Content Date Sep 1, 2017
 Licensed Content Volume 102
 Licensed Content Issue n/a
 Licensed Content Pages 8

Order Details

Type of Use reuse in a thesis/dissertation
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 3
 Format both print and electronic
 Are you the author of this Elsevier article? No
 Will you be translating? No



Heteroprotein complex coacervation: Focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications

Author: Jiabao Zheng, Chuan-he Tang, Weizheng Sun
 Publication: Advances in Colloid and Interface Science
 Publisher: Elsevier
 Date: October 2020

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas -- Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5155581250703

[Printable Details](#)

License date Sep 24, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Elsevier
 Licensed Content Publication Advances in Colloid and Interface Science
 Licensed Content Title Heteroprotein complex coacervation: Focus on experimental strategies to investigate structure formation as a function of intrinsic and external physicochemical parameters for food applications
 Licensed Content Author Jiabao Zheng, Chuan-he Tang, Weizheng Sun
 Licensed Content Date Oct 1, 2020

Order Details

Type of Use reuse in a thesis/dissertation
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 4
 Format both print and electronic
 Are you the author of this Elsevier article? No
 Will you be translating? No



Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate

Author: Meng Zhao, Xue Huang, Hui Zhang, Yanzhen Zhang, Michael Gänzle, Nan Yang, Katsuyoshi Nishinari, Yapeng Fang
 Publication: Food Hydrocolloids
 Publisher: Elsevier
 Date: August 2020

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas -- Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5155600220249

[Printable Details](#)

License date Sep 24, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Elsevier
 Licensed Content Publication Food Hydrocolloids
 Licensed Content Title Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate
 Licensed Content Author Meng Zhao, Xue Huang, Hui Zhang, Yanzhen Zhang, Michael Gänzle, Nan Yang, Katsuyoshi Nishinari, Yapeng Fang
 Licensed Content Date Aug 1, 2020
 Licensed Content Volume 105
 Licensed Content Issue n/a
 Licensed Content Pages 1

Order Details

Type of Use reuse in a thesis/dissertation
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 10
 Format both print and electronic
 Are you the author of this Elsevier article? No
 Will you be translating? No



Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9

Author: Anne-Laure Chapeau,Guilherme M. Tavares,Pascaline Hamon,Thomas Croguennec,Denis Poncelet,Said Bouhallab

Publication: Food Hydrocolloids

Publisher: Elsevier

Date: June 2016

Copyright © 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas – Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5157131343143

[Printable Details](#)

License date Sep 27, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Elsevier
 Licensed Content Publication Food Hydrocolloids
 Licensed Content Title Spontaneous co-assembly of lactoferrin and β -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9
 Licensed Content Author Anne-Laure Chapeau,Guilherme M. Tavares,Pascaline Hamon,Thomas Croguennec,Denis Poncelet,Said Bouhallab
 Licensed Content Date Jun 1, 2016
 Licensed Content Volume 57
 Licensed Content Issue n/a
 Licensed Content Pages 11

Order Details

Type of Use reuse in a thesis/dissertation
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 10
 Format both print and electronic
 Are you the author of this Elsevier article? No



Effect of the Helix–Coil Transition in Bovine Skin Gelatin on Its Associative Phase Separation with Lysozyme

Author: Yurij A. Antonov, Irina Zhuravleva, Alexander Volodine, et al

Publication: Langmuir

Publisher: American Chemical Society

Date: Nov 1, 2017

Copyright © 2017, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals

Author: Fatoumata Diarrassouba, Gabriel Remondetto, Ghislain Garrait, Pedro Alvarez, Eric Beyssac, Muriel Subirade

Publication: Food Chemistry

Publisher: Elsevier

Date: 15 April 2015

Copyright © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas -- Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5157141340148

[Printable Details](#)

License date Sep 27, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Food Chemistry
Licensed Content Title	Self-assembly of β -lactoglobulin and egg white lysozyme as a potential carrier for nutraceuticals
Licensed Content Author	Fatoumata Diarrassouba, Gabriel Remondetto, Ghislain Garrait, Pedro Alvarez, Eric Beyssac, Muriel Subirade
Licensed Content Date	Apr 15, 2015
Licensed Content Volume	173
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	7

Order Details

Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	10
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No



Dear Martin Daniel,

Thank you for your inquiry. Copyright Clearance Center's reprints management team will review your request and generate a quote for your review. We will contact you if additional information is needed.

Request Details:

Transaction Type: Reprints

Shrink-wrapping: No

Article Title: Unfolding and refolding details of lysozyme in the presence of b-casein micelles

Author: Wu, Fu-Gen Luo, Jun-Jie Yu, Zhi-Wu

Publication: Phys. Chem. Chem. Phys

Year: 2011

Volume: 13

Issue: 8

Pages: 3429-3436

Quantity: 1

If you have any questions, please contact us at reprintsinquiry@copyright.com.

Please do not reply to this message.

Nonfreezing Water Structuration in Heteroprotein Coacervates

Author: Xiaosong Du, Daniel Seeman, Paul L. Dubin, et al

Publication: Langmuir

Publisher: American Chemical Society

Date: Aug 1, 2015

Copyright © 2015, American Chemical Society



PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)



Dear Martin Daniel,

Thank you for your inquiry. Copyright Clearance Center's reprints management team will review your request and generate a quote for your review. We will contact you if additional information is needed.

Request Details:

Transaction Type: Reprints

Shrink-wrapping: No

Article Title: Interactions in globular proteins with polyampholyte: coacervation route for protein separation

Author: Pathak, Jyotsana Rawat, Kamla Aswal, V K Bohidar, H B

Publication: RSC advances

Year: 2015

Volume: 5

Issue: 18

Pages: 13579-13589

Quantity: 2

If you have any questions, please contact us at reprintsinquiry@copyright.com.

Please do not reply to this message.



Dear Martin Daniel,

Thank you for your inquiry. Copyright Clearance Center's reprints management team will review your request and generate a quote for your review. We will contact you if additional information is needed.

Request Details:

Transaction Type: Reprints

Shrink-wrapping: No

Article Title: Structure of bovine b-lactoglobulin-lactoferrin coacervates

Author: Kizilay, Ebru Seeman, Daniel Yan, Yunfeng Du, Xiaosong Dubin, Paul L. Donato-Capel, Laurence Bovetto, Lionel Schmitt, Christophe

Publication: Soft Matter

Year: 2014

Volume: 10

Issue: 37

Pages: 7262-7268

Quantity: 2

If you have any questions, please contact us at reprintsinquiry@copyright.com.

Please do not reply to this message.



Heteroprotein complex of soy protein isolate and lysozyme: Formation mechanism and thermodynamic characterization

Author: Jiabao Zheng, Chuan-he Tang, Ge Ge, Mouming Zhao, Weizheng Sun

Publication: Food Hydrocolloids

Publisher: Elsevier

Date: April 2020

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Estadual de Campinas – Martin Aya Rodriguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5157200136756

[Printable Details](#)

License date Sep 27, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Elsevier
 Licensed Content Publication Food Hydrocolloids
 Licensed Content Title Heteroprotein complex of soy protein isolate and lysozyme: Formation mechanism and thermodynamic characterization
 Licensed Content Author Jiabao Zheng, Chuan-he Tang, Ge Ge, Mouming Zhao, Weizheng Sun
 Licensed Content Date Apr 1, 2020
 Licensed Content Volume 101
 Licensed Content Issue n/a
 Licensed Content Pages 1

Order Details

Type of Use reuse in a thesis/dissertation
 Portion figures/tables/illustrations
 Number of figures/tables/illustrations 12
 Format both print and electronic
 Are you the author of this Elsevier article? No
 Will you be translating? No