



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CRISTIANE GRELLA MIRANDA**

**Extração e Modificação por Campos Elétricos Moderados da Proteína  
de Lentilha (*Lens culinaris*) para aplicação em sistemas coacervados**

**CAMPINAS**

**2020**

CRISTIANE GRELLA MIRANDA

Extração e Modificação por Campos Elétricos Moderados da Proteína de  
Lentilha (*Lens culinaris*) para aplicação em sistemas coacervados

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do título  
de Mestra em Engenharia de Alimentos.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carla Kawazoe Sato**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Louise Emy Kurozawa**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação  
defendida pela aluna Cristiane Grella Miranda, orientada  
pela Prof. Dr. Ana Carla Kawazoe Sato e Coorientada pela  
Prof. Dr<sup>a</sup> Louise Emy Kurozawa

CAMPINAS,

2020

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

M762e Miranda, Cristiane Grella, 1995-  
Extração e modificação por campos elétricos moderados da proteína de lentilha (*Lens culinaris*) para aplicação em sistemas coacervados / Cristiane Grella Miranda. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Ana Carla Kawazoe Sato.  
Coorientador: Louise Emy Kurozawa.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas de origem vegetal. 2. Extração alcalina. 3. Ultrassom. 4. Aquecimento ôhmico. I. Sato, Ana Carla Kawazoe. II. Kurozawa, Louise Emy. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Extraction and modification by moderate electric field of protein from lentil (*Lens culinaris*) for application in coacervates systems

**Palavras-chave em inglês:**

Plant proteins

Alkaline extraction

Sonication

Ohmic heating

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Ana Carla Kawazoe Sato [Orientador]

Flavia Maria Netto

Talita Aline Comunian

**Data de defesa:** 10-03-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8765-831X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5427805825414630>

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Ana Carla Kawazoe Sato**

Orientadora – FEA/UNICAMP

**Profa. Dra. Flávia Maria Netto**

Membro Titular – FEA/UNICAMP

**Dra. Talita Aline Comunian**

Membro Titular - *Technische Universität Berlin* / Alemanha

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

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Força maior desconhecida que rege este universo e permite, que de alguma forma, vivamos e realizemos nossos sonhos e objetivos.

Agradeço aos meus pais, Cleonice e Albani, minha Avó Helena e minha Tia Rosilene, que me apoiaram psicologicamente e me financiaram em todos esses anos de aprendizado, e por todo apoio e conforto emocional. A todos os meus familiares, aqui representaram pelos nomes das minhas irmãs, Andressa e Elaine por desempenharem de forma eximia o papel de família.

Aos meus amigos! Ao meu quarteto fantástico que permaneceu unido mesmo a 800 km de distância, Anielle, Sabrina e Cristhian Rafael. Em especial ao Cristhian Rafael que me encorajou e me ajudou a enfrentar mais essa etapa. Aos meus amigos de Campo Mourão que eu trouxe no coração: Jéssica, Mayra e Vinicius. Aos amigos que Campinas me deu Cássia, Raquel, Noadia e Lucas. E aos amigos que tive que cruzar o oceano para conhecer Cristiane, Fernanda e Jorge. Obrigada por tornarem essa caminhada do mestrado mais leve e divertida, vou guardar no coração cada momento de alegria, tristeza, desespero, indecisão, medo... enfim, todas as memórias obtidas durante essa jornada.

Às minhas orientadoras. Me faltam palavras para poder agradecer minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Carla Kawazoe Sato, por todo apoio, dedicação e incentivo durante essa trajetória. Agradeço também a Prof. Dr<sup>a</sup> Louise Emy Kurozawa pela paciência e dedicação, e por aceitar auxiliar este trabalho de forma tão enriquecedora. Gostaria também de agradecer a minha orientadora de coração Dr<sup>a</sup> Paula Speranza, por todos os ensinamentos que vão além do conhecimento científico.

Aos meu supervisor e orientadores em Portugal. Ao Prof. Dr. Antônio A. Vicente pelo aceite e ensinamento durante meu período em Portugal. Em especial, gostaria de agradecer ao Dr. Ricardo Pereira e Dr. Rui Rodrigues pela paciência e dedicação durante o desenvolvimento do trabalho na Universidade do Minho. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) por todo o apoio. Em especial a Paula Okuro, Karen Guedes e Vanessa Martins da Silva, por terem tornado a adaptação mais fácil. Ao meu Grupos de Pesquisa, Flávia, Henrique, Leonardo, Caio, Teresa e Aurenice por todo apoio no desenvolvimento desse projeto.

Ao Laboratório de Indústria e Processos (LIP) por terem sido tão receptivos e tornado essa jornada tão especial. Em especial ao Luis, Pedro, Raquel, Zita, Filipe, Ana

Cristina, Micheli, João e Tina por todas as risadas, por todos os almoços em conjunto, por todo carinho e por serem responsáveis por tornar Braga um dos meus lugares favoritos no mundo.

Gostaria de agradecer a todos os professores que fizeram parte da minha caminhada durante a graduação e mestrado. Os ensinamentos transmitidos pelos senhores, também foram base para este trabalho, mesmo que indiretamente. E por muitas vezes se mostrarem mais que educadores me aconselhando nos momentos de dúvida. Em especial, gostaria de agradecer meu orientador Prof. Dr Odinei Hess Gonçalves e Prof. Dr<sup>a</sup> Angela Maria Gozzo por todo o apoio mesmo à distância.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios financeiros e concessão da bolsa (2018/16456-7) e pela oportunidade de estágio de pesquisa no exterior pela bolsa BEPE (2019/18704-0).

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – código de financiamento 001 e pela concessão da bolsa (88882.329552/2010-01).

À UNICAMP/FEA e a UMINHO.

Por fim, a todos que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho!

**OBRIGADA!**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o processo de extração de proteínas de lentilha para produção de coacervados complexos com a pectina. Foi avaliada a obtenção de isolados extraídos pelo método alcalino (IPL-EA) e método alcalino assistido por carboidrases (IPL-EZ) ou por ultrassom (IPL-US). Os isolados proteicos obtidos das condições com maior rendimento de extração foram avaliados pelas análises de composição centesimal, eletroforese, potencial zeta, solubilidade e tensão interfacial. Diferenças significativas não foram observadas ( $p > 0,05$ ) entre os rendimentos de extração comparando os diferentes métodos estudados. No entanto, após a obtenção dos isolados proteicos, IPL-EA e IPL-EZ apresentaram teor proteico significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao IPL-US. Os tratamentos associados à extração alcalina (ultrassom e tratamento enzimático) não causaram alterações no perfil de carga ou no perfil de massa molecular da proteína. No entanto, foram observadas diferenças no perfil de solubilidade e na taxa de diminuição da tensão interfacial, indicando que o processo de extração pode influenciar as funcionalidades da proteína. O efeito do aquecimento ôhmico (AO) na estrutura da proteína extraída pelo processo alcalino bem como alterações deste processo na formação dos coacervados também foram estudados. Modificações na estrutura secundária e terciária dos isolados proteicos submetidos ao AO em diferentes temperaturas, tempo e intensidade de campo elétrico foram avaliadas. Alterações significativas na estrutura secundária não foram observadas após o tratamento do IPL-EA com AO. As reduções na fluorescência do triptofano devido aos tratamentos indicam mudanças na estrutura terciária. A redução na fluorescência do triptofano foi também verificado no tratamento convencional. Esses resultados indicam que o processo de AO é capaz de modificar a proteína da lentilha, dependendo da temperatura, tempo de exposição e força do campo elétrico. As condições de formação de coacervados foram otimizadas em relação ao pH de formação, razão proteína:pectina e proporção biopolímeros: óleo. Tanto os coacervados produzidos com os isolados obtidos pelos diferentes métodos quanto os coacervados obtidos com a proteína tratada com AO foram caracterizados por espectrofotometria com transformada de Fourier (FTIR). Alta eficiência de encapsulação (acima de 90%) foi observada para todas as proporções biopolímeros: óleo, sendo que a proporção 1:1 foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ). Por fim, os coacervados complexos obtidos usando IPL-EZ, IPL-US e IPL-EA tratado com AO com alta intensidade de campo elétrico indicaram o envolvimento de outros grupos funcionais que não participaram na coacervação utilizando o IPL-EA. A associação de pré-tratamentos (ultrassom e enzimas) à extração alcalina indicou pouca influência no rendimento proteico, mas promoveu diferenças na solubilidade e tensão interfacial entre os isolados produzidos. Já as alterações estruturais na proteína de lentilha pelo AO mostram-se dependentes da temperatura, tempo de exposição e intensidade de campo elétrico. Por fim, os grupos funcionais envolvidos na formação dos coacervados mostraram-se dependentes do tipo de tratamento aplicado ao IPL-EA.

**Palavras chave:** Proteínas Vegetais; Extração Alcalina; Ultrassom; Extração Enzimática; Aquecimento Ôhmico.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the process of extracting lentil proteins to produce complex coacervates with pectin. The obtaining of protein extracted by the alkaline method (LPI-EA) and the alkaline method assisted by carbohydrases (LPI-EZ) or by ultrasound-assisted (LPI-US) was evaluated. The protein isolates obtained in the conditions with the highest extraction yield in the first step were evaluated by analysis of proximate composition, electrophoresis, zeta potential, solubility and interfacial tension. Significant differences were not observed ( $p > 0.05$ ) between extraction yields comparing the different methods studied. After obtaining lentil protein isolates, LPI-EA and LPI-EZ showed a protein content higher than LPI-US. The treatments associated with alkaline extraction (ultrasound-assisted and enzymatic treatment) did not cause changes in the neutral charge condition or in the molecular mass profile of the protein. However, differences were observed in the solubility profile and in the interfacial tension decrease rate, indicating that extraction processes can modify the functionalities of the protein. The effect of thermal and ohmic heating (OH) on the structure of the protein extracted by the alkaline process as well as evaluated the formation process of coacervates were also studied. Changes on secondary and tertiary structure of the protein isolated by application of OH at different temperatures, time and strength of the electric field were evaluated. Significant changes in secondary structure were not observed after treatment of LPI-EA with OH. The reductions in the tryptophan fluorescence due to the OH temperature and the exposure time indicated alteration of the tertiary structure. The tryptophan fluorescence increase was also verified in conventional treatment. These results indicate that OH process is able to modify the lentil protein, depending on the temperature, exposure time and strength of the electric field. The conditions of formation of coacervates were optimized in relation to the formation pH, protein: pectin ratio and proportion of biopolymers: oil. Both coacervates produced with isolated protein obtained by different extraction process and coacervates obtained with LPI-EA treated with OH were characterized by Fourier transform spectrophotometry (FTIR). The high encapsulation efficiency (above 90%) was observed in the all biopolymers: oil ratio, with a 1: 1 ratio being higher ( $p < 0.05$ ). Finally, coacervates obtained using LPI-EZ, LPI-US and LPI-EA treated with OH with a high intensity of electric field, indicate involvement of other functionals groups that do not participating coacervation using LPI-EA. The association of pre-treatments (ultrasound and enzymes) to alkaline extraction did not result in significative difference on protein yield, but promoted significant differences in solubility and interfacial for the different isolates. Changes in the structure of the lentil protein by OH were dependent of temperature, time of exposure and intensity of the electric field. The linseed oil encapsulation was efficient, with high encapsulation efficiency for all the ratios biopolymers: oil used. The functional groups involved in the formation of coacervates were shown to be dependent on the type of treatment applied to IPL-EA.

**Keywords:** Plant protein; Alkaline extraction; Sonication; Enzyme-assisted extraction; Ohmic heating.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da Unidade de Aquecimento Ôhmico. ....	36
<b>Figura 2.</b> Perfil do potencial zeta em função do pH para os isolados proteicos obtidos pela extração alcalina (PL-EA, ●), assistida por carboidrases (PL-EZ, ◆) e por ultrassom (PL-US, ■). ....	53
<b>Figura 3.</b> Perfil de Solubilidade para os IPL em Função do Ph para os isolados proteicos obtidos por extração alcalina (IPL-EA, ○), assistida por carboidrases (IPL-EZ, □), por ultrassom (IPL-US, △). ....	56
<b>Figura 4.</b> Tensão Interfacial Dinâmica dos Sistemas Compostos de Água pura - Óleo de linhaça (—) e óleo de linhaça – isolados proteico obtidos por extração alcalina (IPL-EA, —), assistida por carboidrases (IPL-EZ, —) e por ultrassom (IPL-US, —)....	57
<b>Figura 5.</b> Termogramas para os IPL. A: IPL-EA; B: IPL-EZ; C: IPL-US. ....	54
<b>Figura 6.</b> Gel de eletroforese (SDS-PAGE) para os ISP. P: padrão; A: IPL-EA não-redutor; AR: IPL-EA redutor; B: IPL-EZ não-redutor; BR: IPL-EZ redutor; C: IPL-US não-redutor; CR: IPL-US redutor. ....	51
<b>Figura 7.</b> Espectros de DC para amostras não-tratadas e tratadas com aquecimento ôhmico e convencional. A: efeito da temperatura no tratamento das proteínas; B: efeito do tempo de exposição ao AO e C: efeito da intensidade do campo elétrico do AO. ....	59
<b>Figura 8.</b> Espectro de Fluorescência do Triptofano para proteína de lentilha não tratada e tratada sob diferentes condições. O comprimento de excitação foi à 295 nm. A: efeito da temperatura no tratamento das proteínas; B: efeito do tempo de exposição ao AO e C: efeito da intensidade do campo elétrico do AO. ....	60
<b>Figura 9.</b> Espectro de Fluorescência do ANS para proteína de lentilha não tratada e tratada sob diferentes condições. O comprimento de excitação foi à 370 nm. A: AO em diferentes temperaturas; B: Tempo de exposição ao AO e C: Intensidade do Campo Elétrico do AO. ....	62
<b>Figura 10.</b> Variação de Densidade Ótica como Função do pH. Coacervados obtidos com IPL-EA (COA_EA, ○) Coacervados obtidos com IPL-EZ (COA_EZ, □) e coacervados obtidos com IPL-US. (COA_US, △). ....	64
<b>Figura 11.</b> Formação dos coacervados entre a pectina e os IPL em função da proporção proteína: polissacarídeo. A: Coacervados produzidos com IPL-EA; B: Coacervados produzidos com IPL-EZ e C: Coacervados produzidos com IPL-US. ....	65

**Figura 12.** Espectros de FTIR para os materiais puros e os coacervados complexos. A: pectina; B: Isolados Proteicos. C: Coacervados não tratados com AO; D: Coacervados tratadas com aquecimento convencional; E: Coacervados tratadas com AO1; F: Coacervados tratados com AO2 ..... 69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito do pH no rendimento proteico. ....	47
<b>Tabela 2.</b> Efeito da potência no rendimento proteico. ....	48
<b>Tabela 3.</b> Efeito da Concentração Enzimática no Rendimento Proteico. ....	49
<b>Tabela 4.</b> Composição Centesimal da Farinha de Lentilha e dos Isolados Proteicos em base seca. ....	50
<b>Tabela 5.</b> Condição de pH na qual os isolados proteicos obtidos apresentaram carga nula. ....	53
<b>Tabela 6.</b> Valores de entalpia e temperaturas de transição para os isolados proteicos..	55
<b>Tabela 7.</b> Eficiência de Encapsulação para a Coacervação Complexo do Óleo de Linhaça. ....	66

## ABREVIATURAS

AO: Aquecimento Ôhmico;

IPL: Isolado Proteico de Lentilha;

IPL-EA: Isolado Proteico de Lentilha obtido por Extração Alcalina;

IPL-EZ: Isolado Proteico de Lentilha obtido por Extração Alcalina Assistidas por Enzimas

IPL-US: Isolado Proteico de Lentilha obtido por Extração Alcalina Assistida por Ultrassom;

AO1: Tratamento ôhmico à 80 °C com baixa intensidade de campo elétrico por 20 minutos;

AO2: Tratamento ôhmico à 80 °C com baixa intensidade de campo elétrico por 20 minutos;

Tratamento Convencional: Aquecimento da solução proteica a 80 °C por 20 minutos sem a presença de campo elétrico.

COA\_EA: Coacervados complexos obtidos entre a interação do IPL-EA e a pectina.

COA\_EZ: Coacervados complexos obtidos entre a interação do IPL-EZ e a pectina.

COA\_US: Coacervados complexos obtidos entre a interação do IPL-US e a pectina.

AO1R; AO2R; ConvR: soluções proteicas que foram submetidas ao tratamento ôhmico à 80 °C por 20 minutos, mas foram resfriadas antes de adicionar a solução de pectina para coacervação.

## SÚMARIO

<b>ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	16
CAPÍTULO 1 .....	17
<b>1 INTODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS</b> .....	18
1.1 INTRODUÇÃO GERAL .....	18
1.2 OBJETIVOS.....	20
1.2.1 Objetivo Geral .....	20
1.2. 2 Objetivos Especifico.....	20
CAPÍTULO 2 .....	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 LENTILHA .....	22
2.2.1 Extração Alcalina .....	23
2.2.2 Extração assistida por Ultrassom.....	24
2.2.3 Extração assistida por Enzimas .....	25
2.3 AQUECIMENTO ÔHMICO.....	27
2.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-POLISSACARÍDEO .....	28
2.4.1 Coacervação Complexa .....	29
2.4.1.1 Pectina .....	29
2.5 ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS .....	30
CAPÍTULO 3 .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 MATERIAL .....	33
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Extração Proteica.....	33
3.2.1.1 Extração Alcalina .....	34
3.2.1.2 Extração Alcalina assistida por Ultrassom .....	34
3.2.1.3 Extração Alcalina assistida por Enzimas.....	34

3.2.1.4 Obtenção do Isolado Proteico.....	35
3.2.2 Aquecimento Ôhmico.....	35
3.2.2.1 Unidade Aquecedora .....	36
3.2.2.2 Solução proteica .....	36
3.2.2.3 Influência do Aquecimento Ôhmico na Estrutura da Proteína .....	37
3.2.2.3.1 Temperatura.....	37
3.2.2.3.2 Tempo.....	37
3.2.2.3.3 Intensidade do Campo Elétrico.....	38
3.2.3 Produção dos Coacervados .....	38
3.2.3.1 Determinação das Melhores Condições de Coacervação .....	38
3.2.3.2 Encapsulação do óleo de linhaça .....	39
3.2.3.3 Influência do Aquecimento Ôhmico na Formação dos Coacervados .....	39
3.2.4. Análises .....	40
3.2.4.1 Caracterização do Isolados Proteicos .....	40
3.2.4.1.1 Composição Centesimal .....	40
3.2.4.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	40
3.2.4.1.3 Zeta Potencial .....	41
3.2.4.1.4 Solubilidade .....	41
3.2.4.1.5 Calorimetria Diferencia de Varredura (DSC).....	41
3.2.4.1.6 Tensão Interfacial .....	42
3.2.4.2 Caracterização das Soluções Proteicas Tratadas com Aquecimento Ôhmico ....	42
3.2.4.2.1 Fluorescência.....	42
3.2.4.2.2 Dicroísmo Circular (DC) .....	42
3.2.4.3 Caracterização dos Coacervados .....	43
3.2.4.3.1 Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). 43	
3.2.4.3.2 Eficiência de Encapsulação .....	43
3.2.5 Análise Estatística .....	44

CAPÍTULO 4 .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>47</b>
4.1 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE LENTILHA.....	47
4.1.1 Efeito do pH no Rendimento da Extração Proteica.....	47
4.1.2 Efeito da Potência no Rendimento da Extração Proteica .....	47
4.1.3 Efeito da Concentração Enzimática no Rendimento Proteico.....	49
4.1.4 Composição dos Isolados Proteicos de Lentilha .....	50
4.1.5 Potencial-Zeta.....	52
4.1.6 Perfil de Solubilidade .....	55
4.1.7 Tensão Interfacial .....	57
4.1.8 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	54
4.1.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	51
4.2 EFEITO DO AQUECIMENTO ÔHMICO .....	58
4.2.1 Estrutura Secundária.....	58
4.2.2 Fluorescência Intrínseca .....	59
4.2.3 Fluorescência Extrínseca .....	61
4.3 PRODUÇÃO DOS COACERVADOS COMPLEXOS.....	63
4.3.1 Efeito do pH e da proporção de biopolímeros na formação dos complexos IPL- PECTINA .....	63
4.3.1.1 Efeito do pH .....	63
4.3.1.2 Proporção IPL:PECTINA.....	64
4.3.2 Eficiência de Encapsulação do Óleo de Linhaça.....	66
4.3.3 FTIR .....	67
CAPÍTULO 5 .....	69
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>71</b>
CAPÍTULO 6 .....	72
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação contempla resultados de dois projetos financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP). O primeiro trabalho refere-se ao processo 2018/16456-7, referente a Bolsa de Mestrado, intitulado “Coacervação Complexa Utilizando Proteína de Lentilha Obtida por Diferentes Métodos de Extração” e foi desenvolvido na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Brasil. Já o segundo projeto refere-se a uma Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE, 2019/18704-0) intitulado “Avaliação de Mudanças Conformacionais na Estrutura da Proteína de Lentilha Resultante da Aplicação de Campos Elétricos Moderados” realizado em parceria com a Universidade do Minho (UMinho) em Portugal sob a orientação do Prof. Dr. António A. Vicente e do Dr. Ricardo Pereira.

A dissertação foi organizada em cinco capítulos, tal como descrito a seguir. O Capítulo 1 corresponde a Introdução e Objetivos, que tem como objetivo introduzir e justificar o tema escolhido para esta dissertação. No Capítulo 2 encontra-se a Revisão Bibliográfica, que apresenta uma breve revisão da literatura quanto a proteína de lentilha, métodos de extração utilizados para extração de proteína de origem vegetal, embasamento e avanços do aquecimento ôhmico como tecnologia emergente para aplicação em alimentos e pontos principais sobre a coacervação complexa como método de encapsulação de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados. No Capítulo 3 são apresentadas as Metodologias utilizadas para atingir os objetivos descritos no Capítulo 1. As metodologias no item 3.2.1 são referentes às etapas de extração e caracterização, realizadas no Brasil, enquanto que as metodologias apresentadas no item 3.2.2 referem-se as metodologias desenvolvidas na Universidade do Minho, em Portugal. No Capítulo 4 são apresentados os resultados e discussões dos dados obtidos. De forma semelhante ao Capítulo 3 os resultados apresentados no item no item 4.1.1 são referentes às etapas de extração e caracterização dos isolados obtidos, desenvolvido na Unicamp, e os resultados apresentados no item 4.1.2 referem-se aos dados obtidos durante o intercâmbio em Portugal. Capítulo 5 aborda as principais conclusões ao fim da execução deste trabalho. Por fim, o Capítulo 6 apresenta as referências usadas para embasar a revisão bibliográfica e as discussões utilizadas nessa dissertação.

# CAPÍTULO 1

---

*Introdução Geral e Objetivos*

## **1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**

### **1.1 INTRODUÇÃO GERAL**

Por mudanças nos hábitos alimentares, uma significativa parcela da população deseja reduzir ou eliminar o consumo de proteína de origem animal, seja por questões éticas, sociais ou religiosas (BOIRE et al., 2017). Nos últimos anos, o aumento dos adeptos às práticas veganas e vegetarianas levou a indústria de alimentos a buscar novas fontes proteicas antes dominadas pelas fontes animais. Atualmente, 14% da população brasileira declaram-se vegetarianos, sendo que sua maior concentração se encontra nas áreas urbanas principalmente nas capitais (IBOPE, 2018).

As proteínas são moléculas essenciais na dieta humana, responsáveis por manter a massa muscular, respostas imunes, sinalização celular e reparação de células danificadas (GIANCONE et al., 2009). Durante muitos anos, a proteína de origem animal foi vista como a única forma de suprimento efetivo de todos os aminoácidos necessários para o bem-estar humano. Contudo, hoje sabe-se que o consumo excessivo de produtos de origem animal está relacionado a casos de doenças cardiovasculares (CLIFTON, 2011) e obesidade (BUJNOWSKI et al., 2011) devido ao consumo associado de gorduras saturadas e colesterol.

Diante disso, as proteínas de origem vegetal tornaram-se a alternativa mais viável como nova fonte proteica. Existem três tipos principais de fontes proteicas de origem vegetal: leguminosas (lentilha, grão de bico, ervilha, feijões e tremoço), cereais (milho, trigo e arroz) e sementes oleaginosas (soja, amendoim, girassol, canola, linhaça e gergelim). Entretanto, essas proteínas são extremamente sensíveis às etapas de processamento da cadeia produtivas de alimentos, sendo que a desnaturação da proteína está diretamente relacionada com modificação das propriedades funcionais e influência da performance destas na matriz alimentar (LIN et al., 2017).

A lentilha é uma leguminosa originária do sudoeste da Ásia, que vem tornando-se popular devido às pesquisas que relacionam seu consumo a benefícios à saúde, como redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes dentre outras. Assim sendo, hoje a lentilha é a quinta leguminosa mais produzida no mundo sendo que seu consumo aumentou cinco vezes nas últimas décadas e sua área cultivada aumentou 155% nos últimos anos (JOSHI; TIMILSENA; ADHIKARI, 2017).

O principal método de extração de proteínas vegetal é a extração alcalina seguida da precipitação isoelétrica. Nesse método, uma solução de proteína tem seu pH ajustado a um valor elevado para solubilização da proteína e, após a separação da fração insolúvel, a solução tem o seu pH ajustado até o seu ponto isoelétrico que é o ponto de menor solubilidade, fazendo com que as proteínas precipitem (LAM et al., 2018). Métodos de extração associados à extração alcalina vêm sendo utilizados com o intuito de melhorar o rendimento de extração e pureza do isolado produzido. O ultrassom é entendido como as ondas sonoras acima de 20 kHz capazes de gerar cavitação de bolhas. Os efeitos mecânicos do ultrassom são capazes de romper a parede celular do material vegetal e assim ter uma maior penetração para extração do composto alvo (PICÓ, 2013; KADAM et al., 2015; TIWARI, 2015). Hidrólise enzimática, por sua vez, promove a hidrólise dos carboidratos formadores da parede celular liberando componentes que antes encontravam-se presos na célula. A hidrólise enzimática ganhou destaque no campo científico devido às leves condições experimentais que podem gerar produtos mais seguros e com propriedades funcionais e físicas mais específicas (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2008; SUN, 2011; TAVANO, 2013).

Um dos principais desafios da indústria de alimentos é que as proteínas de origem vegetal consigam desempenhar papéis funcionais como solubilidade, capacidade emulsificante e de formação de espuma semelhante ao das proteínas de origem animal. Assim, tecnologias emergentes podem ser utilizadas com o intuito de melhorar essas propriedades. O aquecimento ôhmico é uma tecnologia emergente onde uma corrente elétrica é aplicada ao material biológico e a resistência presente nesse material gera calor. A presença de corrente elétrica e calor podem causar diversas alterações na cadeia peptídica como desdobramentos e exposição de grupos hidrofóbicos (PEREIRA et al., 2018).

As interações proteína-polissacarídeo são responsáveis por melhorar a textura de formulações alimentícias pela formação de géis e filmes; ainda são o fenômeno base para formação de coacervados no processo de encapsulação (NESTERENKO et al., 2013). A coacervação complexa se mostra uma eficiente técnica para encapsulação de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, como o óleo de linhaça, uma vez que são extremamente susceptíveis a oxidação durante o processamento de alimentos (ERATTE et al., 2018).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar alterações na estrutura, funcionalidade e forma de interação para formação de coacervados da proteína de lentilha obtida por extração alcalina associada à pré-tratamentos ou tratadas com aquecimento ôhmico.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência de pré-tratamentos no rendimento de extração proteica devido à associação de ultrassom e tratamento enzimático à extração alcalina, avaliando o efeito do tratamento nas propriedades dos isolados obtidos;
- Avaliar alterações causadas na estrutura secundária (dicroísmo circular) e na estrutura terciária (fluorescência intrínseca e extrínseca) da proteína de lentilha (obtida pelo método alcalino) devido ao tratamento com aquecimento ôhmico e compará-lo com o aquecimento convencional;
- Formar coacervados entre a proteína de lentilha e a pectina;
- Encapsular o óleo de linhaça nos sistemas coacervados obtidos entre a proteína de lentilha e a pectina.

## CAPÍTULO 2

---

*Revisão Bibliográfica*

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LENTILHA

A lentilha (*Lens culinaris*) é uma das culturas leguminosas mais antigas produzidas no mundo, sendo que seu cultivo ocorre principalmente no Canadá, Turquia, Estados Unidos, Austrália e Índia. É consumida em mais de 70 países, geralmente os grãos inteiros, divididos ou descascados na forma cozida. Os grãos de lentilha apresentam formato de lente, com diâmetros variando entre 2 – 9 mm, com superfície lisa tendo como principal carboidrato formador da parede celular a arabinose. Os grãos de lentilha podem assumir uma gama de cores (verde, castanho, marrom, cinza, preto e branco). Os cotilédones, por sua vez, podem assumir coloração amarela, verde e vermelha, sendo as duas últimas as principais variedades presentes no mercado (BHATTY, 1990; SAXENA, 2009; KHAZAEI et al., 2019).

Em média, os grãos de lentilha possuem aproximadamente de 40-50% carboidratos, 20-30% proteínas e < 1% de gordura (CORREA; POLTRONIERI, 2016; SIVA; THAVARAJAH; THAVARAJAH, 2018). O teor proteico da lentilha é composto majoritariamente de proteínas de armazenamento (80%) e proteínas metabólicas em menor quantidade. Proteínas metabólicas são aquelas relacionadas aos mecanismos de defesa da planta. Fazem parte desse grupo as enzimas, inibidores de enzimas e lectinas. Em contrapartida, as proteínas de armazenamento são as responsáveis por fornecer nitrogênio e enxofre a planta durante as etapas de germinação, crescimento e desenvolvimento (JOSHI; TIMILSENA; ADHIKARI, 2017; KHAZAEI et al., 2019).

As proteínas de armazenamento da lentilha são caracterizadas quanto a sua solubilidade em diferentes solventes e suas proporções são influenciadas pelo genótipo da planta. A principal fração encontrada, representando aproximadamente 46,3%, é o grupo das proteínas solúveis em soluções salinas denominadas globulinas. Ainda, foi demonstrado por Danielsson et al. (1950) que esse grupo se encontra dividido em duas classes nas leguminosas: a 7S (vacilina e convacilina) e 11S (legumina) baseado no seu coeficiente de sedimentação. O grupo proteico solúvel em água (albuminas) representa aproximadamente 29,3% das proteínas seguido das proteínas solúveis em soluções ácidas (gluteínas) com 20,3% do total proteico. As sementes podem ainda apresentar, em menores quantidades, proteínas solúveis em etanol (prolaminas ~1,6%) (NEVES; LOURENÇO, 1995; SULIEMAN et al., 2008; BOYE et al., 2010).

## 2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração de proteínas de fontes vegetais é realizada, geralmente, empregando métodos secos ou úmidos (SWANSON, 1990). Os métodos secos como prensagem e classificação por ar são relativamente fáceis e baratos, contudo, apresentam baixo rendimento de extração, gerando concentrados com baixa pureza chegando a conter no máximo 68% de proteínas (TYLER; YOUNGS; SOSULSKI, 1981). Desta forma, o método úmido é o método mais largamente empregado utilizando a solubilização das proteínas em condições ácidas ou alcalinas, podendo gerar isolados com teor proteico acima de 80% de pureza (JARPA-PARRA et al., 2014). Atualmente a associação de tecnologias emergentes à extração alcalina tem como objetivo aumentar o rendimento proteico e as características dos extratos produzidos (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018).

### 2.2.1 Extração Alcalina

A extração proteica em condições ácidas está relacionada com baixos rendimentos de extração devido à degradação ineficiente da parede celular impedindo a difusão das proteínas para o meio aquoso (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018). Diante disso, a extração alcalina tem sido o método de separação proteica mais utilizado devido à alta solubilidade da proteína e preservação de sua estabilidade nestas condições (LAM et al., 2018).

A maior solubilização da proteína em condições alcalinas, pH entre 8,0 e 11, pode estar relacionada à dois fenômenos. O primeiro refere-se ao aumento da carga negativa total superficial da proteína, devido à dissociação do hidrogênio dos grupos carbólicos e sulfatos (SHEN et al., 2008) ou pela neutralização da cadeia lateral dos aminoácidos básicos (GAO et al., 2020). O aumento da carga negativa leva à maior interação proteína-solvente devido ao aumento da repulsão entre as moléculas de proteína. O segundo fenômeno que pode estar relacionado à maior solubilidade proteica em condições alcalinas é devido à alta concentração de íons hidroxila que promovem o inchamento da parede celular, rompendo as ligações intermoleculares da rede de polissacarídeos resultando em uma maior dissolução da proteína para o meio aquoso (BAI et al., 2020).

Em geral, o processo de extração alcalina ocorre em cinco etapas: 1) solubilização das proteínas em condições alcalinas; 2) centrifugação para retirada de componentes não proteicos; 3) precipitação da proteína no ponto isoelétrico; 4) centrifugação para separação das proteínas precipitadas dos demais componentes solúveis e 5) secagem. A

extração alcalina é afetada pelo pH utilizado na etapa de solubilização, tempo de extração, temperatura do sistema, razão biomassa:solvente e tamanho da partícula de sólido (ZLABUR et al., 2018).

A extração das proteínas vegetais pela dissolução em uma solução aquosa de hidróxido de sódio já foi extensivamente estudada. Entretanto, na maioria dos trabalhos o objetivo foi unicamente aumentar o rendimento e a pureza dos isolados produzidos por essa técnica. Para proteína de lentilha diversos estudos são apresentados com otimização dos parâmetros da extração como pH, razão sólido/líquido, temperatura e tipo de solvente (BOYE et al., 2010; JOSHI et al., 2011; JARPA-PARRA et al., 2014, 2015). Todavia ainda são escassos os estudos de aprofundamento na influência do método de extração na funcionalidade da proteína de lentilha.

### 2.2.2 Extração assistida por Ultrassom

O ultrassom é entendido como as ondas sonoras acima de 20 kHz caracterizado por parâmetros como amplitude, frequência, comprimento de onda e coeficiente de atenuação. O ultrassom pode ser dividido em duas classes quanto a sua intensidade diferindo assim a sua aplicação. Ultrassom a baixa intensidade ocorre em frequências de 2 – 100 MHz com intensidade de  $1 \text{ W.cm}^{-2}$ . Uma vez que essa intensidade não é capaz de gerar mudanças químicas e física no material no qual é empregado, sua principal aplicação é na área de diagnósticos na medicina. O ultrassom de alta intensidade ocorre entre as frequências de 18 100 kHz gerando intensidade acima de  $1 \text{ W.cm}^{-2}$ . Alterações causadas nessas condições são utilizadas em várias áreas da tecnologia de alimentos e da biotecnologia (ZLABUR et al., 2018).

Diversos efeitos químicos e físicos como agitação e rarefação, transmissão acústica, cavitação e formação de radicais podem ser associados à aplicação do ultrassom (TIWARI, 2015). A cavitação é o efeito mais significativo quando ondas ultrassônicas são aplicadas em um meio líquido. Devido às ondas longitudinais do campo ultrassônico, são formadas regiões de compressão e rarefação. Nessas regiões, mudanças de pressão ocorrem, induzindo a formação de bolhas de ar. A primeira fase da cavitação é caracterizada pela expansão da bolha devido à difusão do ar. A bolha continua a se expandir até um ponto crítico onde a energia ultrassônica fornecida já não é suficiente para manter a fase vapor dentro da bolha, o que conseqüentemente, promove o rompimento desta. Nessa fase, tem-se a formação de microjatos em condições extremas

de temperatura e pressão. Esses microjatos são os responsáveis pela extração de componentes vegetais devido ao melhoramento da penetração do solvente nas partículas do grão e também a quebra da parede celular (PICÓ, 2013).

Para o processo de otimização da extração assistida por ultrassom, parâmetros como tipo de solvente, condições de sonicação (temperatura e amplitude de sonicação), tempo de tratamento, tamanho da partícula, razão sólido/líquido e condições do meio (temperatura, pressão, viscosidade e tensão superficial) são parâmetros importantes para atingir os efeitos desejáveis do ultrassom (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019).

É importante ressaltar que o ultrassom pode ser utilizado não só como agente melhorador do rendimento da extração proteica, mas também como meio de modificação das proteínas. Estudos descritos na literatura com proteínas de feijão preto (JIANG et al., 2014), soja (HU et al., 2015), trigo (O'SULLIVAN et al., 2016) e arroz (LI et al., 2016b) apresentam resultados promissores para o uso do ultrassom como modificador da estruturas primária, secundária e terciária. Isso porque a aplicação de ultrassom tanto como pré-tratamento da extração alcalina quanto sua aplicação direta isolado proteico final tem demonstrado diminuição no peso molecular das proteínas, alteração nas principais frações proteicas ( $\alpha$ -helice e  $\beta$ -folha) e também no aumento da hidrofobicidade da proteína (JIANG et al., 2014; LI et al., 2016b; O'SULLIVAN et al., 2016; ZHENG et al., 2019). Tais resultados são importantes uma vez que todas essas alterações na cadeia peptídica podem vir a modificar diversas propriedades funcionais como as interações entre proteínas e polissacarídeos.

### 2.2.3 Extração assistida por Enzimas

O processo de extração assistido por enzimas, também tem se mostrado uma alternativa no aumento do rendimento de extração proteicas. Neste método, podem ser adicionadas diferentes enzimas, principalmente das classes carboidrases e proteases. Além do aumento do rendimento, outro efeito associado à extração assistida por enzimas é o baixo dano causado à estrutura proteica (HADNADJEV et al., 2017). Processos assistidos por carboidrases são baseados na ruptura por hidrólise da parede celular devido a ação de enzimas específicas capazes de degradadas celulose, hemicelulose e/ou pectina sendo esses carboidratos os principais formadores da parede celular (PICÓ, 2013). Os principais fatores associados a eficiência dos processos assistidos por enzimas são composição da enzima, concentração da enzima, tamanho de partícula, razão

substrato/solvente e tempo de hidrólise. Ainda, conhecer as propriedades catalíticas, modo de ação e condições ótimas operacional e o tipo de enzima mais adequada para a matéria de parede em questão estão associados a processos de extração mais eficientes (AZMIR et al., 2013; ZLABUR et al., 2018).

As enzimas utilizadas podem ser originárias de diversas fontes naturais como bactérias, fungos, organismos animais ou vegetais e extratos de frutas (PURI; SHARMA; BARROW, 2012). O complexo multienzimático de carboidrases Viscozyme L® produzido pela Sigma é oriunda de *Aspergillus aculeatus*. Esse complexo, composto por celulases, hemicelulase, arabase,  $\beta$ -glucanase e xilanase, possui atividade enzimática declarada pelo fabricante de 100 FBG/g (LI et al., 2014). Este complexo foi escolhido com base na composição da parede celular da lentilha descritas na literatura. Segundo Brummer et al (2015) a parede celular da lentilha é composta majoritariamente por ácido galacturônico e arabinose, que por sua vez, são os principais componentes formadores da pectina.

Extrações utilizando enzimas são associadas com longos tempos de processo, altos custos operacionais, destruição irreversível das interações proteína-polissacarídeo e a necessidade de cuidadosos ajustes de parâmetros de processos (pH e temperatura). Tem como vantagens associadas baixo impacto ambiental além de obtenção de produtos com superior qualidade para o consumo humano (POJIĆ; MIŠAN; TIWARI, 2018).

Diversos artigos na literatura sobre a utilização da extração assistida por enzimas para extração simultânea de óleos e proteínas (ROSENTHAL et al., 2001; HANMOUNGJAI; PYLE; NIRANJAN, 2002; CAMPBELL et al., 2016) ou para extração proteica de resíduos vegetais (TAN et al., 2011; SARI; BRUINS; SANDERS, 2013; DE FIGUEIREDO et al., 2018; GÖRGÜÇ; BIRCAN; YILMAZ, 2019). Ainda, a maioria destes trabalhos tinha como principal objetivo a otimização dos parâmetros de processo para obter o máximo de rendimento de extração de óleo e de proteína. Poucos estudos utilizando extração alcalina assistida por enzimas focam nas modificações nas funcionalidades do isolado proteico produzido. Entretanto estudos realizados por Jung et al. (2006) e Almeida, Moura e Johnson (2014) indicaram alterações no peso molecular, na propriedades emulsificantes, de formação de espuma e na solubilidade da proteína de soja após o tratamento enzimático com carboidrases e proteases, respectivamente. Assim, o processo enzimático pode alterar a estrutura e conseqüentemente as funcionalidades da proteína extraída. Contudo ainda são escassos os estudos que venham avaliar o impacto

desses pré-tratamento na estrutura das proteínas e como essas alterações influenciariam em propriedades como interação proteína-polissacarídeo.

### 2.3 AQUECIMENTO ÔHMICO

As proteínas de origem vegetal se mostram muito sensíveis às condições de extração, processamento e armazenamento quando compara as proteínas animais. A desnaturação das proteínas nessas etapas pode influenciar sua funcionalidade (LIN et al., 2017). Assim alternativas tecnológicas vêm sendo aplicadas com o intuito de melhorar a funcionalidade dessas proteínas. Dentre as metodologias emergentes, a aplicação de campos elétricos moderados (CEM) vem apresentando resultados promissores no melhoramento da funcionalidade de proteínas (MOREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Contudo, a maioria dos trabalhos aplicam os CEM para avaliar a modificação estrutural de proteínas animais, sendo que estudos com proteínas vegetais ainda são escassos, basicamente com proteínas de soja (SHIMOYAMADA et al., 2015; LI et al., 2018)

A aplicação dos CEM ocorre pela passagem de corrente elétrica nos alimentos normalmente entre as voltagens de 1 a 1000 V (MOREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Um dos fenômenos que pode ocorrer durante a aplicação dos CEM é o aquecimento ôhmico (AO) que ocorre quando uma corrente elétrica é aplicada a um material semicondutor (alimentos ou outras matrizes biológicas) e, devido à presença de resistência elétrica nesse material, tem-se a geração de calor. Os benefícios associados a essa tecnologia incluem a ausência de superfícies quentes, aquecimento rápido e uniforme de líquidos e sólidos, alta eficiência energética, simplicidade, além de ser uma tecnologia ambientalmente amigável e com baixos custos de manutenção (MOREIRA et al., 2019).

Apesar da primeira aplicação do AO ter sido com o intuito de substituição dos processos de pasteurização, essa técnica promove mudanças conformacionais e funcionais de importantes macromoléculas presentes nos alimentos, oferecendo novas perspectivas em relação a esses compostos (PEREIRA et al., 2018). Li et al. (2018) avaliaram as mudanças nas propriedades funcionais das proteínas do extrato de soja com tratamento ôhmico em diferentes voltagens, sendo observada diminuição na hidrofobicidade superficial e nos grupos sulfidrila (88% em  $23 \text{ V.cm}^{-1}$ ). Estudos com a proteína  $\beta$ -lactoglobulina demonstram maior acessibilidade dos grupos hidrofóbicos e reatividade dos grupos sulfidrila (RODRIGUES et al., 2019). Tais resultados são

importantes, uma vez que, mudanças na hidrofobicidade e reatividade dos grupos sulfidrilas implicam em importantes alterações na funcionalidade proteica, como as interações estabelecidas por esses grupos com outros componentes presentes na matriz alimentar (RODRIGUES et al., 2019).

Estudos da literatura indicam que outras propriedades também podem ser modificadas após a aplicação do CEM quando há aquecimento ôhmico (SHIMOYAMADA et al., 2015). Li et al. (2018) após aplicarem AO na proteína do extrato de soja e observaram um aumento de 38% na capacidade emulsificante dessas proteínas. Essa propriedade é uma característica importante para diversos processos realizados na indústria de alimentos, como por exemplo os processos de encapsulação de óleos (RAHMATI et al., 2018).

#### 2.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-POLISSACARÍDEO

Proteínas combinadas com outros biopolímeros comestíveis podem melhorar a qualidade sensorial e nutricional dos produtos alimentícios. Quando expostas ao aquecimento, ultrassom, alta pressão, pH extremo ou força elétrica, as proteínas tendem a desnaturar, levando a exposição dos grupos hidrofóbicos (LIN et al., 2017).

Proteínas e polissacarídeos podem interagir, formando complexos por ligações covalente e/ou não covalente (JI et al., 2015). As ligações covalentes ocorrem devido à interações entre os aminoácidos livres da proteína e os aldeídos de açúcares redutores (CAILLARD; REMONDETTO; SUBIRADE, 2009). As ligações não covalentes, entretanto, incluem ligações de hidrogênio e atração eletrostática levando a formação de agregados. Em geral, interações hidrofóbicas são caracterizadas por complexos formados entre proteínas e polissacarídeos não carregados enquanto que, para polissacarídeos aniônicos, os complexos tendem a se formar principalmente por interações eletrostáticas (CHANG et al., 2014).

Quando proteínas e polissacarídeos se encontram em solução, existem três condições de equilíbrio que podem ser alcançadas: miscibilidade, incompatibilidade termodinâmica e coacervação. A formação dos complexos pode seguir duas vias principais: a separação de fase ou a formação de redes sinérgicas (GIANCONE et al., 2009).

Dentre as condições de equilíbrio atingidas pelas proteínas e polissacarídeo em solução, a formação dos complexos é um dos sistemas mais desejados na indústria

farmacêutica e de alimentos, uma vez que os complexos de proteína-polissacarídeo estão envolvidos em processos fisiológicos e encontram importantes aplicações industriais nos processos de micro e nanoencapsulação (DEVI et al., 2017).

#### 2.4.1 Coacervação Complexa

A encapsulação por coacervação vem ganhando espaço na indústria farmacêutica e alimentícia devido à praticidade de aplicação (DEVI et al., 2017). Na coacervação, ocorre a separação de fases de um ou mais hidrocoloides presentes em uma solução inicial, sendo que a fase com maior concentração do agregado é denominada de coacervado, e a outra fase é a solução de equilíbrio composta majoritariamente pelo solvente. A coacervação é dividida em duas classes: simples e complexa, diferindo entre si pelo número de polímeros diferentes presentes na solução (EGHBAL; CHOUDHARY, 2018).

A coacervação complexa ocorre quando dois biopolímeros de cargas opostas interagem entre si, agregando-se e promovendo uma separação de fases resultando em uma fase líquida, rica em solvente, e outra rica em polímeros, o coacervado (DEVI et al., 2017). Atualmente, a combinação de biopolímeros de carga opostas mais utilizadas é a interação proteína-polissacarídeo, isso porque essa interação desempenha um papel de controle da estrutura de alimentos e biomateriais (ELMER et al., 2011).

A coacervação complexa com interação proteína-polissacarídeo já foi testada para algumas proteínas vegetais, como por exemplo, lentilha-goma arábica (ARYEE; NICKERSON, 2012); soja-quitosana (DU et al., 2018) e ervilha- polissacarídeos pécticos comerciais (WARNAKULASURIYA et al., 2018) apresentando resultados muito satisfatórios. Contudo, ainda não foi avaliado uma possível mudança na estrutura da proteína pelo método de extração o que poderia influenciar diretamente a sua interação com os polissacarídeos.

##### 2.4.1.1 Pectina

Um dos fatores que influenciam a coacervação complexa é o biopolímero utilizado (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; EGHBAL; CHOUDHARY, 2018). A pectina é um carboidrato presente naturalmente na parede celular das plantas. É definida quimicamente como éster metilado do ácido poligalacturônico contendo

principalmente resíduos de ácido  $\alpha$ -D galacturônico. É formada por pelo menos 17 tipos diferentes de monossacarídeos como ácido D-galacturônico como componente principal, seguido da D-galactose e L-arabinose. O grau de esterificação está relacionado com a porcentagem de grupos carbonílicos esterificados com metanol dividindo a pectina em alto teor de metoxilação (ATM) e baixo teor de metoxilação (BTM) (REHMAN et al., 2019).

O uso da pectina como material de parede nos processos de encapsulação é promissor devido a diversos benefícios associados a ela como estabilizador de emulsões, propriedades gelificantes, habilidade de ligação, além de ser considerado um ingrediente alimentar seguro (REHMAN et al., 2019). A pectina já foi utilizada como material de parede em diversas técnicas de encapsulação como *spray drying* (MOHAMMADI et al., 2016), geleificação iônica (AGUILAR et al., 2015), nanoemulsões (GUERRA-ROSAS et al., 2016) e coacervação complexa (MOHAMMADI et al., 2016).

Na coacervação complexa, pares de biopolímeros como gelatina-pectina (SILVA; ROCHA; THOMAZINI, 2011) e proteína do soro de leite-pectina (GHASEMI et al., 2017) já foram utilizados para encapsulação de óleos demonstrando altos rendimentos de encapsulação (acima de 80%). Entretanto estudos de substituição das proteínas de origem animal para coacervação com a pectina ainda são escassos.

## 2.5 ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS

A veiculação de compostos lipofílicos como vitaminas (RAIKOS, 2017; MEGHANI et al., 2018; DIMA; DIMA, 2020), carotenoides (ÁLVAREZ-HENAO et al., 2018), compostos bioativos como a curcumina (NAKAGAWA et al., 2011) e ácidos graxos insaturados em óleos nos processos de encapsulação (MELGOSA et al., 2019), é uma estratégia para aumentar a aplicação desses compostos na indústria de alimento.

Óleos essenciais são ingredientes valiosos na indústria de alimentos, têxtil, de perfumaria, cosmética, agrícola e farmacêutica. Contudo esses óleos são geralmente instáveis e sua percepção sensorial pode ser afetada pelos processos da indústria de alimentos como resultado do aquecimento, oxidação, interações químicas e volatilização (XIAO et al., 2013). Além disso, a encapsulação de óleos como do peixe pode ser uma alternativa para mascarar as percepções sensoriais como sabores e odores indesejáveis (RIOS-MERA et al., 2019).

A coacervação complexa é considerada um dos métodos de encapsulação mais simples, baratos, reprodutíveis e eficazes para encapsulação de substâncias hidrofóbicas

como óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (TIMILSENA et al., 2017). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), por sua vez, são ácidos graxos essenciais presentes em peixes marinho, algas e algumas sementes de plantas. Devido a mudança de hábitos alimentares para dietas sem produtos de origem animal PUFA de origem vegetal vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado (ERATTE et al., 2018). Diante disto, o óleo de linhaça foi escolhido como óleo modelo para o estudo da eficiência de encapsulação para coacervados formados como proteínas obtidas por diferentes métodos de extração e a pectina.

O óleo de linhaça contém em sua composição aproximadamente de 45-55% de PUFA  $\omega$ -3 como o ácido alfa linolênico (ALA  $\omega$ -3: 18-3). O óleo de linhaça é obtido por prensagem a frio ou por extração química usando éter de petróleo das sementes *Linus usitatissimum*. Juntamente com o ALA ( $\omega$ -3: 18-3), o óleo de linhaça contém ácidos graxos  $\omega$ -6 [ácido linoléico, (LA,  $\omega$ -6: 18-2)] (8 a 29%) e ácidos graxos  $\omega$ -9 [ácido oleico, ( $\omega$ -9: 18-1)] (12 a 30%). Outras substâncias naturais como lignanas, glicosídeos cianogênicos e peptídeos cíclicos também são relatadas no óleo de linhaça. No entanto, a maior parte das atividades biológicas foi acreditada para os constituintes como ALA ( $\omega$ -3: 18-3) e LA ( $\omega$ -6: 18-2) (KAJLA; SHARMA; SOOD, 2015; YADAV et al., 2018).

# CAPÍTULO 3

---

*Material e Métodos*

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAL**

Lentilha verde importada pela empresa Yoki (São Bernardo do Campo – SP) foi adquirida no mercado local de Campinas – São Paulo. Os grãos foram triturados em um liquidificador com massa (50 g) e tempo (2 min) padronizados para minimizar os efeitos do tamanho das partículas. A farinha resultante apresentou distribuição de tamanho entre 10 e 1000  $\mu\text{m}$ , com distribuição bimodal e diâmetro médio volumétrico ( $D[4,3]$ ) de 356,85. O complexo multi-enzimático Viscozyme L® foi gentilmente cedido pela empresa Novozymes (Consolação – SP). O padrão de massa molecular (massa molecular de 6 – 180 kDa) para a análise de eletroforese foi adquirido da empresa Bio-Rad. Óleo de linhaça usado na análise de tensão e para os processos de encapsulação foi produzido pela empresa Vital Âtman (São José do Rio Preto – SP). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### **3.2 MÉTODOS**

##### **3.2.1 Extração Proteica**

Esta etapa inicial do projeto teve como objetivo identificar as melhores condições de extração da proteína de lentilha. Foram estudados o efeito do pH na extração alcalina, além de tratamentos de ultrassom com diferentes potências e o uso de carboidrases em diferentes concentrações. O rendimento de extração foi usado como parâmetro para determinação da melhor condição de extração.

Com intuito de avaliar a influência da associação dos pré-tratamentos à extração alcalina na estrutura proteica, foram realizadas análises de caracterização como composição centesimal, eletroforese e propriedades térmicas. Já as propriedades funcionais foram avaliadas pelas análises de solubilidade e tensão interfacial.

### 3.2.1.1 Extração Alcalina

Com intuito de avaliar a influência do pH no processo de extração alcalina, duas condições foram testadas (pH 8 e 9). Para isso, seguiu-se a metodologia descrita por Joshi e colaboradores (2011) com adaptações. Farinha de lentilha foi dispersa em água deionizada na proporção de 1:10 (m/m). Então, o pH foi ajustado (8,0 ou 9,0) com solução de NaOH 1M e a mistura foi agitada magneticamente a 25 °C e 600 rpm por 120 minutos. Em seguida, os sólidos insolúveis foram removidos por centrifugação à 10000 rcf por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação das proteínas extraídas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005) com fator de correção de nitrogênio para proteína de 6,25.

A razão entre a quantidade de proteínas extraída foi expressa como rendimento proteico. O rendimento de extração proteica dos isolados obtidos por extração alcalina e extração alcalina assistida por ultrassom foi determinado pela Eq. (1).

$$\% \text{ Rendimento Proteico} = \frac{M_{\text{proteína no sobrenadante}}}{M_{\text{proteína na farinha de lentilha}}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.2.1.2 Extração Alcalina assistida por Ultrassom

Para avaliar a influência da potência de sonicação na extração da proteína de lentilha, foram avaliadas as potências de 150, 300 e 450 W. Farinha de lentilha foi dispersa em água deionizada na proporção de 1:10 (w/w). Então, o pH foi ajustado para 9,0 com solução de NaOH 1M. Uma sonda de titânio de 13 mm de diâmetro foi utilizada para a sonicação da dispersão por 10 minutos, com controle da temperatura por banho de gelo. Após o processo de sonicação, a dispersão foi deixada sob agitação magnética a 25 °C e 600 rpm por 120 minutos para solubilização da proteína. Os sólidos insolúveis foram removidos por centrifugação (10000 rcf por 20 min a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para determinação das proteínas solubilizadas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005) com fator de correção de nitrogênio para proteína de 6,25. A melhor potência foi determinada com base no rendimento proteico calculado pela Equação 1.

### 3.2.1.3 Extração Alcalina assistida por Enzimas

A influência da concentração enzimática foi avaliada considerando a massa de enzima em relação a massa de material sólido iguais a 1%, 2% e 4% (m/m). Para isso, farinha de lentilha foi dispersa em água deionizada na proporção de 1:10 (m/m). Então, o pH foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 1M e a temperatura foi ajustada para a 50 °C. Estas condições de pH e temperatura descrevem a melhor condição de atuação da Viscozyme L, conforme informado pelo fornecedor. Em seguida, a dispersão foi agitada magneticamente a 25 °C e 600 rpm por 120 minutos. Os sólidos insolúveis foram removidos por centrifugação (10000 rcf por 20 min a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005) com fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25. A melhor concentração enzimática foi determinada com base no rendimento proteico calculada a partir da Equação 2.

$$\% \text{ Rendimento Proteico} = \frac{M_{\text{proteína no sobrenadante}} - M_{\text{proteína da enzima}}}{M_{\text{proteína na farinha de lentilha}}} \times 100 \quad (2)$$

#### 3.2.1.4 Obtenção do Isolado Proteico

Após a determinação das melhores condições para extração alcalina (IPL-EA), extração alcalina assistida por ultrassom (IPL-US) e extração alcalina assistida por enzimas (IPL-EZ), os isolados proteicos foram obtidos. Para isso, o sobrenadante rico em proteína solubilizada obtido a partir dos diferentes processos descritos anteriormente, teve seu pH ajustado para 4,2 com solução de HCl 1M, ponto isoelétrico médio para as proteínas da lentilha. Para auxiliar a precipitação das proteínas, a solução foi novamente centrifugada (10000 rcf por 20 min a 4 °C). Após a centrifugação o precipitado foi ressuspendido em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,0, para posterior liofilização.

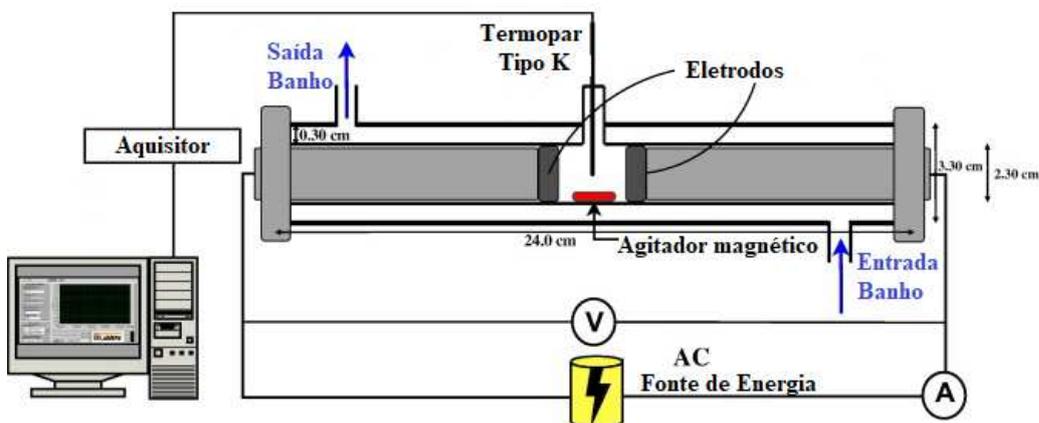
#### 3.2.2 Aquecimento Ôhmico

As amostras obtidas por extração alcalina foram submetidas ao aquecimento ôhmico com o intuito de avaliar a modificação estrutural na proteína de lentilha. Para isso foram estudados diferentes tempos de exposição e intensidades de campo elétrico. Após os tratamentos, alterações na estrutura secundária e terciária foram avaliadas pelas análises de dicroísmo circular e fluorescência (intrínseca e extrínseca), respectivamente.

Soluções proteicas não-tratadas com aquecimento ôhmico denominadas neste trabalho como IPL-EA, foram utilizadas como controles. Todas as modificações causadas pelos tratamentos são discutidas com base nas variações nos espectros de DC e fluorescência do IPL-EA. Os processos denominados como “tratamento convencional” referem-se a soluções proteicas submetidas ao aquecimento sem a presença de campo elétrico.

### 3.2.2.1 Unidade Aquecedora

O reator de aquecimento ôhmico (Figura 1) utilizado neste estudo é composto por um cilindro de vidro encamisado contendo um eletrodo de aço inoxidável isolado em cada lado, como descrito por Rodrigues e colaboradores (2019). A tensão de entrada do sistema foi controlada por um gerador de função (Agilent 33.220 A, Bayan Lepas) conectado a um amplificador (Peavery CS3000) Para os experimentos, um espaço suficiente para acomodar 20 mL de solução foi deixado entre os eletrodos. A temperatura do sistema durante os ensaios de aquecimento ôhmico e convencional foram controlados por um termopar tipo K (Omega Engineering) acoplado a um aquisitor de dados (USB-9161, National Instruments Corporatio). Os resultados foram comparados aos obtidos de amostras de IPL-EA, não submetidas ao tratamento. Ensaios realizados com aquecimento em banho convencional foram utilizados para comparação.



**Figura 1.** Esquema da Unidade de Aquecimento Ôhmico.

**Fonte:** Adaptado de Machado e colaboradores (2010).

### 3.2.2.2 Solução proteica

A solução de proteína de lentilha obtida por extração alcalina para os processos de aquecimento ôhmico e convencional foi obtida pela dissolução do isolado proteico

liofilizado em água destilada (2% m/m). A solução foi deixada sob agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente. Após esse período o pH da solução foi ajustado para 3,0 com solução de NaOH 1M antes de ser inserida no reator. A solução teve seu pH ajustado com bases nos melhores resultados de formação dos coacervados em testes preliminares (item 3.2.3.1).

### 3.2.2.3 Influência do Aquecimento Ôhmico na Estrutura da Proteína

Inicialmente diferentes temperaturas de AO foram analisadas para determinar aquela que promoveria maiores alterações na estrutura proteica. A partir disso, fixando a temperatura, diferentes tempos de exposição foram avaliados para verificar a influência do tempo na modificação da estrutura proteica. Por fim, após a definição da melhor condição de temperatura e tempo de exposição, a influência da intensidade do campo elétrico foi avaliada em três condições: ausência de campo elétrico (tratamento convencional), campo elétrico residual (AO1,  $5 \text{ V.cm}^{-1}$ ) e campo elétrico significativo (AO2, média de  $15 \text{ V.cm}^{-1}$ ). Todas alterações observadas foram discutidas com base nos espectros de DC e fluorescência do IPL-EA (sem nenhum tratamento).

#### 3.2.2.3.1 Temperatura

Soluções de proteína de lentilha foram adicionadas ao reator da unidade de aquecimento e agitadas magneticamente para manter a homogeneidade do sistema. Os ensaios com a presença de campo elétrico foram conduzidos a fim de atingir as temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Alcançada a temperatura desejada, o sistema permaneceu nesta condição por 30 segundos. Após este período alíquotas foram retiradas e resfriadas em banho de gelo para as análises de caracterização. O campo elétrico aplicado para atingir e manter as temperaturas desejadas variaram entre 10 e  $75 \text{ V.cm}^{-1}$ .

#### 3.2.2.3.2 Tempo

Após avaliar o efeito da temperatura, a condição de 80 °C foi utilizada para avaliar a influência do tempo de exposição ao campo elétrico nessa temperatura. Para isso, soluções de proteína de lentilha foram adicionadas ao reator da unidade de aquecimento e agitadas magneticamente para manter a homogeneidade do sistema. O campo elétrico

aplicado para atingir e manter 80 °C variou entre 75 e 10 V.cm<sup>-1</sup>. Após a temperatura ser atingida, o sistema se manteve nessa condição por 30 minutos, sendo que alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 5, 10, 20 e 30 minutos e resfriadas em banho de gelo para as análises de caracterização. Vale ressaltar que o tempo 0 corresponde ao tempo exato em que a solução atingiu 80 °C.

#### 3.2.2.3.3 Intensidade do Campo Elétrico

Soluções contendo 2 % (m/m) de proteína de lentilha foram submetidas a tratamentos térmicos a 80 °C por 20 minutos com diferentes intensidades de campo elétrico. Para avaliar o efeito do campo elétrico, ensaios sem a presença de campo elétrico (convencional) foram realizados pelo aquecimento do reator utilizando um banho na temperatura desejada. A fim de avaliar a influência da intensidade do campo elétrico na proteína, foram analisados dois tratamentos. Para ambos os ensaios a etapa inicial foi a mesma, onde, inicialmente um campo elétrico de 75 V.cm<sup>-1</sup> foi aplicado na solução até atingir a temperatura desejada. Em seguida, para o primeiro tratamento ôhmico (AO1), a tensão de entrada do sistema foi reduzida para o mínimo permitido pelo equipamento com o objetivo de atingir um campo elétrico residual (5 V.cm<sup>-1</sup>) e a temperatura foi controlada majoritariamente pela passagem de água a 80 °C na camisa do reator. Para o segundo tratamento ôhmico (AO2), a tensão de entrada foi variada com o intuito de manter a temperatura desejada constante, sendo que o campo elétrico necessário para isto variou entre 20 e 10 V.cm<sup>-1</sup>. Amostras não tratadas foram utilizadas como controle.

### 3.2.3 Produção dos Coacervados

#### 3.2.3.1 Determinação das Melhores Condições de Coacervação

Inicialmente preparou-se uma solução estoque de todos os isolados proteicos isolados proteicos de lentilha (IPL-EA; IPL-US e IPL-EZ) e da pectina na concentração de 2%. Em seguida soluções de proteína e pectina foram misturadas na proporção de 1:1 (m/m) e o pH da mistura foi então ajustado para 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4,5 e 5. As amostras foram avaliadas em função da quantidade de complexos formados, o que foi determinada através de análise visual e por ensaios de densidade ótica a 600 nm por espectrofotometria (ARYEE; NICKERSON, 2012). Após a determinação do melhor pH de formação dos

coacervados, foram avaliadas diferentes razões entre proteína:polissacarídeo (1:1; 1:2; 1:3; 2:1 e 3:1, m/m). A razão que resultou na maior quantidade de complexos formados (análise visual e ensaios de densidade ótica a 600 nm) foi utilizada para a encapsulação do óleo de linhaça.

### 3.2.3.2 Encapsulação do óleo de linhaça

A melhor condição (pH e proporção de biopolímeros) para formação dos coacervados (item 3.2.3.1) foi utilizada para encapsulação do óleo de linhaça. Para a encapsulação do óleo de linhaça, foram testadas 3 razões biopolímero:óleo (1:1; 1:0,5 e 1:0,25 m/m). As micropartículas de coacervados foram preparadas seguindo a metodologia descrita por Xiao e colaboradores (2019), com adaptações. Inicialmente, foi realizada a formação de uma emulsão entre o isolado proteico e o óleo de linhaça sob agitação a 13000 rpm durante 4 minutos em sistema rotor estator (T18, IKA). Posteriormente, sob agitação magnética foi adicionada a solução aquosa de polissacarídeo à solução proteica e o pH da mistura foi ajustado até o pH ótimo para obtenção dos coacervados. Os sistemas coacervados foram deixados sob refrigeração por 24 horas para a separação de fases. Após este período, os coacervados foram separados por filtração e secos por liofilização para avaliação das interações por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e eficiência de encapsulação

### 3.2.3.3 Influência do Aquecimento Ôhmico na Formação dos Coacervados

Micropartículas de coacervados preparadas com proteínas submetidas ao tratamento ôhmico foram produzidas seguindo a metodologia descrita por Xiao e colaboradores (2019), com algumas modificações. Após aplicação do aquecimento térmico convencional, AO1 ou AO2, 10 mL foram coletados e resfriados em banho de gelo. Após o resfriamento foi adicionada solução de pectina (10 mL) e ajustado o pH (3,0). Os outros 10 mL restantes ainda a 80 °C foram misturados com pectina (10 mL) no interior do reator e resfriados em banho de gelo para posterior ajuste do pH (3,0). Soluções proteicas não tratadas foram utilizadas para a produção de coacervados controle.

O sistema contendo os coacervados e a fase de equilíbrio foram filtrados e os coacervados foram liofilizados para caracterização por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FITR).

### 3.2.4. Análises

Os isolados proteicos obtidos por extração alcalina, extração assistida por ultrassom e assistidas por enzimas foram caracterizados em relação a composição centesimal, eletroforese, potencial zeta e propriedades térmicas. Além disso, os isolados foram caracterizados quanto a funcionalidade pelas análises de solubilidade e tensão interfacial.

#### 3.2.4.1 Caracterização do Isolados Proteicos

##### 3.2.4.1.1 Composição Centesimal

Os isolados proteicos de lentilha e a farinha de lentilha foram caracterizados em relação a sua composição usando métodos oficiais. O conteúdo de proteínas foi determinado pela metodologia micro-Kjeldahl (AOAC, 2005) utilizando como fator de 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína. O teor de gordura foi determinado por Bligh e Dyer (1959). Umidade foi determinada pela secagem de 5 g de amostra a 105 ° C até peso constante (AOAC, 2005). Em seguida, esta amostra foi incinerada para determinação do teor de cinzas. Os carboidratos solúveis foram determinados seguindo a metodologia descrita por Dubois e colaboradores (1956) e as fibras foram determinadas por diferença.

##### 3.2.4.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os perfis de massa molecular dos isolados proteicos foram determinados usando a metodologia SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). O gel utilizado era composto 6% (m / v) de acrilamida no gel de empacotamento e 12% (m / v) de acrilamida no gel de resolução. As amostras foram diluídas em um tampão contendo Tris-HCl 1,25 mM (pH 6,8), glicerol a 20%, azul de bromofenol a 0,04% e SDS a 4%. Para condições redutoras, 5% (v / v) de  $\beta$ -mecarptoetanol foi adicionado ao tampão usado para diluir a amostra. Em seguida, as amostras foram aquecidas (95 ° C por 4 min) para a desnaturação proteica. A corrida foi realizada a 110 V e incluiu marcadores de alto massa molecular. Os géis foram corados com solução de coloração (Comassie Blue Brilliant (Sigma Chemical) a 0,25%

(p / v) em etanol a 45% (v / v), 10% (v / v) de ácido acético e 45% (v / v) de água deionizada) e descorados com solução contendo etanol a 10% (v / v), ácido acético a 5% (v / v) e água deionizada a 85%.(v / v).

#### 3.2.4.1.3 Zeta Potencial

A medida do potencial zeta dos isolados proteicos em função do pH foi determinada usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument), equipado com um Autotitulado MPT-2 (Malvern Instrument). Soluções proteicas (0,1% m/m) foram preparadas e deixadas sob agitação a 25 °C por 30 min. O potencial zeta foi calculado a partir da mobilidade eletroforética usando a equação de Henry e a aproximação de Smoluchnowski. Todas as medições foram realizadas a 25 °C.

#### 3.2.4.1.4 Solubilidade

O perfil de solubilidade dos isolados proteicos foi determinado de acordo com a metodologia de Morr e colaboradores (1985) com pequenas modificações. 25 mg de isolado proteico foram dispersos em 25 mL de água deionizada. O pH das dispersões foram ajustadas para 2, 4, 7 ou 9 com NaOH 1 M ou HCl 1 M e agitadas a 25 °C por 1 h. Em seguida, as dispersões foram centrifugadas a 1000 rcf por 20 min a 4 °C. A massa de proteína presente no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando uma curva padrão de albumina de soro bovino construída previamente. A solubilidade foi calculada como a razão percentual de proteína no sobrenadante em relação à proteína total na amostra inicial. O perfil de solubilidade foi obtido por plotagem da solubilidade média da proteína em função do pH, determinada em duplicata.

#### 3.2.4.1.5 Calorimetria Diferencia de Varredura (DSC)

As transições térmicas dos isolados proteicos foi examinada por análise de DSC usando 2920 Modulated (TA Instruments). Para cada IPL, aproximadamente 6 mg da amostra foram pesados em uma cápsula de alumínio e esta foi hermeticamente selada e aquecida de 20 a 140 °C a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Uma panela vazia selada foi usada como referência.

#### 3.2.4.1.6 Tensão Interfacial

A tensão interfacial entre isolados proteicos (0,1% m/m) e óleo de linhaça foi determinada usando um tensiômetro Tracker-S (Teclis). O método da gota ascendente foi utilizado, no qual foi injetado óleo com auxílio de uma seringa na fase aquosa. As medidas de tensão interfacial entre água deionizada e óleo foram usadas como controle. Todas as medidas foram realizadas em duplicata e a 25 ° C por 3000 segundos.

#### 3.2.4.2 Caracterização das Soluções Proteicas Tratadas com Aquecimento Ôhmico

As amostras tratadas ou não (IPL-EA) foram caracterizadas em relação a estrutura secundária e terciária a partir das análises de dicróismo circular e fluorescência do triptofano e acessibilidade de grupos hidrofóbicos.

##### 3.2.4.2.1 Fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados em um fluorímetro Aqualog (HOBIBA). A fluorescência intrínseca das soluções proteicas tratadas pelo aquecimento ôhmico, convencional e não-tratadas foi determinada pela excitação do triptofano nas amostras a 280 nm e a emissão em 300 a 450 nm. A acessibilidade de sítios hidrofóbicos foi determinada através da adição de ácido 1-Anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS). Para isso, 100 µL de uma solução de ANS foram homogeneizados com 3 mL da solução contendo soluções proteicas tratadas pelo aquecimento ôhmico, convencional e não-tratadas e deixadas reagir por 30 minutos. O complexo ANS-proteína foi determinado pela excitação do complexo em 370 nm e quantificação da emissão em 400 a 650 nm (RODRIGUES et al., 2019).

##### 3.2.4.2.2 Dicroísmo Circular (DC)

Os espectros de DC foram obtidos em um espectrofotômetro (Jasco Inc) entre 260 e 190 nm a 25 °C, usando uma cubeta de quartzo de 1 mm. Os parâmetros experimentais

foram: 1 nm de largura de banda; 0,5 nm de passo entre os dados, velocidade da corrida de 50 nm.min<sup>-1</sup>, resposta D.I.T. de 1s.

### 3.2.4.3 Caracterização dos Coacervados

Os coacervados produzidos com os isolados proteicos obtidos por diferentes métodos e pelo isolado proteico extraído por extração alcalina tratadas pelo aquecimento ôhmico e convencional foram caracterizados por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A eficiência de encapsulação foi utilizada como parâmetro para avaliar a influência do processo de obtenção do isolado proteico de lentilha na retenção de óleo de linhaça dentro do coacervado.

#### 3.2.4.3.1 Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para investigar as interações entre a proteína de lentilha e o polissacarídeo, foi utilizado o método espectrofotométrico FTIR. Os espectros de infravermelho dos compostos individuais (pectina e isolado proteico) e das formulações de complexos foram obtidos utilizando espectrofotômetro (modelo IR Prestige-21). Inicialmente, as amostras secas foram dispersas em KBr na proporção de 1:100 (amostra:KBr) e o pó resultante foi colocado em um molde de 13 mm e pressionado empregando uma prensa hidráulica (Modelo SSP-10<sup>a</sup>) conectada a uma bomba a vácuo. Utilizou-se uma força de 80 kN por 10 minutos para a formação da pastilha. Em seguida a pastilha foi acoplada ao porta amostra do espectrofotômetro para obtenção dos espectros.

#### 3.2.4.3.2 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da determinação do óleo superficial das partículas liofilizadas e do óleo total presente no sistema. Para isso seguiu-se a metodologia descrita por Karaca, Nickerson e Low (2013) com adaptações. Para o óleo superficial, 1 g de partícula foi dispersa em 30 ml de hexano mediante a agitação vigorosa por 30 segundos. O solvente foi filtrado (papel Whatman n°1) em um béquer de vidro previamente tratado em estufa a 105 °C e deixado na capela durante uma noite para evaporação do solvente. Em seguida, o hexano residual foi retirado pelo aquecimento da

amostra a 105 °C em estufa com circulação de ar e a massa de óleo superficial foi determinado por gravimetria. Para a determinação do óleo total do sistema, 1 g de amostra foi dispersa em 4 mL de água destilada. Com o intuito de romper a interação proteína-polissacarídeo o pH do sistema foi ajustado para 5, pH este onde não há interação entre os dois biopolímeros determinada no item 3.2.3.1. A solução resultante foi então misturada com 25 mL de uma mistura de hexano:isopropanol (3:1 v/v) e agitada por 15 minutos e posteriormente centrifugada à 1000 rcf por 20 min a 4 °C. A fase orgânica clara foi filtrada através sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o solvente foi evaporado durante a noite na capela em um béquer previamente tratado a 105 °C para remoção da umidade. Em seguida, o hexano residual foi retirado pelo aquecimento da amostra à 105 °C em estufa com circulação de ar e a massa de óleo total foi determinado por gravimetria.

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada pela Eq. (3).

$$(\%)EE = \left[ \frac{(\text{óleo total} - \text{óleo superficial})}{\text{óleo total}} \right] \times 100 \quad (3)$$

### 3.2.5 Análise Estatística

Todos os experimentos de extração foram realizados em triplicata e a análises de caracterização em duplicata. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP). Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Tukey ( $p < 0,05$ ) ou Teste t ( $p < 0,05$ ) foi usada para determinar diferenças estatísticas entre as médias no *software* SISVAR (*Computer Statistical Analysis System*).

# CAPÍTULO 4

---

*Resultados e Discussões*

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DE LENTILHA

#### 4.1.1 Efeito do pH no Rendimento da Extração Proteica

Deve-se considerar que, de forma geral, as proteínas presentes na parede vegetal são pouco solúveis em água devido à sua natureza hidrofóbica e interação entre as moléculas de proteína pelas pontes dissulfeto (SHEN et al., 2008). Assim, condições alcalinas vêm sendo utilizadas como uma eficiente estratégia para extração das proteínas de matrizes vegetais (SHEN et al., 2008). A maior solubilização das proteínas em condições alcalinas, deve-se principalmente ao aumento da carga negativa total da proteína melhorando, assim, a interação proteína-solvente (SHEN et al., 2008; GAO et al., 2020). Dentre as condições alcalinas utilizadas não foram observadas diferenças no rendimento das proteínas solubilizadas no sobrenadante.

**Tabela 1.** Efeito do pH no rendimento proteico.

Valor de pH	Rendimento Proteico* (%)
pH 8,0	57,66 <sup>a</sup> ± 6,68
pH 9,0	61,73 <sup>a</sup> ± 3,63

\* Todos os dados foram expressos como média de três repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo Teste t.

Estudos realizados com diversas matrizes vegetais, incluindo a lentilha, têm demonstrado que extrações alcalinas conduzidas entre pH 9,0 e 10 promovem a maior recuperação de proteína (BOYE et al., 2010; JOSHI et al., 2011; JARPA-PARRA et al., 2014). Sendo assim, o pH 9,0 foi selecionado para etapa de solubilização das proteínas nos demais processos de extração estudados (assistidos por enzimas e ultrassom).

#### 4.1.2 Efeito da Potência no Rendimento da Extração Proteica

Com o intuito de avaliar o efeito do tratamento ultrassônico no rendimento de extração das proteínas de lentilha (Tabela 2), a potência da sonicação variou de 150 a 450

W. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os processos assistidos por ultrassom, nem entre amostras sonicadas e o controle (extração alcalina, pH 9).

**Tabela 2.** Efeito da potência no rendimento proteico.

Potência (W)	Rendimento Proteico * (%)
Controle	61,73 <sup>a</sup> ± 3,63
150	62,69 <sup>a</sup> ± 7,90
300	64,20 <sup>a</sup> ± 6,98
450	62,38 <sup>a</sup> ± 2,22

\* Todos os dados foram expressos como média de três repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Controle corresponde ao processo de extração alcalina em pH 9,0.

Embora as extrações assistidas por ultrassom estejam associadas a rendimentos de extração mais altos na literatura (GÖRGÜÇ; BIRCAN; YILMAZ, 2019), não observou-se diferença entre os rendimento de extração de proteínas obtidas com a aplicação do ultrassom em diferentes potências ou sem a aplicação deste pré-tratamento. O aumento da temperatura da solução proteica neste trabalho (valor final de temperatura ~39°C; ~52 °C e ~60°C para as potências de 150, 300 e 400W, respectivamente), mesmo com a utilização de banho de gelo, pode ter sido responsável por prejudicar os possíveis efeitos positivos relacionados a sonicação. A aplicação do ultrassom pode aumentar o rendimento da extração de proteínas, principalmente devido aos efeitos da cavitação que melhoram a transferência de massa pela quebra da parede celular e liberação dos compostos incorporados na matriz (TIWARI, 2015). No entanto, o aumento da temperatura associado ao processo de sonicação tem influência direta no efeito da cavitação devido a mudança na pressão do vapor, que por sua vez, influencia a força com a qual ocorrerá colapso da bolha da cavitação. Altas temperaturas aumentam a pressão de vapor o que pode causar o enchimento da bolha com água e resultar em colapso suave, sem força suficiente para quebrar a parede celular (ELDIN et al., 2018). Além disso, altas temperaturas também podem favorecer a formação de agregados proteicos e a precipitação destes durante a etapa de solubilização, reduzindo a quantidade de proteína solubilizada (NICOLAI; BRITTEN; SCHMITT, 2011).

Para estudos futuros, os efeitos indesejados da temperatura poderiam ser minimizados otimizando outros parâmetros relevantes para a extração assistida por ultrassom. Esses parâmetros incluem tipo de solvente, condições de irradiação

(temperatura e amplitude), tempo, pH, tamanho de partícula e razão sólido/solvente (ALBERO; TADEO; PÉREZ, 2019).

Como não foram observadas diferenças significativas no rendimento de proteínas solubilizadas entre os três tratamentos assistidos por ultrassom, a menor potência avaliada (150 W) foi selecionada para obtenção do isolado proteico em pó e caracterização em relação a suas propriedades físico-químicas e funcionais.

#### 4.1.3 Efeito da Concentração Enzimática no Rendimento Proteico

A influência da concentração enzimática no rendimento da extração de proteínas foi verificada variando a concentração de 1 a 4% (m/m) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito da Concentração Enzimática no Rendimento Proteico.

Concentração Enzimática* (%)	Rendimento Proteico** (%)
Controle	61,73 <sup>a</sup> ± 3,63
1	65,93 <sup>a</sup> ± 5,48
2	61,67 <sup>a</sup> ± 3,46
4	61,55 <sup>a</sup> ± 4,01

\* Todos os dados foram expressos como média de três repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Neste estudo as condições ótimas de enzimas utilizadas seguiram as condições ideais (pH e temperatura) descritas pelo fornecedor. Nessas condições não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos enzimáticos nem entre os tratamentos e o controle (extração alcalina, pH 9). Estudos indicam que o uso de combinações enzimáticas como protease e celulasas pode aumentar o rendimento da extração quando comparado a processos que aplicam uma única enzima devido à complexidade da ligação da proteína com os componentes da matriz celular (ROSENTHAL et al., 2001). Além disso pode ter ocorrido a degradação da parede celular pela ação enzimática, mas a degradação foi limitada e não alterou a dissolução nem a transferência de moléculas aprisionadas na matriz celular, conforme observado por Campbell et al. (2016) na extração de proteínas da torta de girassol. Ainda, efeitos como a presença de enzima livre em solução ou inibição competitiva pela liberação dos compostos da matriz celular podem ter contribuído para anulação dos efeitos positivos de extração pelo processo enzimático (SHEN et al., 2008).

Como não foram observadas diferenças significativas no rendimento de proteínas solubilizadas no sobrenadante para os três tratamentos assistidos por enzimas, a menor concentração enzimática avaliada (1% enzima/substrato) foi selecionada para obtenção do isolado proteico em pó e caracterização em relação a suas propriedades físico-químicas e funcionais.

#### 4.1.4 Composição dos Isolados Proteicos de Lentilha

A composição centesimal da farinha de lentilha e dos IPL é apresentada na Tabela 4. Embora não tenha sido observada diferenças significativas no rendimento da quantidade de proteínas solubilizada na primeira etapa do trabalho, os isolados proteicos na forma de pó IPL-EA e IPL-EZ apresentaram maior teor proteico do que a IPL-US. Isso indica que as proteínas de lentilha são altamente solúveis em condições alcalinas o que leva a sua liberação, independente da presença de pré-tratamentos (JOSHI et al., 2011; JARPA-PARRA et al., 2015).

**Tabela 4.** Composição Centesimal da Farinha de Lentilha e dos Isolados Proteicos em base seca.

Componente	Farinha de Lentilha	IPL-EA	IPL-EZ	IPL-US
Proteína	28,08 ± 0,72	83,86 <sup>a</sup> ± 0,72	84,76 <sup>a</sup> ± 1,39	78,21 <sup>b</sup> ± 1,22
Carboidrato	18,06 ± 0,23	6,21 <sup>b</sup> ± 0,06	5,50 <sup>c</sup> ± 0,12	6,93 <sup>a</sup> ± 0,03
Lipídeos	2,90 ± 0,44	5,86 <sup>a</sup> ± 0,64	5,52 <sup>a</sup> ± 0,02	7,20 <sup>a</sup> ± 0,75
Cinzas	1,75 ± 0,15	4,31 <sup>a</sup> ± 0,31	5,76 <sup>b</sup> ± 0,13	5,3 <sup>b</sup> ± 0,02
Fibras	48,27 ± 0,87	-	-	2,15 ± 1,43

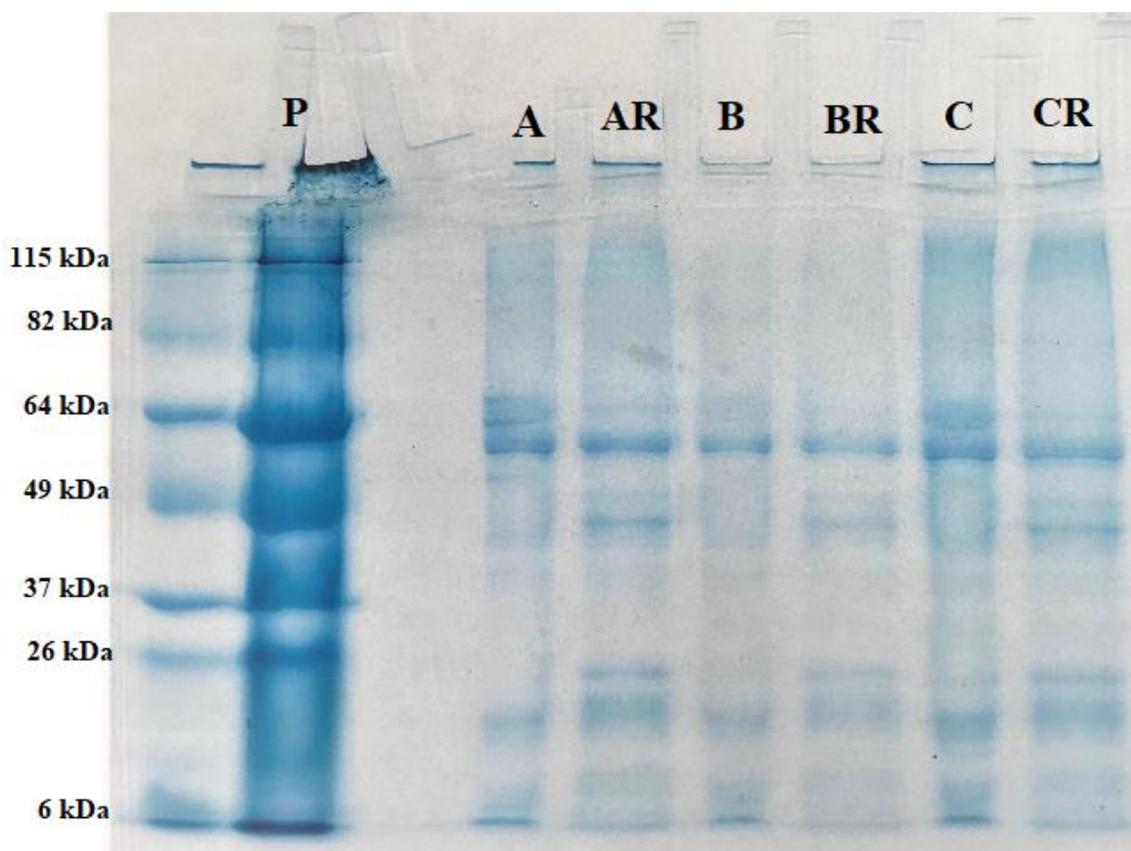
\* Todos os dados foram expressos como média de três repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. IPL-EA: Isolado Proteico obtido por extração alcalina; IPL-EZ: Isolado proteico obtido por extração alcalina assistida por enzima; IPL-US: Isolado proteico obtido por extração alcalina assistida por ultrassom.

Diferenças significativas no conteúdo de carboidratos solúveis foram observadas dependendo do pré-tratamento aplicado. Apesar da Viscozyme L ser uma carbohidrase com alta especificidade à arabinose, que por sua vez, encontra-se em grande proporção na parede celular da lentilha, IPL-EZ foi o tratamento que apresentou menor teor de carboidratos solúveis. Esses resultados indicam que essa enzima não foi eficiente na quebra dos polissacarídeos da parede celular da lentilha em carboidratos solúveis. Já o maior teor de carboidratos solúveis foi atribuído a amostra obtida por extração assistida por ultrassom provavelmente devido à ruptura da parede celular pela cavitação.

É possível observar que o processo de extração assistido por ultrassom levou à maior solubilização de outros compostos, além da proteína, como carboidratos e lipídeos quando comparado com os outros processos de extração avaliados. Esse efeito também foi observado por Byanju et al (2020), que utilizaram ultrassom como pré-tratamento da extração alcalina de proteínas de feijão e grão-de-bico. Esses autores observaram que a sonicação levou à extração de outros componentes como lipídeos, açúcares e iso-flavonoides, diminuindo o teor de proteína presentes no isolado proteico em comparação com o processo controle (alcalino).

#### 4.1.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A Figura 2 apresenta a eletroforese em condições redutoras e não redutoras para os IPL obtidos pelos três processos de extração avaliados no presente estudo. Não foram observadas diferenças nos perfis de SDS-PAGE entre os diferentes processos de extração indicando que o pré-tratamento não foi capaz de clivar a proteínas em subunidade de menor peso molecular.



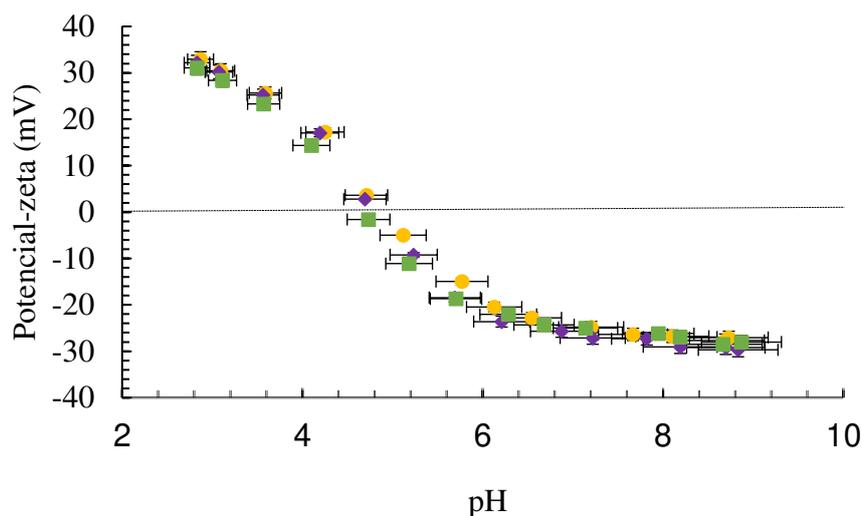
**Figura 2.** Gel de eletroforese (SDS-PAGE) para os ISP. P: padrão; A: IPL-EA não-redutor; AR: IPL-EA redutor; B: IPL-EZ não-redutor; BR: IPL-EZ redutor; C: IPL-US não-redutor; CR: IPL-US redutor.

Em condições não redutoras (colunas A, B e C), é possível observar bandas com aproximadamente 64 kDa e bandas entre 15 e 19 kDa. As bandas presentes entre 15 e 19 kDa podem ser a gama-vicilina ou polipeptídios liberados devido a quebras das proteínas de armazenamento devido ao tratamento alcalino (GHUMMAN; KAUR; SINGH, 2016). Já as bandas por volta de 64 kDa provavelmente se referem à uma das subunidades da legumina. A legumina é a principal fração proteica presente na lentilha, apresentando-se como um hexâmetro de alto peso molecular (~320-380 kDa). Os seis pares de peptídeos do hexamero são ligados por interações não-covalente, sendo que cada um dos pares possui uma subunidade ácida (~40 kDa) e uma sub-unidade básica (20kDa), ligadas por ligação dissulfeto (JARPA-PARRA et al., 2015).

Avaliação das bandas observadas em condições redutoras (coluna AR, BR e CR) indica o desaparecimento parcial da banda referente às sub-unidades da legumina (64 kDa) e o aparecimento de bandas próximas a 49 kDa. As condições redutoras promovem ruptura da ligação dissulfeto (BARBANA; BOYE, 2011), responsável pela ligação da cadeia  $\alpha$ -ácida (40 kDa) e  $\beta$ -básica (20 kDa) de cada subunidade do hexamero da legumina (JARPA-PARRA et al., 2015).

#### 4.1.5 Potencial-Zeta

A variação do potencial zeta em função do pH é apresentada na Figura 3. Todas as amostras exibiram perfis semelhantes de potencial zeta e nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) foi observada na condição de carga nula para os isolados obtidos dos diferentes processos (Tabela 5), que se manteve em torno de 4,6 – 4,8 nas condições estudadas.



**Figura 3.** Perfil do potencial zeta em função do pH para os isolados proteicos obtidos pela extração alcalina (IPL-EA, ●), assistida por enzimas (IPL-EZ, ▲) e por ultrassom (IPL-U ■).

O potencial zeta dos IPL foi afetado pela variação do pH, devido à protonação gradual dos grupos carboxila, desprotonação dos grupos amino e/ou ionização dos grupos laterais dos aminoácidos presentes na cadeia peptídica (TANG; SUN, 2011). Independentemente do método de extração, o potencial zeta da proteína de lentilha isolada variou de + 31,8 mV a - 27,6 mV, com o aumento do pH de 2 a 8, respectivamente. Tais resultados indicam que a adição de pré-tratamentos à extração alcalina não causa alterações na carga superficial da cadeia peptídica. Jarpa-Parra e colaboradores (2014) estudaram a influência do pH na extração de proteínas da farinha de lentilha e observaram perfis zeta semelhantes e condições de carga neutra para todas as amostras e semelhante aos valores relatados neste trabalho.

**Tabela 5.** Condição de pH na qual os isolados proteicos obtidos apresentaram carga nula.

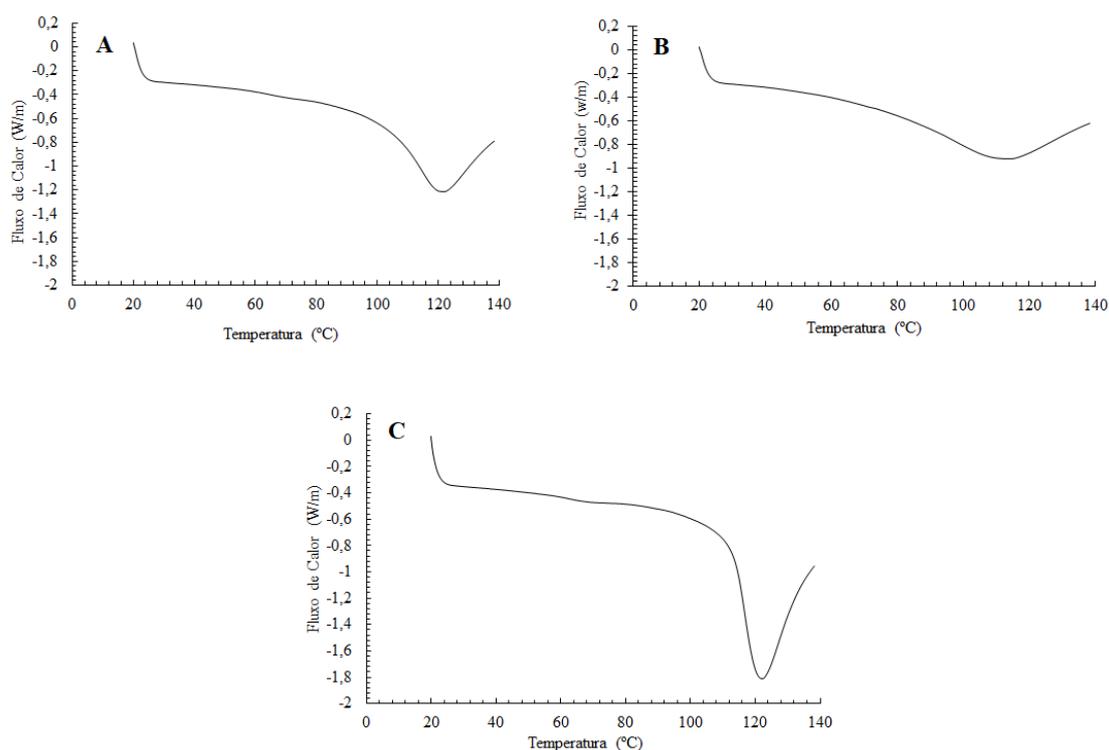
IPL	pH para condição de carga nula*
IPL-EA	4,82 <sup>a</sup> ± 0,007
IPL-EZ	4,77 <sup>a</sup> ± 0,07
IPL-US	4,61 <sup>a</sup> ± 0,007

\* Todos os dados foram expressos como média de três repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras sobrescritas diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. IPL-EA: Isolado Proteico obtido por extração alcalina; IPL-EZ: Isolado proteico obtido por extração alcalina assistida por enzima; IPL-US: Isolado proteico obtido por extração alcalina assistida por ultrassom.

#### 4.1.8 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Por meio da análise de DSC é possível determinar a temperatura de desnaturação  $T_d$  relacionada a estabilidade da proteína ao calor e a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) que pode ser correlacionado com o grau de organização da estrutura secundária da proteína (KOSHIYAMA; HAMANO; FUKUSHIMA, 1981). Assim as propriedades térmicas dos IPL, avaliadas pela análise DSC, são apresentadas na Figura 4.

Picos endotérmicos entre 120-122 °C (Tabela 6) são observados para todas as amostras, indicando que essa fração consiste de uma única espécie de proteína ou de várias espécies com termoestabilidade semelhantes. Esse pico é geralmente atribuído à desnaturação térmica das globulinas e normalmente possui alto valor de temperatura associado (AHMED; VARSHNEY; RAMASWAMY, 2009) refletindo a ruptura das ligações de hidrogênio que mantêm as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas (TANG; SUN, 2011).



**Figura 4.** Termogramas para os IPL. A: IPL-EA; B: IPL-EZ; C: IPL-US.

A alta temperatura de desnaturação encontrada para a proteína da lentilha, independentemente do método de extração, é derivada da alta estabilidade térmica da globulina. A principal globulina presente na proteína da lentilha é a legumina, que por

sua vez, é um hexâmero altamente compacto que mostra alta estabilidade térmica (LADJAL-ETTOUMI et al., 2016; KHAZAEI et al., 2019).

Apesar da temperatura de desnaturação ser semelhante para todos os isolados proteicos, o valor da energia associada ( $\Delta H$ ) ao pico de desnaturação térmica é diferente dependendo do processo de extração aplicado (Tabela 6).

O IPL-EA apresentou a menor entalpia de desnaturação indicando que a proteína proveniente do processo alcalino sofreu certo grau de desnaturação devido a exposição ao pH e requer menos energia para se desnaturar (LEE et al., 2007). Apesar da solubilização em pH 9,0 ocorrer para todos os processos de extração (assistidos por ultrassom e enzimas), os processos auxiliares promovem alterações na estrutura das proteínas, deixando está mais resistente à desnaturação em condições alcalinas.

O IPL-EZ, por outro lado, apresentou um valor de  $\Delta H$  intermediário entre os isolados avaliados. Contudo, o pico associado a este isolado mostra-se mais largo que os demais (IPL-EA e IPL-US) o que pode ser atribuído ao desdobramento pela repulsão entre as cargas positivas da proteína (MARTÍNEZ; AÑÓN, 1996).

Por fim, o IPL-US é o isolado proteico com pico com maior energia associada. A maior amplitude do pico em comparação aos demais isolados (IPL-EA e IPL-EZ) pode indicar a maior cooperatividade no processo de desnaturação térmica devido a presença dos oligômeros (MARTÍNEZ; AÑÓN, 1996).

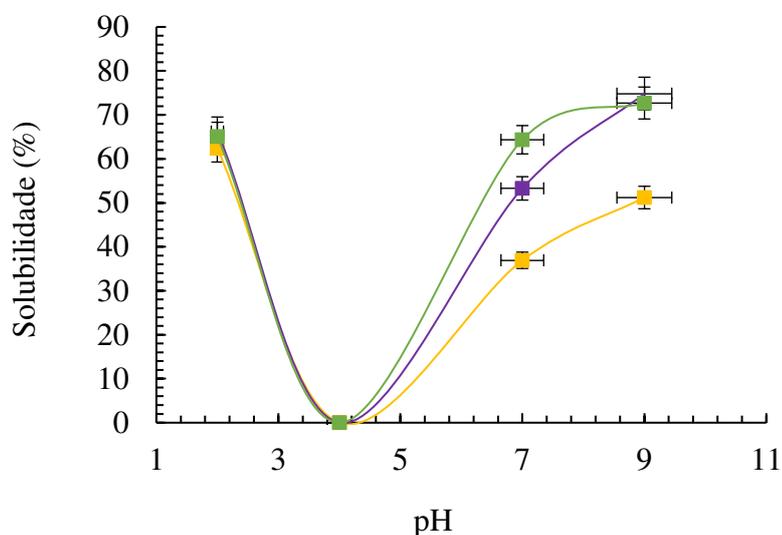
**Tabela 6.** Valores de entalpia e temperaturas de transição para os isolados proteicos.

Amostra	$\Delta H$ (J.g <sup>-1</sup> )	<i>Tonset</i> (°C)	Td (°C)
IPL-EA	39,72	106,30	120,34
IPL-EZ	75,24	113,74	122,00
IPL-US	84,69	115,67	122,44

#### 4.1.6 Perfil de Solubilidade

A solubilidade (Figura 5) para todos os IPL mostra-se dependente do pH. Dentro dos valores de pH avaliados, a menor solubilidade foi observada na região próxima ao pH 4, condição essa em que as proteínas apresentam valores de potencial zeta mais próximos da neutralidade (pH 4-5), favorecendo interações eletrostáticas proteína-proteína. A maior solubilidade foi observada em pH 2 (altamente ácido) e 9 (altamente alcalino). Nessas condições, a proteína apresenta maior carga líquida positiva e negativa,

respectivamente, responsável por maiores interações proteína-água (LADJAL ETTOUMI; CHIBANE; ROMERO, 2016).

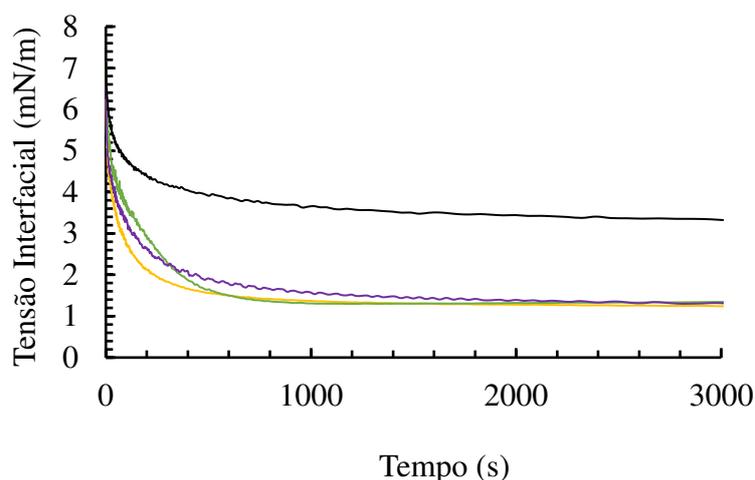


**Figura 5.** Perfil de Solubilidade para os IPL em Função do Ph para os isolados proteicos obtidos por extração alcalina (IPL-EA, — ), assistida por carboidrases (IPL-EZ, — ), por ultrassom (IPL-US, — ).

Nas condições neutra (pH 7) e alcalina (pH 9), é possível observar diferenças na solubilidade das proteínas extraídas. As proteínas presentes no IPL-US apresentaram maior solubilidade em condições alcalinas em comparação com os demais processos de extração. Essas alterações no perfil de solubilidade podem ser atribuídas a mudanças conformacionais que podem ocorrer durante o processo de extração. Assim sendo, os processos de extração assistidos por enzimas e por ultrassom podem ter maior concentração de grupos hidrofílicos expostos favorecendo interação proteína-solvente (SONG et al., 2013; JIANG et al., 2014). Em contrapartida, a extração alcalina pode ter causado alterações conformacionais na cadeia peptídica expondo mais grupos hidrofóbicos dificultando a interação proteína-solvente (SONG et al., 2013; JIANG et al., 2014), corroborando com os resultados de calorimetria diferencial de varredura (Figura 3) que indicam maior desdobramento da cadeia péptica pelo processo alcalino. Ainda, como discutido anteriormente (Seção 4.1.4), a sonicação pode ter levado à agregação e precipitação de parte das proteínas insolúveis da lentilha, resultando em um IPL-US com maior teor de proteínas solúveis (Figura 3).

#### 4.1.7 Tensão Interfacial

A tensão interfacial dinâmica entre o óleo de linhaça e a água, contendo ou não os IPL, é apresentada na figura 6. Após 3000 s, a tensão interfacial reduziu de 7,14 mN.m<sup>-1</sup> para 3,20 mN.m<sup>-1</sup> para água pura; enquanto para soluções contendo os IPL, a redução da tensão interfacial foi ainda maior: de 6,23 mN.m<sup>-1</sup> para 1,23 mN.m<sup>-1</sup> para IPL-EA; de 7,15 mN.m<sup>-1</sup> a 1,35 mN.m<sup>-1</sup> para solução contendo IPL-EZ e de 6,62 mN.m<sup>-1</sup> a 1,29 mN.m<sup>-1</sup> para IPL-US. Apesar da redução da tensão interfacial na presença da proteína de lentilha, não houve diferença significativa na tensão de equilíbrio após 3000 segundos entre os isolados avaliados.



**Figura 6.** Tensão Interfacial Dinâmica dos Sistemas Compostos de Água pura - Óleo de linhaça ( — ) e óleo de linhaça – isolados proteico obtidos por extração alcalina (IPL-EA, —), assistida por carboidrases (IPL-EZ, —) e por ultrassom (IPL-US, —).

Esses resultados sugerem que os IPL possuem atividade de superfície, uma vez que os sistemas aquosos contendo proteínas apresentaram menor tensão interfacial após 3000 segundos do que o sistema com água pura. Embora os valores finais da tensão interfacial tenham sido semelhantes entre todas as soluções contendo IPL, a taxa de decaimento foi diferente, dependendo da condição de obtenção da proteína da lentilha. As soluções com IPL-EA apresentaram menor valor de tensão interfacial antes de 500 segundos, seguidas pelas soluções contendo IPL-EZ, indicando que proteínas obtidas sem pré-tratamentos foram capazes de estabilizar a interface óleo-água mais rapidamente do que em outras condições. Esse rápido declínio na tensão interfacial do IPL-EA, pode ser

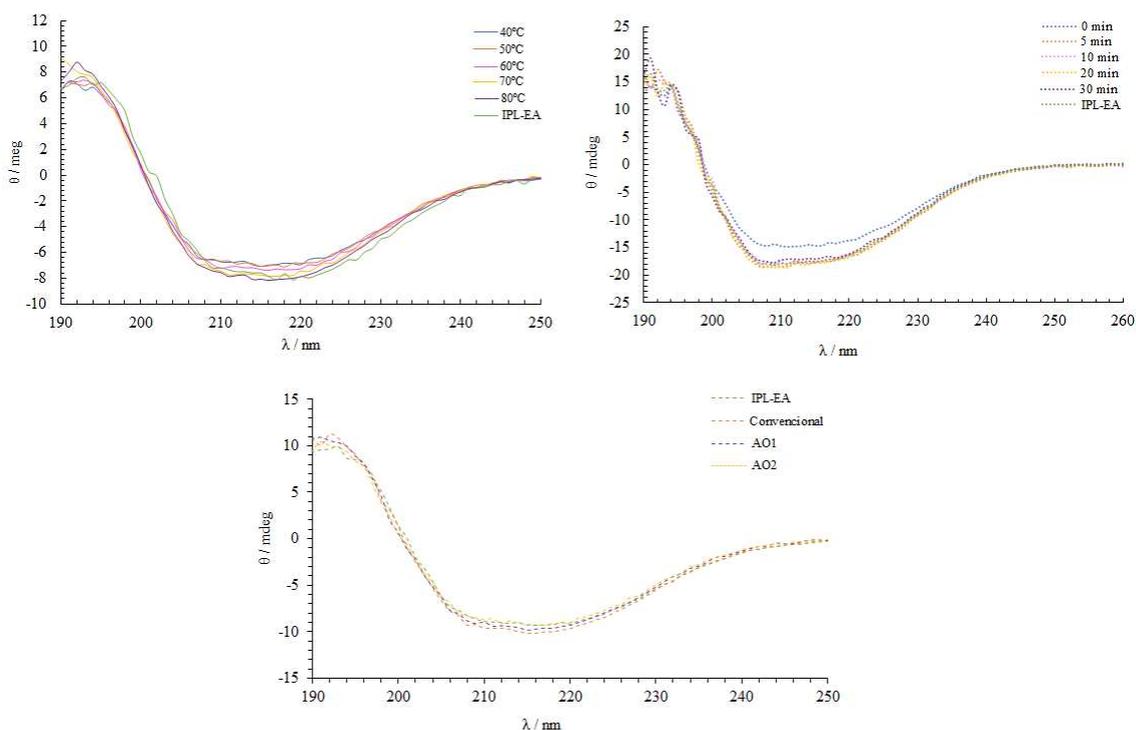
atribuído ao aumento da hidrofobicidade da superfície da proteína pela maior exposição de grupos hidrofóbicos após a extração alcalina (BOUAOUINA et al., 2006; PRIMOZIC et al., 2017). Esses resultados estão de acordo com os dados de solubilidade em que o IPL-EA apresenta a menor solubilidade em pH 7, provavelmente devido à exposição de grupos hidrofóbicos.

## 4.2 EFEITO DO AQUECIMENTO ÔHMICO

Nesta etapa, o tratamento ôhmico foi realizado no IPL-EA e teve como objetivo avaliar mudanças conformacionais na proteína de lentilha, que podem vir a melhorar as características tecnológicas do isolado proteico.

### 4.2.1 Estrutura Secundária

Na figura 7 são apresentados os espectros de dicroísmo circular (DC) para as amostras extraídas pelo tratamento alcalino, não-tratadas, e as tratadas sob aquecimento ôhmico em diferentes condições. O dicroísmo circular é uma ferramenta rápida e simples para determinação da estrutura secundária e das propriedades de desdobramentos das proteínas (GREENFIELD, 2007). Dentre os principais elementos estruturais das proteínas estão  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha e espiral que podem ser identificados no espectro de DC devido a picos positivos e negativos característicos. A estrutura  $\alpha$ -hélice apresenta uma banda positiva em 190 nm e uma banda negativa em 208 e 220 nm. Para  $\beta$ -folha, observa-se uma banda negativa em 218 nm e uma positiva em 195 nm. A estrutura aleatória da espiral, por sua vez, é indicada por uma banda positiva em 215 nm e baixa elipticidade em torno de 203 nm (GREENFIELD, 2007; FURTADO et al., 2017; MOREIRA et al., 2019). Apesar da estrutura proteica ser, geralmente, composta pelas estruturas já citadas (WOODY, 2010), picos positivos acentuados em 190 nm e picos negativos acentuados em 210 nm indicam proporções significativas de  $\beta$ -folha em todos os espectros de proteína isolada de lentilha avaliados nesse trabalho (Figura 7). A presença de  $\beta$ -folha é característico de proteínas vegetais e está relacionada à estrutura mais rígida e estável termicamente dessas proteínas (CARBONARO; MASELLI; NUCARA, 2015).



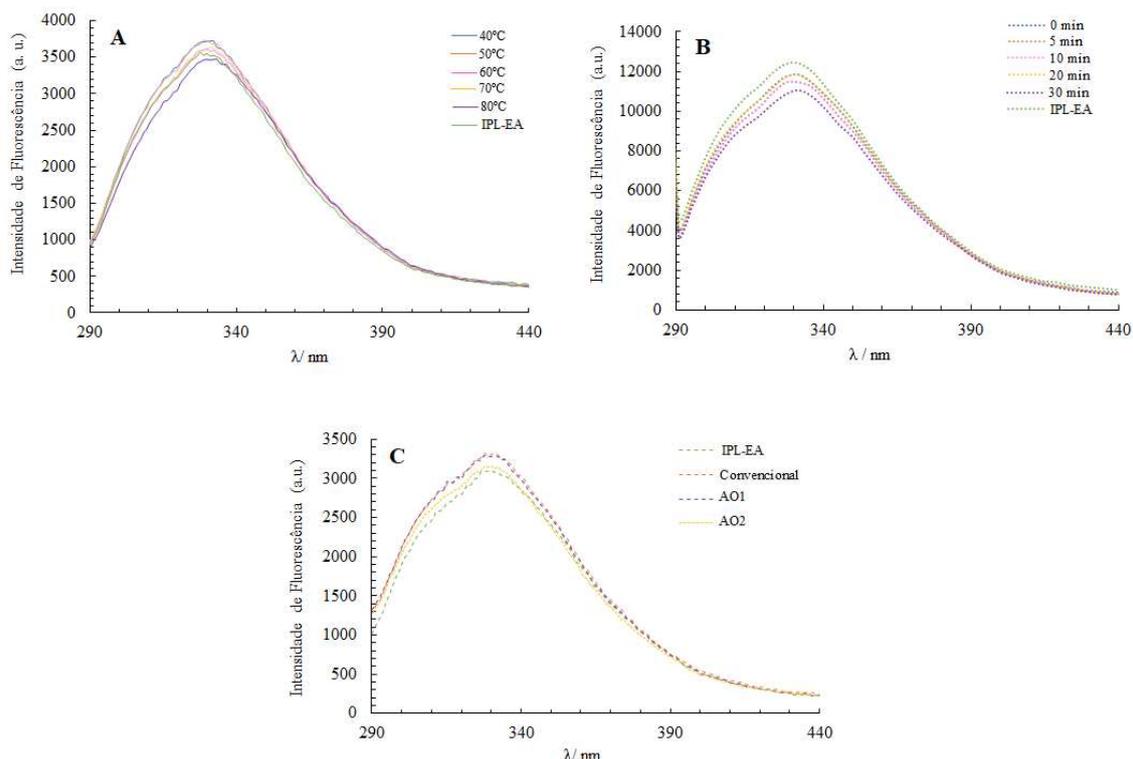
**Figura 7.** Espectros de DC para amostras não-tratadas e tratadas com aquecimento ôhmico e convencional. A: efeito da temperatura no tratamento das proteínas; B: efeito do tempo de exposição ao AO e C: efeito da intensidade do campo elétrico do AO.

Diferenças no perfil espectral de DC para variação de temperatura (Figura 7A), variações no tempo de exposição (Figura 7B) e variações na intensidade do campo elétrico (Figura 7C) no AO não são observadas, indicando que o aquecimento ôhmico não foi capaz de causar alteração na estrutura secundária do IPL-EA. Isso pode ter ocorrido porque a proteína proveniente do IPL-EA já apresenta certo grau de desdobramento da cadeia peptídica devido ao processo de extração, o que pode ser evidenciado pelos baixos valores de entalpia na análise de DSC associada ao pico de desnaturação térmica (Tabela 6). Ainda, uma vez que, altas magnitudes de elipticidade podem estar relacionadas com a perda da estrutura mais ordenada da proteína valores semelhantes entre as amostras tratadas e não tratadas com AO também corroboram com a hipótese de que o IPL-EA já sofreu desdobramento da cadeia peptídica pelo processo de extração (FURTADO et al., 2017).

#### 4.2.2 Fluorescência Intrínseca

As proteínas possuem aminoácidos fluorescentes como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina, como é o caso da proteína da lentilha (KHAZAEI et al., 2019). O triptofano

é o principal resíduo responsável pela absorção de fluorescência da proteína a 280 nm (LADOKHIN, 2000; LAKOWICZ, 2000). A espectrometria de fluorescência é uma técnica simples, capaz de detectar mudanças no ambiente do fluoróforo, podendo ser associadas aos desdobramentos da cadeia peptídica devido a tratamentos aplicados às proteínas (EFTINK, 1998). Os espectros de fluorescência do triptofano para as amostras tratadas e não tratadas com AO sob diferentes condições são apresentados na Figura 8.



**Figura 8.** Espectro de Fluorescência do Triptofano para proteína de lentilha não tratada e tratada sob diferentes condições. O comprimento de excitação foi à 295 nm. A: efeito da temperatura no tratamento das proteínas; B: efeito do tempo de exposição ao AO e C: efeito da intensidade do campo elétrico do AO.

Alterações conformacionais na cadeia peptídica da lentilha devido ao AO em diferentes temperaturas são apresentadas na Figura 8A. Nas menores temperaturas (40 °C e 50 °C), houve um aumento na intensidade de fluorescência do triptofano em relação ao espectro do IPL-EA. No entanto, um decréscimo da fluorescência é observado com o aumento da temperatura, sendo que a 80 °C a intensidade da fluorescência é menor que a do IPL-EA. Diversos fatores podem vir a inibir a fluorescência do triptofano. No caso da proteína de lentilha, sugere-se que o aumento da temperatura no AO teria levado a exposição de aminoácidos capazes de inibir a fluorescência do triptofano. Resíduos de aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina se apresentam em

maior proporção na composição aminoacídica da proteína de lentilha em relação aos aminoácidos fluorescentes (triptofano, tirosina e fenilalanina) (KHAZAEI et al., 2019). Estes resíduos aminoacídicos são capazes de inibir a fluorescência do triptofano por processos não reativos como fotoionização, cruzamento entre sistemas e transferência de prótons. Além disso, os ensaios de aquecimento ôhmico realizados no presente estudo, foram realizados em pH ácido (pH 3), condição na qual a histidina pode ser capaz de inibir a fluorescência do triptofano devido a formação de empilhamento com o anel indol (LADOKHIN, 2000). Tal inibição também indica modificação da cadeia peptídica da lentilha pelo processos aplicados (LADOKHIN, 2000; RODRIGUES et al., 2019).

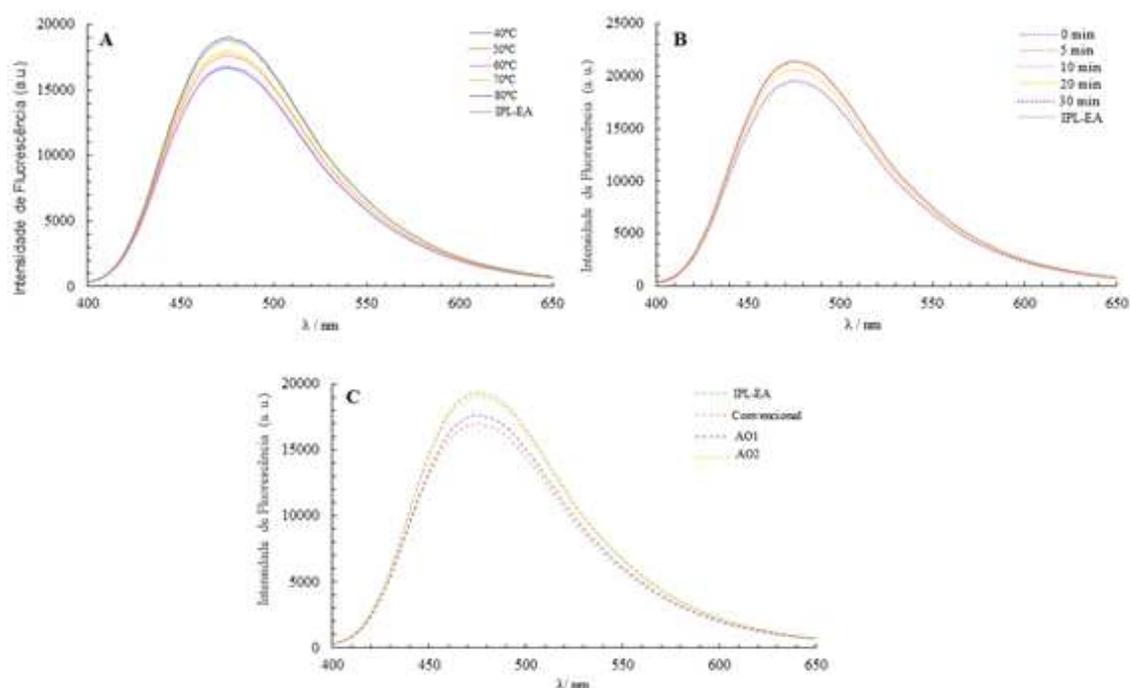
A redução de fluorescência a 80 °C é melhor observada na Figura 8B onde avaliou-se o tempo de exposição ao AO a 80 °C. Esses resultados indicam que o AO a 80 °C promoveu alterações na exposição do triptofano ou na acessibilidade dos inibidores desse aminoácido como descrito anteriormente (LADOKHIN, 2000). Os espectros de fluorescência indicam um perfil dependente do tempo, com alta redução da fluorescência após 30 minutos de AO a esta temperatura. Além disso, é verificado um intervalo de transição entre 10 e 20 minutos com aumento e diminuição da fluorescência intrínseca, respectivamente. Assim, considerou-se que no tempo de 20 minutos poderiam estar ocorrendo alterações na estrutura da lentilha, o que tornaria interessante para os demais ensaios de AO. Assim, o tempo de 20 min foi escolhido para a avaliação da influência da intensidade do campo elétrico durante o AO.

Variações na intensidade do campo elétrico (Figura 8C) mostram um aumento na intensidade da fluorescência em relação à fluorescência do IPL-EA quando aplicados tratamentos sem a aplicação de campo elétrico (tratamento convencional) e na presença de campo elétrico reduzido (AO1). A redução da fluorescência é observada na presença de campo elétrico mais intenso (AO2). Ou seja, a presença de campos elétricos mais intensos pode ter levado a exposição de grupos inibidores do triptofano devido a alteração na estrutura terciária da proteína.

#### 4.2.3 Hidrofobicidade superficial

O ANS é um corante fluorescente com baixa intensidade de fluorescência em água, contudo apresenta considerável aumento em sua emissão quando exposto a ambientes hidrofóbicos (OTA; TAKANO, 2019) Sendo assim a fluorescência extrínseca utilizando ANS tem sido usada pra predizer mudanças na estrutura da proteína com

aumento ou redução na superfície hidrofóbica da proteína (ROYER, 2006). A Figura 9 apresenta os espectros de fluorescência do complexo proteína-ANS para a proteína de lentilha tratada sob diferentes condições.



**Figura 9.** Espectro de Fluorescência do ANS para proteína de lentilha não tratada e tratada sob diferentes condições. O comprimento de excitação foi à 370 nm. A: AO em diferentes temperaturas; B: Tempo de exposição ao AO e C: Intensidade do Campo Elétrico do AO.

Em geral, todos os tratamentos diminuíram ou não causaram nenhum efeito na acessibilidade dos grupos hidrofóbicos, evidenciado pela diminuição da intensidade da fluorescência em relação à fluorescência do IPL-EA (CARDAMONE; PURI, 1992). O aumento de temperatura do AO (Figura 9A) não mostrou correlação com a redução da fluorescência do complexo. Estes resultados sugerem que mudanças na estrutura da proteína de lentilha podem ter acontecido aumentando ou diminuindo a acessibilidade dos grupos hidrofóbicos com variações de temperatura (MONAHAN; GERMAN; KINSELLA, 1995). A avaliação da influência do tempo de exposição a 80 °C (Figura 9B) demonstrou que a superfície hidrofóbica da proteína só foi alterada para os tempos de 20 e 30 minutos dificultando a interação proteína-ANS. Reduções da fluorescência do complexo ANS-proteína são observadas após a aplicação de um AO1 e na ausência do CEM (Figura 9C). No entanto, para tratamentos com campo elétrico (AO1 e AO2), a fluorescência foi maior que o tratamento térmico convencional. Tais resultados indicam

que a associação do CEM com o aquecimento aumenta a acessibilidade dos grupos hidrofóbicos inibidos pela presença de temperatura (RODRIGUES et al., 2019).

### 4.3 PRODUÇÃO DOS COACERVADOS COMPLEXOS

Inicialmente, os isolados proteicos produzidos pelos diferentes métodos de extração foram utilizados pra determinar as melhores condições de formação de coacervados (pH e IPL:Pectina). Os coacervados foram então utilizados para encapsulação do óleo de linhaça e determinar sua eficiência de encapsulação.

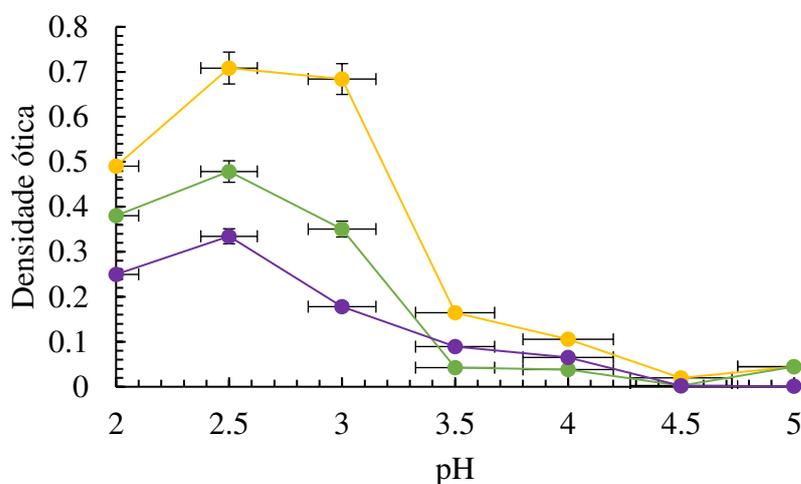
O IPL-EA foi submetido ao aquecimento ôhmico com o intuito de avaliar mudanças na interação proteína-polissacarídeo. A melhor condição de formação determinada na etapa inicial foi utilizada para avaliar o efeito da temperatura na coacervação do IPL-EA com a pectina.

#### 4.3.1 Efeito do pH e da proporção de biopolímeros na formação dos complexos IPL-PECTINA

##### 4.3.1.1 Efeito do pH

A variação de densidade ótica em função do pH para a complexação dos isolados proteicos com a pectina são apresentados na Figura 10. Perfis semelhantes são observados para os coacervados produzidos com os três isolados proteicos. O aumento da densidade ótica nos valores entre 2 e 2,5 indica a formação de agregados insolúveis entre os IPL e a pectina (MOUNSEY et al., 2008), sendo que a maior insolubilidade é atingida em pH 2,5 (densidade ótica máxima). Tais resultados estão de acordo com os perfis de potencial zeta (Figura 2) para os isolados proteicos, onde em regiões mais ácidas (entre 2 e 2,5) são observadas cargas mais positivas. A caracterização da pectina por potencial zeta (dados não mostrados) apresentou cargas líquidas entre -4,24 mV e -9,59 mV para faixa de pH entre 2 e 2,5, sendo assim maiores interações nessa faixa de pH eram esperadas. Reduções na densidade ótica são observados a partir do pH 3,0, com densidade mínima em pH 4,5. Nesta condição, os isolados proteicos obtidos apresentam carga nula (Tabela 5) e a solubilidade é mínima (Figura 3). Desta forma, nesta condição, os IPL não são capazes de interagir com a pectina, uma vez que, não apresentam carga líquida positiva nem se

encontram dispersos em solução. Desta forma o pH de 2,5 foi selecionado para a produção dos coacervados.



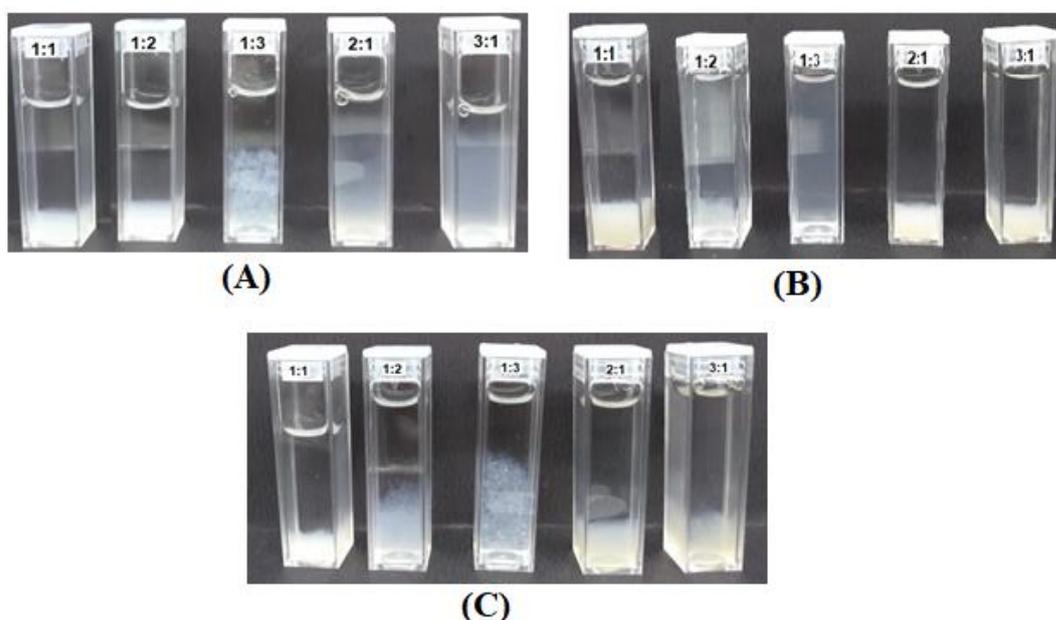
**Figura 10.** Variação de Densidade Ótica como Função do pH. Coacervados obtidos com IPL-EA (COA\_EA, —) Coacervados obtidos com IPL-EZ (COA\_EZ, —) e coacervados obtidos com IPL-US. (COA\_US, —).

#### 4.3.1.2 Proporção IPL:PECTINA

A proporção proteína:polissacarídeo desempenha um importante papel no balanço de cargas no sistema (ELMER et al., 2011). Diferenças na aparência dos coacervados formados são observados para as diferentes proporções e isolados obtidos de diferentes maneiras (Figura 11). Os coacervados produzidos com IPL-EA (COA\_EA, Figura 11A) apontam a formação de coacervados e complexos na faixa de pH testada. Proporções 1:1 e 1:2 (proteína-pectina) demonstram a maior produção de complexos insolúveis, sendo que a proporção 1:1 é a que apresenta a fase de equilíbrio mais límpida e com maior variação densidade ótica (0,395) após 20 minutos de descanso da solução. Nas proporções de biopolímeros em que a concentração de proteína era maior (2:1 e 3:1) que a de pectina, não houve formação de complexos insolúveis. Esses resultados podem indicar formação de complexos solúveis e/ou os materiais dispersos na solução (CHEN; CHI, 2017).

Para os coacervados produzidos com IPL-EZ (COA\_EZ, Figura 11B), observa-se a formação de coacervados insolúveis para as proporções 1:1; 2:1 e 3:1 com densidades óticas de 0,4785; 0,4100 e 0,4285, respectivamente. Tais resultados se repetem para os coacervados formados com IPL-US (COA\_US, Figura 11C), sendo que a maior formação de coacervados insolúveis é observada para as proporções 1:1; 2:1 e 3:1 com densidades

ópticas de 0,250; 0,103 e 0,105, respectivamente. Apesar de a 1:1 ainda apresentar maior produção de coacervados insolúveis (maior variação de densidade óptica e fase de equilíbrio mais limpa após 20 minutos), a formação de coacervados em condições nas quais a proporção de proteína é maior é um ponto interessante a se observar. Esses resultados indicam que a aplicação do pré-tratamento tanto enzimático como ultrassom pode ter contribuído para exposição de grupos laterais carregados da cadeia peptídica que poderiam vir a interagir com um maior número de moléculas de pectina em comparação aos sistemas contendo IPL-EA.



**Figura 11.** Formação dos coacervados entre a pectina e os IPL em função da proporção proteína: polissacarídeo (da esquerda para direita 1:1; 1:2; 1:3; 2:1; 3:1). A: Coacervados produzidos com IPL-EA; B: Coacervados produzidos com IPL-EZ e C: Coacervados produzidos com IPL-US.

A principal via de formação de coacervados descrita hoje na literatura envolve a interação eletrostática entre biopolímeros de cargas opostas (SCHMITT; TURGEON, 2011) como é o caso da pectina e dos isolados proteicos produzidos neste trabalho. Apesar das análises de caracterização como potencial zeta e eletroforese não apresentarem diferenças entre a carga superficial (Figura 2) ou peso molecular (Figura 2) dos diferentes IPL, os ensaios de coacervação utilizando diferentes proporções de biopolímeros (Figura 11) apresentam diferenças nos aspectos dos coacervados formados. As análises de DSC (Figura 4), solubilidade (Figura 5) e DC (Figura 7), por sua vez, indicaram mudanças

conformacionais na estrutura proteica do IPL-EA atribuindo a esse isolado uma estrutura proteica mais desorganizada. Tal desorganização afeta a distribuição de cargas, o que conseqüentemente, influencia a afinidade de interação entre os biopolímeros (TURGEON; LANEUVILLE, 2009). Este comportamento pode ser relacionado ao comportamento diferente do IPL-EA em relação aos demais obtidos neste trabalho, que não apresentou a formação de complexos nas proporções de 2:1 e 3:1 (proteína: polissacarídeo).

#### 4.3.2 Eficiência de Encapsulação do Óleo de Linhaça

A melhor condição de formação (pH = 2,5 e proporção de biopolímeros 1:1) foi utilizada para avaliar a eficiência de encapsulação de diferentes razões de óleo em relação a proporção total de biopolímeros (Tabela 7). Diferenças significativas entre as partículas e a proporções de óleo são observadas. Para todos o IPL, a condição em que a massa de óleo presente no sistema era superior (1:1 biopolímero:óleo) apresentou maiores valores de eficiência de encapsulação.

**Tabela 7.** Eficiência de Encapsulação para a Coacervação Complexo do Óleo de Linhaça.

<b>Biopolímeros: óleo</b>	<b>Eficiência* (%)</b>
<b>COA_EA</b>	
1:1	94,25 <sup>A,a,c</sup> ±0,130
1:0,5	92,49 <sup>B,a</sup> ±0,951
1:0,25	91,10 <sup>C,a</sup> ±0,746
<b>COA_EZ</b>	
1:1	96,59 <sup>A,a,b</sup> ± 0,497
1:0,5	95,05 <sup>A,b</sup> ± 0,618
1:0,25	94,78 <sup>A,b,c</sup> ± 2,353
<b>COA_US</b>	
1:1	95,17 <sup>A,b</sup> ± 1,758
1:0,5	95,08 <sup>A,b</sup> ± 1,42
1:0,25	93,36 <sup>A,a,b</sup> ± 1,864

\*Todos os dados foram expressos como média de duas repetições de processo ± desvio padrão. As médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna para cada coacervados (COA\_EA; COA\_EZ e COA\_US) indica que não há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as proporções de óleo. Letras minúsculas

iguais na mesma coluna para a mesma proporção de óleo (1:1; 1:0,5; 1:0,25) indica que não há diferença significativa em ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes coacervados.

Independente do IPL utilizado, valores de eficiência de encapsulação acima de 90% foram observados. Tais resultados estão condizentes com a literatura que atribui altos valores de eficiência de encapsulação (acima de 90%) a coacervação complexa (YUAN et al., 2017). Observa-se na Tabela 7 que para o ILP-EA a eficiência de encapsulação foi significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente para todas as proporções de biopolímeros:óleo, sendo que para proporção 1:1 refere-se a maior eficiência de encapsulação. Já a razão biopolímeros:óleo não influenciou a eficiência de encapsulação dos coacervados formados com IPL-EZ e IPL-US ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3 FTIR

A coacervação complexa entre dois biopolímeros de cargas opostas ocorre devido a formação de interações eletrostáticas entre eles. Modificações na dinâmica molecular dos biopolímeros devido as interações eletrostáticas podem ser detectadas pela análise de FTIR. Na Figura 12 são apresentados os espectros para os materiais puros (IPL e pectina) e para os coacervados formados tanto com as amostras tratadas com AO quanto para as amostras não-tratadas. No espectro da pectina (Figura 12A), observam-se grupos funcionais característicos dos polissacarídeos nas faixas de  $3500 - 2900 \text{ cm}^{-1}$  (-OH) e de  $1720$  a  $1580 \text{ cm}^{-1}$  (C=O) referentes ao ácido carboxílico I e II (SINGTHONG et al., 2004; ALBANO; NICOLETTI, 2018). Esses grupos são responsáveis por assumir cargas negativas conferindo caráter aniônico a molécula de pectina. Nos espectros dos isolados proteicos (IPL-EA; IPL-EZ e IPL-US), observam-se grupos característicos das amidas em  $1653 \text{ cm}^{-1}$  (amida I),  $1541 \text{ cm}^{-1}$  (amida II) e  $1238 \text{ cm}^{-1}$  (amida III). Estes grupamentos, por sua vez, são responsáveis por assumir cargas positivas em pHs abaixo do ponto isoelétrico (KAUSHIK et al., 2016).

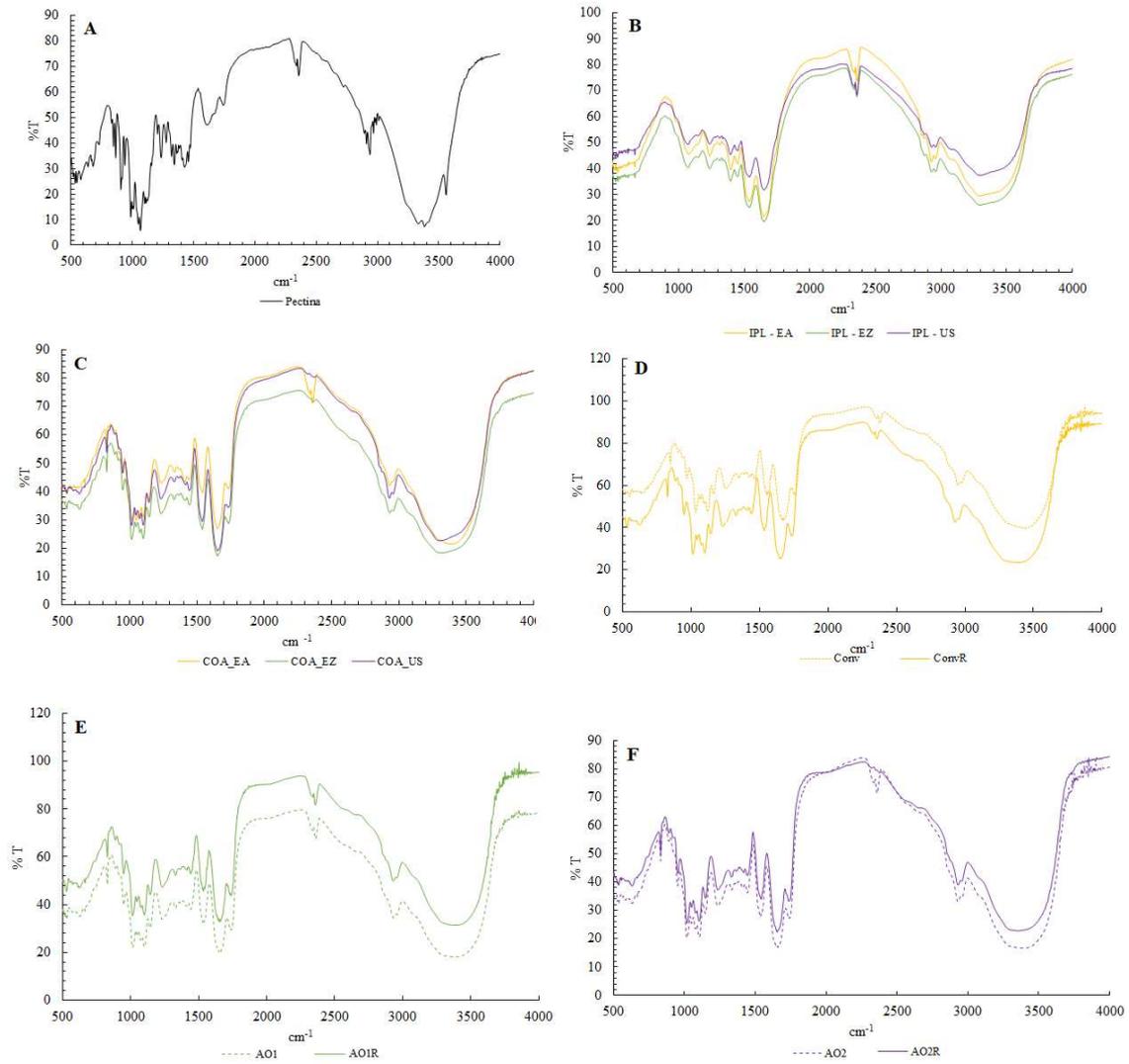
É possível observar nos espectros dos coacervados não-tratados com AO (Figura 12C) e tratados com AO (Figura 12D, E, F) perturbações na região carbonamida e variações de intensidade entre  $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ . Essas alterações ocorrem, uma vez que, os polissacarídeos e as proteínas interagem entre si através da interação amina (HUANG et al., 2012) evidenciando a formação dos coacervados. De forma geral, maiores alterações entre os espectros dos coacervados produzidos não foram observados em comparação ao coacervado produzido com ILP não tratada com aquecimento ôhmico,

sendo que todos os espectros apresentam perfil semelhante ao do isolado proteico correspondente, com variações na intensidade de transmitância.

Não foram observadas diferenças no perfil de FTIR entre os processos de extração aplicados (Figura 12B), sugerindo que a aplicação de processos auxiliares à extração alcalina não levou a alterações nas vibrações dos grupos funcionais por estiramento ou deformações angulares.

Além das perturbações na região carboniamina, que evidenciam a encapsulação, (Figura 12C). o desaparecimento do pico entre 2000 e 2500  $\text{cm}^{-1}$  para os coacervados utilizando IPL pré-tratados com ultrassom e aplicação de enzima, sugerem diferentes interações proteína-pectina desses isolados em comparação com o IPL-EA.

Modificações na interação proteína-polissacarídeo devido a alterações estruturais causadas pelo tratamento convencional (Figura 12D) e aquecimento ôhmico (Figura 12E e F) na estrutura proteica do IPL-EA foram avaliadas. Observa-se perfis semelhantes ao do IPL-EA não tratado (Figura 12B), assim como para as amostras de coacervados produzidas antes ou após o resfriamento da solução proteica a temperatura ambiente. O IPL-EA tratado com AO em baixa intensidade de campo elétrico (AO1, Figura 12E) apresenta um perfil de FTIR muito semelhante ao espectro dos coacervados produzidos com IPL-EA não tratado (Figura 12C linha amarela), sendo que não houve diferenças nos espectros entre a amostra resfriada (Figura 12E, linha AO1R) antes da formação do coacervado e o espectro do coacervado formado com a solução proteica a 80°C. Contudo, os coacervados formados a com o IPL tratado pelo aquecimento convencional (80 °C sem a presença de campo elétrico, Figura 12D) e tratados com aquecimento ôhmico com alta intensidade de campo elétrico apresentam diferenças no espectro de FTIR em comparação com o coacervado controle (Figura 12C linha amarela), sugerem que outros grupos podem ter participado da coacervação complexa entre a proteína e a pectina.



**Figura 12.** Espectros de FTIR para os materiais puros e os coacervados complexos. A: pectina; B: Isolados Proteicos. C: Coacervados não tratados com AO; D: Coacervados tratadas com aquecimento convencional; E: Coacervados tratadas com AO1; F: Coacervados tratados com AO2

## CAPÍTULO 5

---

*Conclusões Gerais*

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

A extração alcalina mostrou-se eficiente na extração das proteínas de lentilha, sendo que os tratamentos auxiliares não aumentaram o rendimento da extração alcalina. Apesar disso, diferenças nas propriedades funcionais entre os processos foram observadas. LPI-US apresentou solubilidade em pH 7 e 9 foi significativamente superior ao da extração alcalina, indicando modificações na estrutura proteica e exposição de grupos mais hidrofílicos. Além disso, a observação de perfis semelhantes na avaliação do potencial zeta, eletroforese e temperatura de desnaturação, independentemente do método de extração utilizado. Contudo a maior taxa de decaimento de tensão superficial atribuída e entalpia de desnaturação associadas ao LPI-EA, indicam que os processos associados podem promover o desdobramento da cadeia peptídica atribuindo características específicas para cada isolado proteico produzido.

O aquecimento ôhmico foi utilizado como tecnologia de modificação da estrutura proteica. Não foram observadas alterações na estrutura secundária da proteína. Contudo alterações na estrutura terciária são observadas com alterações na hidrofobicidade superficial das proteínas, sendo dependente da temperatura, tempo de exposição e intensidade de campo elétrico.

Por fim, foi possível observar que a proteína de lentilha, independente do processo utilizado para a sua extração ou da aplicação ou não do tratamento com AO, foi capaz de se complexar com a pectina, formando coacervados solúveis e insolúveis, dependentes da condição de pH e proporção de biopolímeros. Ainda, altas eficiências de encapsulação foram obtidas para o óleo de linhaça por coacervação complexa. Tais resultados despertam grande interesse para utilização dessa técnica e dessas proteínas para aplicação de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados na indústria de alimentos. Além disso, os resultados deste trabalho mostram que a aplicação do ultrassom e do tratamento enzimático em combinação com a extração alcalina e o tratamento do IPL-EA com aquecimento AO podem ter envolvido novos grupos funcionais nas formações dos complexos.

## CAPÍTULO 6

---

*Referências*

**6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUILAR, K. C. et al. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v. 154, p. 17–24, 2015.

AHMED, J.; VARSHNEY, S. K.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high pressure treatment on thermal and rheological properties of lentil flour slurry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1538–1544, 2009. Disponível em:

ALBANO, K. M.; NICOLETTI, V. R. Ultrasonics - Sonochemistry Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O / W emulsions with low oil soybean content stabilization. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 41, n. October 2017, p. 562–571, 2018.

ALBERO, B.; TADEO, J. L.; PÉREZ, R. A. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 739–750, 2019.

ALMEIDA, N. M.; MOURA, J. M. L. N.; JOHNSON, L. A. Properties of soy protein produced by countercurrent, two-stage, enzyme-assisted aqueous extraction. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 6, p. 1077–1085, 2014.

ÁLVAREZ-HENAO, M. V. et al. Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. **Food Chemistry**, v. 256, n. 118, p. 181–187, 2018. Disponível em:

AOAC. (Association of Official Analytical Chemists) (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International, 18th ed. Gathersburg, MD U.S.A **Official methods**, 2005.

ARYEE, F. N. A.; NICKERSON, M. T. Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 520–527, 2012.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAI, L. et al. The influence of extraction pH on the chemical compositions, macromolecular characteristics, and rheological properties of polysaccharide: The case of okra polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. July 2019, p. 105586, 2020.

BARBANA, C.; BOYE, J. I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 94–101, 2011.

BHATTY, R. Cooking Quality of Lentils : The Role of Structure and Composition of Cell Walls. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, n. 2, p. 376–383, 1990.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 21, p. 911–

917, 1959.

BOIRE, A. et al. Proteins for the future: A soft matter approach to link basic knowledge and innovative applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n. June, p. 0–1, 2017.

BORZOVA, V. A. et al. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–29, 2016.

BOUAOUINA, H. et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 275–284, 2006.

BOYE, J. I. et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 537–546, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRUMMER, Y.; KAVIANI, M.; TOSH, S. M. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. **Food Research International**, v. 67, p. 117–125, 2015.

BUJNOWSKI, D. et al. Longitudinal Association between Animal and Vegetable Protein Intake and Obesity among Men in the United States: The Chicago Western Electric Study. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 8, p. 1150–1155, 2011.

BYANJU, B. et al. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 712–721, 2020.

CAILLARD, R.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Physicochemical properties and microstructure of soy protein hydrogels co-induced by Maillard type cross-linking and salts. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 98–106, 2009.

CAMPBELL, K. A. et al. Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. **Food Chemistry**, v. 208, p. 245–251, 2016.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 19–30, 2015.

CARDAMONE, M.; PURI, N. K. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. **Biochemical Journal**, v. 282, n. 2, p. 589–593, 1992.

CHANG, Y. Y. et al. Effect of gums on the rheological characteristics and microstructure of acid-induced SPI-gum mixed gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, n. 1, p. 183–191, 2014.

- CHEN, Y. E.; CHI, H. A Review of Recent Progress in Drug and Protein Encapsulation: Approaches, Applications and Challenges. **Materials Science & Engineering C**, 2017.
- CLIFTON, P. M. Protein and coronary heart disease: The role of different protein sources. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 13, n. 6, p. 493–498, 2011.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016.
- CORREA, I. N.; POLTRONIERI, F. Hypocholesterolemic action of proteins from legumes. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição**, v. 7527, n. 2, p. 79–90, 2016.
- DANIELSSON, C.-E. et al. **An Electrophoretic Investigation of Vicilin and Legumin from Seeds of Peas.** *Acta Chemica Scandinavica*, 1950. .
- DAVIS, P. J.; WILLIAMS, S. C. Protein modification by thermal processing. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 53, n. SUPPL. 46, p. 102–105, 1998.
- DE FIGUEIREDO, V. R. G. et al. Action of multi-enzyme complex on protein extraction to obtain a protein concentrate from okara. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 1508–1517, 2018.
- DEVI, N. et al. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.
- DIMA, C.; DIMA, S. Bioaccessibility study of calcium and vitamin D3 co-microencapsulated in water-in-oil-in-water double emulsions. **Food Chemistry**, v. 303, n. May 2019, p. 125416, 2020.
- DU, Y. et al. Effect of high coacervation temperature on the physicochemical properties of resultant microcapsules through induction of Maillard reaction between soybean protein and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 234, n. October 2018, p. 91–97, 2018.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- EFTINK, M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 63, n. 3, p. 276–284, 1998.
- EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. October 2017, p. 254–264, 2018.
- ELDIN, H. et al. Science Optimization of protein yields by ultrasound assisted extraction from *Eurycoma longifolia* roots and effect of agitation speed. **Journal of King Saud University - Science**, 2018.

ELMER, C. et al. Complex coacervation in pea protein isolate-chitosan mixtures. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1441–1446, 2011.

ERATTE, D. et al. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 121–131, 2018.

FURTADO, G. de F. et al. Structural and emulsifying properties of sodium caseinate and lactoferrin influenced by ultrasound process. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 178–188, 2017.

GAO, Z. et al. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. **Food Research International**, v. 131, n. January, p. 109045, 2020.

GHASEMI, S. et al. Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, n. August, p. 369–377, 2017.

GHUMMAN, A.; KAUR, A.; SINGH, N. Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (*Lens culinaris*) and horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) lines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 137–144, 2016.

GIANCONE, T. et al. Protein-polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin-soy flour mixture. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1263–1269, 2009.

GÖRGÜÇ, A.; BIRCAN, C.; YILMAZ, F. M. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 283, n. January, p. 637–645, 2019.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438–446, 2016.

HADNADJEV, M. et al. Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. **Food and Feed Research**, v. 44, n. 1, p. 11–21, 2017.

HANMOUNGJAI, P.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 7, p. 771–776, 2002.

HU, H. et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean  $\beta$ -conglycinin and glycinin. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 102–110, 2015.

HUANG, G. Q. et al. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 534–539, 2012.

- IBOPE. Pesquisa de opinião pública sobre vegetarianismo. **Ibope inteligência**. 2018. Disponível em <  
[https://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB\\_0416\\_VEGETARIANISMO.pdf](https://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB_0416_VEGETARIANISMO.pdf)>
- JARPA-PARRA, M. et al. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 461–469, 2014.
- JARPA-PARRA, M. et al. Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 45–53, 2015.
- JI, J. et al. Preparation and stabilization of emulsions stabilized by mixed sodium caseinate and soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 156–165, 2015.
- JIANG, L. et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, v. 62, p. 595–601, 2014.
- JOSHI, M. et al. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1513–1522, 2011.
- JOSHI, M.; TIMILSENA, Y.; ADHIKARI, B. Global production, processing and utilization of lentil: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 12, p. 2898–2913, 2017.
- JUNG, S. et al. Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 1, p. 71–78, 2006.
- KADAM, S. U. et al. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 60–67, 2015.
- KAJLA, P.; SHARMA, A.; SOOD, D. R. Flaxseed—a potential functional food source. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1857–1871, 2015.
- KARACA, A. C.; NICKERSON, M.; LOW, N. H. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 448–457, 2013.
- KAUSHIK, P. et al. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. **Food Research International**, v. 86, p. 1–8, 2016.
- KHAZAEI, H. et al. Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications. **Foods**, v. 8, n. 391, p. 1–23, 2019.
- KOSHIYAMA, I.; HAMANO, M.; FUKUSHIMA, D. A heat denaturation study of the 11S globulin in soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 309–322, 1981.

- KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, 2008.
- LADJAL-ETTOUMI, Y. et al. Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. **Food Biophysics**, v. 11, n. 1, p. 43–51, 2016.
- LADOKHIN, A. S. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1–18, 2000.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 680–685, 1970.
- LAKOWICZ, J. R. **Topics in Fluorescence Spectroscopy**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- LAM, A. C. Y. et al. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. **Food Reviews International**, v. 34, n. 2, p. 126–147, 2018.
- LEE, H. C. et al. Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1199–1207, 2007.
- LI, K. et al. EFFECT OF ULTRASOUND ON ALKALI EXTRACTION PROTEIN FROM RICE DREG FLOUR. 2016a.
- LI, S. et al. Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 20–28, 2016b.
- LI, X. et al. Effect of ohmic heating on fundamental properties of protein in soybean milk. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 3, p. 1–10, 2018.
- LI, Y. et al. Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from perilla (*Perilla frutescens* L.) seeds. **CYTA - Journal of Food**, v. 12, n. 1, p. 16–21, 2014.
- LIN, D. et al. Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, p. 130–144, 2017.
- MACHADO, L. F. et al. Moderate electric fields can inactivate *Escherichia coli* at room temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 520–527, 2010.
- MARTÍNEZ, E. N.; AÑÓN, M. C. Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2523–2530, 1996.
- MEGHANI, N. et al. Formulation of vitamin D encapsulated cinnamon oil

- nanoemulsion: Its potential anti-cancerous activity in human alveolar carcinoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 166, p. 349–357, 2018.
- MELGOSA, R. et al. Omega-3 encapsulation by PGSS-drying and conventional drying methods. Particle characterization and oxidative stability. **Food Chemistry**, v. 270, n. July 2018, p. 138–148, 2019.
- MOHAMMADI, A. et al. Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC-pectin complexes and evaluating their release rate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 816–822, 2016.
- MONAHAN, F. J.; GERMAN, J. B.; KINSELLA, J. E. Effect of pH and Temperature on Protein Unfolding and Thiol / Disulfide Interchange Reactions during Heat-Induced Gelation of Whey Proteins. p. 46–52, 1995.
- MOREIRA, T. C. P. et al. Effect of Ohmic heating on functionality of sodium caseinate – A relationship with protein gelation. **Food Research International**, v. 116, p. 628–636, 2019.
- MORR, C. V. et al. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715–1718, 1985.
- MOUNSEY, J. S. et al. The effect of heating on  $\beta$ -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 65–73, 2008.
- NAKAGAWA, K. et al. Encapsulation of Curcumin Loaded Oil Droplets By Cryotropic Gel Formation from O/W Emulsion. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1973–1979, 2011.
- NESTERENKO, A. et al. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 469–479, 2013.
- NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. Isolation and In Vitro Hydrolysis of Globulin G1 From Lentils (*LENS CULINARIS*, *MEDIK*). **Journal Food Biochem.**, v. 19, n. 0162, p. 109–120, 1995.
- NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C.  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1945–1962, 2011.
- O’SULLIVAN, J. et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 141–154, 2016.
- OTA, C.; TAKANO, K. Spectroscopic Analysis of Protein-Crowded Environments Using the Charge-Transfer Fluorescence Probe 8-Anilino-1-Naphthalenesulfonic Acid. **ChemPhysChem**, v. 20, n. 11, p. 1456–1466, 2019.
- PEREIRA, R. N. et al. Ohmic heating for the dairy industry: a potential technology to develop probiotic dairy foods in association with modifications of whey protein

structure. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 95–101, 2018.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84–99, 2013.

POJIĆ, M.; MIŠAN, A.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, n. October 2017, p. 93–104, 2018.

PRIMOZIC, M. et al. Effect of lentil proteins isolate concentration on the formation, stability and rheological behavior of oil-in-water nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 237, p. 65–74, 2017.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 37–44, 2012.

RAHMATI, N. F. et al. Introducing Speckled sugar bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolates as a new source of emulsifying agent. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 498–508, 2018.

RAIKOS, V. Encapsulation of vitamin E in edible orange oil-in-water emulsion beverages: Influence of heating temperature on physicochemical stability during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 155–162, 2017.

REHMAN, A. et al. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 90, n. March, p. 35–46, 2019.

RIOS-MERA, J. D. et al. Encapsulation optimization and pH- and temperature-stability of the complex coacervation between soy protein isolate and inulin entrapping fish oil. **Lwt**, v. 116, n. August, p. 108555, 2019.

RODRIGUES, R. M. et al. Electric field effects on  $\beta$ -lactoglobulin thermal unfolding as a function of pH – Impact on protein functionality. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 52, n. July 2018, p. 1–7, 2019.

ROSENTHAL, A. et al. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 6, p. 499–509, 2001.

ROYER, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. **Chemical Reviews**, p. 1769–1784, 2006.

SARI, Y. W.; BRUINS, M. E.; SANDERS, J. P. M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 78–83, 2013.

SAXENA, M. C. Plant Morphology, Anatomy and Growth Habit. In: ERSIKINE, W.; MUEHLAUER, F. J.; SARKER, A. (Ed.). **The lentil: Botany, Production and Uses**. Oxford: CAB International, 2009. p. 47–59.

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

SHEN, L. et al. Food Chemistry Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. **Food Chemistry**, v. 107, p. 929–938, 2008.

SHIMOYAMADA, M. et al. Characterization of Soymilk Prepared by Ohmic Heating and the Effects of Voltage Applied. **Food Science and Technology Research**, v. 21, n. 3, p. 439–444, 2015.

SILVA, D. F.; ROCHA, G. A.; THOMAZINI, M. MICROENCAPSULATION OF LYCOPENE BY GELATIN – PECTIN. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. Weisburger 2002, 2011.

SINGTHONG, J. et al. Structural characterization , degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy ( Cissampelos pareira ) pectin. v. 58, p. 391–400, 2004.

SILVA, N.; THAVARAJAH, P.; THAVARAJAH, D. The impact of processing and cooking on prebiotic carbohydrates in lentil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 72–77, 2018.

SONG, X. et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 538–544, 2013.

SULIEMAN, M. A. et al. Changes in total protein digestibility, fractions content and structure during cooking of lentil cultivars. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, n. 6, p. 801–805, 2008.

SUN, X. D. Review Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 2447–2459, 2011.

SWANSON, B. G. Pea a n d Lentil Protein Extraction a n d Functionality 1. v. 67, n. May, p. 276–280, 1990.

TAN, S. H. et al. Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 1075–1082, 2011.

TANG, C. H.; SUN, X. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from Phaseolus legumes: Implications for the structure-function relationship. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 315–324, 2011.

TAVANO, O. L. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Protein hydrolysis using proteases : An important tool for food biotechnology. “**Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**”, v. 90, p. 1–11, 2013.

TIMILSENA, Y. P. et al. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty

- acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369–381, 2017.
- TIWARI, B. K. A clean , green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.
- TURGEON, S. L.; LANEUVILLE, S. I. Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes. From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products. In: KASAPIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J. B. (Ed.). **Modern Biopolymer Science**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. p. 327–363.
- TYLER, R. T.; YOUNGS, C. G.; SOSULSKI, F. W. Air Clasification of Legumes. I. Separation Efficiency, Yiels, and Composition of the Sarch and Protein Fractions. **Cereal Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 144–148, 1981.
- WARNAKULASURIYA, S. et al. Effect of the degree of esterification and blockiness on the complex coacervation of pea protein isolate and commercial pectic polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 264, n. December 2017, p. 180–188, 2018.
- WOODY, R. W. Circular Dichroism Of Intrinsically Desordered Proteins. In: UVERSKY, V.; LONGHI, S. (Ed.). **Instrumental Analysis of intrinsically disordered proteins: assessing structure and conformation**. [s.l.] John Wiley and Sons, Inc. Publication, 2010. p. 303–323.
- XIAO, J. X. et al. Complex coacervation of carboxymethyl konjac glucomannan and chitosan and coacervate characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 436–445, 2019.
- XIAO, Z. et al. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1482–1494, 2013.
- YADAV, R. K. et al. Modulation of oxidative stress response by flaxseed oil: Role of lipid peroxidation and underlying mechanisms. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 135, n. February, p. 21–26, 2018.
- YUAN, Y. et al. Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 171–179, 2017.
- ZHENG, T. et al. Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods. **Food Hydrocolloids**, v. 97, n. July, p. 105216, 2019.
- ZLABUR, J. S. et al. New Trends in Food Technology Compounds From Plant Materials. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (Ed.). **Role of Materials Science in Food Bioengineering**. 19. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–36.