

DOUGLAS FERNANDO BALBINO

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS E
NANOESTRUTURAS CONTENDO OVALBUMINA E LACTOFERRINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra

Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira
Igor José Boggione Santos

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B172f Balbino, Douglas Fernando, 1993-
2019 Formação e caracterização de complexos coacervados e
nanoestruturas contendo ovalbumina e lactoferrina / Douglas
Fernando Balbino. – Viçosa, MG, 2019.
101f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Química supramolecular. 2. Proteínas. 3. Interações.
4. Termodinâmica. 5. Espectroscopia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22 ed. 547.7

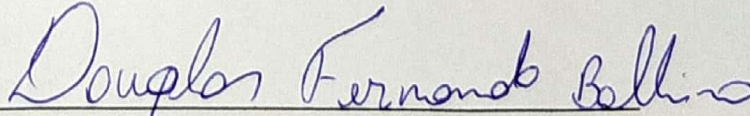
DOUGLAS FERNANDO BALBINO

**FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS COACERVADOS E
NANOESTRUTURAS CONTENDO OVALBUMINA E LACTOFERRINA**

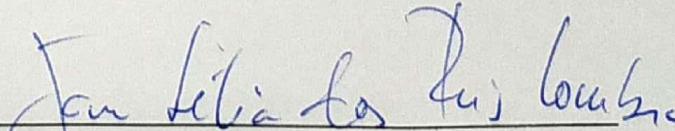
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2019.

Assentimento:



Douglas Fernando Balbino
Autor



Jane Sélia dos Reis Coimbra
Orientadora

*A Deus, meu grande e verdadeiro amor,
aos meus pais, pelo amor incondicional,
aos meus irmãos, por serem anjos de Deus em
minha vida, e
à minha namorada, por ser minha Maria,
dedico esse trabalho*

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível devido a ajuda de algumas pessoas muito especiais. Por isso, gostaria de agradecer:

A Deus, fonte de todo amor e sabedoria, por ter me concedido o dom da vida e por ter me capacitado na execução deste trabalho.

À Mãezinha do Céu e toda milícia celeste, por não cessarem de me amar e de interceder por mim junto a Deus Pai.

À Igreja Católica, nas figuras dos estimados amigos Pe. Paulo Dionê, pároco da Paróquia Santa Rita de Cássia, Pe. Sérgio José, Pe. Lucas Germano e Pe. Márcio Henrique, por alimentar a minha alma com a Palavra de Deus e com o Pão Vivo descido do céu, a Sagrada Eucaristia, a fim de que eu viva eternamente no reino celeste.

Aos meus pais, Fernando e Zélia, por serem meus maiores incentivadores. Pacientes, carinhosos e amorosos, sempre me ajudaram além das suas possibilidades. Que Deus sempre derrame muitas graças em nossa família. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Kátia e Eduardo, por serem meus grandes amigos, por me incentivarem a buscar os meus sonhos e por celebrarem comigo cada vitória que alcanço em minha vida. Com vocês a vida é mais prazerosa. Amo muito vocês!

Aos demais familiares, por todo apoio que me deram ao longo da minha vida. Em especial, agradeço à minha avó Maria, por sempre me receber em sua casa com um sorriso no rosto e um delicioso almoço.

À minha namorada, Thaynara, pelo respeito, paciência, companheirismo, amor e carinho. Sempre foi e será um ombro amigo em quem posso depositar minha confiança. Agradeço, principalmente, por me conduzir à santidade. Amo muito você!

À minha querida orientadora, professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela oportunidade e por me impulsionar a ser cada vez melhor. Seus ensinamentos, sua generosidade e sua amizade

contribuíram não só pelo meu crescimento como cientista, mas também como ser humano. Tenho orgulho de ter sido seu orientado.

Aos estimados coorientadores, professor Eduardo Basílio de Oliveira e professor Igor José Boggione Santos, por todo ensinamento compartilhado e por sempre serem solícitos quando eu precisava. Jamais mediram esforços para me ajudar, seja via videochamada ou permanecendo comigo muito além do expediente.

Aos demais membros da banca, professora Angélica Ribeiro da Costa e D.Sc. Davi Rocha Bernardes de Oliveira, por todas valiosas correções que certamente fizeram com que esse trabalho ficasse ainda melhor.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por terem oferecido conhecimento para meu crescimento acadêmico e estrutura para a execução deste trabalho.

Às agências financiadoras desse trabalho: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos ao longo desses dois anos e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais). Ademais, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), por permitir a realização de parte dos experimentos no Laboratório Nacional de Biociências (LnBio). De modo especial, agradeço à D.Sc. Fernanda Aparecida Heleno Batista e D.Sc. Ana Carolina Migliorini Figueira, pelo apoio nas análises calorimétricas e espectroscópicas.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares e ao D.Sc. Éber Antônio Alves Medeiros, por permitirem a realização de parte dos experimentos no Laboratório de Embalagens (LABEM) do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Aos amigos do Laboratório de Operações e Processos (LOP) e Laboratório de Estudo de Materiais Alimentares (LEMA), em especial, Ana Paula Hanke, Camila Saraiva, Danielle

Ferreira, Guilherme Mendes, Héctor Hernández, José Antônio Lafetá, Kely Correa, Maria Claudia Negrete, Michele Harumi, Monique Torres, Pedro Henrique Calhau, Otávio Ribeiro, Talita Teixeira e Thomás de Oliveira por cada ensinamento compartilhado, pelo excelente convívio e por terem rido comigo e de mim ao longo desses dois anos.

Ao Marciano e à Lívia, grandes amigos da universidade, por me hospedarem em Campinas e por fazerem com minha estadia fosse muito proveitosa.

Aos coautores desse trabalho, Bruno Leão Nascimento, Gustavo Leite Milião e Lucas de Souza Soares, por não só me auxiliarem no desenvolvimento desse projeto, mas também serem grandes amigos que levarei para toda vida.

Aos grupos católicos Adolescentes Seguidores de Cristo (ASC), Jovens Seguidores de Cristo (JSC), e Eternos Seguidores de Cristo, na figura do estimado diretor espiritual Sr. Cônego José Geraldo Vidigal de Carvalho, pedacinhos do céu aqui na terra, por tudo que vivi de intenso e verdadeiro, por suscitarem em mim o desejo de ser cada vez melhor, por não permitir me contentar com caminho até aqui percorrido e, principalmente, por me presentarem com amizades verdadeiras que me impulsionam a viver a santidade. Que, unidos, sejamos felizes sempre! Amo vocês!

Aos demais amigos e colegas, por me ajudarem ao longo de toda a minha vida, seja com orações ou com a presença de cada um. Que um dia possamos celebrar a nossa ressurreição para a vida eterna.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e não foram aqui citados.

“Hoje, apenas hoje, serei feliz na certeza de que fui criado para a felicidade, não só no outro mundo, mas também já neste.”

(SÃO JOÃO XXIII)

RESUMO

BALBINO, Douglas Fernando, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Formação e caracterização de coacervados complexos e nanoestruturas contendo ovalbumina e lactoferrina.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Coorientadores: Eduardo Basílio de Oliveira e Igor José Boggione Santos.

Estruturas supramoleculares (E-Sup) são sistemas complexos formados por meio de interações intermoleculares entre biopolímeros com o propósito de conferir características biológicas e físico-químicas melhores em relação às moléculas precursoras. Diferentes E-Sup, como os complexos coacervados e as nanoestruturas, podem ser obtidas a depender da finalidade desejada, das biomoléculas utilizadas, das técnicas empregadas e das condições físico-químicas de formação. Embora algumas pesquisas relatem a formação de E-Sup a partir de proteínas alimentares, não foram encontrados estudos que abordem a associação entre ovalbumina (OVA) e lactoferrina (LF). Dessa forma, este trabalho foi subdividido em três capítulos para melhor entender os aspectos relacionados à formação de complexos coacervados e nanoestruturas de OVA e LF. No primeiro capítulo, o objetivo foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as proteínas e E-Sup estudadas. No segundo capítulo, o objetivo foi produzir e caracterizar complexos coacervados de OVA e LF, variando razão molar, pH e adição de NaCl ou ureia. Medidas de turbidez e potencial zeta indicaram que a melhor condição de formação foi obtida na razão (OVA:LF) 2:1, em pH 6,0 e sem adição de NaCl ou ureia. A análise de calorimetria de titulação isotérmica indicou que a interação entre as proteínas em pH 6,0 foi espontânea e entalpicamente dirigida. Estruturas, em sua maioria, esféricas e de diâmetro hidrodinâmico médio (d_h) de cerca de 620 nm foram formadas. Espectros de fluorescência e de dicroísmo circular indicaram possíveis mudanças conformacionais das proteínas na formação dos coacervados. Por fim, no terceiro capítulo, o objetivo foi produzir nanoestruturas de OVA e LF a partir da técnica de gelificação térmica, variando pH, temperatura e tempo de aquecimento. Os resultados demonstraram que a combinação destes fatores influenciou no tipo e tamanho das estruturas obtidas. Análises de espalhamento dinâmico de luz mostraram que os sistemas preparados em pH 7,0 e 8,5 produziram estruturas com $d_h < 300$ nm e índice de polidispersidade $< 0,2$. Nanoestruturas de menor d_h (~ 130 nm), obtidas em pH 8,5 e tratamento térmico de 86 °C/34 min, foram estáveis por 30 dias de armazenamento a 4, 25 e 40 °C. Desse modo, este trabalho demonstrou que diferentes tipos de E-Sup podem ser formadas a partir da associação entre OVA e LF, podendo oferecer novas aplicações bio e técnico-funcionais.

Palavras-chave: Química supramolecular. Proteína. Interação. Termodinâmica. Espectroscopias.

ABSTRACT

BALBINO, Douglas Fernando, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Formation and characterization of complex coacervates and nanostructures containing ovalbumin and lactoferrin.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-advisers: Eduardo Basílio de Oliveira and Igor José Boggione Santos.

Supramolecular structures (E-Sup) are complex systems formed by intermolecular interactions between biopolymers in order to improve biological and physicochemical characteristics of precursor molecules. Different E-Sup, such as complex coacervates and nanostructures, can be obtained depending on the desired purpose, the molecules used, the techniques employed to produce the structures, and the physicochemical conditions of formation. Although some researchers report the formation of E-Sup from food proteins, no studies addressing the association between ovalbumin (OVA) and lactoferrin (LF) have been found. Thus, this current study was subdivided into three chapters to better understand the aspects that are related to the formation of complex coacervates and nanostructures of OVA and LF. In the first chapter, the objective was to perform a literature review of the proteins and E-Sup studied. In the second chapter, the objective was to produce and characterize OVA-LF complex coacervates, varying molar ratio, pH, and NaCl or urea addition. Turbidity and zeta-potential measurements indicated that the optimum condition in the formation of coacervates was obtained at molar ratio (OVA: LF = 2:1), at pH 6.0, and without NaCl or urea addition. Isothermal titration calorimetry indicated that the interaction between these proteins was spontaneously and enthalpically driven, at pH 6.0. Mostly spherical structures with an average hydrodynamic diameter (d_h) of approximately 620 nm were formed. Fluorescence and circular dichroism spectra indicated possible conformational changes of the proteins in coacervates formation. Finally, in the third chapter, the objective was to produce OVA and LF nanostructures using the thermal gelation technique, varying pH, temperature and heating time. Results demonstrated that the combination of these factors influenced the type and size of the structures obtained. Dynamic light scattering showed that systems prepared at pH 7.0 and 8.5 produced nanostructures with $d_h < 300$ nm and polydispersity index < 0.2 . Smaller d_h nanostructures (~130 nm), obtained at pH 8.5 and heat treatment at 86 °C/34 min, were stable for 30 days of storage at 4, 25 and 40 °C. Thus, this study demonstrated that different types of E-Sup can be formed from the association between OVA and LF, and may offer new bio and technical-functional applications.

Keywords: Supramolecular chemistry. Protein. Interaction. Thermodynamics. Spectroscopies.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Estrutura cristalina da ovalbumina.....	26
Figura 2 – Estrutura cristalina da lactoferrina.....	28

CAPÍTULO 2

GRAPHICAL ABSTRACT.....	46
Figure 1 – (a) Native OVA and LF, and (b) OVA–LF mixtures in different molar ratio (OVA:LF) zeta-potential and (c) Native OVA and LF, and (d) OVA–LF mixtures in different molar ratio (OVA:LF) turbidity as a function of the pH; (e) turbidity of coacervation process, at 2:1 molar ratio, with identification of its pH_c , $pH_{\phi 1}$, and $pH_{\phi 2}$; (f) phase diagram of complex coacervates in terms of pH_c , $pH_{\phi 1}$, and $pH_{\phi 2}$ as a function of the molar ratio; and (g) turbidity variation of different molar ratios, at pH 6.00 without NaCl or urea addition.....	59
Figure 2 – a) pM and pN of complex coacervates as a function of the ratio (r); and (b) turbidity kinetics of complex coacervates formed at molar ratio 2:1 and pH 6.00, maintained at 25 °C.....	62
Figure 3 – Turbidity of mixtures containing complex coacervates at 2:1 molar ratio as a pH function, at different concentrations of (a) NaCl or (b) urea.....	64
Figure 4 – ITC thermogram and interaction isotherm for titration of (a) LF into OVA and (b) OVA into LF, both at pH 6.00 and T = 25 °C.....	66
Figure 5 – Hydrodynamic diameter distribution for (a) OVA, (b) LF and (c) complex coacervates formed at r = 2:1, pH 6.00 and without NaCl or urea addition.....	69
Figure 6 – DSC thermogram for (a) OVA, (b) LF and (c) complex coacervates formed at r = 2:1 ratio, pH 6.00 and without NaCl or urea addition.....	70
Figure 7 – (a) Circular dichroism and (b) fluorescence spectra of OVA, LF, and complex coacervates produced at r = 2:1, pH 6.00, and without NaCl or urea addition. (c) Optical photomicrographs of complex coacervates formed at ratio r = 2: 1, pH 6.00, and without addition of NaCl or urea....	72

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Fluxograma de produção das nanoestruturas contendo OVA e LF.....	84
Figura 2 – Misturas de OVA e LF nas razões molares (r, OVA:LF) de 1:2, 1:1 e 2:1 obtidas após submetidas a pH 7,0, T = 80 °C e t = 25 min.....	88
Figura 3 – Espectros de (a) dicroísmo circular e (b) fluorescência das proteínas nativas e dos sistemas S2, S4, S6 e S8.....	93
Figura 4 – Efeito da temperatura no armazenamento da nanoestrutura formada na razão r = 2:1 e pH 8,5, T = 86 °C/34 min.....	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de complexos coacervados heteroproteicos.....	32
Tabela 2 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de nanoestruturas proteicas.....	34

CAPÍTULO 2

Table 1 – Thermodynamic parameters of the OVA and LF interaction, at 25 °C and pH 6.00.....	67
Table 2 – Transition temperature (T_m) and the transition enthalpy (ΔH_m) of the native proteins and complex coacervate formed at 2:1 molar, pH 6.00, and without NaCl or urea addition.....	71

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Níveis codificados e reais das variáveis independentes para a formação de nanoestruturas contendo OVA e LF.....	82
Tabela 2 – Matriz de interação entre os efeitos com os valores não codificados.....	83
Tabela 3 – Análise de espalhamento dinâmico de luz das proteínas nativa (OVA e LF) e das estruturas formadas na razão $r = 2:1$ e submetidas aos tratamentos definidos no DCCR.....	89
Tabela 4 – Valores de potencial zeta das nanoestruturas formadas na razão $r = 2:1$ e em pH 8,5, $T = 86$ °C e $t = 34$ min.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OVA	Ovalbumina
OT	Ovotransferrina
β Lg	β -lactoglobulina
α La	α -lactoalbumina
LIS ou LYS	Lisozima
LF	Lactoferrina
GMP	Glicomacropéptido
BSA	Albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
WPI	Isolado proteico de soro (<i>whey protein isolate</i>)
WPC	Concentrado proteico de soro (<i>whey protein concentrate</i>)
SPI	Isolado proteico de soja (<i>soy protein isolate</i>)
E-Sup	Estruturas supramoleculares
CC	Complexos coacervados
OVA-LF	Misturas de ovalbumina e lactoferrina
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico (ou pH isoelétrico) das proteínas
pN	Ponto isoelétrico (ou pH isoelétrico) das misturas de ovalbumina e lactoferrina
pM	pH de máxima turbidez das soluções proteicas e das misturas de ovalbumina e lactoferrina
pH _c , pH _{ϕ1} e pH _{ϕ2}	Valores críticos de pH durante a titulação
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DSC	Calorimetria diferencial de varredura (<i>differential scanning calorimetry</i>)
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (<i>dynamic light scattering</i>)
SLS	Espalhamento de luz estático (<i>static light scattering</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
CD	Espectroscopia molecular de dicroísmo circular (<i>circular dichroism</i>)
FI	Espectroscopia de fluorescência (<i>intensity fluorescence</i>)

FTIR	Espectroscopia no infravermelho (<i>fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
UV-Vis	Espectroscopia UV-Visível (<i>ultraviolet–visible spectroscopy</i>)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (ou <i>transmission electron microscopy</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (ou <i>scanning electron microscopy</i>)
AFM	Microscopia de força atômica (ou <i>atomic force microscopy</i>)
CLSM	microscopia confocal de varredura a laser (ou <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
OM	Microscopia ótica (ou <i>optical microscopy</i>)
QCM	Microbalança de cristal de quartzo (<i>Quartz crystal microbalance</i>)
r	Razão molar de interação
Abs_{600}	Densidade óptica a 600 nm
τ	Turbidez
l	Caminho óptico da cubeta
μ_e	Mobilidade eletroforética
v	Velocidade da partícula
E	Campo elétrico aplicado
η	Viscosidade do meio
ϵ_0	Permissividade do meio
ϵ_r	Constante dielétrica do meio
ζ	Zeta
d_h	Diâmetro hidrodinâmico médio
D	Coefficiente de difusão
k_B	Constante de Boltzmann
PDI	Índice de polidispersão (<i>polydispersity index</i>)
σ	Desvio padrão
$\Delta_{int}GOVA-LF$	Variação da energia livre de Gibbs na interação entre ovalbumina e lactoferrina
$\Delta_{int}HOVA-LF$	Variação da entalpia na interação entre ovalbumina e lactoferrina
$\Delta_{int}SOVA-LF$	Variação da entropia na interação entre ovalbumina e lactoferrina
K_{OVA-LF}	Constante de associação entre ovalbumina e lactoferrina
N_{OVA-LF}	Coefficiente estequiométrico da interação entre ovalbumina e lactoferrina
R	Constante dos gases ($8.31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
T	Temperatura absoluta
t	Tempo

ΔT	Variação da temperatura
T_m	Temperatura de transição
ΔH_m	Entalpia de transição
T_{des}	Temperatura de desnaturação
$[\theta]$	Elipticidade residual média
θ	Sinal CD
MM	Massa molecular da proteína
n	Número de resíduos de aminoácidos da proteína
c	Concentração da proteína
λ_{Max}	Pico de máxima intensidade no espectro de fluorescência
DCCR	Delineamento composto central rotacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos	23
CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica.....	25
1. Ovalbumina	26
2. Lactoferrina	27
3. Estruturas supramoleculares (E-Sup) proteicas.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II: MANUSCRITO: Thermodynamic formation mechanism and characterization of ovalbumin/lactoferrin heteroprotein complex coacervates produced at optimized conditions.....	45
GRAPHICAL ABSTRACT	46
HIGHLIGHTS	47
ABSTRACT	49
1. INTRODUCTION.....	50
2. MATERIAL AND METHODS.....	52
2.1 Material.....	52
2.2 Heteroprotein complex coacervates formation.....	52
2.2.1 Sample preparation.....	52
2.2.2 Turbidity measurements.....	52
2.2.3 Zeta-potential	53
2.2.4 Isothermal titration calorimetry (<i>ITC</i>).....	54
2.3 Heteroprotein complex coacervates characterization	55
2.3.1 Hydrodynamic average diameter	55
2.3.2 Intrinsic fluorescence spectroscopy (<i>FI</i>).....	56
2.3.3 Circular dichroism spectroscopy (<i>DC</i>).....	56

2.3.4	Differential scanning calorimetry (<i>DSC</i>)	57
2.3.5	Optical microscopy	57
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	58
3.1	Heteroprotein complex coacervation	58
3.2	Effect of the destabilizing agents addition on the complex coacervates formation...63	
3.3	Thermodynamic characterization of OVA-LF interaction	65
3.4	Hydrodynamic average diameter	68
3.5	Complex coacervates thermal stability	70
3.6	Structure and morphological characterization	71
4.	CONCLUSIONS	73
	Acknowledgment.....	74
5.	REFERENCES	75
CAPÍTULO III – Caracterização e estabilidade de nanoestruturas de ovalbumina e lactoferrina formadas em condições otimizadas pela técnica de gelificação térmica..... 78		
	RESUMO.....	79
1.	INTRODUÇÃO.....	80
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
2.1	Material.....	81
2.2	Preparo das soluções proteicas.....	81
2.3	Desenho experimental.....	82
2.4	Formação das nanoestruturas de OVA e LF	83
2.5	Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade	84
2.6	Potencial zeta	85
2.7	Espectroscopia de dicroísmo circular	85
2.8	Espectroscopia de Fluorescência intrínseca.....	86
2.9	Estabilidade.....	87
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88

3.1	Definição da razão molar (OVA:LF).....	88
3.2	Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade	88
3.3	Potencial zeta	91
3.4	Caracterização estrutural.....	92
3.5	Estabilidade das nanoestruturas	94
4.	CONCLUSÕES	95
5.	REFERÊNCIAS	97
3.	CONCLUSÃO GERAL	100

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Estruturas supramoleculares (E-Sup) são complexos estáveis que podem ser gerados a partir da associação entre polímeros, como proteínas e/ou polissacarídeos, e sob diferentes condições físico-químicas de formação, como pH, temperatura, força iônica e concentração de biopolímeros, resultando na produção de micro e nanoesferas, nanogéis, nanofibras, nanotubos, entre outras.

Proteínas são macromoléculas anfífilas encontradas naturalmente em matérias primas animais e vegetais. Elas possuem ampla aplicabilidade na indústria de alimentos devido ao seu valor nutritivo, atributos sensoriais, atividade antimicrobiana e propriedades técnico-funcionais, sobretudo propriedades interfaciais, o que possibilita a atuação delas na formação e estabilização de sistemas coloidais, como espumas e emulsões.

As interações intermoleculares proteicas têm sido frequentemente pesquisadas no meio científico em razão da capacidade de estas biomoléculas se auto ou coassociarem, tornando-as adequadas para a produção de E-Sup, sejam em tamanho micro ou nano. Estudos recentes relatados na literatura abordam a produção e caracterização de E-Sup obtidas a partir de proteínas de diferentes fontes alimentares como leite (Saraiva et al., 2017), ovo (Santos et al., 2018a), soja (Chen et al., 2014) e trigo (Luna-Valdez et al., 2017).

A ovalbumina (OVA) é a proteína presente em maior proporção em relação à massa total de proteínas da clara do ovo. Ela é frequentemente utilizada como agente emulsificante e estabilizante de espumas. Por outro lado, a lactoferrina (LF) é uma glicoproteína presente no leite que apresenta capacidade de quelar íons metálicos, principalmente o ferro, desempenhando atividade antimicrobiana, anticancerígena, anti-hipertensiva, etc.

As E-Sup podem exibir algumas propriedades físico-químicas (cor, solubilidade, viscosidade, difusividade, etc.) e biológicas (digestibilidade, biodisponibilidade) distintas se comparadas às proteínas nativas, oferecendo assim novas funcionalidades e aplicações para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Como exemplo, em razão da baixa resistência à degradação físico-química e biológica que alguns bioativos e fármacos podem apresentar, uma das potenciais aplicabilidades das E-Sup é a utilização delas para encapsulamento e liberação controlada destes compostos. Diniz et al. (2014) produziram nanopartículas a partir da interação entre α -lactoalbumina e glicomacropéptido para encapsulamento de vitamina B2 e quercetina, Monteiro et al. (2016) sintetizaram nanopartículas esféricas contendo α -lactoalbumina e lisozima também para encapsulamento de vitamina B2 e quercetina, Saraiva et al. (2017) obtiveram nanopartículas de lactoferrina e β -lactoglobulina e Santos et al. (2018a) produziram complexos coacervados contendo ovalbumina e lisozima.

Uma vez que não foram encontrados trabalhos que abordem a associação entre OVA e LF, o objetivo desta pesquisa foi produzir: (i) complexos coacervados, variando pH, razão molar, e adição de NaCl ou ureia; e (ii) nanoestruturas, variando pH, temperatura e tempo de aquecimento. Além disso, objetivou-se caracterizar os coacervados via técnicas calorimétricas, espectroscópicas e morfológicas, bem como caracterizar as nanoestruturas via técnicas espectroscópicas e quanto à estabilidade quando armazenadas a 4, 25 e 40 °C.

Com o objetivo de compreender a associação entre as proteínas, essa dissertação foi organizada da seguinte maneira:

- **OBJETIVOS** – Este item apresenta o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.
- **CAPÍTULO I** – Este capítulo apresenta uma breve revisão sobre as proteínas e as estruturas supramoleculares estudadas, bem como relata trabalhos recentemente publicados sobre o tema.
- **CAPÍTULO II** – Este capítulo apresenta um estudo que avalia o efeito da razão molar de interação, pH e adição de NaCl ou ureia na formação de complexos coacervados de OVA e LF. Análise de calorimetria de titulação isotérmica foi utilizada para monitorar mudanças na entalpia de interação entre as proteínas. Além disso, os complexos coacervados obtidos na condição ótima de formação (apresentou maior valor de turbidez e $|\text{potencial zeta}| \approx 0$ mV) foram caracterizados via análises de espalhamento dinâmico de luz, calorimetria diferencial de varredura, espectroscopia de fluorescência intrínseca, espectroscopia de dicroísmo circular e microscopia ótica.
- **CAPÍTULO III** – Este capítulo apresenta um estudo que avalia o efeito do pH, temperatura e tempo de aquecimento na formação de nanoestruturas de OVA e LF, utilizando a técnica de gelificação térmica. As nanoestruturas foram caracterizadas via análises de espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência intrínseca. A estabilidade das nanoestruturas formadas na condição ótima (apresentou menor diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão $< 0,2$) foi avaliada via análises de espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta durante 30 dias de armazenamento a 4, 25 e 40 °C.
- **CONCLUSÃO GERAL** – Apresenta um resumo geral a partir dos resultados obtidos e considerações finais importantes sobre o estudo realizado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir e caracterizar complexos coacervados e nanoestruturas contendo OVA e LF.

2.2. Objetivos específicos

Capítulo I – Revisão bibliográfica

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre OVA, LF e E-Sup.

Capítulo II – Thermodynamic formation mechanism and characterization of ovalbumin-lactoferrin heteroprotein complex coacervates produced at optimized conditions

- Investigar a formação de complexos coacervados de OVA e LF, a 25 °C, via análises de turbidez, a 600 nm, e potencial zeta, avaliando o efeito do pH (3 – 10) e da razão molar de interação (OVA:LF – 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 1:2, 1:4 e 1:8);
- Definir a melhor condição de razão molar e pH na formação dos complexos coacervados;
- Avaliar o efeito da adição de NaCl (10 – 200 mmol L⁻¹) ou ureia (200 – 600 mmol L⁻¹), a 25 °C, na formação dos complexos coacervados, via análise de turbidez, a 600 nm;
- Estimar parâmetros termodinâmicos – razão molar (N_{OVA-LF}), constante de interação (K_{OVA-LF}) e variações na entalpia de interação ($\Delta_{int}H_{OVA-LF}$), na energia livre de Gibbs ($\Delta_{int}G_{OVA-LF}$) na entropia ($\Delta_{int}S_{OVA-LF}$) – via análise de calorimetria de titulação isotérmica, a 25 °C, em pH 6,0;
- Caracterizar, a 25 °C, os complexos coacervados obtidos na condição ótima quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade, via espalhamento dinâmico de luz; quanto à estrutura, via espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca; quanto à estabilidade térmica, via calorimetria diferencial de varredura; e quanto à morfologia, via microscopia ótica;

Capítulo III - Caracterização e estabilidade de nanoestruturas de ovalbumina e lactoferrina formadas em condições otimizadas pela técnica de gelificação térmica

- Avaliar a formação de nanoestruturas a partir da variação de 3 fatores – pH (4,5, 5,5, 7,0, 8,5 e 9,5), temperatura (70, 74, 80, 86 e 90 °C) e tempo de aquecimento (10, 16, 25, 34 e 40 min) – em um delineamento composto central rotacional, caracterizando as estruturas formadas, a 25 °C, via espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.

- Verificar mudanças conformacionais das proteínas na formação das nanoestruturas via análises de espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia fluorescência intrínseca;
- Avaliar a estabilidade das nanoestruturas otimizadas (menor diâmetro médio e índice de polidispersão $\leq 0,1$) ao longo de 30 dias, a 4, 25 e 40 °C, via espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.

CAPÍTULO I:
Revisão bibliográfica

1. Ovalbumina

A ovalbumina (OVA) é uma glicoproteína fosforilada sintetizada no oviduto das aves, cuja massa molecular de aproximadamente 45 kDa é composta por 385 aminoácidos, dos quais cerca de 50 % são hidrofóbicos. O seu ponto isoelétrico está dentro da faixa de pH 4,5-4,8 e sua temperatura de desnaturação é de aproximadamente 84 °C (Mine, 1995; Nisbet et al., 1981; Oe et al., 1988; Stadelman & Cotterill, 1986). Ela é a proteína encontrada em maior quantidade na clara do ovo, contabilizando cerca de 55 % (m/m) do total de proteínas do albúmen (Iwashita et al., 2017; Stadelman & Cotterill, 1986).

Na forma nativa, ela contém, estruturalmente, 33 % de α -hélice, 5 % de folhas β e 62 % de uma estrutura aleatória e não repetitiva (Batra et al., 1989). Ela é a única na clara do ovo que apresenta apenas uma ligação dissulfeto, entre os resíduos Cys-73 e Cys-120, e quatro grupamentos sulfidrilas livres no seu interior, que podem ficar expostos quando submetida ao processamento (Batra et al., 1989; Gharbi & Labbafi, 2018). Ela possui em sua estrutura nove resíduos de tirosina (Y29, 42, 97, 106, 117, 125, 212, 281 e 291) e três de triptofano (W148, 184 e 267) (Niu et al., 2015). Na separação das proteínas do ovo por eletroforese é observada a ocorrência de três bandas (A1, A2 e A3), as quais contêm dois, um e nenhum grupos fosfatos por molécula, respectivamente, compondo esta biomolécula na proporção de 85:12:3 (Mine, 1995; Stadelman & Cotterill, 1986). Estes grupamentos, quando estão presentes, se ligam aos resíduos de serina 68 e 344 (Nisbet et al., 1981; Stevens, 1991). A Figura 1 apresenta a estrutura cristalina da ovalbumina.

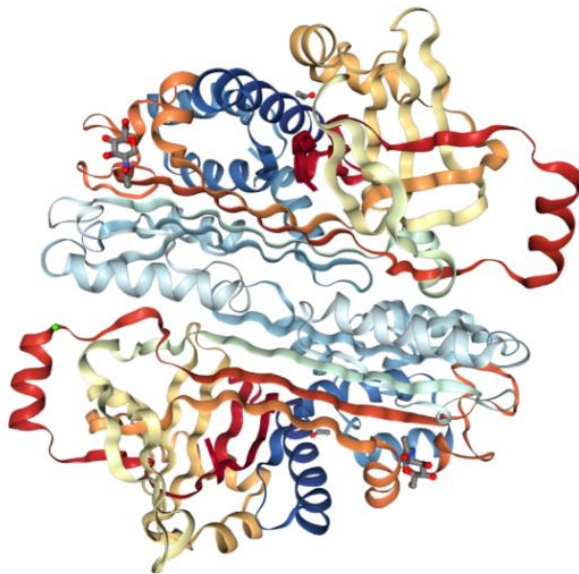


Figura 1 - Estrutura cristalina da ovalbumina.
Fonte: (STEIN et al., 1991; <http://www.rcsb.org/3d-view/1OVA/1>)

A ovalbumina contribui para que a clara do ovo exiba algumas funcionalidades, como atividade emulsificante e capacidade de formar espumas, devido às suas excelentes propriedades térmicas e de superfície (Croguennec et al., 2007; Doi et al., 1991; Zhao et al., 2016). Além disso, proteínas globulares e compactas como a ovalbumina (Savadkoochi et al., 2016) gelificam quando são submetidas ao aquecimento, pois elas sofrem desnaturação térmica, formando agregados que, com o aumento de temperatura, aumentam de tamanho. Esses aglomerados podem se apresentar nas formas lineares (filamentos finos) ou aleatórias (partículas densas), a depender das condições do tratamento empregado (pH, força iônica, concentração de proteína). A formação deles acontece em virtude da exposição dos grupos sulfidrilas que ocorre após o desdobramento da proteína, o que permite a ocorrência de ligações covalentes e interações intra/intermoleculares (Croguennec et al., 2007), alterando as propriedades físico-químicas e técnico-funcionais.

2. Lactoferrina

A lactoferrina (LF), também chamada de lactotransferrina, é uma glicoproteína sintetizada em mamíferos, tais como humanos, vacas, cabras, etc. Foi identificada pela primeira vez, em 1939, em leite bovino e, em 1960, foi isolada do leite humano por Johansson (Levay & Viljoen, 1995). Ela é encontrada em secreções mucosas como, por exemplo, saliva, lágrimas, fluidos vaginais, sêmen, leite e colostro. Pertencente à família das transferrinas, assim como a transferrina sérica, a ovotransferrina e a melanotransferrina, uma das funções da lactoferrina é o carregamento de íons metálicos como os íons férricos, cúpricos, de alumínio e de zinco, facilitando sua absorção pelo corpo humano. Devido sua capacidade de ligar reversivelmente ao Fe^{+3} , a lactoferrina pode estar ligada ao ferro (holo-LF) ou não (apo-LF), o que gera uma conformação tridimensional diferente para ambas situações (García-montoya et al., 2012). Enquanto a apo-LF tem uma conformação aberta, a holo-LF tem uma conformação fechada, sendo mais resistente à proteólise.

A lactoferrina está presente em soro de leite de vaca em uma concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ela dispõe em sua estrutura de aproximadamente 700 aminoácidos, o que lhe confere uma massa molecular de cerca de 80 kDa. Seu ponto isoelétrico foi relatado entre 8,0 a 9,0. Ela possui duas temperaturas de desnaturação que são de aproximadamente 60 e 90 °C (Bengoechea et al., 2011; Levay & Viljoen, 1995).

Assim como as demais transferrinas, seu enovelamento consiste em dois domínios globulares (N e C) de tamanho semelhante e homólogos (33-41 % de homologia), que são ligados por uma alfa-hélice composta por onze aminoácidos (333-343), conferindo flexibilidade

à molécula. Os aminoácidos são dispostos em estruturas de α -hélice e de folhas β , dividindo cada domínio em subdomínios (N1 e N2; C1 e C2), sendo que a cadeia polipeptídica dos aminoácidos 1 ao 332 corresponde ao domínio N e dos aminoácidos do 344 ao 700 corresponde ao domínio C (Öztafl & Özgünefl, 2005). Em cada domínio há um sítio que permite a ligação do ferro. Dessa maneira, ela pode se organizar em três isoformas que podem apresentar ausência de Fe^{3+} ou conter um ou dois átomos de Fe^{3+} por biomolécula. Em cada domínio há também a presença de um grupo CO_3^{2-} . Os sítios de ligação de Fe^{3+} em ambos domínios N e C são três ligantes aniônicos: duas tirosinas e um aminoácido aspártico, além da histidina que é um aminoácido neutro, formando uma rede de ligação de hidrogênio. As funções do ânion carbonato são neutralizar cargas positivas que podem repelir o cátion e parcialmente prepara o local de ligação do metal na apo-proteína adicionando mais dois potenciais ligantes (Levay & Viljoen, 1995). A estrutura da lactoferrina é apresentada na Figura 2

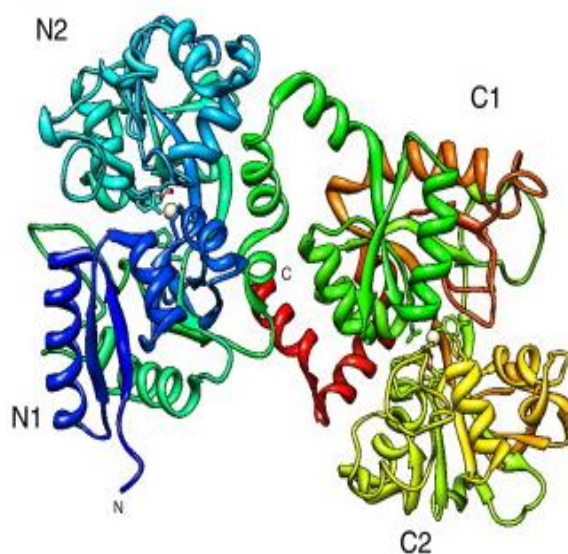


Figura 2 - Estrutura cristalina da lactoferrina.
Fonte: (García-montoya et al., 2012)

Dado que o ferro é necessário para o desenvolvimento dos microrganismos e a lactoferrina é capaz de sequestrar este íon metálico presente no meio, ela atua como agente antimicrobiano. Além disso, ela apresenta uma gama de outras bioatividades, tais como: antifúngica, antiviral, antiparasitária, anticancerígena, anti-hipertensiva, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e enzimática (García-montoya et al., 2012). Assim, seu emprego torna-se propício, por exemplo, como ingrediente alimentar em fórmulas infantis, suplemento natural de ferro em alimentos funcionais, nutracêutico e até mesmo em filmes comestíveis. Outras aplicações da lactoferrina se dá como agente espumante, gelificante, além da sua utilização no encapsulamento de compostos bioativos.

3. Estruturas supramoleculares (E-Sup) proteicas

Estruturas supramoleculares (E-Sup) são complexos químicos e funcionais formados pela associação de polímeros naturais e/ou sintéticos que são mantidos juntos por interações intermoleculares, como interações eletrostáticas, interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. Suas interações reversíveis despertam o surgimento de uma química dinâmica constitucional, o que leva a cobrir tanto o nível molecular quanto o supramolecular. (Lehn, 2007). As E-Sup formadas a partir de biopolímeros desempenham papéis simultâneos: i) econômico, dado que agrega valor à matéria-prima e ao produto; ii) nutricional, por oferecer ao consumidor alimentos com os nutrientes biodisponíveis; e iii) funcional biológico e tecnológico, devido à sua capacidade de incorporação, proteção, carregamento e liberação controlada de bioativos, de retenção de água, de formação de espumas e de atuação como emulsificante e gelificante,

As proteínas alimentares são polímeros naturais adequados para a produção de E-Sup, pois são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e são facilmente adaptáveis ao corpo humano, além de possuírem a capacidade de se auto ou coassociarem. Essas estruturas, quando formadas, exibem propriedades físico-químicas (como cor, solubilidade, viscosidade, resistência à degradação, difusividade, etc) e biológicas distintas se comparadas às proteínas em tamanho macro, podendo oferecer novas funcionalidades e resultando em novas aplicações (Durán & Marcató, 2013; Neethirajan & Jayas, 2011). Cabe ressaltar que as proteínas de origem animal se destacam dentre as proteínas naturais, por apresentarem excelentes propriedades funcionais e serem biologicamente mais completas, uma vez que possuem uma composição que contém quase todos os aminoácidos essenciais que o ser humano necessita para o seu desenvolvimento. Por outro lado, embora as proteínas de origem vegetal geralmente careçam de alguns aminoácidos essenciais, elas podem apresentar-se mais completas se associadas com outras proteínas (Monteiro, 2014).

Muitos estudos nesta área de pesquisa focaram na elucidação da produção de sistemas mono proteicos; no entanto, faz-se necessário, também, a compreensão do desenvolvimento de sistemas mais complexos envolvendo mais de uma proteína, pois permite a inovação e o intercâmbio de funcionalidades entre elas (Monteiro et al., 2016; Nigen et al., 2010).

O mecanismo de obtenção dos sistemas supramoleculares e a forma estrutural que eles desenvolvem são dependentes da conformação das biomoléculas e do equilíbrio das forças atrativas e repulsivas entre elas, bem como das condições físico-químicas do meio em que estão, como pH, temperatura, força iônica, concentração das proteínas e presença de outras moléculas

(Erabit et al., 2014; Gunasekaran et al., 2007). Uma grande diversidade dessas estruturas, incluindo coacervados complexos (Santos et al., 2018a), microesferas (Diarrassouba et al., 2015), nanoesferas (Diniz et al., 2014), nanogéis (Bourbon et al., 2015), nanofibras (Loveday et al., 2011), nanotubos (Ipsen & Otte, 2007), etc., podem ser geradas a partir deste processo de automontagem (Desfougères et al., 2010). De fato, é importante que haja controle das propriedades e, sobretudo, do tamanho dos agregados, pois sua estrutura e morfologia definirão sua potencial aplicabilidade (Erabit et al., 2014).

As técnicas comumente empregadas na produção das estruturas supramoleculares proteicas são a: dessolvatação/coacervação, emulsificação, gelificação térmica, “nano spray drying” e eletrofiação (Elzoghby et al., 2012; Lee et al., 2011; López-Rubio & Lagaron, 2012; Luna-Valdez et al., 2017).

Coacervados são complexos gerados a partir da associação de biopolímeros, proteínas e/ou polissacarídeos, opostamente carregados, resultando em separação de fase. Sua formação se dá principalmente pela atração eletrostática entre os biopolímeros, o que faz com que fatores como pH e força iônica sejam de fundamental importância na obtenção destes complexos (Croguennec et al., 2017). Outros fatores como razão molar, temperatura e adição de agentes desnaturantes, como ureia, também podem influenciar diretamente na formação deles (Liu et al., 2015). A formação dos complexos coacervados podem envolver quatro etapas: (a) preparo das dispersões aquosas dos biopolímeros; (b) mistura das dispersões; (c) alteração de fatores extrínsecos, como pH, razão molar e adição de sal ou ureia; e (d) uso de altas temperaturas e/ou agente reticulador no endurecimento de matrizes poliméricas (Timilsena et al., 2019). Embora alguns grupos de pesquisa relataram a formação de complexos coacervados utilizando proteínas e polissacarídeos, poucos estudos abordaram a formação de coacervados heteroproteicos. A Tabela 1 apresenta trabalhos que abordaram a formação de complexos coacervados heteroproteicos.

Por outro lado, nanopartículas são sistemas formados a partir da associação entre biopolímeros, produzindo estruturas de até 300 nm de tamanho, em ao menos uma dimensão, e que apresente modificação em alguma propriedade funcional, reológica e/ou biológica (Giroux et al., 2010; Tamjidi et al., 2013). O método de gelificação térmica, comumente utilizado na produção das nanoestruturas, é um processo que envolve o desdobramento da proteína pela aplicação de calor, expondo grupos funcionais que estavam escondidos na proteína nativa, como sulfidrilas, seguido de interações entre as biomoléculas, incluindo interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Elzoghby et al., 2012; Yu et al., 2006). Durante o resfriamento,

ligações de hidrogênio e dissulfeto são formadas, ocasionando um grande aumento da elasticidade (Batista et al., 2005). A Tabela 2 apresenta trabalhos que abordaram a formação de nanoestruturas proteicas a partir de diferentes metodologias de produção.

Segundo Monteiro (2014), diversas técnicas instrumentais têm sido utilizadas para caracterizar as estruturas supramoleculares, como:

- i) Quanto ao tamanho e índice de polidispersão (PDI, *polydispersity index*), via espalhamento de luz dinâmico (DLS, *dynamic light scattering*); à massa molar, espalhamento de luz estático (SLS, *static light scattering*); e à carga superficial líquida, via potencial zeta;
- ii) Quanto à estruturação da cadeia peptídica e mudanças conformacionais, via espectroscopia dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*), espectroscopia de fluorescência (FI, *Fluorescence Intensity*), espectroscopia UV-visível, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*), espectroscopia Raman e difração de raio X;
- iii) Quanto à morfologia, via microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscope*), microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscope*), microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscope*), microscopia confocal de varredura a laser (CLSM, *confocal laser scanning microscope*) e microscopia ótica (OM, *optical microscope*).
- iv) Quanto à bio e técnico-funcionalidades, via análises de formação e estabilização de espumas, propriedades emulsificantes, tensão superficial, tensão interfacial, densidade, encapsulamento e liberação controlada.

Tabela 1 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de complexos coacervados heteroproteicos.

Proteínas	Ponto isoelétrico	Objetivo	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referências
SPI e LF	$pI_{SPI} = pI_{LF} = 8,6-8,9$	Investigar a coacervação entre SPI e LF, estudar a termodinâmica de formação e caracterizar a estrutura dos coacervados formados.	Turbidimetria, potencial ζ , DLS, OM, ITC, SDS-PAGE, FTIR, DSC, SEM, AFM	Duas condições ótimas de coacervação foram obtidas: i) pH 6.25 e SPI:LF = 1:3 (produziram esferas de 50-150 nm de diâmetro), e ii) pH 6.60 e SPI:LF = 1:4 (produziram cadeias de 50-150 nm de comprimento e 20-80 nm de largura). Os coacervados foram gerados via interações eletrostáticas. A coacervação foi espontânea e entropicamente desfavorável. A interação SPI-LF aumentou a estabilidade térmica do lóbulo mais sensível da LF.	(Zheng et al., 2020)
OVA e LIS	$pI_{OVA} = 5,1$ $pI_{LIS} = 9,5$	Estudar a influência do pH, da razão mássica e da adição de NaCl na coacervação de OVA e LIS.	Turbidimetria, potencial ζ , DLS, FTIR, OM, SEM e ITC.	A condição ótima de coacervação foi obtida na razão molar (OVA:LIS) 1:1 e pH 7,5. A adição de NaCl, mesmo em baixas concentrações, foi desfavorável à coacervação. Microesferas de 2,2 μm de diâmetro médio foram formadas.	(Santos et al., 2018a)
BSA e LIS	$pI_{BSA} = 5,2$ $pI_{LIS} = 9,5$	Estudar a influência do pH, da razão mássica e da adição de NaCl na formação de coacervados de BSA e LIS.	Turbidimetria, potencial ζ , DLS, FTIR, OM, SEM e DSC.	A condição ótima de coacervação foi obtida na razão molar (BSA:LIS) 1:2 e pH 9,0. A adição de NaCl foi desfavorável à coacervação. Microesferas de 1,7 μm de diâmetro médio foram formadas.	(Santos et al., 2018b)
βLg e LF	$pI_{\beta\text{Lg}} = 5,1$ $pI_{LF} = 9,0$	Estudar a aplicação de coacervados de βLg e LF como biocarreadores de vitamina B9.	Turbidimetria, potencial ζ , DLS, microscopia de contraste de fase, cinética da turbidez, estabilidade e análise de esfericidade.	Biocarreadores esféricos de 2 a 20 μm de diâmetro incluídos de vitamina B9 foram formados em pH 5,5. Enquanto coacervados menores que 5 μm apresentaram formato de esferas quase perfeitas, coacervados entre 5 e 20 μm apresentaram formato de elipsoides.	(Chapeau et al., 2016)

Continua...

Tabela 1 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de complexos coacervados heteroproteicos. (Conclusão)

Proteínas	Ponto isoelétrico	Objetivo	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referências
β Lg e LF	$pI_{\beta\text{Lg}} = 5,1$ $pI_{\text{LF}} = 9,0$	Investigar o impacto das duas isoformas da β Lg (A e B) na formação de coacervados com LF.	Turbidimetria e ITC.	As condições ótimas de formação dos coacervados foi obtida em pH 5,5 para a mistura β Lg(A)+LF e 5,75 para a mistura β Lg(A)+LF, ambos na razão molar (β Lg:LF) de 8:1. Partículas com tamanho variando entre 2,5 e 7,5 μm foram formadas.	(Tavares et al., 2015)
β Lg e LIS	$pI_{\beta\text{Lg}} = 5,0$ $pI_{\text{LIS}} = 10,7$	Produzir uma estrutura contendo OVA e LIS capaz de carrear componentes nutracêuticos.	Turbidimetria, tamanho de partículas, potencial zeta, TEM e SEM.	A condição ótima de formação dos coacervados foi obtida na razão molar (β Lg:LIS) de 2:1 e pH 7,5. Microesferas de cerca de 7 μm de diâmetro médio foram formadas. Vitamina D3 foi encapsulada com sucesso pelos complexos coacervados.	(Diarrassouba et al., 2015)
LF e β Lg	$pI_{\text{OVA}} = 5,1$ $pI_{\text{LIS}} = 9,5$	Estudar a influência do pH e da fração molar de LF na formação de coacervados de LF e β Lg.	Turbidimetria, potencial zeta, DLS.	A condição ótima de formação dos coacervados foi obtida na razão molar (LF: β Lg) de 1:3 e pH 6,3. A coacervação foi independente da ordem de mistura das dispersões proteicas.	(Anema & Kruif, 2014)

Em que: ITC = calorimetria de titulação isotérmica; DSC = calorimetria diferencial de varredura; DLS = espalhamento dinâmico de luz; SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida; FTIR = espectroscopia no infravermelho; TEM = microscopia eletrônica de transmissão; SEM = microscopia eletrônica de varredura; OM = microscopia ótica; β Lg = β -lactoglobulina; LIS = lisozima; LF = lactoferrina; OVA = ovalbumina; BSA = albumina de soro bovino; SPI = isolado proteico de soja.

Tabela 2 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de nanoestruturas proteicas.

Proteínas	Objetivo	Técnica de produção	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referencias
β Lg e LF	Produzir e caracterizar E-Sup, variando pH, temperatura e tempo de aquecimento.	Gelificação térmica com ajuste de pH	CD, FI, potencial ζ e DLS	Produção de nanopartículas com superfície hidrofóbica e diâmetro médio variando entre 30 e 100 nm, que podem atuar na incorporação e liberação controlada de bioativos.	(Saraiva et al., 2017)
α La e LIS	Compreender o efeito do pH, temperatura e tempo de aquecimento no desenvolvimento de E-Sup.	Gelificação térmica com ajuste de pH	DSC, ITC, DLS, potencial ζ , CD, FI, OM, TEM e Estabilidade	Formação de nanoesferas de 60 nm de diâmetro que se mostraram estáveis durante 30 dias, a 25 °C, e durante 90 dias, a 4 °C. Elas oferecem novas oportunidades para produção de sistemas carreadores de compostos bioativos.	(Monteiro et al., 2016)
LF e GMP	Estudar o efeito da temperatura, concentração e força iônica na produção de nanogéis.	Gelificação térmica com ajuste de pH	DLS, potencial ζ , QCM, UV-Vis, FI, CLSM, TEM, AFM e estabilidade	Os nanogéis apresentaram formato esférico de 170 nm de diâmetro hidrodinâmico. Ademais, eles podem atuar como biocarreadores na indústrias alimentícias e farmacêuticas.	(Bourbon et al., 2015)
α La e GMP	Investigar e caracterizar E-Sup, variando pH e tratamento térmico.	Gelificação térmica com ajuste de pH	DSC, ITC, DLS, CD, FI, e propriedades espumante e emulsificante	Formação de nanopartículas de 250 nm de tamanho. As E-Sup apresentaram maior intensidade de fluorescência do que as proteínas, o que sugere que a vizinhança dos cromóforos se tornou mais apolar/hidrofóbica, aumentando a capacidade de formação da espuma.	(Diniz et al., 2014)
Proteínas da soja	Produzir e caracterizar nanogéis estáveis a partir de proteínas da soja.	Gelificação térmica com ajuste de pH	DLS, potencial ζ , turbidimetria, TEM, determinação de sulfidrina e FI	Formação de nanogéis esféricos de cerca de 70 a 130 nm de diâmetro hidrodinâmico. Os nanogéis, de núcleo hidrofóbico e superfície hidrofílica, foram sensíveis a alterações no pH e estáveis quanto à força iônica.	(Chen et al., 2014)

Continua...

Tabela 2 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de nanoestruturas proteicas. (Continuação)

Proteínas	Objetivo	Técnica de produção	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referencias
β Lg	Estudar o efeito do pH, [NaCl], [CaCl ₂] e temperatura de aquecimento na obtenção de E-Sup.	Gelificação térmica com ajuste de pH e adição de sais de cloro	FI e TEM	Produção de nanofibras de comprimentos variando entre 50 e 100 nm e com potencial aplicação na formação géis viscoelásticos, podendo aumentar a viscosidade do produto.	(Loveday et al., 2011)
α La e LIS	Investigar e caracterizar a formação de E-Sup, variando pH e tratamento térmico.	Gelificação térmica com ajuste de pH	CLSM, TEM, SEM, AFM e estabilidade das estruturas.	Quando: i) [proteína] = 0,1 mmol·L ⁻¹ : nanoesferas (400-700 nm) ii) [proteína] = 0,2 mmol·L ⁻¹ : microesferas (2-3 μ m)	(Nigen et al., 2010)
α La e LIS	Avaliar o papel das interações eletrostáticas na formação e estabilidade das estruturas formadas.	Gelificação térmica com ajuste de pH	Turbidimetria, estabilidade, OM e DLS.	Formação de microesferas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos produtos devido às suas bio e técnico-funcionalidades.	(Nigen et al., 2009)
OVA e OT	Produzir e caracterizar nanogéis anfóteros estáveis.	Gelificação térmica com ajuste de pH	Potencial ζ , DLS, FI, TEM, AFM	Formação de nanogéis esféricos (100-220 nm de diâmetro) com potencial aplicação para encapsulamento de ácido benzoico. Além disso, os nanogéis podem atuar como agentes emulsificante e gelificante, e na retenção de sabor	(Hu et al., 2007)
β -caseína e LIS	Produzir e caracterizar as nanopartículas, variando pH e tratamento térmico.	Gelificação térmica com ajuste de pH	DLS, potencial ζ , FI, AFM e TEM.	Nanopartículas de formato esférico com diâmetro médio de 200 nm. Sistemas carreadores de fármacos	(Pan et al., 2007)

Continua...

Tabela 2 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de nanoestruturas proteicas. (Continuação)

Proteínas	Objetivo	Técnica de produção	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referencias
OVA e LIS	Formar e caracterizar nanogéis a partir de duas proteínas globulares opostamente carregadas.	Gelificação térmica com ajuste de pH	Potencial ζ , SLS, DLS, TEM	Formação de nanogéis esféricos (200 nm de diâmetro) com potencial aplicação como sistemas carreadores de fármacos. Podem atuar também como agente emulsificante e gelificante e também na retenção de sabor	(Yu et al., 2006)
WPI	Produzir e caracterizar as propriedades físico-químicas de nanopartículas, utilizando etanol.	Dessolvatação em etanol	Distribuição de tamanho, TEM, FI, tensão interfacial.	Formação de partículas esféricas com tamanho variando entre 10 e 100 nm. As nanoestruturas apresentaram propriedades interfaciais similares com das proteínas nativas, o que indica seu como estabilizante emulsões e espumas. Também se demonstrou um excelente sistema para incorporação de zinco e encapsulação de corante hidrofílico.	(Gülseren et al., 2012a, 2012b, 2012c)
β Lg e WPC	Investigar o uso das proteínas do soro como hidrogéis sensíveis ao pH e sistemas de nanopartículas.	Dessolvatação em acetona	DLS, potencial ζ e estabilidade.	Formação de nanopartículas com tamanho médio de 60 nm, que podem ser usadas como biocarreadores de compostos bioativos.	(Gunasekaran et al., 2007)
BSA	Explorar a viabilidade da nano spray drying na produção de nanopartículas proteicas	Nano spray drying	SEM e TEM.	Formação de nanopartículas esféricas de tamanho médio de 460 nm. Esta metodologia se apresenta como uma alternativa com rendimento de produção de nanoestruturas superior às técnicas tradicionais.	(Lee et al., 2011)

Continua...

Tabela 2 – Estudos de formação, caracterização e funcionalidade de nanoestruturas proteicas. (Conclusão)

Proteínas	Objetivo	Técnica de produção	Técnicas de caracterização	Principais resultados	Referencias
WPC	Investigar a aplicação da eletrofiação na produção de E-Sup.	Eletrofiação	OM, FTIR, SEM, e estabilidade.	Formação de micro e nanocápsulas com potencial aplicação de no encapsulamento de compostos bioativos, como β -caroteno.	(López-Rubio & Lagaron, 2012)
Proteínas do soro	Produzir nanopartículas para produção de sistemas carreadores de compostos sensíveis.	Ciclagem de pH	Tamanho de partícula, turbidimetria, estabilidade.	Formação de nanopartículas, cujo tamanho variou entre 100 e 300 nm, com potencial aplicação no encapsulamento de compostos sensíveis, tais como aromas e corantes.	(Giroux et al., 2010)

Em que: *ITC* = calorimetria de titulação isotérmica; *DSC* = calorimetria diferencial de varredura; *PDI* = índice de polidispersividade; *DLS* = espalhamento dinâmico de luz; *SLS* = espalhamento estático de luz; *CD* = espectroscopia molecular de dicroísmo circular; *FTIR* = espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier; *FI* = espectroscopia de fluorescência; *UV-Visível* = espectroscopia UV-Visível; *TEM* é microscopia eletrônica de transmissão; *SEM* = microscopia eletrônica de varredura; *AFM* é microscopia de força atômica; *CLSM* = microscopia confocal de varredura a laser; *OM* = microscopia ótica; *QCM* = microbalança de cristal de quartzo; β *Lg* = β -lactoglobulina; α *La* = α -lactoalbumina; *LIS* = lisozima; *LF* = lactoferrina; *OVA* = ovalbumina; *OT* = ovotransferrina; *GMP* = glicomacropéptido; *BSA* = albumina de soro bovino; *WPI* = isolado proteico de soro e *WPC* = concentrado proteico de soro.

Os trabalhos apresentados na Tabela 1 e na Tabela 2 mostram que o objetivo da formação das E-Sup é modificar ou melhorar propriedades biológicas e/ou técnico funcionais das proteínas nativas. Como pode ser observado, as principais aplicabilidades dessas estruturas nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas são o encapsulamento, entrega e liberação controlada de compostos bioativos e fármacos (Gunasekaran et al., 2007), como Vitamina B9 (Lehn, 2007) vitamina D3 (Diarrassouba et al., 2015), zinco (Gülseren et al., 2012a), β -caroteno (López-Rubio & Lagaron, 2012), ácido benzoico (Hu et al., 2007), etc. Além disso, muitos desses biosistemas apresentam propriedades técnico-funcionais, tais como: emulsificação, e capacidade de formação e estabilização de espumas e géis (Diniz et al., 2014; Pan et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anema, S.G., Kruif, C.G.K. De, 2014. Journal of Colloid and Interface Science Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. **J. Colloid Interface Sci.** 430, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.036>
- Batista, A.P., Portugal, C.A.M., Sousa, I., Crespo, J.G., Raymundo, A., 2005. Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. **Int. J. Biol. Macromol.** 36, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.04.003>
- Batra, P., Sasa, K., Ueki, T., Takeda, K., 1989. Circular dichroic study of conformational changes in ovalbumin. **J. Protein Chem.** 8, 221–229.
- Bengoechea, C., Peinado, I., McClements, D.J., 2011. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics. **Food Hydrocoll.** 25, 1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.014>
- 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 Hydrocoll.** 48, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.026>
- 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 Hydrocoll.** 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.003>
- Chen, N., Lin, L., Sun, W., Zhao, M., 2014. Stable and pH-Sensitive Protein Nanogels Made by Self-Assembly of Heat Denatured Soy Protein. **J. Agric. Food Chem.** 62, 9553–9561.
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J.J., Pezennec, S., 2007. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. **J. Colloid Interface Sci.** 315, 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.041>
- 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>
- 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. **J. Phys. Chem. B** 114, 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 Chem.** 173, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.009>
- Diniz, R., Sélia, J., Vianna, Á., Carvalho, N. De, Ribeiro, A., José, I., Santos, B., Costa, G., Manuel, A., Helena, L., 2014. Production, characterization and foamability of α -lactalbumin/glycomacropptide supramolecular structures. **Food Res. Int.** 64, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.079>
- Doi, E., Shimizu, A., Oe, H., Kitabatake, N., 1991. Melting of heat-induced ovalbumin gel by pressure. **Food Hydrocoll.** 5, 409–425. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80100-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80100-8)
- Durán, N., Marcato, P.D., 2013. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. **Int. J. Food Sci. Technol.** 48, 1127–1134. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12027>
- Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **J. Control. Release** 157, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
- Erabit, N., Flick, D., Alvarez, G., 2014. Formation of β -lactoglobulin aggregates during thermomechanical treatments under controlled shear and temperature conditions. **J. Food Eng.** 120, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.003>
- García-montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-gallegos, S., Rascón-cruz, Q., 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein : An overview. *BBA - Gen. Subj. Biochimica et Biophysica Acta.* 1820, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>
- Gharbi, N., Labbafi, M., 2018. Effect of processing on aggregation mechanism of egg white proteins. **Food Chem.** 252, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.088>
- Giroux, J., Houde, J., Britten, M., 2010. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. **Food Hydrocoll.** 24, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.013>
- Gülseren, I., Fang, Y., Corredig, M., 2012a. Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol. **Food Chem.** 135, 770–774. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.146>

- Gülseren, I., Fang, Y., Corredig, M., 2012b. Complexation of high methoxyl pectin with ethanol desolvated whey protein nanoparticles: physico-chemical properties and encapsulation behaviour. **Food Funct.** 3, 859–866. <https://doi.org/10.1039/c2fo10235h>
- Gülseren, I., Fang, Y., Corredig, M., 2012c. Whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol: Characterization, thermal stability and interfacial behavior. **Food Hydrocoll.** 29, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.015>
- Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L., 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **J. Food Eng.** 83, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.11.001>
- Hu, J., Yu, S., Yao, P., 2007. Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. **Langmuir** 23, 6358–6364.
- Ipsen, R., Otte, J., 2007. Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin. **Biotechnol. Adv.** 25, 602–605. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.006>
- Iwashita, K., Handa, A., Shiraki, K., 2017. Co-aggregation of ovalbumin and lysozyme. **Food Hydrocoll.** 67, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.014>
- Lee, S.H., Heng, D., Ng, W.K., Chan, H.K., Tan, R.B.H., 2011. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **Int. J. Pharm.** 403, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.012>
- Lehn, J., 2007. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chem. Soc. Rev.** 36, 151–160. <https://doi.org/10.1039/b616752g>
- Levay, P.F., Viljoen, M., 1995. LACTOFERRIN : A GENERAL REVIEW. **Haematologica** 80, 252–267.
- Liu, J., Young, Y., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2015. Food Hydrocolloids Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L .). **Food Hydrocoll.** 49, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.035>
- López-Rubio, A., Lagaron, J.M., 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 13, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.012>
- Loveday, S.M., Wang, X.L., Rao, M. a, Anema, S.G., Singh, H., 2011. Effect of pH, NaCl, CaCl₂ and temperature on self-assembly of β -lactoglobulin into nanofibrils: a central

- composite design study. **J. Agric. Food Chem.** 59, 8467–8474. <https://doi.org/10.1021/jf201870z>
- Luna-Valdez, J.G., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Ramos Clamont-Montfort, G., Mendoza-Wilson, A.M., Mercado-Ruiz, J.N., Madera-Santana, T.J., Rascon-Chu, A., Chaquilla-Quilca, G., 2017. Structural and physicochemical characterization of nanoparticles synthesized from an aqueous extract of wheat bran by a cold-set gelation/desolvation approach. **Food Hydrocoll.** 62, 165–173. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.07.034>
- Mine, Y., 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends Food Sci. Technol.** 6, 225–232.
- Monteiro, A. A. 2014. **Nanopartículas proteicas formadas por α -lactoalbumina e lisozima e encapsulamento de quercetina e vitamina B2. 2014.** 153 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil
- Monteiro, R., Pereira, R.N., Diniz, R., Teixeira, V., Oliveira, E.B., Coimbra, J.S., 2016. Design of bio-based supramolecular structures through self-assembly of α -lactalbumin and lysozyme. **Food Hydrocoll.** 58, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.009>
- Neethirajan, S., Jayas, D.S., 2011. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food Bioprocess Technol.** 4, 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0328-2>
- Nigen, M., Croguennec, T., Bouhallab, S., 2009. Formation and stability of α -lactalbumin–lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. **Food Hydrocoll.** 23, 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.005>
- Nigen, M., Gaillard, C., Croguennec, T., Madec, M., Bouhallab, S., 2010. Dynamic and supramolecular organisation of α -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. **Biophys. Chem.** 146, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.10.001>
- Nisbet, A.D., Saundry, R.H., Moir, A.J.G., Fothergill, L.A., Fothergill, J.E., 1981. The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. **Eur. J. Biochem.** 115, 335–345.
- Niu, F., Dong, Y., Shen, F., Wang, J., Liu, Y., Su, Y., 2015. Food Hydrocolloids Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin e gum arabic complex coacervation. **Food Hydrocoll.** 43, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>
- Oe, H., Doi, E., Hirose, M., 1988. Amino-terminal and carboxyl-terminal half-molecules of ovotransferrin: preparation by a novel procedure and their interactions. **J. Biochem.** 103, 1066–1072. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122381>

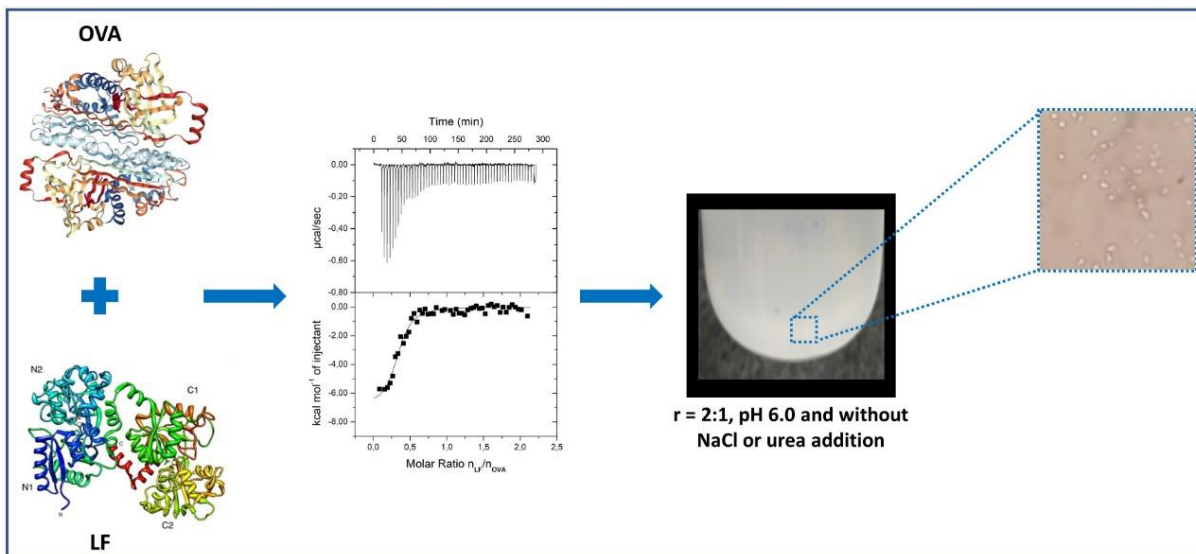
- Öztafl, Y.E., Özgünefl, N., 2005. Lactoferrin : a multifunctional protein. **Adv. Mol. medicine** 149–154.
- Pan, X., Yu, S., Yao, P., Shao, Z., 2007. Self-assembly of β -casein and lysozyme. **J. Colloid Interface Sci.** 316, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.007>
- Santos, M.B., Costa, A.R. da, Garcia-Rojas, E.E., 2018a. Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme: Formation and thermodynamic characterization. **Int. J. Biol. Macromol.** 106, 1323–1329. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.132>
- Santos, M.B., Ribeiro, A., Carvalho, C. W. P., Garcia-rojas, E.E., 2018b. 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>
- Saraiva, C., Coimbra, J., Vianna, A., Carvalho, N. De, Basílio, E., Oliveira, D., Francisco, R., Ribeiro, A., Almeida, É. De, Barbosa, A., 2017. Formation and characterization of supramolecular structures of β -lactoglobulin and lactoferrin proteins. **Food Res. Int.** 100, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.065>
- Savadkoochi, S., Bannikova, A., Mantri, N., Kasapis, S., 2016. Structural properties of condensed ovalbumin systems following application of high pressure. **Food Hydrocoll.** 53, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.021>
- Stadelman, W.J., Cotterill, O.J., 1986. Egg science and technology, Third. ed. Macmillan Education, Columbia. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-09142-3>
- Stein, P.E., Leslie, A.G.W., Finch, J.T., Carrell, R.W., 1991. Crystal Structure of Uncleaved Ovalbumin at 1.95 Å Resolution. **J. Mol. Biol.** 221, 941–959.
- Stevens, L., 1991. Egg White Proteins. **Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.** 100, 1–9.
- 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 Hydrocoll.** 48, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.027>
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., Nasirpour, A., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 19, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>
- Timilsena, Y., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J., 2019. Complex coacervation: Principles , mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules.** 121, 1276–1286.

- Yu, S., Yao, P., Jiang, M., Zhang, G., 2006. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. **Biopolymers** 83, 148–158. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Zheng, J., Gao, Q., Tang, C., 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, March 2020, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105415>
- Zhao, Y., Chen, Z., Li, J., Xu, M., Shao, Y., Tu, Y., 2016. Formation mechanism of ovalbumin gel induced by alkali. **Food Hydrocoll.** 61, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.041>

CAPÍTULO II:

**MANUSCRITO: Thermodynamic formation
mechanism and characterization of
ovalbumin/lactoferrin heteroprotein complex
coacervates produced at optimized conditions**

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- OVA–LF coacervates were obtained by mainly electrostatic interactions.
- The optimum coacervation condition was achieved at 2:1 molar ratio and pH 6.0.
- NaCl or urea addition was disadvantageous to the complex coacervation.
- OVA–LF interaction was spontaneous and enthalpically driven regardless mixture order.
- Coacervates with a hydrodynamic average diameter about 620 nm were obtained.

**Thermodynamic formation mechanism and characterization of
ovalbumin/lactoferrin heteroprotein complex coacervates produced at
optimized conditions**

Douglas Fernando Balbino ^a, Bruno Leão Nascimento ^a, Gustavo Leite Milião ^a, Lucas de Souza Soares ^a, Igor José Boggione Santos ^b, Eduardo Basílio de Oliveira ^a, Jane Sélia dos Reis Coimbra ^{a*}

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

^b Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, 36420-000, Ouro Branco, MG, Brazil.

* Corresponding author: jcoimbra@ufv.br

ABSTRACT

Supramolecular structures from proteins have been seen as an alternative to modify/improve products techno-functional properties of their precursors biopolymers. Then, this study aimed to investigate the formation of complex coacervates from ovalbumin and lactoferrin, as a function of molar ratio ($r = \text{OVA:LF} - 1:8$ to $8:1$), pH (3.0 to 10.0), and NaCl (0 to $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) or urea (0 to $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) presence by turbidity and zeta-potential measurements. Results showed that NaCl or urea addition was disadvantageous to coacervation. Furthermore, maximal turbidity and lower |zeta-potential| values were obtained at $r = 2:1$, and pH 6.0. At this condition, spherical complex coacervates presented hydrodynamic average diameter near to 620. ITC and zeta-potential measurements showed that coacervation was mainly drive to electrostatic interactions between the proteins. Regardless of the mixing order, ITC measurements indicated that the sites on protein was saturated when the molar ratio reached $r = 2:1$, corroborating the results observed in the turbidimetric assay. In addition, proteins interaction was spontaneous and enthalpically driven. Lastly, conformational changes in the secondary and tertiary structures of native OVA and LF assessed by circular dichroism and fluorescence spectroscopies suggested intermolecular interactions between these proteins.

Keywords: protein; supramolecular structure; colloidal structures; thermodynamics; spectroscopy.

1. INTRODUCTION

Complex coacervates are supramolecular structures formed by the association of oppositely charged polymers, as proteins and/or polysaccharides, resulting in liquid-liquid phase separation. Generally, a phase consisting of insoluble complexes (coacervates) coexists with a diluted phase, at the end of the equilibrium (Schmitt & Turgeon, 2011; Kayitmazer, 2017). The formation of complex coacervates may involve four steps: (a) preparation of polymers aqueous solutions; (b) mixing of polymers aqueous solutions to promote their interactions; (c) altering extrinsic factors, as pH, salt concentration, and/or temperature, to induce interactions between polymers; and (d) use of high temperatures, desolvating agent or crosslinker in hardening polymeric matrices (Timilsena et al., 2019). In order to understand which parameters may affect the coacervation phenomenon, it is important to know the biopolymers intrinsic factors (composition, molecular weight, structure, flexibility, etc.) along with the aqueous medium extrinsic factors (pH, ionic strength, temperature, presence of denaturing agents, etc.) (Niu et al., 2015; Timilsena et al., 2019). In general, complex coacervates tend to be formed when the net electrical charge of the biopolymers compensates each other, in a medium with low ionic strength; however, the environment conditions for highest complex coacervation depends of biopolymer employed (Croguennec et al., 2017; Timilsena et al., 2019).

Some studies have been reporting complex coacervates formation and their potential technological applications. For instance, Santos et al. (2018a) investigated the effect of molar ratio (OVA:LYS – 1:8 to 8:1), pH (11.0 – 2.0), and NaCl presence (0, 10, 50, 100, and 300 mmol·L⁻¹) on the formation of complex coacervates between ovalbumin (OVA) and lysozyme (LYS). Turbidity, zeta-potential, hydrodynamic average diameter, intermolecular interactions, thermodynamic parameters (N, K, ΔH , ΔS , and ΔG), and morphology were studied. The authors demonstrated that molar ratio, pH, and NaCl addition influenced the formation of complex coacervates. OVA and LYS coacervation was enhanced for smaller NaCl concentration, and optimum pH was observed between the proteins isoelectric point (pI). It is believed that such behaviour occurs since electrostatic interaction is the driving force for the coacervation process. In another study, Diarrasouba et al. (2015) investigated vitamin D3 encapsulation by complex coacervates formed between β -lactoglobulin (β Lg) and lysozyme. Molar ratio (β Lg:LYS – 30:1 to 1:3) and pH (4 – 11) effects were analyzed in the coacervation process. Results demonstrated that vitamin D3 was successfully encapsulated by β Lg:LYS microparticles and therefore they

may display applicability as potential food-grade vehicle for bioactives in the development of food products and pharmaceuticals. Encapsulation and controlled release of bioactive compounds are the most common applications for these structures (Diarrassouba et al., 2015; Chapeau et al., 2016); however, other techno-functional properties, such as the improvement of emulsions/foams kinetic stability, have been associated to the use of coacervates (Moschakis & Biliaderis, 2017).

Although some research teams reported the coacervation from food proteins, no studies addressing the formation of complex coacervates between ovalbumin (OVA) and lactoferrin (LF) have been found. OVA, the largest protein presents in eggs (next to 54% w/w), is a globular protein composed of 385 amino acids that presents a molecular mass of approximately 45 kDa, and isoelectric point (pI) close to pH 4.5 (Iwashita et al., 2017). OVA is frequently used as emulsifying and foaming agents in food products due to its amphiphilic character (Niu et al., 2015). On the other hand, LF is a glycoprotein present in milk, composed of 700 amino acids, with a molecular mass around 80 kDa, and pI value at pH between 8.0 and 9.0 (Bengoechea et al., 2011). LF has wide applicability in the food and pharmaceutical industries due to its benefit in treating various infectious diseases caused by bacteria, fungi, protozoa and viruses, as well as antihypertensive, anticancer and antioxidant activities (García-Montoya et al., 2012).

Complex coacervates from food proteins could play numerous bio and techno-functional activities in formulated products. However, the understanding of the mechanisms that drive their formation becomes necessary and is a challenge for food researchers. In this way, studies should be performed to obtain complex coacervates from different proteins sources, to evaluate the thermodynamic mechanisms that influence the coacervate formation, and to characterize the complex coacervates, in order to stimulate the bio and technological applications of these supramolecular structures. Then, the purposes of this research were: (1) to study the effect of pH, molar ratio, and NaCl or urea concentration on the formation of complex coacervates containing ovalbumin and lactoferrin by turbidity and zeta-potential, (2) to monitor changes in the enthalpy of interaction between these biopolymers by isothermal titration calorimetry (ITC), and (3) to characterize the complex coacervates by dynamic light scattering (DLS), fluorescence intensity (FI), circular dichroism spectroscopy (CD), differential scanning calorimetry (DSC) and optical microscopy. We believe that to study the interactions between OVA and LF could contribute to the development of colloidal supramolecular structures not

commonly reported in the literature, with improved physicochemical properties to be applied in future industrial applications.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

Albumin from chicken egg white or ovalbumin (purity $\geq 98.0\%$; ID product = A5503; Batch number: #SLBQ9036V; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) and lactoferrin (Vivinal Lactoferrin TD – Bioferrin 2000, ID product = 597909; Batch number = 385; Glanbia Nutritionals, California, USA) were used in all experiments. Sodium chloride (NaCl, purity $\geq 99.0\%$, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), urea (purity $\geq 99.5\%$; ID product = GE17-1319-01; Batch number = K39405373; GE Healthcare, Uppsala, Sweden), hydrochloric acid (HCl, Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), and sodium hydroxide (NaOH, purity $\geq 98.0\%$; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) were of analytical grade. All reagents were used without further purification. Deionized water (electrical resistivity $\approx 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$, at $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$; Reference A+, Millipore, USA) was used for all experiments.

2.2 Heteroprotein complex coacervates formation

2.2.1 Sample preparation

Stock solutions of ovalbumin (OVA) or lactoferrin (LF) were prepared at 0.1% (w/w). The proteins were weighed using an analytical balance (Shimadzu, AY 220, Philippines) and the solutions were stirred using a magnetic agitator (BS-2H, Biobase Biodustry, China) until complete protein dissolution (at least 30 min), at $25.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Protein solutions were mixed in seven molar ratios (r) of OVA:LF – 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, and 8:1. Protein solutions had their pH adjusted (914 pHmeter/conductometer, Metrohm, Switzerland) from 3.0 to 10.0 using $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl or NaOH solutions.

2.2.2 Turbidity measurements

Turbidity measurements of the mixtures as a function of pH were determined at 600 nm (Abs_{600}) using a UV-Vis spectrophotometer (Cary[®] 50, Varian, Australia), at $25.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Quartz cuvette of 10 mm (Hellma Analytics, Alemanha) was used. Deionized water was used as blank. Next, absorbance values were expressed as turbidity (Eq. 1). OVA and LF solutions were used as control. The turbidity of complex coacervates formed at optimized conditions of

pH and molar ratio was monitored over 360 min), according to Chapeau et al. (2016). OVA and LF solutions at pH 6.0 had no detectable turbidity.

Another experiment was carried out, in order to evaluate how the ionic strength may influence the coacervation phenomenon. For this experiment, the turbidity of complex coacervates formed in the optimized condition of molar ratio was investigated at different NaCl s (0, 10, 25, 50, 100, and 200 mmol·L⁻¹) and urea (0, 200, 400, and 600 mmol·L⁻¹) concentrations. Complex coacervates formed in the optimized condition without NaCl or urea addition were used as control.

For all turbidity measurements, treatments were repeated at least twice, and the results were presented as an average ± standard deviation.

$$\tau = \frac{2,303 \cdot Abs_{600}}{l} \quad (1)$$

In Eq. (1), τ is the turbidity, and l is the optical path corresponding to the width of the cuvette.

2.2.3 Zeta-potential

Zeta-potential values of isolated proteins and the OVA-LF ratios studied were estimated by particles electrophoretic mobility using a particle analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, United Kingdom), at 25.0 ± 0.1 °C. The systems were added in a cuvette and subjected to a constant electric field. Then, particles velocity was determined to calculate the electrophoretic mobility (Eq. 2). Next, zeta-potential values were calculated by Zetasizer Software considering the Smoluchowski model for the double layer (Eq. 3). Treatments were repeated at least twice, and the results were presented as an average ± standard deviation.

$$\mu_e = \frac{v}{|E|} \quad (2)$$

$$\zeta = \frac{\eta \cdot \mu_e}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (3)$$

In Eq. (2) and (3), μ_e is the electrophoretic mobility, v is the velocity of the particle, E is the applied electric field, η is the viscosity of the solution, ε_0 is the permissivity of the free space, ε_r is the medium dielectric constant, and ζ is the zeta-potential.

2.2.4 Isothermal titration calorimetry (ITC)

Isothermal titration calorimeter (VP-ITC, Microcal, England) was used to monitor changes in the enthalpy of interactions between OVA and LF. OVA or LF was solubilized in deionized water and stirred for 1 h. Next, values of pH solutions were adjusted to 6.0 using HCl or NaOH, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, to avoid experimental errors resulting from pH mismatch (Hosseini et al., 2013), and the solutions were degassed under vacuum for 3 min. Calorimeter's cell was firstly filled with 2 mL of OVA solution ($50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the syringe was completed with 600 μL of LF solution ($500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Secondly, the cell was filled with 2 mL of LF solution ($50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and the syringe was completed with 600 μL of OVA solution ($500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Fifty-six sequential injections of 5 μL each were performed at regular intervals of 300 s, time required for the re-establishment of system thermodynamic equilibrium. The injection time was 10 s. The system was maintained under constant stirring at 307 rpm for complete mixing at $25.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ in all experiments. Control treatment was obtained by titrating the protein solution into the deionized water at pH 6.0, and all results were subtracted from its value. Finally, a curve of corrected peaks was adjusted by using the model of one set of sites (VP Viewer 2000 – Origin 7, Origin Lab. Corp., MA, USA), from which were estimated: (i) the enthalpy change of the interaction ($\Delta_{\text{int}}H_{\text{OVA-LF}}$), by the integration of heat exchange peaks for each injection; (ii) the stoichiometric coefficient ($N_{\text{OVA-LF}}$), by Eq. (4); and (iii) the association constant ($K_{\text{OVA-LF}}$), by Eq. (5).



$$K_{\text{OVA-LF}} = \frac{[\text{OVA-LF}]}{[\text{OVA}][\text{LF}]} \quad (5)$$

In Eq. (4) and (5), $[\text{OVA-LF}]$ is the concentration of the complexes, $[\text{OVA}]$ is the concentration of ovalbumin, and $[\text{LF}]$ is the concentration of lactoferrin.

Gibbs free energy change ($\Delta_{\text{int}}G_{\text{OVA-LF}}$) and entropy change ($\Delta_{\text{int}}S_{\text{OVA-LF}}$) associated with the interaction between proteins were calculated from Eq. (6) and (7), respectively:

$$\Delta_{\text{int}}G_{\text{OVA-LF}} = -RT \cdot \ln K_{\text{OVA-LF}} \quad (6)$$

$$\Delta_{\text{int}}G_{\text{OVA-LF}} = \Delta_{\text{int}}H_{\text{OVA-LF}} - T \cdot \Delta_{\text{int}}S_{\text{OVA-LF}} \quad (7)$$

In Eq. (6) and (7), R is the gas constant ($8.31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), and T is the absolute temperature.

2.3 Heteroprotein complex coacervates characterization

OVA-LF complex coacervates were produced at the optimized condition (molar ratio 2:1, pH 6.0, and without NaCl or urea addition), according to highest turbidity value and |zeta-potential| ≈ 0 mV determined in the sections 2.2.2 and 2.2.3. Then, coacervates in aqueous medium were characterized by dynamic light scattering, intrinsic fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, differential scanning calorimetry, and optical microscopy approaches.

2.3.1 Hydrodynamic average diameter

Hydrodynamic average diameter of OVA-LF complex coacervates was estimated by dynamic light scattering (DLS) using a particle analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, United Kingdom), at 25.0 ± 0.1 °C. Aqueous systems were added in a cuvette and subjected to instrumental analysis. This analysis is based on the principle that small particles in suspension undergo the random thermal motion known as Brownian motion, which is modeled by the Stokes-Einstein equation (Eq. 8). Then, the hydrodynamic average diameter was estimated from the diffusion coefficient determinate by DLS. OVA and LF solutions prepared at pH 6.0 were also studied. Two replicates were performed, and each estimate consisted of an average of at least ten readings per replicate. Additionally, the polydispersity index of particles was calculated according to Eq. (9).

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot d_h} \quad (8)$$

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{d_h}\right)^2 \quad (9)$$

In Eq. (8) and (9), d_h is the particles hydrodynamic average diameter, D is the translational diffusion coefficient, k_B is the Boltzmann's constant, T is the absolute temperature, η is the dynamic viscosity, PDI is the polydispersity index, σ is the standard deviation of the particle diameters.

2.3.2 Intrinsic fluorescence spectroscopy (FI)

Fluorescence emission spectra of OVA-LF complex coacervates were obtained on a fluorescence spectrometer (PC-1 Fluorometer, ISS-K2, USA) coupled to a thermostatic bath adjusted to 25.0 ± 0.1 °C (Polyscience Digital Temperature Controller, Model: 9101, USA), polarizers, monochromator, and a 295 nm filter.

Aqueous systems were placed in a quartz cuvette, with an optical path of 10 mm (Hellma Analytics, Germany), and were excited at a wavelength of 280 nm (maximal absorption by tyrosine and tryptophan), and the emission spectra were recorded between 295 and 450 nm, with a base-time of 1 s and step-size of 1 nm. Excitation and emission slit lengths were set at 2 and 1 nm, respectively. Then, fluorescence intensities were measured and subtracted from the blank (deionized water at pH 6.0) for correct reading. FI spectra of native OVA and LF, prepared at pH 6.0, were also analyzed.

2.3.3 Circular dichroism spectroscopy (DC)

Circular dichroism spectra of OVA-LF complex coacervates was obtained on a spectropolarimeter (J-810 spectropolarimeter, Jasco Corporation, Japan) equipped with a Peltier PFD 425S temperature controller (Jasco Corporation, Japan) coupled to an AWC 100 thermostatic bath adjusted to 25.0 ± 0.1 °C (Julabo, Germany).

The CD spectra were collected under constant nitrogen flow by using a quartz cuvette (Hellma Analytics, Germany) with the optical path of 1 mm (Hellma Analytics, Germany), at a wavelength range between 200 and 260 nm, and data pitch of 1 nm. This spectral region corresponds to the absorption of the peptide bond, resulting in information about proteins secondary structure. Dilutions of 1:2 (protein or complex coacervates:water) were required to not exceed the limit of the equipment voltage. The spectra of the measured samples were subtracted from the blank (deionized water at pH 6.0) for correct reading. All spectra were obtained by average of ten consecutive accumulations. The mean residual ellipticity [θ] ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) was normalized following Eq. (10). The deconvolution of the mean residual ellipticity and the calculation of the secondary structural content was performed by CONTIN program on DICHROWEB web server: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> (Whitmore & Wallace, 2004). Reference Set 7 (optimized for 190–240 nm) and Wavelength Step of 1.0 nm was used. CD spectra of native OVA and LF, prepared at pH 6.0, were also analyzed.

$$[\theta] = 100 \frac{\theta \cdot MM}{n \cdot c \cdot l} \quad (10)$$

In Eq. (10), θ is the CD signal, MM is the molecular mass of the protein, n is the number of amino acid residues, c is the protein concentration, and l is the optical path of the cuvette.

2.3.4 Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal behavior of OVA-LF complex coacervates was studied by differential scanning calorimetry (MicroCal VP-DSC calorimeter, Malvern Instruments, United Kingdom). Ultrapure water ($T_m = 0\text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta H_m = 333\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) and indium standard ($T_m = 156.6\text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta H_m = 28.71\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) were used as standards for equipment calibration. OVA or LF solutions were set at 0.4% (w/w) and stirred for 1 h for in order to assure complete solubilization, at $25 \pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, OVA and LF native solutions were mixed at a molar ratio of 2:1, and then the pH was adjusted at 6.0. Next, aliquots (about 600 μL) of each system were collected, degassed, and injected into the calorimeter. The cell was maintained at $20\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min, and heated from 20 to $110\text{ }^\circ\text{C}$ at a rate of $1\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. OVA and LF solutions 0.4% (w/w) prepared at pH 6.0 were also analyzed. The thermograms were subtracted from the blank (deionized water at pH 6.0) for correct reading. The MN2State model was used to adjust the data. The transition temperature (T_m , or melting temperature), where half the macromolecules are folded and half are unfolded, and the transition enthalpy as measured by thermal denaturation (ΔH_m) were determined using VP Viewer 2000 software - Origin 7 (Origin Lab. Corp., Massachusetts, USA).

2.3.5 Optical microscopy

OVA-LF complex coacervates morphology characteristics were observed using an optical microscope (CX40, Olympus Optical Co., Japan). A volume of 5 μL of the complex dispersion was placed at the microscope slides, and covered with glass coverslips. Then, a drop of immersion oil was put onto microscope slides, and the material was observed at a magnification of x100. No supramolecular structures were detected in the control solutions.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Heteroprotein complex coacervation

Zeta-potential and turbidity measurements were performed in order to evaluate the condition for better formation of heteroprotein complex coacervates between OVA and LF. In this way, zeta-potential and turbidity values of native proteins and different mixing molar ratios, at different pH values, are shown in Figure 1a-d.

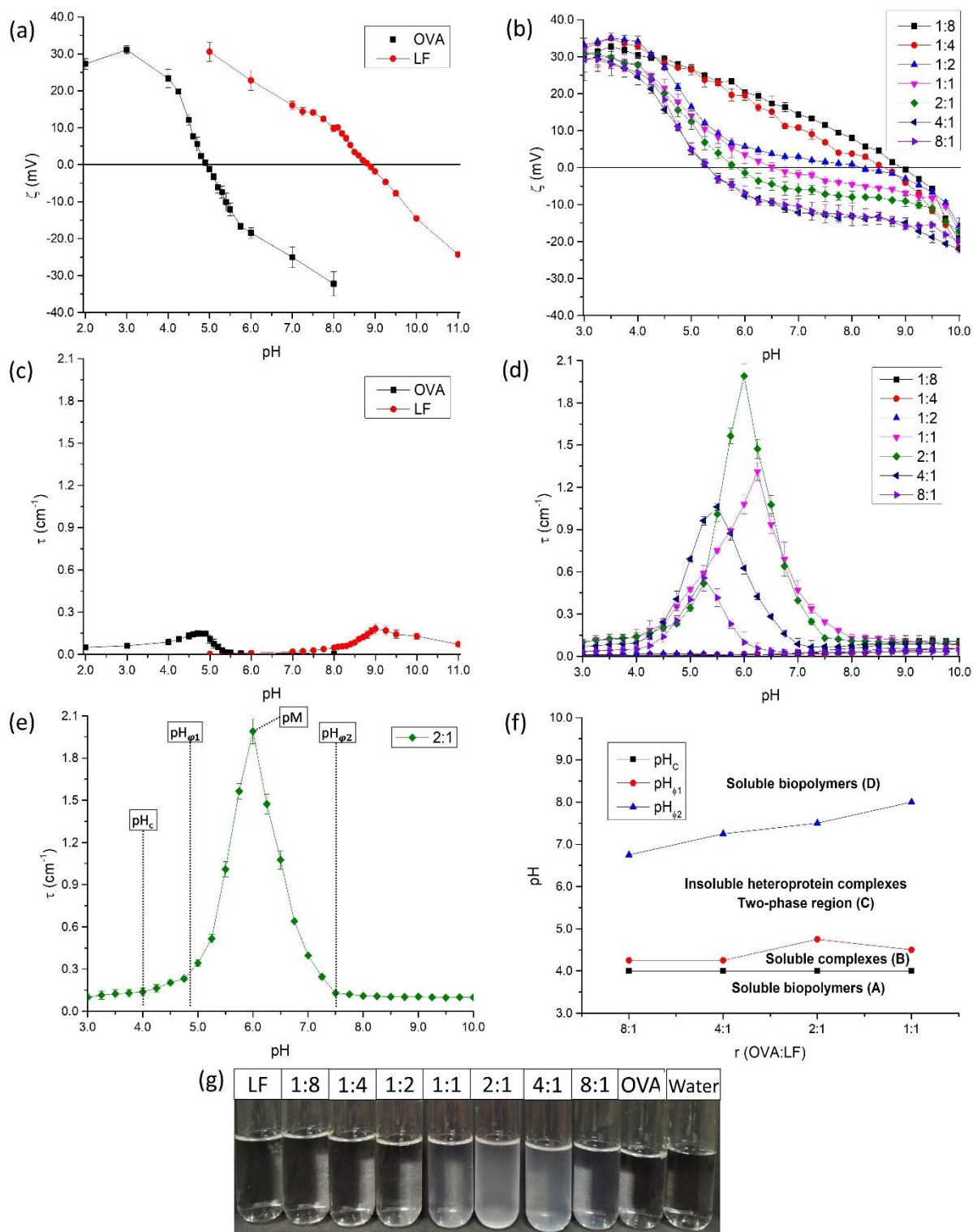


Figure 1 – (a) Native OVA and LF, and (b) OVA–LF mixtures in different molar ratio (OVA:LF) zeta-potential and (c) Native OVA and LF, and (d) OVA–LF mixtures in different molar ratio (OVA:LF) turbidity as a function of the pH; (e) turbidity of coacervation process, at 2:1 molar ratio, with identification of its pH_c , $\text{pH}_{\phi 1}$, and $\text{pH}_{\phi 2}$; (f) phase diagram of complex coacervates in terms of pH_c , $\text{pH}_{\phi 1}$, and $\text{pH}_{\phi 2}$ as a function of the molar ratio; and (g) turbidity variation of different molar ratios, at pH 6.00 without NaCl or urea addition.

Figure 1a exhibits OVA and LF zeta-potential, at different pH values. OVA presented zeta-potential ranging from +30.0 to -30.0 mV for pH from 2.00 to 8.00, and pI near to 4.90, which agrees with the results found by Santos et al. (2018a). On the other hand, LF showed zeta-potential varying from +30.0 to -25.0 mV for pH from 3.00 to 10.00, and pI close to 8.80, in agreement with Gulão et al. (2014). Figure 1c shows the turbidity of OVA or LF solutions, at different pH values. Both OVA and LF solutions showed turbidity lower than 0.200 cm^{-1} for all pH values. Noticeably, a slight increase in turbidity measurements was observed at pH values near to the proteins isoelectric point (pI), reaching maximum value at pH 4.70 (0.149 cm^{-1}) for OVA, and pH 9.00 (0.182 cm^{-1}) for LF. These increments could be explained by the self-aggregation of the proteins through minimal electrostatic repulsion and, consequently, solubility decrease.

The influence of pH and molar ratio on the surface charge density of complex coacervates are shown in Figure 1b. For all molar ratios, zeta-potential ranged between +35.0 to -25.0 mV from pH 3.00 to 10.00. It is possible to observe that the complex coacervates isoelectric point (pN) occurred between the pI values of OVA and LF, when the proteins are oppositely charged, suggesting that electrostatic force is the driving force of this interaction (Santos et al., 2018a). The pN corresponds to the pH value at which the net electrical charge of the complexes in relation to the medium is zero (neutral net charge). The coacervates pN value changed according to the molar ratio: higher pN value was observed for mixtures which contained higher amounts of LF, whereas lower pN value was observed for mixtures with greater amounts of OVA. Thus, the highest pN of the complex coacervates was observed at pH 8.80, for 1:4 and 1:8 molar ratios, and the lowest pN was verified at pH 5.25, for 8:1 molar ratio. Figures 1a and 1c show the similarity in regards to shape between zeta-potential curve of OVA–LF complexes at 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, and 1:2 molar ratios with the OVA curve, and the 1:4 and 1:8 zeta-potential curve with the LF curve. This behavior is possibly connected to the predominance of one protein regarding another in the complexes.

In addition, Figure 1d exhibits the turbidity of OVA–LF mixtures, at different molar ratio and pH values. The systems containing the molar ratios (OVA:LF) 1:2, 1:4, and 1:8 presented lower turbidity values in all pH range. However, a slight increase of their turbidity (maximum of 0.110 cm^{-1}) was observed between pH 7.00 and 10.00, where pH was similar to

pN. This increment could be explained by OVA–LF soluble complexes formation along with LF self-aggregation due to excess in LF (Timilsena et al., 2019).

For the molar ratios 8:1; 4:1, 2:1, and 1:1, it is possible to observe four phases (A–D) during the coacervation process, as a consequence of turbidity variation, that are separated by three critical values of pH (pH_c , pH_{ϕ_1} , and pH_{ϕ_2}): the pH_c corresponds to the beginning of the formation of soluble complexes; the pH_{ϕ_1} represents the beginning of the formation of insoluble complexes (complex coacervates); and the pH_{ϕ_2} represents the start of the complexes dissociation (Santos et al., 2018a; Moschakis and Biliaderis, 2017; Niu et al., 2015). Furthermore, pM is the pH value at which optical density reaches a maximum, i.e., the highest turbidity measurement was observed.

Based on pH_c , pH_{ϕ_1} , and pH_{ϕ_2} derived from Figure 1d, Figure 1e shows the critical pH values for the coacervation process for the molar ratio 2:1, and Figure 1f shows a phase diagram of coacervation process for the molar ratios 8:1; 4:1, 2:1, and 1:1 as a function of pH. The first phase (A), for pH lower than pH_c , contains soluble proteins in aqueous media and occurs at low turbidity measurements. At the 8:1, 4:1, 2:1 and 1:1 molar ratios, the turbidity remained practically constant and negligible, at $pH < pH_c = 4.0$. This result could be associated with the high concentration of net positive electrical charges on the proteins, resulting in electrostatic repulsion between the biopolymers, causing them to remain soluble in the medium. In the second phase (B), when $pH_c < pH < pH_{\phi_1}$, a slight turbidity increase was observed due to the presence of small heteroprotein soluble complexes, since the NaOH addition neutralizes positive charges on the proteins surfaces, resulting in a lower net electrical charge and, consequently, weak electrostatic interactions between the proteins (Liu et al., 2015). Besides, the slight turbidity increase could be also explained by non-electrostatic interaction (hydrogen bonds and hydrophobic interactions) formed between the biopolymers (Santos et al., 2018a). For the 8:1 and 4:1 molar ratios, the discrete turbidity increase occurred between pH 4.00 and 4.25; for the 2:1 molar ratio, between 4.00 and 4.75; and for 1:1 molar ratio, between 4.00 and 4.50.

Additionally, the third phase (C), in which $pH_{\phi_1} < pH < pH_{\phi_2}$, is characterized by the abrupt turbidity increase and phase separation caused by the presence of insoluble OVA-LF complex coacervates formed due to the strong electrostatic attraction between the oppositely charged biomolecules, because in that range, pH between proteins pI, OVA and LF were oppositely charge (Liu et al., 2015). This increase in turbidity values is a result of the

supramolecular structures formation, that are larger than the native proteins and soluble complexes, which in turn coexist with a dilute phase. Besides, maximum turbidity peaks (pM) were detected at 5.25 ($\sim 0.600 \text{ cm}^{-1}$), 5.50 ($\sim 1.100 \text{ cm}^{-1}$), 6.00 ($\sim 2.100 \text{ cm}^{-1}$), and 6.25 ($\sim 1.400 \text{ cm}^{-1}$) pH values for the 8:1, 4:1, 2:1, and 1:1 molar ratios, respectively. Similar results were obtained by Santos et al. (2018a), who observed a region of high turbidity between $\text{pH}_{\phi 1}$ and $\text{pH}_{\phi 2}$, corresponding to the formation of complexes coacervates of ovalbumin and lysozyme for all molar ratios. Finally, the fourth phase (D), in which $\text{pH} > \text{pH}_{\phi 2}$, is characterized by a turbidity decrease due to the complex dissociation (Bastos et al., 2018). Similar to phase (A), the high concentration of net negative electrical charge on the surface promotes electrostatic repulsion between the proteins. For the 8:1, 4:1, 2:1, and 1:1 molar ratios, $\text{pH}_{\phi 2}$ corresponds, respectively, to pH 6.75, 7.25, 7.50, and 8.00. Moreover, we can observe that pH_c and $\text{pH}_{\phi 1}$ was very similar. On the other hand, $\text{pH}_{\phi 2}$ was molar ratio dependent, i.e., the increase in LF concentration caused a shift of $\text{pH}_{\phi 2}$ to a high pH value. This dependence could be explained by the higher pH that is required to promote LF deprotonation.

Figure 2a presents the variation of the pH of maximum turbidity and (pM) isoelectric point of the native proteins (pI) and the complex coacervates (pN) as a function of the molar ratio. Besides, Figure 2b shows turbidity kinetics of complex coacervates produced at molar ratio of 2:1 (OVA:LF) and pH 6.00, maintained for 360 min.

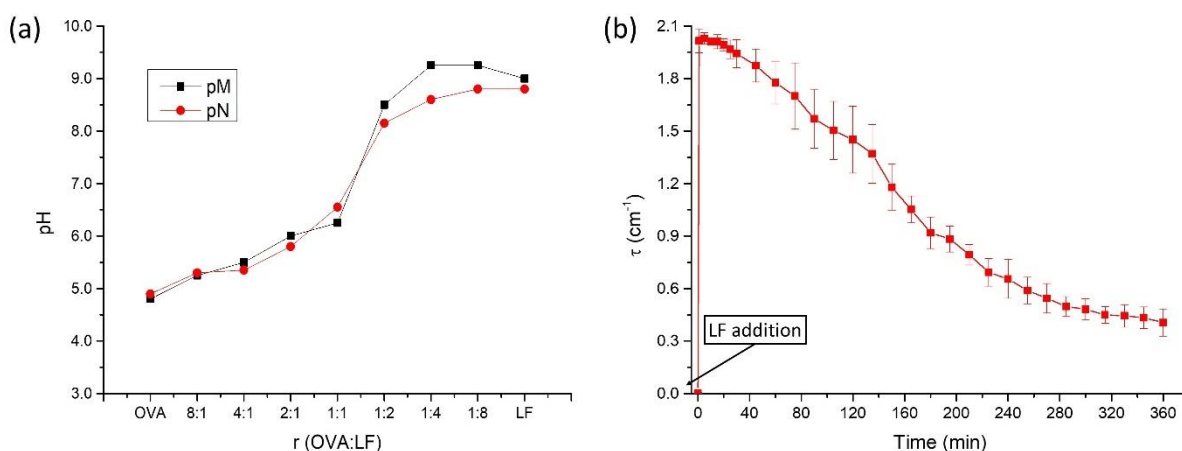


Figure 2 – (a) pM and pN of complex coacervates as a function of the ratio (r); and (b) turbidity kinetics of complex coacervates formed at molar ratio 2:1 and pH 6.00, maintained at 25 °C.

It is possible to observe that the pM value of a system, at a given molar ratio, is close to its pN for all mixtures studied. This behavior could be explained by minimal electrostatic

repulsion between the proteins, resulting in their interaction, and formation of complex larger than the native protein (Figure 2a). Thus, results suggest that the formation of coacervates occurred in systems with higher turbidity values and zeta-potential near to zero.

Figure 2b shows that mixtures turbidity measurements, at the molar ratio 2:1 and pH 6.0, spontaneously increased from 0.005 cm^{-1} to 2.015 cm^{-1} as soon as (about 90 s) LF solution was added into the OVA solution. The mixture remained kinetically stable for approximately 20 min, followed by an almost linear decrease in turbidity until an asymptotic minimum observed up to 300 min. On the other hand, the decrease in turbidity could be explained by the settling of the particles at the bottom of the container, since they have a higher density than the solvent (water), forming two characteristic phases: coacervate phase (rich in colloids) and equilibrium phase (poor in colloids) (Timilsena et al., 2019). Chapeau et al. (2016) obtained similar results to the turbidity kinetics of addition β Lg into the vitamin B9 + LF solution at molar ratio (vitamin B9: total protein) of 2:11. According to the authors, the β Lg addition promotes sudden and high increase of turbidity (from about 0.000 cm^{-1} to approximately 3.250 cm^{-1}) that corresponds to the coacervates formation in the solution followed by a gradual decrease towards a minimum asymptotic value.

The optimal condition of coacervation between OVA and LF was achieved at 2:1 molar ratio and pH 6.0, since it exhibited the highest turbidity values and zeta-potential near to zero. Thus, the effect of NaCl or urea addition as a function of pH was investigated in mixtures formed at a molar ratio of 2:1. To know the best coacervation condition is economically important as it ensures that the biopolymers interacted with each other, and for further studies on structural, morphological, and thermal characterization of complex coacervates, and its technical and biofunctional applicability (Timilsena et al., 2019).

3.2 Effect of the destabilizing agents addition on the complex coacervates formation

The effect of NaCl or urea addition on OVA-LF complex coacervates formation at 2:1 ratio as a function of the pH was studied using a turbidimetric approach (Figure 3).

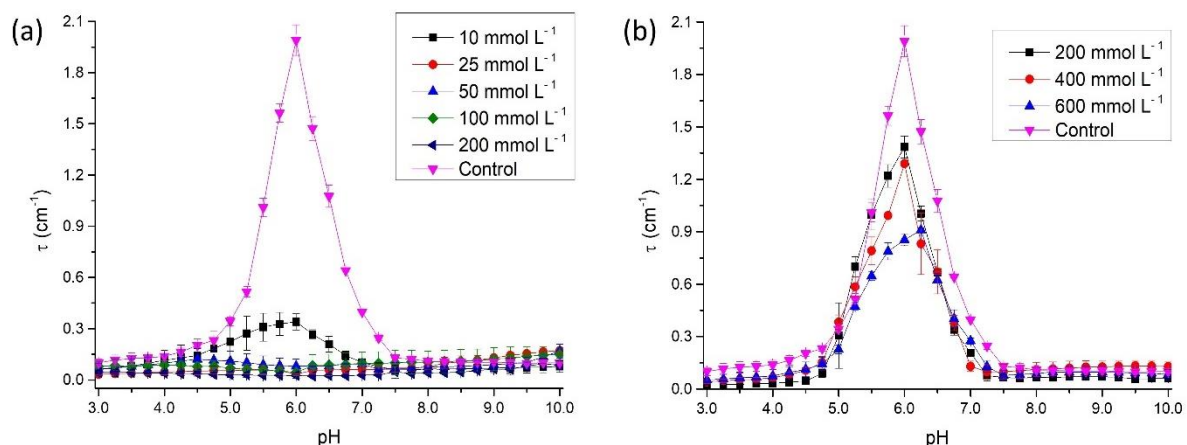


Figure 3 – Turbidity of mixtures containing complex coacervates at 2:1 molar ratio as a pH function, at different concentrations of (a) NaCl or (b) urea.

In Figure 3a, maximum turbidity peaks (pM) were observed at pH 6.00 in the control and in the mixtures containing NaCl at 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration. However, the mixtures at 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl presented a reduction of the turbidity from about 2.100 cm^{-1} to approximately 0.4 cm^{-1} . Values of pH_c (from 4.00 to 3.75), pH_{ϕ_1} (from 4.75 to 4.50) and pH_{ϕ_2} (from 7.50 to 7.25) of 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl mixtures were decreased by 0.25 when compared to control. On the other hand, as NaCl concentration increased from 25 to 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ no substantial turbidity was observed in the systems. In this way, pH_c , pH_{ϕ_1} , and pH_{ϕ_2} were not observed. These results showed that NaCl addition was disadvantageous to complex coacervation which can be explained by the shielding effect of the salt on charged proteins. When the ions bind to the charged patches present on the proteins, the electrostatic attraction (the main driving force of the coacervation) is inhibited, hindering the formation of the supramolecular structures of larger sizes (Liu et al., 2015). Our results were similar to those presented by Santos et al. (2018a), Santos et al. (2018b), and Anema & Kruif (2014). Such papers studied the effect of NaCl addition on complex coacervates formation and observed that the addition of salt reduced systems turbidity,

In Figure 3b, pM was observed at pH 6.00 in the control and in the mixtures containing urea at 200 and 400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentrations. For the mixture containing urea at 600 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration, pM was observed at pH 6.25. The addition of urea reduced the maximal turbidity of mixtures with 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\sim 1.400\text{ cm}^{-1}$), 400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\sim 1.300\text{ cm}^{-1}$), and 600 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\sim 0.900\text{ cm}^{-1}$) in regard to the control ($\sim 2.100\text{ cm}^{-1}$). Values of pH_c and pH_{ϕ_1} were the same for all mixtures added with urea. However, pH_{ϕ_2} for mixtures containing urea at 200 and 400

mmol·L⁻¹ concentrations decreased its value by 0.25. Therefore, results demonstrated that urea addition was also disadvantageous to complex coacervation. This may be related to urea being a denaturing agent, disrupting hydrogen bonds and hydrophobic interactions that stabilize the complex formed. Besides, it modifies the aqueous phase making it more apolar, increasing the solubility of hydrophobic groups that were hidden in the hydrophobic pocket of the structures (Liu et al., 2010; Liu et al., 2015).

It is possible to observe that either NaCl or urea addition hindered the formation of OVA and LF coacervates. In addition, although hydrogen bonds and hydrophobic interactions may also play some important role in coacervation phenomenon, electrostatic interactions were the main forces acting on complex coacervates formation. Finally, the coacervation optimized condition of OVA and LF was obtained at 2:1 molar ratio, pH 6.00, and without NaCl or urea addition.

3.3 Thermodynamic characterization of OVA-LF interaction

Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to investigate the interaction between OVA and LF. Results of two ITC approaches were presented in Figure 4: in the first case (Figure 4a), LF was titrated into OVA; and in the second (Figure 4b), OVA was titrated into LF.

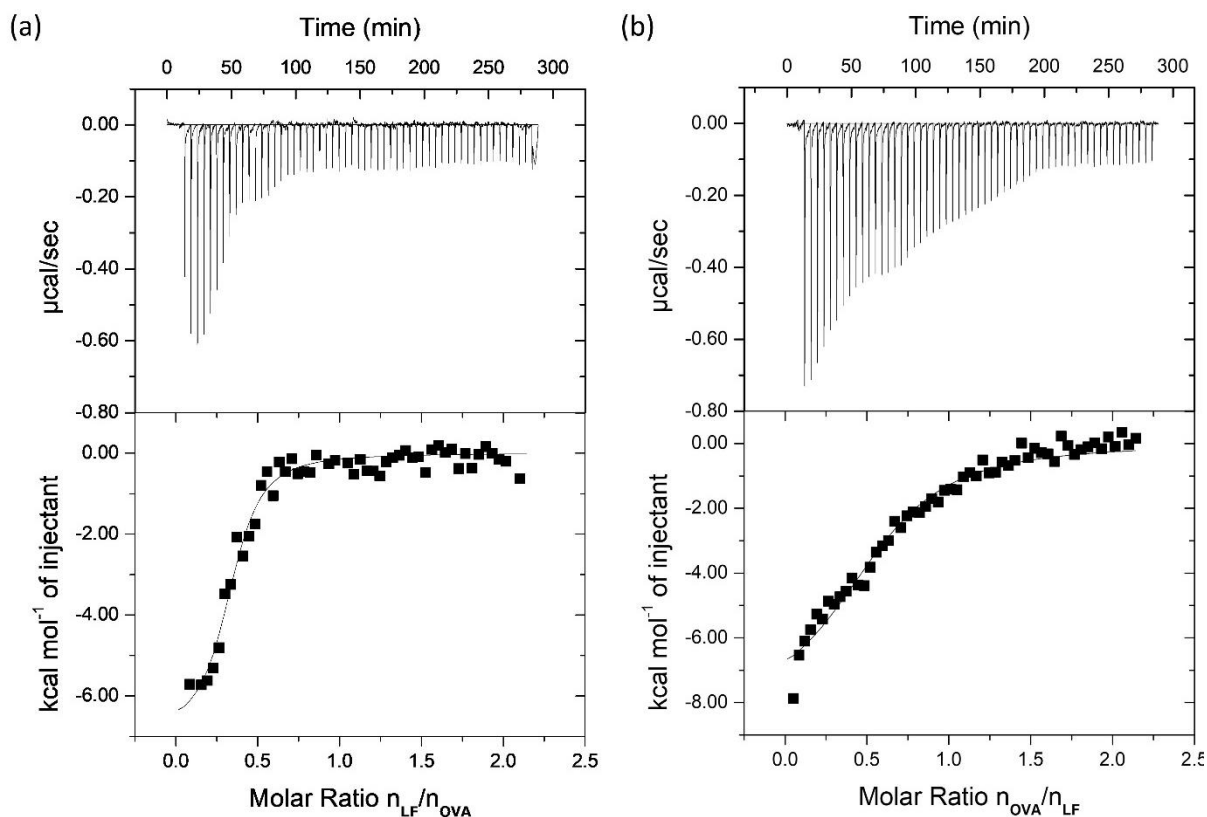


Figure 4 - ITC thermogram and interaction isotherm for titration of (a) LF into OVA and (b) OVA into LF, both at pH 6.00 and $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In Figure 4, the displayed peaks in the upper panels were obtained from the amount of energy, released or absorbed, necessary to maintain $\Delta T = 0$ as a function of the time. The $\Delta_{\text{Int}}H$ values presented in the bottom panels were reached by the integration of the peaks and represent the enthalpy change after proteins interaction. One set of Sites Model was adjusted to the experimental curves. The enthalpy change is dependent on four main factors: (i) association/dissociation of ions and charged protein groups ($\Delta_{\text{Int}}H_i$); (ii) interaction between the proteins ($\Delta_{\text{Int}}H_{\text{OVA-LF}}$); (iii) changes in protein solvation ($\Delta_{\text{Int}}H_{\text{Sol.}}$); and (iv) conformational rearrangement of protein structure ($\Delta_{\text{Int}}H_{\text{Rear.}}$) (Monteiro et al., 2016). The 1st factor suggests that an exothermic process may happen, while the 3rd and 4th indicate the occurrence of endothermic processes. The 2nd factor, in turn, can be both endothermic, due to the proteins desolvation, and/or exothermic, due to electrostatic interactions.

Regardless the order of mixture (OVA into LF or vice versa), the titration behavior of was exothermic for all injections. However, when titrating LF into OVA, the peaks decreased in intensity until reaching constant signals after the 17th injection (Figure 4a) and the heat

release decreased from 6 kcal mol⁻¹ and reached a plateau at molar ratio (OVA:LF) of approximately 2:1. On the other hand, when titrating OVA into LF, constant signals were obtained after the 37th injection, and the heat release decreased from 8 kcal·mol⁻¹ until reached a plateau also at 2:1 molar ratio (OVA:LF). In this last setting, the peaks decreased in intensity more slowly than in the previous one. For both experiments, the enthalpy peaks intensity decreased as the number of binding sites which did not participate in the interaction increased (Kayitmazer, 2017). Endothermic processes, such as $\Delta_{\text{Int}}H_{\text{Sol.}}$, and $\Delta_{\text{Int}}H_{\text{Rear.}}$, may also have contributed to the reduction of peaks intensity. Furthermore, constant signals (after the 17th for LF in OVA and 37th injections for OVA in LF titration) represented the protein dilution heat since all available OVA sites were saturated.

Table 1 summarizes the thermodynamic parameters of interaction of OVA and LF, at 25 °C and pH 6.00.

Table 1 - Thermodynamic parameters of the OVA and LF interaction, at 25 °C and pH 6.00.

	LF into OVA	OVA into LF
Model fitting:	One set of Sites	One set of Sites
Chi²/DoF	8.320·10 ⁴	1.084·10 ⁵
T (K)	298.15	298.15
N	0.342	0.584
K (M⁻¹)	6.66·10 ⁵	1.40·10 ⁵
ΔH (kcal·mol⁻¹)	-6.923	-8.31
ΔS (kcal·mol⁻¹·K⁻¹)	0.00343	-0.00432
TΔS (kcal·mol⁻¹)	1.022	-1.29
ΔG (kcal·mol⁻¹)	-7.95	-7.02

In the first experiment, the stoichiometric coefficient (N) obtained was 0.342 and ΔG value was negative (-7.95 kcal·mol⁻¹), being that the ΔH (-6.92 kcal·mol⁻¹) contribution was higher than T·ΔS (1,02 kcal·mol⁻¹). These results indicated that OVA–LF interaction was spontaneous and enthalpically driven, suggesting that electrostatic interactions were most important to complex coacervates formation (Kayitmazer, 2017), and entropically favored. For the second experiment, N was 0.584, and ΔG value was negative (-7.02 kcal·mol⁻¹). In addition, ΔH (-8.31 kcal·mol⁻¹) contribution was higher than T·ΔS (-1,30 kcal·mol⁻¹). These results indicated that OVA–LF interaction was spontaneous and enthalpically driven and entropically

disfavored. Finally, high binding constant values in the order of $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$) suggest a strong interaction between proteins (Ferstl et al., 2013).

In general, OVA and LF interaction was enthalpically driven and spontaneous, due mainly to electrostatic interactions that occurred between the oppositely charged proteins. Moreover, these observations were independent of the order of mixing. Saturation of protein interaction sites in both experiments was achieved at 2:1 (OVA:LF) molar ratio in agreement with turbidity and zeta-potential results. Thus, optimized condition for OVA-LF coacervation process was set as $r = 2:1$ and pH 6.00.

3.4 Hydrodynamic average diameter

The diameter distribution and hydrodynamic average diameter of proteins and complex coacervates were measured by DLS, and the results were presented in Figure 5. For this experiment, complex coacervates were formed at $r = 2:1$ ratio, pH 6.00, and without NaCl or urea addition.

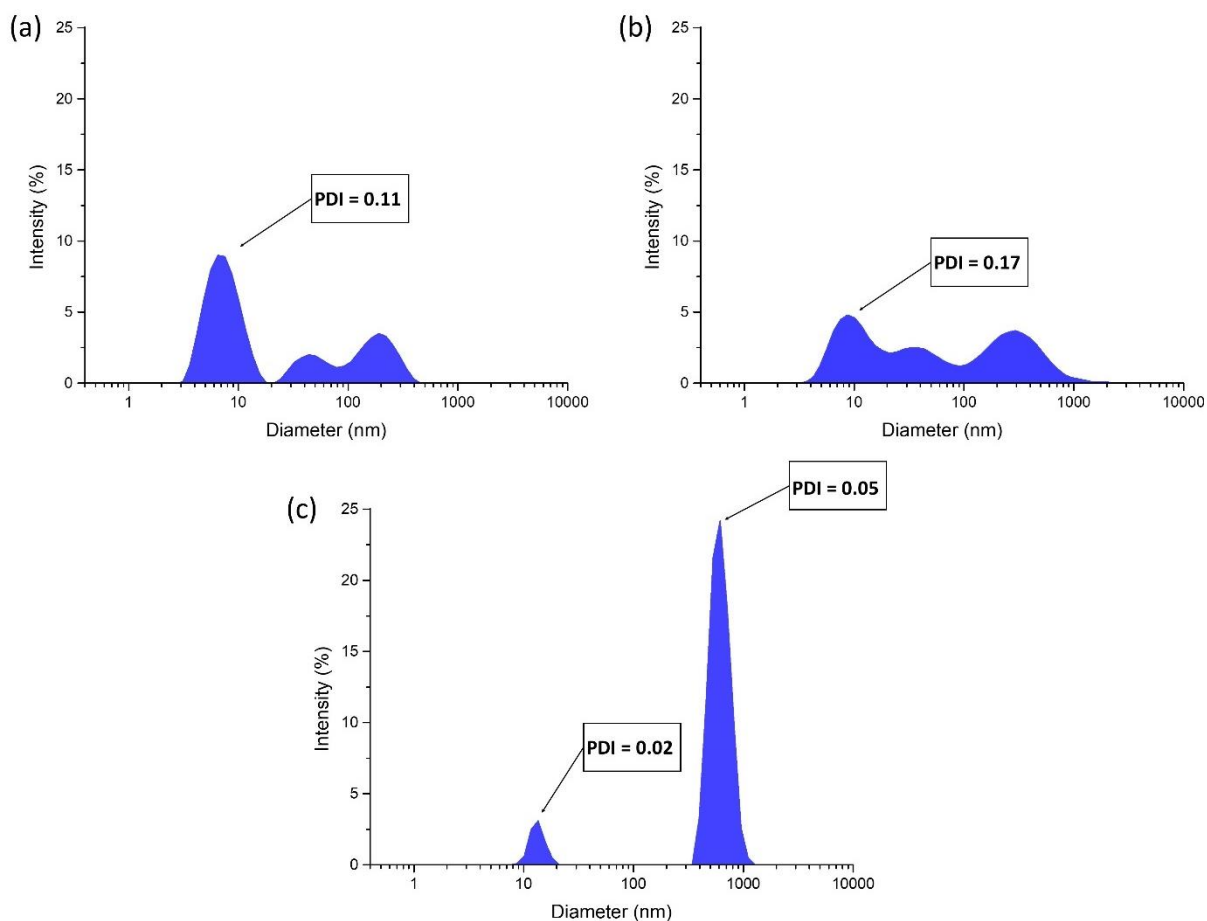


Figure 5 - Hydrodynamic diameter distribution for (a) OVA, (b) LF and (c) complex coacervates formed at $r = 2:1$, pH 6.00 and without NaCl or urea addition.

In Figure 5a, OVA presented three diameter peaks with average diameters and intensities of: (i) 7.5 nm and 67.9%; (ii) 48.5 nm and 14.9%; (iii) 188.4 nm and 17.2%. Likewise, in Fig 5b, three distinct peaks were presented for LF with average diameters and intensities of: (i) 10.7 nm and 37.4%; (ii) 44.3 nm and 22.8%; (iii) 334.3 nm and 39.8%. In both solutions, peaks with the highest diameters could be attributed to the existence of protein aggregates (Liu et al., 2015). Thus, OVA average diameter was 7.5 nm ($PDI < 0.1$), and LF average diameter was 10.7 ($PDI < 0.2$), which are in agreement with the literature (Sponton et al., 2017; Saraiva et al., 2017). The highest intensity (91.7%) in Figure 5c, presenting an average diameter next to 621.3 nm ($PDI < 0.05$), was attributed to OVA–LF complex coacervates formed. The lowest peak (8.3%) in Figure 5c, with an average diameter of 13.41 nm ($PDI < 0.02$), was attributed to non-complexed proteins. Observations about Figure 5c suggest that the condition employed was favorable to the OVA–LF electrostatic interaction, and consequently

complex coacervates formation, producing structures larger than the isolated proteins, as also observed in other coacervation studies (Diarrassouba et al., 2015, Liu et al., 2015, and Santos et al., 2018b).

3.5 Complex coacervates thermal stability

The thermal behavior of OVA, LF, and OVA–LF complex coacervates (CC) produced at $r = 2:1$ molar ratio, pH 6.00, and without NaCl or urea addition was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). The thermograms were presented in Figure 6.

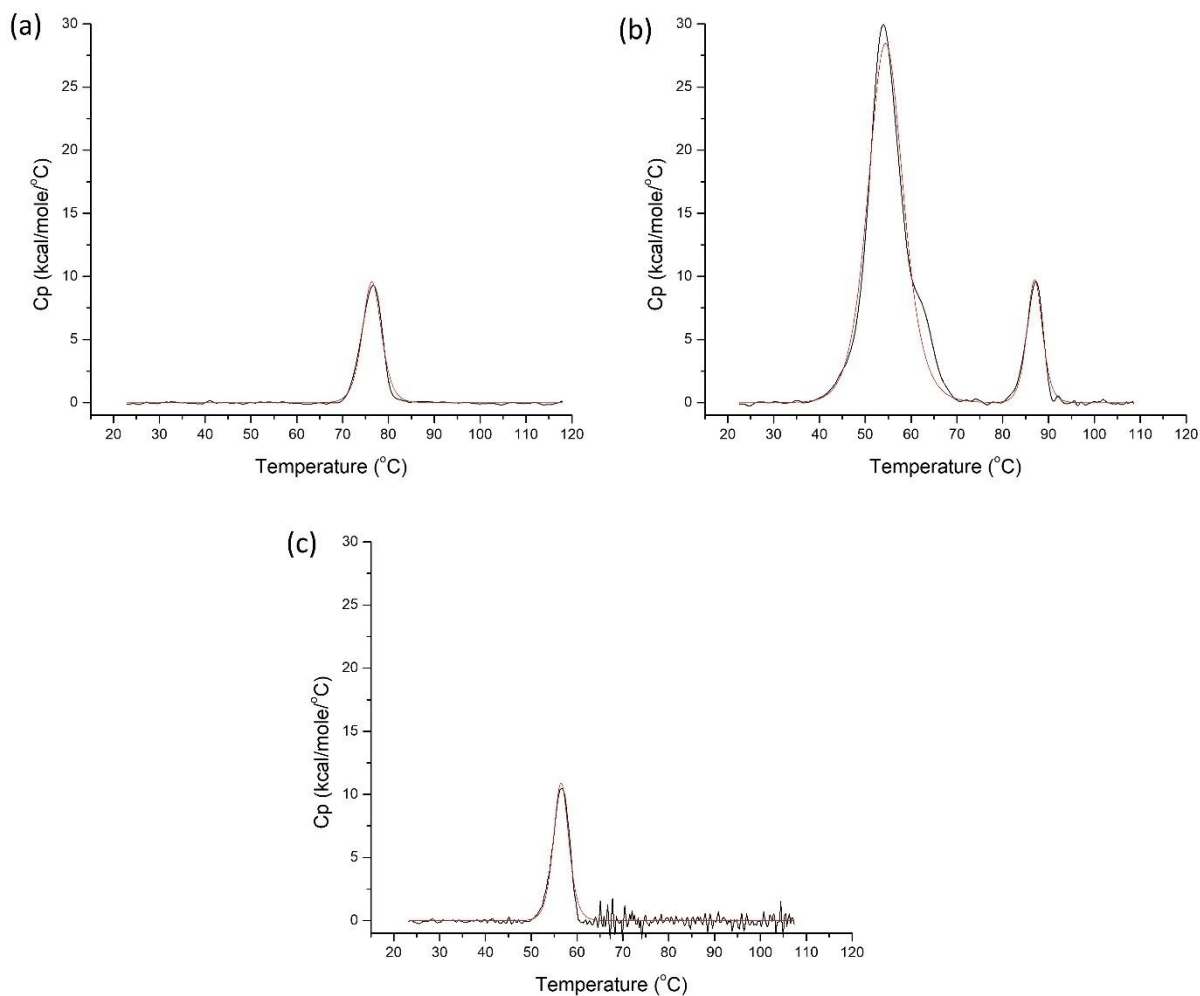


Figure 6 - DSC thermogram for (a) OVA, (b) LF and (c) complex coacervates formed at $r = 2:1$ ratio, pH 6.00 and without NaCl or urea addition.

Table 2 shows the transition temperature and the transition enthalpy as measured by thermal denaturation for each thermogram peak of OVA, LF, or complex coacervate.

Table 1 – Transition temperature (T_m) and the transition enthalpy (ΔH_m) of the native proteins and complex coacervate formed at 2:1 molar, pH 6.00, and without NaCl or urea addition.

		OVA	LF	CC
Model fitting:		MN2State	MN2State	MN2State
Chi²/DoF		$2.815 \cdot 10^4$	$7.903 \cdot 10^5$	$1.617 \cdot 10^5$
Pico 1	T₁ (°C)	76.4	54.5	56.5
	ΔH_1 (kcal·mol⁻¹)	$5.27 \cdot 10^4$	$2.89 \cdot 10^5$	$4.83 \cdot 10^4$
Pico 2	T₂ (°C)	-	87.0	-
	ΔH_2 (kcal·mol⁻¹)	-	$4.39 \cdot 10^4$	-

Noticeably, for OVA thermogram (Figure 6a), the occurrence of one endothermic peak ($T_{OVA} = 76.4$ °C and $\Delta H_{OVA} = 5.27 \cdot 10^4$ kcal·mol⁻¹) was observed. The denaturation temperature found for OVA is next to that reported by Niu et al. (2018) (around 72.0 °C). On the other hand, for LF (Figure 6b), two distinct endothermic peaks were observed ($T_{LF1} = 54.5$ °C and $\Delta H_{LF1} = 2.89 \cdot 10^5$ kcal·mol⁻¹; and $T_{LF2} = 87.0$ °C and $\Delta H_{LF2} = 4.39 \cdot 10^4$ kcal·mol⁻¹). According to Paulsson et al. (1993), the two endothermic peaks may be related to the denaturation of the apo and holo forms of LF, since the authors demonstrated that the second peak transition enthalpy increased with increasing iron content. For complex coacervate thermogram (Figure 6c), only one peak was observed ($T_{CC} = 56.5$ °C, and $\Delta H_{CC} = 4.83 \cdot 10^4$ kcal·mol⁻¹). This temperature (T_{CC}) is close to the denaturation temperature of the lower heat stable lobe of the LF (T_{LF1}). Thus, two hypotheses could be assumed: (i) complex coacervates were formed and they presented greater thermal stability ($T_{CC} = 56.5$ °C) than the lower stable LF lobe ($T_{LF1} = 54.5$ °C); and (ii) OVA molecules were involved in thermally stable complexes with preferentially holo LF, which could have caused the disappearance of the second peak, leaving some apo LF free in the dilute phase.

3.6 Structure and morphological characterization

Possible structural changes in OVA and LF structures after their interaction were investigated by circular dichroism and intrinsic fluorescence spectroscopies. As it can be seen, Figure 7a and 7b present circular dichroism and fluorescence spectra, respectively, of OVA, LF and complex coacervates formed at $r = 2:1$ and 25 °C. Furthermore, morphological characterization of the OVA–LF complex coacervates was performed by optical microscopic

analysis, and results were presented in Figure 8. This analysis can be used to obtain a better understanding of the complex coacervates structure.

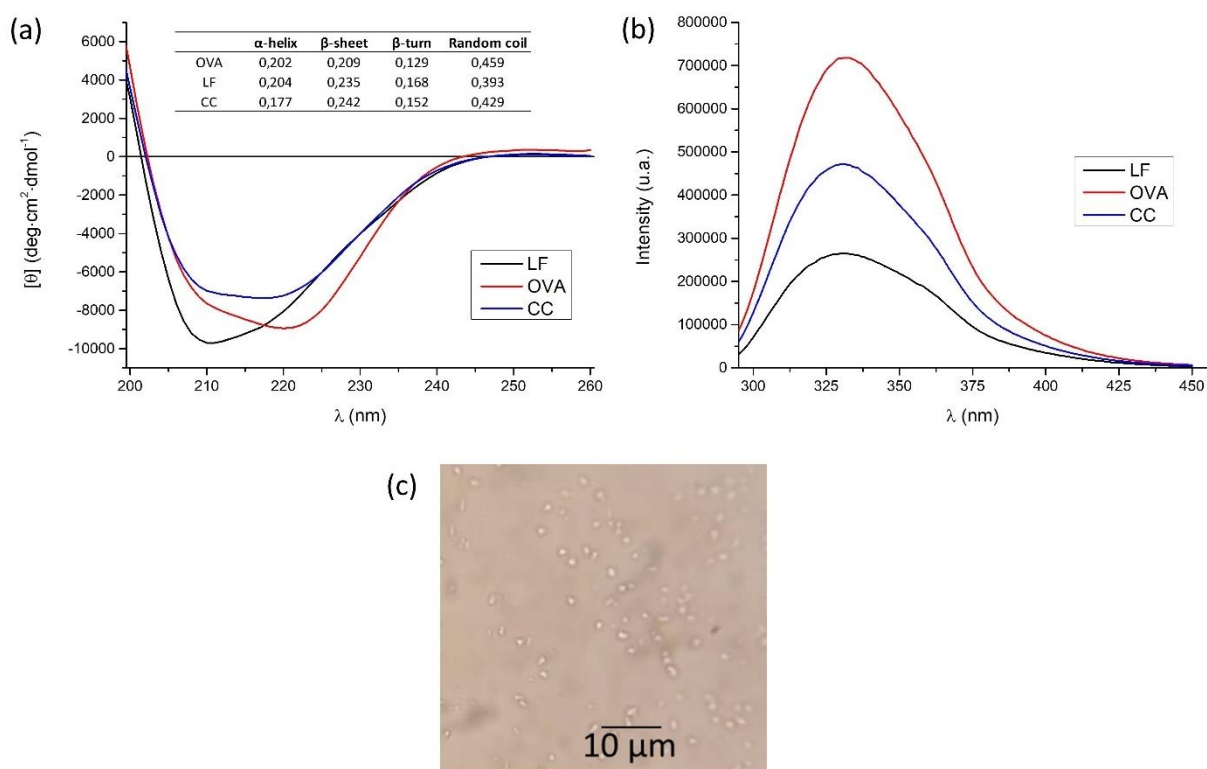


Figure 7 - (a) Circular dichroism and (b) fluorescence spectra of OVA, LF, and complex coacervates produced at $r = 2:1$, pH 6.00, and without NaCl or urea addition. (c) Optical photomicrographs of complex coacervates formed at ratio $r = 2:1$, pH 6.00, and without addition of NaCl or urea.

Circular dichroism is a well-known technique used to mostly analyze modifications in the secondary structure of proteins. In this way, the fractions of α -helix, β -sheet, β -turn, and random coil structure for OVA, LF, and OVA-LF complex coacervates were determined (as mentioned in section 2.2.3) and are showed in Figure 7a. Peaks in the CD spectra at 205-210 nm and 220-223 nm are characteristic of polypeptide chains existing in α -helix conformation, whereas peaks at 210-218 nm are attributed to β -sheet conformation (Li et al., 2017; Wei et al., 2018). In the OVA spectrum, two characteristic peaks with negative bands were shown at 208 and 222 nm, indicating the predominance of α -helix structures (Geng et al., 2014). However, upon deconvolution of the mean residual ellipticity, α -helix and β -sheets were noticed to be present in the same proportion, approximately 0.200 (Figure 7a). For LF, a characteristic peak with a negative band at 208 nm was observed, which presupposes α -helix predominance (Xu et

al., 2019). However, after the deconvolution, it was possible to determine the slight predominance of β -sheet structures (approximately 0.230). Regarding the OVA-LF complex coacervates, the decrease in the magnitude of the mean residual ellipticity in the negative bands 208 and 222 nm, concerning the precursor proteins, indicates a reduction of α -helix structure. Besides, the existence of a peak at approximately 218 nm, suggests a transition of α -helix structures to β -sheets, as observed after complex data deconvolution.

On the other hand, intrinsic fluorescence is commonly applied to check changes on the tertiary structure of such biomolecules (Monteiro et al., 2016). The intensity fluorescence emission from proteins excited at 280 nm is mainly due to their residues of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) (Li et al., 2017). As can be observed in Figure 7b, maximum intensity peak (λ_{MAX}) in the three systems (Figure 7b) was close to 330 nm, which indicates that the fluorophores are buried inside the proteins. Moreover, the attenuation of OVA fluorescence intensity after LF addition also suggests the interaction between them.

The spherical shape can be observed for the structures, presenting diameters < 1000 nm (Figure 7c). Complex coacervates are structures that can be used in encapsulation and controlled release of bioactive compounds (Diarrassouba et al., 2015). This spherical shape can directly influence the encapsulation and controlled release of bioactive compounds (Shaddel et al., 2017).

4. CONCLUSIONS

This study revealed that complex coacervates could be formed from ovalbumin and lactoferrin. Factors like pH, molar ratio, and NaCl or urea presence/absence influenced in the coacervation process. Complex coacervates optimal condition was found to be at 2:1 (OVA:LF) molar ratio and pH 6.00. Moreover, NaCl or urea addition was unfavorable to the complex coacervates formation. ITC measurements showed that OVA-LF interaction was spontaneous and enthalpically driven, indicating that electrostatic interaction was predominant, which agreed with the results observed in the DLS experiments. Spherical coacervate structures with hydrodynamic average diameter of approximately 620 nm were observed. Changes in circular dichroism and intrinsic fluorescence spectra suggested conformational modifications in the structures of both proteins upon coacervation process. In the DSC thermograms of coacervates, it was observed one transition temperature ($T_{CC} = 56.5$ °C). Therefore, this study highlighted

the OVA-LF interactions under different conditions, enabling the formation of complex coacervates that can be used in industrial applications.

Acknowledgment

The authors are thankful to the Brazilian research agencies CAPES, CNPq, and FAPEMIG, for their financial support; Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), for allowing us to use some facilities in the Laboratório Nacional de Biociências (LNBio); Professor Nilda de Fátima Ferreira Soares and *D. Sc.* Eber A. A. Medeiros, for allowing us to use some facilities in the Laboratório de Embalagens (LABEM – UFV); *D. Sc.* Fernanda Aparecida Heleno Batista and *D. Sc.* Ana Carolina Migliorini Figueira, for their support in ITC, DSC, and spectroscopies analysis;

5. REFERENCES

- Anema, S. G., & Kruif, C. G. K. De. (2014). Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 430(1), 214–220.
- Bastos, L., Wanderlei, C., Carvalho, P. De, & Garcia-rojas, E. E. (2018). Formation and characterization of the complex coacervates obtained between lactoferrin and sodium alginate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(1), 332–338.
- Bengoechea, C., Peinado, I., & McClements, D. J. (2011). Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1354–1360.
- 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(1), 280–290.
- Croguennec, T., Tavares, G. M., & Bouhallab, S. (2017). Heteroprotein complex coacervation : A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239(1), 115–126.
- 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(1), 203–209.
- Ferstl, M., Drechsler, M., Rachel, R., Rischer, M., Urgan, J., Backofen, M., & Goepferich, A. (2013). The Impact of Polyelectrolyte Structure on the Shape of Nanoassemblies with Cationic Peptides. *Journal do Pharmaceutical Science*, 102(8), 2599–2607.
- García-montoya, I. A., Cendón, T. S., Arévalo-gallegos, S., & Rascón-cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(3), 226–236.
- Geng, X., Cui, B., Li, Y., Jin, W., An, Y., & Zhou, B. (2014). Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation. *Food Hydrocolloids*, 37(1), 86–92.
- Gulão, E. S., Souza, C. J. F., Silva, F. A. S., Coimbra, J. S. R., & Garcia-Rojas, E. E. (2014). Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum arabic: Formation and characterization. *Food Research International*, 65(1), 367-374
- Hosseini, S. M. H., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S. H., Moosavi-Movahedi, A. A., Saboury, A. A., Mohammadifar, M. A., Farahnaky, A., Atri, M. S. & Van der Meeren, P. (2013). Complex coacervation of β -lactoglobulin– κ -Carrageenan aqueous mixtures as affected by

- polysaccharide sonication. *Food chemistry*, 141(1), 215-222.
- Iwashita, K., Handa, A., & Shiraki, K. (2017). Co-aggregation of ovalbumin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 67(1), 206–215.
- Kayitmazer, A. B. (2017). Thermodynamics of complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239(1), 169–177.
- Li, Z., Wang, Y., Pei, Y., Xiong, W., Xu, W., & Li, B. (2017). Effect of substitution degree on carboxymethylcellulose interaction with lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 62(1), 222–229.
- Liu, J., Young, Y., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2015). Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole fl axseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Hydrocolloids*, 49(1), 95–103.
- Liu, S., Cao, Y.-L., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Intermolecular Interactions during Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 552–556.
- Monteiro, A. A., Monteiro, M. R., Pereira, R. N., Diniz, R., Costa, A. C., Malcata, F. X., Teixeira, J. A., Teixeira, A. V., Oliveira, E. B., Coimbra, J. S., Vicente, A. A., Óscar, L. R. Design of bio-based supramolecular structures through self-assembly of α -lactalbumin and lysozyme. *Food hydrocolloids*, v. 58, p. 60-74, 2016.
- Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Biopolymer-based coacervates: Structures , functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28(1), 96–109.
- Niu, F., Dong, Y., Shen, F., Wang, J., Liu, Y., & Su, Y. (2015). Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin e gum arabic complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 43(1), 1–7.
- Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Feng, Z., & Su, Y. (2018). Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. *Food Chemistry*, 260(1), 1–6.
- Paulsson, M.A., Svensson, U., Kishore, A.R., Naidu, A.S. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *Journal of Dairy Science*, 76 (1993), pp. 3711-3720
- Santos, M. B., Ribeiro, A., & Garcia-rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex coacervates of ovalbumin and lysozyme : Formation and thermodynamic characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106(1), 1323–1329.

- Santos, M. B., Wanderlei, C., Carvalho, P. De, & Garcia-rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 74(1) 267–274.
- Saraiva, C., Coimbra, J., Vianna, A., Carvalho, N. De, Basílio, E., Oliveira, D., ... Barbosa, A. (2017). Formation and characterization of supramolecular structures of β -lactoglobulin and lactoferrin proteins. *Food Research International*, 100(1), 674–681.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein / polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1), 63–70.
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-achachlouei, B., & Huang, Q. (2017). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(1), 1800-1810.
- Sponton, O. E., Perez, A., Ramel, J. V., & Santiago, L. G. (2017). Protein nanovehicles produced from egg white . Part 1 : Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocolloids Journal*, 73(1), 67–73.
- Timilsena, Y., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles , mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121(1), 1276–1286.
- Wei, J., Zeng, X., Tang, T., Jiang, Z., & Liu, Y. (2018). Unfolding and nanotube formation of ovalbumin induced by pulsed electric field. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45(1), 249–254.
- Whitmore, L., Wallace, B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32 (2004), pp. W668-W673.
- Xu, K., Zhao, Z., Guo, M., & Du, J. (2019). Conjugation between okra polysaccharide and lactoferrin and its inhibition effect on thermal aggregation of lactoferrin at neutral pH. *LWT - Food Science and Technology*, 107(1), 125–131.

CAPÍTULO III:

Caracterização e estabilidade de nanoestruturas de ovalbumina e lactoferrina formadas em condições otimizadas pela técnica de gelificação térmica

RESUMO

Nanoestruturas proteicas são estruturas supramoleculares de até 300 nm de tamanho em ao menos uma dimensão que são formadas com o propósito de oferecer novas funcionalidades às proteínas precursoras. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em um delineamento composto central rotacional, o efeito do pH (4,5 a 9,5), temperatura (70 a 90 °C) e tempo de aquecimento (10 a 40 min), na formação de nanoestruturas de ovalbumina (OVA) e lactoferrina (LF), na razão molar (OVA:LF) de 2:1, pela técnica de gelificação térmica. Análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e espectroscopia de fluorescência (FI) foram realizadas para caracterizar as nanoestruturas. Os resultados mostraram que formação e a conformação estrutural das nanoestruturas foram dependentes das condições físico-químicas aplicadas. Em pH 5,5, complexos coacervados heteroproteicos de diâmetro hidrodinâmico médio (d_h) de aproximadamente 900 nm foram formados. Em pH 7,0 e 8,5, nanoestruturas de $d_h < 300$ nm e PDI $< 0,2$ foram produzidas. Em geral, o aumento do tratamento térmico levou à formação de estruturas de menor d_h . As nanoestruturas de menor d_h (~ 130 nm) foram obtidas em pH 8,5, e tratamento térmico de 86 °C por 34 min. Análises de CD e FI mostraram mudanças nas estruturas secundária e terciária das nanoestruturas em relação às proteínas nativas. Por fim, as nanoestruturas foram estáveis por 30 dias quando armazenadas a 4, 25 ou 40 °C. Essas nanoestruturas podem ser alternativas promissoras no desenvolvimento de sistemas biocarreadores de compostos bioativos para as indústrias de alimentos.

Palavras-chave: proteína; estrutura supramolecular; nanopartícula; temperatura; gelificação térmica.

1. INTRODUÇÃO

Nanoestruturas são sistemas formados a partir da auto ou coassociação entre biopolímeros, produzindo estruturas com até 300 nm de tamanho, em ao menos uma dimensão, e que apresente modificação em alguma propriedade funcional, reológica e/ou biológica em relação aos seus biopolímeros precursores (Giroux et al., 2010; Tamjidi et al., 2013).

Uma grande diversidade de nanoestruturas, incluindo nanoesferas, nanogéis, nanofibras e nanotubos podem ser geradas a partir da associação de proteínas (Desfougères et al., 2010). O formato da nanoestrutura é dependente do tipo de moléculas envolvidas na produção, do equilíbrio das forças atrativas e repulsivas entre elas e das condições físico-químicas do meio (pH, temperatura, força iônica, razão molar, concentração das proteínas e presença de outras moléculas) (Monteiro et al., 2016). Diferentes metodologias podem ser empregadas na formação das nanoestruturas como, por exemplo, dessolvatação, coacervação, emulsificação, gelificação térmica, “*nano spray drying*” e “*electrospraying*” (Lee et al., 2011; Elzoghby et al., 2012; López-Rubio & Lagaron, 2012; Luna-Valdez et al., 2017).

A gelificação térmica é um processo sequencial que envolve a seguintes etapas: (i) exposição de grupos funcionais, como grupos sulfidrilas, que estavam escondidos causada pelo desdobramento da proteína devido à aplicação de calor; (ii) formação de agregados via interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas; (iii) o enrijecimento dos agregados devido à ocorrência ligações dissulfeto; e, por fim, (iv) aumento da elasticidade como resultado da formação de interações de hidrogênio após o resfriamento (Batista et al., 2005; Elzoghby et al., 2012; Yu et al., 2006).

As proteínas são macromoléculas anfífilas que exibem ampla aplicabilidade na indústria de alimentos devido ao seu valor nutritivo, atributos sensoriais, atividade antimicrobiana e propriedades técnico-funcionais, sobretudo propriedades interfaciais (Zhao et al., 2016). A ovalbumina (OVA) é uma proteína globular encontrada na clara do ovo, que possui 385 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 45,5 kDa, pI em torno de 4,5 – 4,8 e temperatura de desnaturação de aproximadamente 72 °C (Croguennec et al., 2017; Desfougères et al., 2010; Niu et al., 2018). Ela possui ampla aplicabilidade na indústria de alimentos devido a sua atuação como agente emulsificante e estabilizante de espumas e emulsões. (Niu et al., 2015; Zhao et al., 2016). A lactoferrina, pertencente à família das transferrinas, é uma glicoproteína encontrada no leite, que possui uma gama de funcionalidades, como atividades emulsificante, antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante (García-montoya et al., 2012). A

massa molecular de 80 kDa desta proteína é devido a sua composição que contém cerca de 700 resíduos de aminoácidos. Ela possui pI entre 8 e 9, além de duas temperaturas de desnaturação (61 e 93 °C), as quais foram atribuídos aos dois lóbulos presente nesta proteína (Bengoechea et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito combinado de pH, temperatura e tempo de aquecimento na formação de nanoestruturas contendo ovalbumina e lactoferrina. Análises de espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência intrínseca foram realizadas para caracterizar as nanoestruturas formadas. Por fim, a estabilidade das nanoestruturas foi avaliada ao longo de 30 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Ovalbumina (OVA) (Albumin from chicken egg white; purity \geq 98.0 %; ID product = A5503; Batch number: #SLBQ9036V; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) e lactoferrina (LF) (Vivinal Lactoferrin TD – Bioferrin 2000, ID product = 597909; Batch number = 385; Glanbia Nutritionals, California, USA) foram utilizadas em todos os experimentos. Ácido clorídrico (HCl) (Vetec[®] Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH) (purity \geq 98,0 %; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) foram utilizados nos ajustes de pH. Água deionizada (Milli-Q[®] Reference, Millipore, EUA; resistividade elétrica \approx 18,2 M Ω ·cm⁻² a 25 °C) foi utilizada no preparo de todas as soluções e soluções aquosas. Todos os reagentes não sofreram nenhuma purificação adicional.

2.2 Preparo das soluções proteicas

Soluções aquosas de OVA e LF na concentração de 0,1 % (m/m) foram preparadas solubilizando, separadamente, a proteína em pó em água deionizada. As proteínas foram pesadas em uma balança analítica (AUY 220, Shimadzu, Filipinas). As dispersões proteicas foram mantidas sob agitação contínua de aproximadamente 300 rpm em um agitador magnético (BS-2H, LabScience, Biobase Biodustry, China) por 30 min, a 25 °C, até completa reidratação das proteínas (Monteiro et al., 2016).

2.3 Desenho experimental

No estudo de formação das nanoestruturas foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) com cinco repetições no ponto central, avaliando o efeito do pH, temperatura (T) e tempo de aquecimento (t).

Os valores de pH e temperatura no DCCR foram baseados, respectivamente, no ponto isoelétrico (pI_{OVA} : 4,8 e pI_{LF} : 8,8) e na temperatura de desnaturação ($T_{desn. OVA}$: 72 °C e $T_{desn. LF}$: 61 e 93 °C) de cada proteína (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes para a formação de nanoestruturas contendo OVA e LF.

Variáveis independentes	- α	-1	0	1	+ α
pH	4,5	5,5	7	8,5	9,5
T (°C)	70	74	80	86	90
t (min)	10	16	25	34	40

A Tabela 2 apresenta a matriz de interação entre os fatores estudados.

Tabela 2 - Matriz de interação entre os efeitos com os valores não codificados.

Sistema	pH	T (°C)	t (min)
1	5,5	74	16
2	8,5	74	16
3	5,5	86	16
4	8,5	86	16
5	5,5	74	34
6	8,5	74	34
7	5,5	86	34
8	8,5	86	34
9	4,5	80	25
10	9,5	80	25
11	7,0	70	25
12	7,0	90	25
13	7,0	80	10
14	7,0	80	40
15	7,0	80	25
16	7,0	80	25
17	7,0	80	25
18	7,0	80	25
19	7,0	80	25

2.4 Formação das nanoestruturas de OVA e LF

Para determinação da razão molar de produção das nanoestruturas, as soluções proteicas preparadas previamente, como descrito no item 2.2, foram misturadas nas razões molares (r) (OVA:LF) 1:2, 1:1 e 2:1 e as misturas foram submetidas à agitação contínua em um agitador magnético (BS-2H, LabScience, Biobase Biodustry, China) por 30 min, a 25 °C . Seguindo metodologia adaptada daquela proposta por Saraiva et al. (2017), a razão molar foi escolhida com base na formação de sistemas turvos e sem a ocorrência de precipitado (coacervados) quando os sistemas 1:2, 1:1 e 2:1 foram submetidos ao tratamento do ponto central do DCCR exibido na Tabela 2 (pH = 7,0, T = 80 °C e t = 25 min).

Para produção das nanoestruturas, as soluções de OVA e LF foram misturadas na melhor condição definida anteriormente. As misturas foram deixadas sob agitação de 300 rpm, a 4 °C, em uma B.O.D (SP-500 SPLabor, Brasil), *overnight* (12 h). As nanoestruturas foram preparadas por meio da técnica de gelificação térmica com ajuste prévio de pH, seguindo metodologia proposta por Hu et al. (2007) e Monteiro et al. (2016). Desse modo, as misturas foram submetidas aos tratamentos definidos pelo DCCR, variando pH (4,5 a 9,5), temperatura (70 a 90 °C) e tempo de aquecimento (10 a 40 min). Soluções de HCl e/ou NaOH (0,05 mol·L⁻¹

¹ e/ou 0,01 mol·L⁻¹) e um medidor de pH (914 ph/conductometer, Metrohm, Suíça) foram utilizados no ajuste de pH dos sistemas. O tratamento térmico foi realizado em banho termostático (TE-184, Tecnal, Brasil).

A Figura 1 apresenta um fluxograma da preparação das nanopartículas proteicas.

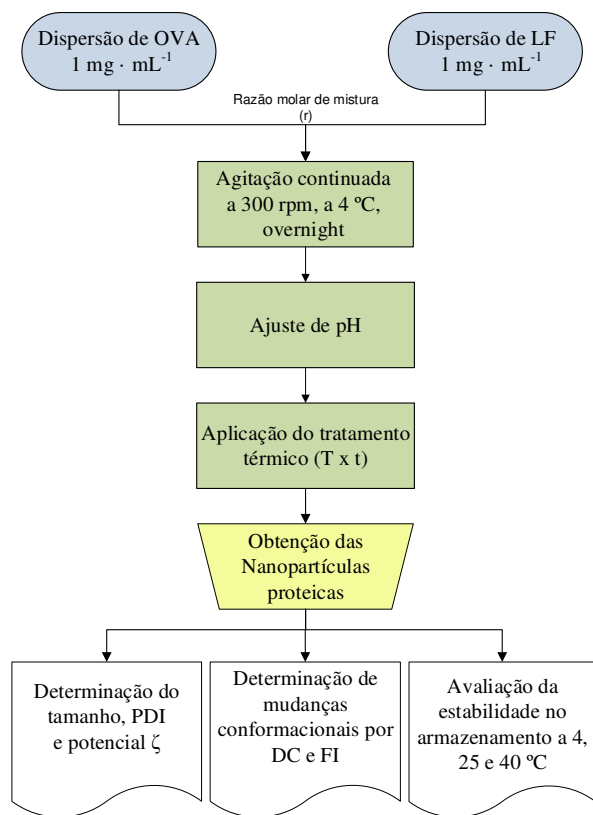


Figura 1 – Fluxograma de produção das nanoestruturas contendo OVA e LF.

2.5 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade

O diâmetro hidrodinâmico médio (d_h) e o índice de polidispersividade (*PDI*) das nanoestruturas foram estimados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra). Ele é equipado com um laser He/Ne 4 mW que emite um comprimento de onda de 632,8 nm, uma célula de medição, um detector do tipo fotodiodo avalanche e um correlacionador. As amostras foram analisadas a 25,0 °C. O programa CONTIN, integrado ao equipamento, foi utilizado para determinar o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas, a partir das funções de autocorrelação de intensidade ajustadas. Cada estimativa foi composta de uma média de ao menos dez leituras por replicata, sendo realizadas duas replicatas. Soluções individuais das proteínas sem alteração de

pH e não submetidas ao tratamento térmico foram usadas como controle. O índice de polidispersividade das partículas foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{d_h} \right)^2 \quad (1)$$

Em que, σ é o desvio padrão dos diâmetros das partículas (nm); e d_h é o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (nm).

2.6 Potencial zeta

O potencial zeta (ζ) das nanoestruturas formadas foi estimado a partir da determinação da mobilidade eletroforética das nanoestruturas, utilizando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra). A mobilidade eletroforética foi calculada, utilizando a Equação 2, a partir da velocidade e da direção do deslocamento das nanoestruturas quando submetidas a um campo elétrico constante. Dessa forma, foi possível estimar os valores de potencial zeta considerando o modelo de Smoluchowski para camada dupla dado na Equação 3. Uma alíquota de aproximadamente 1 mL de amostra foi colocada em uma cubeta própria para a análise. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C com três replicatas.

$$\mu_e = \frac{v}{|E|} \quad (2)$$

$$\zeta = \frac{\eta \cdot \mu_e}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \quad (3)$$

Em que, μ_e é a mobilidade eletroforética ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$), v é a velocidade da partícula ($m \cdot s^{-1}$), E é o campo elétrico aplicado ($mV \cdot m^{-1}$), η é a viscosidade da solução (Pa·s); ϵ_0 é a permissividade do espaço livre ($C^2 \cdot N^{-1} \cdot m^{-2}$), ϵ_r é a constante dielétrica do meio; e ζ é o potencial zeta (mV).

2.7 Espectroscopia de dicroísmo circular

Um espectropolarímetro J-810 (Jasco Corporation, Japão) equipado com um controlador de temperatura Peltier PFD 425S (Jasco Corporation, Japão) acoplado a um banho termostaticado AWC 100 (Julabo, Alemanha) foi utilizado na análise de espectroscopia de

dicroísmo circular das nanoestruturas formadas. Espectros CD foram coletados a 25 °C, sob fluxo constante de nitrogênio, utilizando cubetas de quartzo de 1 mm (Hellma Analytics, Alemanha), em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 260 nm com *data pitch* de 1 nm (Monteiro et al., 2016). Diluições 1:2 em água deionizada foram necessárias na análise. Os espectros obtidos para as amostras foram subtraídos do branco para correta leitura. Todos os espectros foram obtidos pela média de dez acumulações. Soluções individuais das proteínas sem alteração de pH e não submetidas ao tratamento térmico foram usadas como controle. Água deionizada foi utilizada como branco. A elipticidade residual média foi normalizada seguindo a Equação 9.

$$[\theta] = 100 \frac{\theta \cdot MM}{n \cdot c \cdot l} \quad (9)$$

Em que, θ é o sinal de DC (mgrau); MM é a massa molecular da proteína (kDa); n é o número de resíduos de aminoácidos; c é a concentração proteica (g L^{-1}); e l é o caminho ótico da cubeta (cm). A massa molecular e o número de resíduos de aminoácidos foram obtidos a partir de uma média ponderada entre as duas proteínas.

2.8 Espectroscopia de Fluorescência intrínseca

Espectros de emissão de fluorescência das nanoestruturas foram obtidos em um espectrofluorímetro (PC-1 Fluorometer, ISS-K2, EUA) acoplado a um banho termostático (Polyscience Digital Temperature Controller, Model: 9101, USA), polarizadores, monocromador e um filtro de 295 nm. Para isso, as amostras foram aplicadas em uma cubeta de quartzo (Hellma Analytics, Alemanha) com caminho ótico de 10 mm. As nanoestruturas foram excitadas em 280 nm (máxima absorção pela tirosina e triptofano) e os espectros de emissão foram registrados entre 295 e 450 nm, com *time-base* de 1 s e *step-size* de 1 nm. O comprimento da fenda de excitação foi de 2 nm e o comprimento da fenda de emissão foi de 1 nm. A intensidade de fluorescência das nanoestruturas foi subtraída do branco para correta leitura. Soluções individuais das proteínas sem alteração de pH e não submetidas ao tratamento térmico foram usadas como controle. Água deionizada foi utilizada como branco. Ao menos duas replicatas foram realizadas. O procedimento utilizado foi adaptado de Diniz et al. (2014).

2.9 Estabilidade

As nanoestruturas foram avaliadas quanto à estabilidade seguindo metodologia proposta por Giroux et al. (2010), adaptada. As nanoestruturas formadas na condição ótima (menor diâmetro médio de partícula e $PDI \leq 0,2$) foram submetidas a três diferentes temperaturas de armazenamento: (i) 4 °C (condição de refrigeração); (ii) 25 °C (condição de temperatura ambiente); e (iii) 40 °C (condição de ambiente acelerado) (Monteiro et al., 2016). Análises de distribuição de tamanho, PDI e carga superficial das nanoestruturas foram realizadas ao longo de 30 dias de armazenamento. Ao menos três replicatas foram realizadas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Definição da razão molar (OVA:LF)

Na Figura 2 são apresentadas misturas de OVA e LF em diferentes razões molares após serem submetidas a $\text{pH} = 7,0$ e tratamento térmico de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 min.

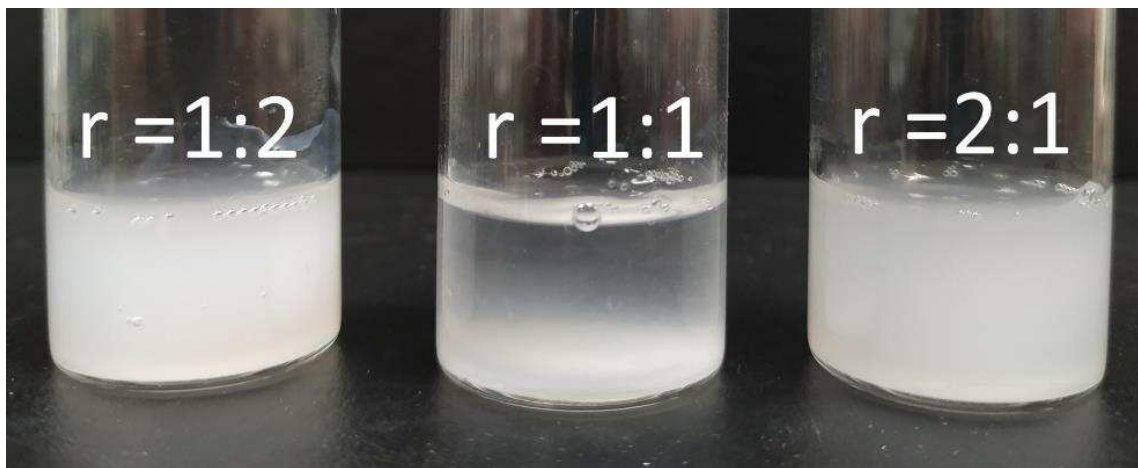


Figura 2 – Misturas de OVA e LF nas razões molares (r , OVA:LF) de 1:2, 1:1 e 2:1 obtidas após submetidas a $\text{pH} 7,0$, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $t = 25\text{ min}$.

O sistema preparado na razão $r = 1:1$ foi descartado pois apresentou formação de complexos insolúveis (coacervados) que são indesejáveis para este experimento. Esta formação pode estar relacionada à mínima repulsão eletrostática que ocorre entre OVA e LF nesta condição de razão molar e pH , resultando em estruturas supramoleculares densas e maiores que as proteínas precursoras. Na razão $r = 1:2$, também houve formação de complexos insolúveis no fundo do recipiente (em menor quantidade que $r = 1:1$), o que nos leva a acreditar que este sistema não se manterá cineticamente estável. Por fim, na razão $r = 2:1$ não houve formação de precipitado e o sistema se apresentou turvo, condições indicadas para formação complexos proteicos solúveis de tamanho nano (Saraiva et al., 2017).

3.2 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade

Na Tabela 3 são apresentados o diâmetro hidrodinâmico médio (d_h), intensidade e índice de polidispersividade (PDI) dos picos encontrados para as proteínas nativas e para os sistemas preparados na razão $r = 2:1$ e submetidas aos tratamentos definidos previamente.

Nas soluções de OVA e LF, os picos de maior diâmetro médio podem ser atribuídos à presença de agregados proteicos (Liu et al., 2015). Dessa forma, pode-se inferir d_h de 7,3 nm para OVA e 13,0 nm para LF. Esses valores são semelhantes aos relatados na literatura por Sponton et al. (2017) e Saraiva et al. (2017).

Tabela 3 - Análise de espalhamento dinâmico de luz das proteínas nativa (OVA e LF) e das estruturas formadas na razão r = 2:1 e submetidas aos tratamentos definidos no DCCR.

Sistema	Pico 1			Pico 2			Pico 3		
	Media (d.nm)	intensidade (%)	PDI	Media (d.nm)	intensidade (%)	PDI	Media (d.nm)	intensidade (%)	PDI
1	903,9	95,8	0,04	150,5	4,2	0,02			
2	189,2	100	0,17						
3	927	90,5	0,10	122,2	9,5	0,06			
4	156,1	100	0,11			0,00			
5	881,4	56,1	0,38	11,57	25,9	0,39	166,4	18	0,08
6	184,4	100	0,17						
7	933,4	94,3	0,07	139,8	5,7	0,05			
8	137,5	100	0,13						
9	32,95	82,5	0,16	393,5	17,5	0,16			
10	31,1	55,6	0,07	381,5	44,4	0,03			
11	267,6	100	0,09						
12	214,1	100	0,08						
13	225,2	100	0,07						
14	223,5	100	0,10						
15	240,9	100	0,07						
16	238,2	100	0,07						
17	240,7	100	0,08						
18	243,8	100	0,07						
19	256,5	100	0,10						
LF	13,0	38		305,7	36,1		43,59	20,3	
OVA	7,3	43,2		537,9	29,6		65,0	16,4	

Como pode-se observar na Tabela 3, o diâmetro médio das estruturas formadas em pH 5,5, sistemas 1, 3, 5 e 7, variou em torno de 900 nm. Tal constatação é devido à formação de complexos insolúveis heteroproteicos (coacervados), havendo, portanto, separação de fase líquido-líquido. A formação desses coacervados é resultado da forte atração eletrostática que há entre as proteínas quando elas estão opostamente carregadas. Os tratamentos térmico empregados nesta condição de pH apresentou pouco efeito no diâmetro médio dos coacervados

obtidos. Monteiro et al. (2016) observaram a formação de precipitado, independente do tratamento térmico, em sistemas de α -lactoalbumina e lisozima quando submetidos a pH 7,0.

Os sistemas 9 e 10 formados em pH 4,5 e 9,5, respectivamente, apresentaram, para o pico de maior intensidade, diâmetro médio de aproximadamente 30 nm. Isso pode ser explicado, sobretudo, pelo pH do tratamento empregado. Uma vez que em pH 4,5 ambas proteínas estão positivamente carregadas e em pH 9,5 ambas estão negativamente carregadas, a repulsão eletrostática existente entre elas nestas condições pode ter sido um fator preponderante para que as proteínas pouco interagissem entre si, embora tenham sido submetidas ao tratamento térmico. Resultados semelhantes foram encontrados por Saraiva et al. (2017) na formação nanoestruturas de lactoferrina e β -lactoglobulina.

Os sistemas do 11 ao 19, produzidos em pH 7,0, apresentaram diâmetro médio variando entre aproximadamente 210 e 270 nm. Ao observar conjuntamente os sistemas 11, 12 e 15, pode-se verificar que a temperatura do tratamento influenciou no tamanho das nanoestruturas obtidas. Maiores temperaturas empregadas resultaram em menores diâmetros de partículas. Isso pode estar relacionado às mudanças conformacionais das proteínas quando submetidas a temperaturas maiores que a temperatura de desnaturação delas. Dessa forma, ocorre exposição de grupos não polares que antes estavam escondidos no interior, levando à ocorrência de interações hidrofóbicas entre elas. O PDI foi menor que 0,1 em todos esses sistemas produzidos neste pH, indicando homogeneidade da distribuição de tamanho das partículas. Comportamento semelhante foi observado por Bourbon et al. (2015). Esses autores observaram que o aumento da temperatura levou à maior rapidez e aumento da agregação da mistura de lactoferrina e glicomacropéptido na formação de nanogéis.

Por fim, nos sistemas 2, 4, 6 e 8, formados em pH 8,5, foram obtidas nanoestruturas de diâmetro hidrodinâmico médio variando entre 140 e 190 nm. Maiores tratamentos térmicos influenciaram positivamente na obtenção de nanoestruturas de menor diâmetro hidrodinâmico. Dessa forma, a condição que produziu a menor nanoestrutura foi obtida em temperatura de 86 °C e tempo de 34 min. Este diâmetro é aproximadamente 30 % menor do que o da nanoestrutura produzida no tratamento térmico mais brando, isto é, para temperatura de 74 °C e tempo de 16 min. Hu et al. (2007) também observaram redução de cerca de 30 % no diâmetro médio dos nanogéis formados por ovalbumina e ovotransferrina quando submetidos à temperaturas maiores (50 °C).

Quase todos os sistemas, exceto o 8 e 9, apresentaram diâmetro maiores que os estimado para as proteínas. Esse resultado sugere que as condições empregadas favoreceram a formação de sistemas heteroproteicos contendo OVA e LF com tamanhos que variaram de aproximadamente 130 até 900 nm.

3.3 Potencial zeta

Na Tabela 4 são apresentados o potencial zeta das estruturas produzidas na razão r = 2:1 e submetidas aos tratamentos definidos previamente pelo DCCR.

Tabela 4 Valores de potencial zeta das nanoestruturas formadas na razão r = 2:1 e em pH 8,5, T = 86 °C e t = 34 min.

Sistema	Pot. zeta (mV)
1	-0,4
2	-27,8
3	-4,9
4	-28,0
5	-6,0
6	-26,3
7	-2,0
8	-20,4
9	24,1
10	-28,1
11	-22,0
12	-23,4
13	-26,1
14	-24,6
15	-24,1
16	-24,6
17	-21,6
18	-24,3
19	-24,1

Nota-se que no sistema 9, em que o pH é menor que o pI das proteínas isoladas, o potencial zeta foi de +24,0 mV. Por outro lado, no sistema 10, em que o pH é superior ao pI das proteínas, o potencial zeta foi de - 28,1 mV. As demais estruturas apresentaram potencial zeta entre esses valores. Enquanto valores de potencial zeta negativos ou positivos sugerem a repulsão eletrostática entre os biopolímeros, valores próximo a zero (~ |5,0| mV) indicam a atração eletrostática entre eles (Bourbon, 2015).

Os sistemas 1, 3, 5 e 7, formados em pH 5,5, apresentaram potencial zeta variando entre 0 e -6,0 mV. Valores de potencial zeta próximos a neutralidade sugerem a formação de complexos insolúveis, como abordado anteriormente. Além disso, a atenuação das cargas líquidas superficiais das proteínas indica que a principal força motriz responsável pela formação dos coacervados, nestes sistemas, é a atração eletrostática. Resultado semelhante também foi observado por Monteiro et al. (2016) quando ajustou o pH da mistura contendo α -lactoalbumina e lisozima para 8,2.

As estruturas formadas em pH 7,0 e 8,5 exibiram potencial zeta variando entre -20 e -28 mV. Dessa forma, acredita-se que a formação das nanoestruturas nestas condições foi devida, principalmente, às ligações dissulfeto entre os grupos sulfidrilas das proteínas e interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos que estavam escondidos no interior das proteínas nativas (Bourbon et al., 2015). A lactoferrina não possui grupos sulfidrilas livres na sua forma nativa, entretanto, quando submetida aos tratamentos térmicos empregados, ela foi possivelmente desnaturada expondo grupos sulfidrilas inicialmente inacessíveis (Furtado, 2018). A ovalbumina, por outro lado, possui um ligação dissulfeto em sua cadeia e quatro grupos sulfidrilas livres em seu interior que, quando desnaturada, podem ligar-se covalentemente com grupamentos sulfidrilas livres presente em outras biomoléculas (Iwashita et al., 2017).

3.4 Caracterização estrutural

Na Figura 3 são apresentados os espectros obtidos pelas análises de fluorimetria e dicroísmo circular para as nanoestruturas formadas nos sistemas 2, 4, 6 e 8, uma vez que eles foram os únicos que apresentaram apenas um pico de distribuição de tamanho (com PDI menor que 0,1) e os menores diâmetros de partículas. As variações nos espectros dos sistemas nanoestruturados em relação às proteínas precursoras indicam possíveis mudanças conformacionais e estruturais.

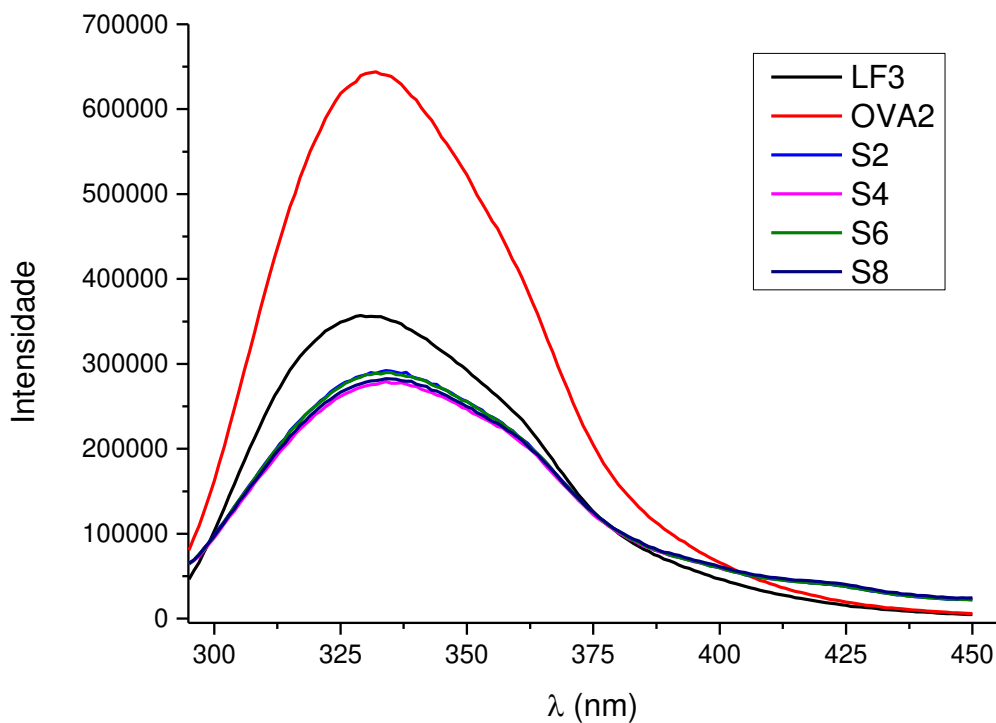
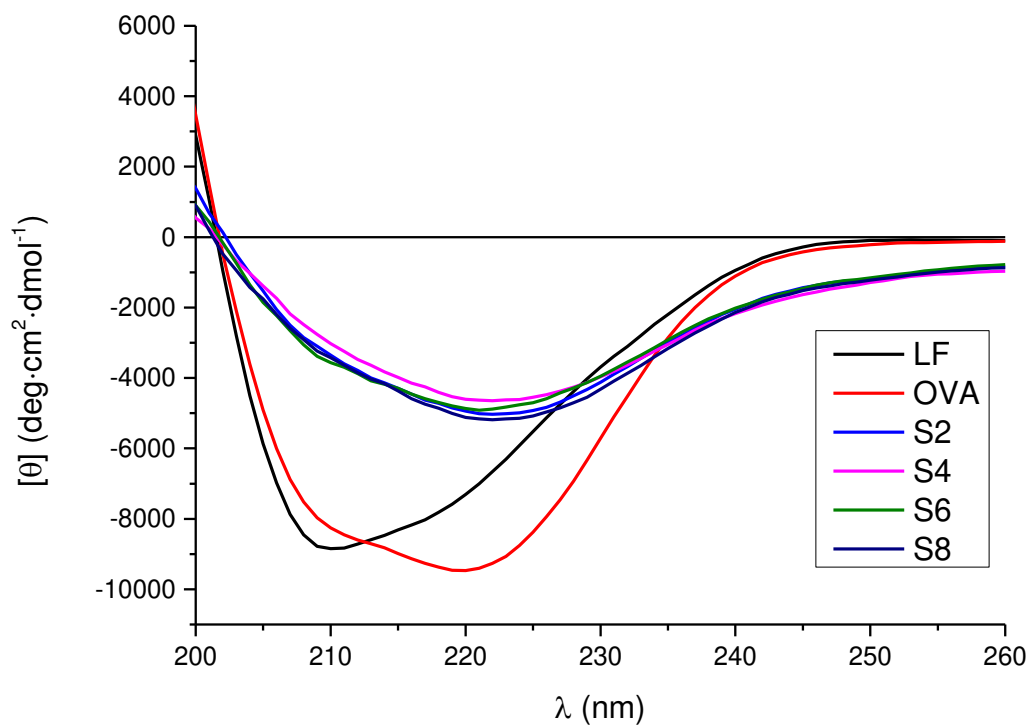


Figura 3 – Espectros de (a) dicroísmo circular e (b) fluorescência das proteínas nativas e dos sistemas S2, S4, S6 e S8.

Sinais de dicroísmo circular na faixa de UV distante (< 260 nm) podem ser usados para monitorar mudanças na estrutura secundária de proteínas. No espectro CD, pode-se

observar picos característicos em 208 e 222 nm para a ovalbumina e em 208 nm para a lactoferrina. Esses picos são característicos de cadeias polipeptídicas com predominância de conformação α -hélice (Geng et al., 2014). Nos sistemas S2, S4, S6 e S8, a forma e a magnitude dos espectros foram consideravelmente influenciadas pelo tratamento térmico, o que sugere alteração na estrutura secundária das proteínas. Tal constatação pode ser resultado do desdobramento da cadeia polipeptídica causado pelo tratamento térmico (Xu et al., 2019).

Para a fluorimetria, os picos de máxima (λ_{MAX}) intensidade de emissão foram obtidos em 228 nm para a lactoferrina, 232 nm para a ovalbumina e 234 nm para os sistemas nanoestruturados, o que indica mudança conformacional das nanoestruturas em relação às proteínas (Fig. 12b). O deslocamento batocrômico para comprimentos de onda maiores sugere que os fluoróforos, que antes estavam no interior da proteína, foram expostos ao meio. A atenuação da intensidade de fluorescência da OVA e LF após serem misturadas e submetidas ao tratamento térmico sugere interação entre elas. Isso pode ser explicado a partir do desdobramento da proteína, que expõe grupamentos sulfidrilas que antes estavam no interior das proteínas. Esses grupamentos se ligam formando ligações dissulfeto.

Em relação ao complexo OVA-LF, a diminuição da magnitude da elipticidade residual média nas bandas negativas 208 e 222 nm, em relação às proteínas precursoras, indica redução de estrutura α -hélice e possível interação entre as proteínas, corroborando os resultados obtidos na fluorescência. Isso pode ser resultado de um possível desdobramento parcial das proteínas (Chen et al., 2018).

3.5 Estabilidade das nanoestruturas

Diferentes condições de armazenamento empregadas para as nanoestruturas podem ser prejudiciais à estabilidade delas. Por isso, a menor nanoestrutura, obtida em pH 8,5, temperatura de 86 °C e tempo de 36 min, foi avaliada quanto a estabilidade. Para isso, elas foram submetidas às temperaturas de 4, 25 e 40 °C ao longo de 1 mês e o diâmetro médio foi determinado.

Na Figura 4 é apresentados os resultados do diâmetro médio das amostras durante o armazenamento.

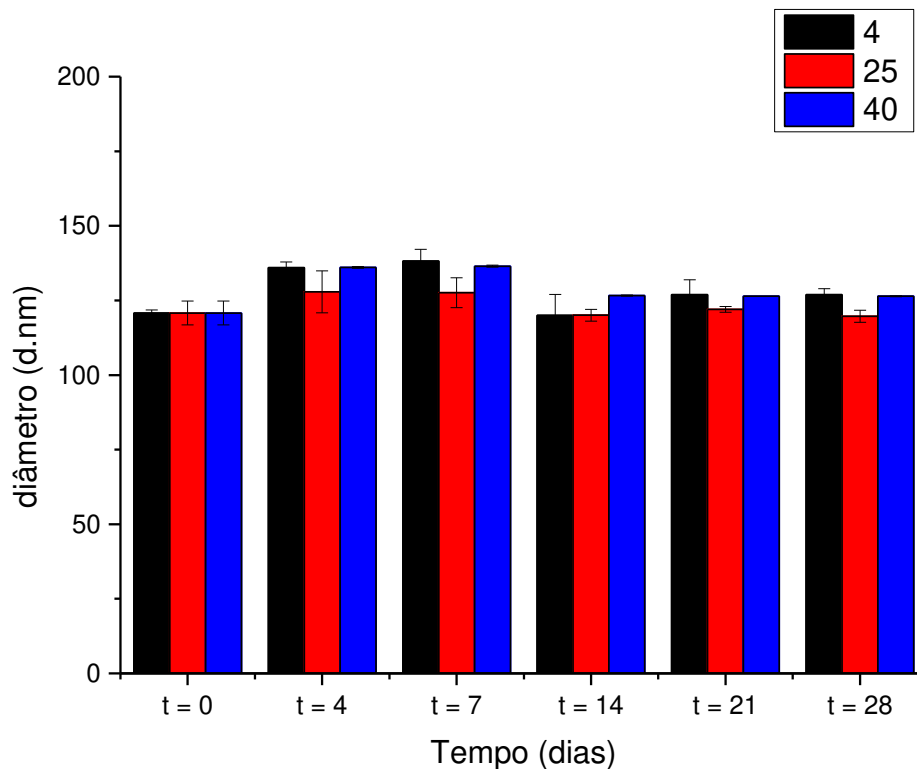


Figura 4 – Efeito da temperatura no armazenamento da nanoestrutura formada na razão $r = 2:1$ e pH 8,5, $T = 86$ °C/34 min.

Pode-se notar que as nanoestruturas não apresentaram mudanças significativas ($p > 0,05$) em relação ao diâmetro médio durante o período de armazenamento nas três temperaturas. Além disso, o PDI permaneceu menor que 0,1 em todas as condições de armazenamento. Estes resultados demonstram que a nanoestrutura é cineticamente estável e possui baixa polidispersividade. Quanto à carga elétrica líquida superficial, todas as nanoestruturas apresentaram potencial zeta menores que ± 25 mV. Alguns autores sugerem que sistemas formados por biopolímeros, as partículas permanecem em dispersão quando o potencial é maior que ± 25 mV (Pomastowski et al., 2014). Resultados similares foram obtidos por Monteiro et al. (2016). Este autor e seus colaboradores observaram que nanoestruturas formadas por α -lactoalbumina e lisozima permaneceram estáveis por ao menos 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. Dessa forma, as nanoestruturas formadas por ovalbumina e lactoferrina demonstram potencial aplicabilidade nas mais diversas áreas.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que nanoestruturas formadas por ovalbumina e lactoferrina podem ser formadas em condições específicas de pH e tratamento térmico (temperatura e tempo

de aquecimento). Todos os sistemas preparados em pH 7 e 8,5, independente do tratamento térmico, apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio menor que 300,0 nm e PDI < 0,2. O sistema de menor diâmetro hidrodinâmico (~ 130,0 nm) foi preparado na razão r = 2:1, pH = 8,5, T = 86 °C e t = 34 min. As nanopartículas foram cineticamente estáveis ao longo de 30 dias de armazenamento a 4, 25 e 40 °C. Dessa forma, elas podem apresentar muitas aplicabilidades na indústria de alimentos, cosmético e fármacos.

5. REFERÊNCIAS

- Batista, A.P., Portugal, C.A.M., Sousa, I., Crespo, J.G., Raymundo, A., 2005. Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. **Int. J. Biol. Macromol.** 36, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.04.003>
- Bengoechea, C., Peinado, I., McClements, D.J., 2011. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics. **Food Hydrocoll.** 25, 1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.014>
- 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 Hydrocoll.** 48, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.026>
- 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 Hydrocoll.** 57, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.003>
- Chen, Y., Hu, J., Yi, X., Ding, B., Sun, W., Yan, F., Wei, S., 2018. LWT - Food Science and Technology Interactions and emulsifying properties of ovalbumin with tannic acid. **LWT - Food Sci. Technol.** 95, 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.088>
- Croguennec, T., Tavares, G.M., Bouhallab, S., 2017. Heteroprotein complex coacervation : A generic process. **Adv. Colloid Interface Sci.** 239, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.009>
- 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. **J. Phys. Chem. B** 114, 4138–4144. <https://doi.org/10.1021/jp9090427>
- Diniz, R., Sélia, J., Vianna, Á., Carvalho, N. De, Ribeiro, A., José, I., Santos, B., Costa, G., Manuel, A., Helena, L., 2014. Production, characterization and foamability of α -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. **Food Res. Int.** 64, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.079>
- Elzoghby, A.O., Samy, W.M., Elgindy, N.A., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **J. Control. Release** 157, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
- Furtado, G. F., Pereira, R. N. C., Vicente, A. A., Cunha, R. L., 2018. Cold gel-like emulsions

- of lactoferrin subjected to ohmic heating. **Food Res. Int.** 103, 371-379.
- García-montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-gallegos, S., Rascón-cruz, Q., 2012. **Biochimica et Biophysica Acta** Lactoferrin a multiple bioactive protein : An overview ☆. BBA - Gen. Subj. 1820, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>
- Giroux, J., Houde, J., Britten, M., 2010. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. **Food Hydrocoll.** 24, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.013>
- Geng, X., Cui, B., Li, Y., Jin, W., An, Y., & Zhou, B., 2014. Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation. **Food Hydrocolloids.** 37, 86–92.
- Hu, J., Yu, S., Yao, P., 2007. Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. **Langmuir** 23, 6358–6364.
- Iwashita, K., Handa, A., Shiraki, K., 2017. Co-aggregation of ovalbumin and lysozyme. **Food Hydrocoll.** 67, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.014>
- Lee, S.H., Heng, D., Ng, W.K., Chan, H.K., Tan, R.B.H., 2011. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **Int. J. Pharm.** 403, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.012>
- Liu, J., Young, Y., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2015. Food Hydrocolloids Intermolecular interaction and complex coacervation between bovine serum albumin and gum from whole flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Hydrocoll.** 49, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.035>
- López-Rubio, A., Lagaron, J.M., 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 13, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.012>
- Luna-Valdez, J.G., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Ramos Clamont-Montfort, G., Mendoza-Wilson, A.M., Mercado-Ruiz, J.N., Madera-Santana, T.J., Rascon-Chu, A., Chaquilla-Quilca, G., 2017. Structural and physicochemical characterization of nanoparticles synthesized from an aqueous extract of wheat bran by a cold-set gelation/desolvation approach. **Food Hydrocoll.** 62, 165–173. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.07.034>
- Monteiro, R., Pereira, R.N., Diniz, R., Teixeira, V., Oliveira, E.B., Coimbra, J.S., 2016. Design

- of bio-based supramolecular structures through self-assembly of α -lactalbumin and lysozyme. **Food Hydrocoll.** 58, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.009>
- Niu, F., Dong, Y., Shen, F., Wang, J., Liu, Y., Su, Y., 2015. Food Hydrocolloids Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin e gum arabic complex coacervation. **Food Hydrocoll.** 43, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.009>
- Niu, F., Kou, M., Fan, J., Pan, W., Feng, Z., Su, Y., 2018. Structural characteristics and rheological properties of ovalbumin-gum arabic complex coacervates. **Food Chem.** 260, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.141>
- Pomastowski, P., Sprynskyy, M., Buszewski, B., 2014. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces The study of zinc ions binding to casein. **Colloids Surfaces B Biointerfaces** 120, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.009>
- Saraiva, C., Coimbra, J., Vianna, A., Carvalho, N. De, Basílio, E., Oliveira, D., Francisco, R., Ribeiro, A., Almeida, É. De, Barbosa, A., 2017. Formation and characterization of supramolecular structures of β -lactoglobulin and lactoferrin proteins. **Food Res. Int.** 100, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.065>
- Sponton, O.E., Perez, A., Ramel, J. V, Santiago, L.G., 2017. **Food Hydrocolloids** Protein nanovehicles produced from egg white . Part 1 : Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity 73, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.033>
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., Nasirpour, A., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 19, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>
- Xu, K., Zhao, Z., Guo, M., Du, J., 2019. LWT - Food Science and Technology Conjugation between okra polysaccharide and lactoferrin and its inhibition e ff ect on thermal aggregation of lactoferrin at neutral pH. **LWT - Food Sci. Technol.** 107, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.082>
- Yu, S., Yao, P., Jiang, M., Zhang, G., 2006. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. **Biopolymers** 83, 148–158. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Zhao, Y., Chen, Z., Li, J., Xu, M., Shao, Y., Tu, Y., 2016. Formation mechanism of ovalbumin gel induced by alkali. **Food Hydrocoll.** 61, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.041>

3. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho demonstrou que diferentes estruturas supramoleculares podem ser produzidas a partir da associação entre ovalbumina e lactoferrina, em função dos fatores empregados. Complexos coacervados esféricos de diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 620 nm foram formados na condição ótima de coacervação: r (OVA:LF) = 2:1, pH 6,0 e ausência de NaCl ou ureia. A coacervação de OVA e LF em pH 6,0 foi um processo espontâneo e entalpicamente dirigido, indicando que a atração eletrostática deve ser a força motriz desse fenômeno. Por outro lado, nanoestruturas de diâmetro hidrodinâmico médio menor que 300,0 nm e PDI menor que 0,2 foram formadas para sistemas preparados em pH 7,0 e 8,5, independente do tratamento térmico aplicado. As nanoestruturas de menor diâmetro hidrodinâmico (~ 130,0 nm), preparadas na razão r = 2:1, pH = 8,5, T = 86 °C e t = 34 min, foram cineticamente estáveis ao longo de 30 dias de armazenamento a 4, 25 ou 40 °C. Mudanças nos espectros de dicroísmo circular e fluorescência sugeriram alterações conformacionais das proteínas na formação dos coacervados e das nanoestruturas.

Essas estruturas podem apresentar muitas aplicabilidades na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Dessa forma, sugere-se que estudos acerca da técnico-funcionalidade (formação e estabilização de espumas e emulsões), biofuncionalidade (encapsulamento e liberação controlada de compostos bioativos) e a inclusão destes sistemas coloidais em matrizes alimentícias sejam realizados. Por fim, devem ser realizados ensaios toxicológicos, a fim de avaliar o efeito da destas estruturas quando ingeridas pelos indivíduos.