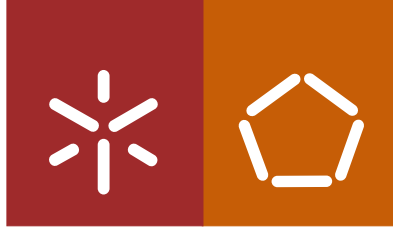


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Susana Fernandes dos Santos

**Produção de nanohidrogéis a partir de
proteínas do leite**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Susana Fernandes dos Santos

Produção de nanohidrogéis a partir de proteínas do leite

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Micro/Nano Tecnologias

Trabalho realizado sob a orientação do
**Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira
Soares Vicente**

e co-orientação do
Doutor Miguel Ângelo Parente Ribeiro Cerqueira

Autor: Susana Fernandes dos Santos

e-mail: susy_f_santos@hotmail.com, santos.susanaf@gmail.com

Telefone: +351 918823301

C.C.: 13332076

Título da Tese

Produção de nanohidrogéis a partir de proteínas do leite

Orientador: Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Co-Orientador: Doutor Miguel Ângelo Parente Ribeiro Cerqueira

Ano de conclusão: 2011

Mestrado em Micro/Nano Tecnologias

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 22 de Dezembro de 2011

AGRADECIMENTOS

A elaboração de uma tese requer sempre trabalho, dedicação e amor. Mas, após a sua conclusão, adquirimos muito mais do que aquilo que demos. Além do aprofundamento científico na área, há, também, um grande enriquecimento a nível pessoal. Por isso, a todos aqueles que possibilitaram a realização deste trabalho e fizeram com que este se tornasse menos árduo, não poderia terminar sem lhes prestar um sincero agradecimento.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Vicente, por prontamente ter aceite orientar este trabalho, pela sua apreciação crítica e amizade ao longo desta etapa.

Ao meu co-orientador, Doutor Miguel Cerqueira, pelo incentivo, apoio, orientação e disponibilidade sempre demonstrada.

A todos os meus colegas do Laboratório de Instalações Piloto, do Departamento de Engenharia Biológica, em especial à Ana Isabel, Ana Cristina, Hélder, Marthyna e Bruna pela ajuda, comentários e sugestões oportunas.

À Eng^a Cristina Quintelas pela total disponibilidade e ajuda na utilização do Espectrómetro de Absorção Atómica. À Eng^a Madalena Vieira por se mostrar sempre disponível sempre que necessitava da sua ajuda.

E, por fim, às pessoas mais importantes – à minha família e amigos. Aos meus pais por todo o amor, apoio, ânimo, compreensão, incentivo e, por sempre, serem em mim. Ao meu irmão pelo apoio, força e amizade. Aos meus avós, António e Maria Vitória, pelo carinho, sabedoria e energia que sempre me transmitiram. Aos meus verdadeiros amigos pelo apoio e compreensão que tiveram durante este período.

A atitude de todos, aqui mencionados, contribuiu para que este trabalho fosse uma realidade e, em vós, terei um exemplo para a minha futura caminhada.

A todos, MUITO OBRIGADA!

Produção de nanohidrogéis a partir de proteínas do leite

RESUMO

Os nanohidrogéis podem ser incorporados em vários produtos (alimentos, cosméticos e farmacêuticos, por exemplo) com o objectivo de proteger um composto bioactivo ou melhorar as propriedades dos produtos comerciais. Tendo como objectivo a aplicação de nanohidrogéis em alimentos, é necessário que estes sejam formados por elementos edíveis, como as proteínas do leite.

O principal objectivo desta tese, foi a formação de nanohidrogéis recorrendo à utilização de proteínas e ao uso de um sal. O cloreto de ferro foi usado como um agente gelificante, essencial na produção dos nanohidrogéis, mas também pelo facto do ferro (carente em muitos seres humanos) possuir a capacidade de se ligar à lactoferrina e poder ser usado como um suplemento alimentar.

Para a produção dos nanohidrogéis foram testados vários factores: pH, temperatura de aquecimento, tempo de aquecimento, concentração de proteína e de sal. Após a formação dos nanohidrogéis foi feita a sua caracterização (estudo da estabilidade dos nanohidrogéis ao longo do tempo, ao pH, à temperatura e resistência à liofilização, pela avaliação do tamanho, do índice de polidispersividade e pela carga eléctrica; estudo da morfologia pela Microscopia Electrónica de Transmissão e Microscopia de Força Atómica; estudo da estrutura dos nanohidrogéis pela Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier e estudo da eficiência de ligação do ferro aos nanohidrogéis).

Verificou-se que a formação dos nanohidrogéis é possível através das condições usadas (0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C, 20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃), permitindo uma ligação ao ferro eficaz (cerca de 20 %). Os nanohidrogéis mostraram ser estáveis durante 12 semanas, à temperatura (4 – 60 °C) e ao pH (2 – 11). De uma forma geral, pode-se concluir que os nanohidrogéis desenvolvidos podem ser usados na indústria alimentar.

Nanohydrogels production by milk proteins

ABSTRACT

Nanohydrogels can be incorporated into various products (foods, cosmetics and pharmaceuticals, for example) in order to protect a bioactive compound or improve properties of commercial products. With the aim of applying nanohydrogels in food, it's necessary that they are made of edible components such as milk proteins.

The main objective of this thesis was the formation of nanohydrogels through the use of proteins and the use of a salt. Iron chloride was used as gelling agent, which is essential in the nanohydrogels production, but also because of the iron (it lack in many humans) have the ability to bind to lactoferrin and can be used as a food supplement.

For nanohydrogels production several factors were tested: pH, heating temperature, heating time, protein and salt concentration. After nanohydrogels formation, it was made their characterization (nanohydrogels stability study over time, pH, temperature and resistance to lyophilization by size, polydispersity index and the electric charge evaluating; morphological study by Transmission Electronic Microscopy and Atomic Force Microscopy; nanohydrogels structure studies by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and efficiency study of iron binding to nanohydrogels).

It was found that the formation of nanohydrogels is made possible by the conditions used (0.2 % lactoferrin, pH7, 75 °C, 20 minutes, 0.035 mol/L FeCl₃), allowing an iron binding effectively (around 20 %). Nanohydrogels shown to be stable for 12 weeks, temperature (4 – 60 °C) and pH (2 – 11). In general, it can be concluded that the nanohydrogels developed can be used in the food industry.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE NOMENCLATURA GERAL	XXI
CAPÍTULO 1. MOTIVAÇÃO, OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO	1
1.1 MOTIVAÇÃO	2
1.2 OBJECTIVO	3
1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE	3
CAPÍTULO 2. INTRODUÇÃO	5
2.1 A NANOTECNOLOGIA E A ÁREA ALIMENTAR	5
2.2 BIOPOLÍMEROS	6
2.2.1 PROTEÍNAS	7
2.2.1.1 LACTOFERRINA	8
2.2.1.2 A LACTOFERRINA NA FORMAÇÃO DOS NANOHI-DROGÉIS	10
2.3 FORMAÇÃO DE NANOHI-DROGÉIS	11
2.4 FERRO E SAÚDE	13
2.4.1 NANOHI-DROGÉIS COM FERRO	13
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHI-DROGÉIS	13
2.5.1 TAMANHO E CARGA ELÉCTRICA	14
2.5.1.1 DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ	14
2.5.2 ESTABILIDADE	15

2.5.3 PROPRIEDADES ÓPTICAS	15
2.5.4 MORFOLOGIA	16
2.5.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO	16
2.5.4.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA	16
2.5.5 ESTRUTURA	17
2.5.5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER	17
2.5.6 LIGAÇÃO E LIBERTAÇÃO DE UM COMPOSTO	17
2.5.6.1 MÉTODO ANALÍTICO	18
2.5.6.1.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA	18
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 DESENVOLVIMENTO DOS NANOHIROGÉIS	19
3.1.1 MATERIAIS	19
3.1.2 FORMAÇÃO DOS NANOHIROGÉIS	19
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHIROGÉIS	22
3.2.1 DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ	22
3.2.2 TURBIDEZ	23
3.2.3 MORFOLOGIA	24
3.2.3.1 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA	25
3.2.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO	25
3.2.4 ESTRUTURA	25
3.2.5 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DO FERRO À LACTOFERRINA	25
3.2.6 QUANTIFICAÇÃO DO FERRO	26
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSÃO	29
4.1 DESENVOLVIMENTO DE NANOHIROGÉIS (parte 1)	29
4.2 DESENVOLVIMENTO DE NANOHIROGÉIS (parte 2)	31
4.2.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	32
4.2.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE AQUECIMENTO	34
4.2.3 INFLUÊNCIA DO pH	35

4.2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL	37
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHI-DROGÉIS	40
4.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO	40
4.3.2 ESTABILIDADE	41
4.3.2.1 ESTABILIDADE AO LONGO DO TEMPO	41
4.3.2.2 ESTABILIDADE TÉRMICA	43
4.3.2.3 ESTABILIDADE AO pH	44
4.3.3 RESISTÊNCIA À LIOFILIZAÇÃO	47
4.3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER	48
4.3.5 LIGAÇÃO DO FERRO	49
4.3.6 LIBERTAÇÃO DO FERRO	50
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS	51
5.1 CONCLUSÃO	51
5.2 PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	61
Anexo 1	63
Anexo 2	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2–1. Processo de formação dos nanohidrogéis com sal. 12

CAPÍTULO 4

Figura 4–2. Influência da temperatura *versus* tamanho dos nanohidrogéis. a, b – 32
Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–3. Polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 33
20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃) a várias temperaturas (60, 70, 75, 80, 90 °C). a,
b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–4. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 33
20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃) a várias temperaturas (60, 70, 75, 80, 90 °C). a
– Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–5. Efeito da temperatura de aquecimento (60, 70, 75, 80, 90 °C) na 34
turbidez (a 600 nm) nas soluções de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7),
aquecidas durante 20 minutos. a, b – Letras diferentes são estatisticamente
diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–6. Efeito do tempo de aquecimento na formação dos nanohidrogéis 35
(0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C) na turbidez (a 600 nm) ao longo de 60 minutos.
a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–7. Influência do pH no tamanho dos nanohidrogéis formados (0,2 % 36
lactoferrina, 20 minutos, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃). a, b – Letras diferentes são
estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–8. Polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, 20 minutos, 36
75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃) a pH 4, 7 e 10. a, b, c – Letras diferentes são
estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Figura 4–9. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, 20 minutos, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl ₃) a pH 4, 7 e 10. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	37
Figura 4–10. Influência da concentração de cloreto de ferro (III) no tamanho dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).	38
Figura 4–11. Influência da concentração de cloreto de ferro (III) no índice de polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).	38
Figura 4–12. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C) a diferentes concentrações de cloreto de ferro (III) (0, 0,01, 0,025, 0,035, 0,04, 0,055 mol/L). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	39
Figura 4–13. Efeito da adição de cloreto de ferro (III) (0,01, 0,025, 0,035, 0,04 e 0,055 mol/L) na turbidez (a 600 nm) de nanohidrogéis de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C, 20 minutos). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	39
Figura 4–14. Fotografias de microscopia electrónica de transmissão dos nanohidrogéis produzidos a partir de soluções de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7, 85 °C, 45 minutos, 0,035 mol/L FeCl ₃). a) dia 1 – ampliação 5 µm; b) dia 1 – ampliação 100 nm; c) dia 11 – ampliação 200 nm e d) dia 11 - ampliação 100 nm.	41
Figura 4–15. Tamanho dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	42
Figura 4–16. Polidispersividade dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	42
Figura 4–17. Potencial Zeta dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	43

Figura 4–18. Tamanho dos nanohidrogéis entre os 4 °C e os 70 °C (de 8 °C em 8 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).	44
Figura 4–19. Polidispersividade dos nanohidrogéis entre os 4 °C e os 40 °C (de 8 °C em 8 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).	44
Figura 4–20. Solução de nanohidrogéis a pH 2.	45
Figura 4–21. Solução de nanohidrogéis a pH 12.	45
Figura 4–22. Solução (pH 2) com nanohidrogéis adicionados.	46
Figura 4–23. Solução (pH 12) com nanohidrogéis adicionados.	46
Figura 4–24. Tamanho dos nanohidrogéis em diferentes pHs. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).	46
Figura 4–25. Polidispersividade dos nanohidrogéis em diferentes pHs. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).	47
Figura 4–26. Espectro FTIR, em transmitância (% T), de quatro amostras analisadas na região espectral entre 400 e 4000 cm^{-1} .	49

ANEXOS

Figura A–27. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 2, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO_4 .	63
Figura A–28. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 4, antes do aquecimento.	64
Figura A–29. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO_4 .	64
Figura A–30 Solução de lactoferrina, pH 7, 85 °C, 45 minutos, sem sal. A) Água + proteína; B) Agregado de proteína.	64
Figura A–31. Solução de lactoferrina, pH 9, 85 °C, 45 minutos, sem sal adicionado.	64
Figura A–32. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO_4 .	65
Figura A–33. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, sem	65

adição de sal.	
Figura A-34. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,005 mol/L de FeSO ₄ .	66
Figura A-35. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,01 mol/L de FeSO ₄ .	66
Figura A-36. Adição de FeSO ₄ à emulsão de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos. A) Cristais de sal.	66
Figura A-37. Início do aquecimento de 4 soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos. (A) e (B) – pH 12; (C) e (D) – pH 4.	67
Figura A-38. Aquecimento de 4 soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos, 20 minutos após o início do aquecimento. (A) e (B) – pH 12; (C) e (D) – pH 4.	67
Figura A-39. Soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos. A) pH 12, 0,02 mol/L FeCl ₃ ; B) pH 12, 0,02 mol/L de CaCl ₂ ; C) pH 4, 0,02 mol/L FeCl ₃ e D) pH 4, 0,02 mol/L CaCl ₂ .	67
Figura A-40. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeCl ₃ .	67
Figura A-41. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,035 mol/L de FeCl ₃ .	68
Figura A-42. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,04 mol/L de FeCl ₃ .	68
Figura A-43. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,05 mol/L de FeCl ₃ .	69
Figura A-44. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 5 % lactoferrina; B) 2,5 % lactoferrina; C) 1 % lactoferrina; D) 0,5 % lactoferrina.	70
Figura A-45. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 5 % lactoferrina + 0,0184 mol/L FeCl ₃ ; B) 2,5 % lactoferrina + 0,0092 mol/L FeCl ₃ ; C) 1 % lactoferrina + 0,0037 mol/L FeCl ₃ ; D) 0,5 %	70

lactoferrina + 0,0018 mol/L FeCl ₃ .	
Figura A-46. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 0,4 % lactoferrina; B) 0,3 % lactoferrina; C) 0,2 % lactoferrina.	70
Figura A-47. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 0,4 % lactoferrina + 0,0015 mol/L FeCl ₃ ; B) 0,3 % lactoferrina + 0,0011 mol/L FeCl ₃ ; C) 0,2 % lactoferrina + 0,0007 mol/L FeCl ₃ .	70
Figura A-48. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 0,1 % lactoferrina; B) 0,05 % lactoferrina.	71
Figura A-49. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 0,1 % lactoferrina + 0,0004 mol/L FeCl ₃ ; B) 0,05 % lactoferrina + 0,0002 mol/L FeCl ₃ .	71
Figura A-50. Tamanho médio das partículas – Efeito da Concentração de Lactoferrina – a pH 4, 85 °C, 45 minutos. a, b, c, d – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).	72
Figura A-51. Polidispersividade das soluções – Efeito da Concentração de Lactoferrina – a pH 4, 85 °C, 45 minutos. a, b, c, d – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).	73
Figura A-52. Perfil da solução de 2,5 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0092 mol/L de FeCl ₃ .	73
Figura A-53. Perfil da solução de 1 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0037 mol/L de FeCl ₃ .	73
Figura A-54. Perfil da solução de 0,5 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0018 mol/L de FeCl ₃ .	74
Figura A-55. Perfil da solução de 0,4 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0015 mol/L de FeCl ₃ .	74
Figura A-56. Perfil da solução de 0,3 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0011 mol/L de FeCl ₃ .	74
Figura A-57. Perfil da solução de 0,2 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0007 mol/L de FeCl ₃ .	75

Figura A-58. Perfil da solução de 0,1 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0004 mol/L de FeCl ₃ .	75
Figura A-59. Perfil da solução de 0,05 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0002 mol/L de FeCl ₃ .	75
Figura A-60. Tamanho médio das partículas em soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 4, 85 °C, 45 minutos) – Influência da Concentração de Sal (FeCl ₃). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	77
Figura A-61. Polidispersividade das soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 4, 85 °C, 45 minutos) – Efeito da Concentração de Sal (FeCl ₃). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si (p<0,05).	77
Figura A-62. Imagens AFM de soluções de lactoferrina após o processo de gelificação (0,2 % lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0007 mol/L) – 10 × 10 μm.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1. Condições experimentais para a formação dos nanohidrogéis	21
Tabela 4-2. Tamanho e polidispersividade de soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 7) sem aquecimento e sem sal, com aquecimento e sem sal e com aquecimento e com sal	31
Tabela 4-3. Tamanho e índice de polidispersividade dos nanohidrogéis antes e depois da liofilização	47
Tabela A-4. Tamanho e polidispersividade das soluções de proteína para diferentes concentrações de Lactoferrina	72
Tabela A-5. Tamanho e polidispersividade nas soluções de proteína – Influência da Concentração de FeCl_3	76
Tabela A-6. Tabela-resumo dos ensaios realizados para a formação dos nanohidrogéis, a partir das condições para a obtenção de um hidrogel (sistema macro)	79

LISTA DE NOMENCLATURA GERAL

ABREVIATURAS

bLf – Lactoferrina bovina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Da – Dalton

DLS – Dispersão Dinâmica da Luz

DTP – Distribuição do Tamanho das Partículas

EAA – Espectroscopia de Absorção Atômica

EUA – Estados Unidos da América

FTIR – Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier

g – Grama

IV – Infravermelho

PDI – Índice de Polidispersividade

L – Litro

Lf – Lactoferrina

TEM – Microscopia Electrónica de Transmissão

m – Metro

μm – Micrómetro

μL – Microlitro

mg - Miligrama

min – Minutos

mol – Mole

mV – Milivolts

nm – Nanómetro

NPs – Nanopartículas

pI – Ponto Isoeléctrico

PZ – Potencial Zeta

rpm – Rotações por minuto

RU – Reino Unido

SÍMBOLOS

d – Diâmetro

h – Horas

T – Temperatura

T_{amb} – Temperatura ambiente

% T – Transmitância (percentagem)

CAPÍTULO 1

MOTIVAÇÃO, OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO

Neste capítulo, irá ser apresentada a motivação para a realização desta tese, os principais objectivos, assim como a forma como a dissertação está organizada.

1.1 MOTIVAÇÃO	2
1.2 OBJECTIVO	3
1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE	3

1.1 MOTIVAÇÃO

A nanotecnologia pode ser usada em aplicações na indústria alimentar [por exemplo, nanopartículas (NPs)] (Deleers, Pathak, & Thassu, 2007). Os nanohidrogéis são NPs gelificadas de tamanho nanométrico. Os nanohidrogéis têm várias características, entre as quais: biocompatibilidade, elevada retenção de água e grande área superficial (Oh, Drumright, Siegwart, & Matyjaszewski, 2008; Hamidi, Azadi, & Rafiei, 2008).

Podem ser distinguidos vários tipos de nanohidrogéis, dependendo do material usado para a sua produção, que podem ser baseados em lípidos, proteínas e polissacarídeos. Para o desenvolvimento de nanohidrogéis à base de proteínas de grau alimentar, existe uma grande variedade que pode ser usada, como por exemplo β -lactoglobulina, lisozima, ovalbumina e lactoferrina (Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006; Yu, Yao, Jiang, & Zhang, 2006; Remondetto, Paquin, & Subirade, 2002).

Sendo a lactoferrina (Lf) uma proteína, que é particularmente abundante no leite, tem grande interesse devido às suas propriedades funcionais (por exemplo: antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-tumoral, imunológica e actividades enzimáticas) (Brock, 2002). Além disso, tem uma elevada afinidade para com o ferro (Fe) (Baker, et al., 1994).

A possível sinergia entre as características da lactoferrina e as do Fe através da produção de nanohidrogéis, poderá originar um sistema para fortificar os alimentos de forma vantajosa. Os consumidores no mundo industrializado estão cada vez mais conscientes da relação entre dieta e saúde (Palzer, 2009). A deficiência de Fe é um problema de saúde, que afecta uma larga proporção da população mundial (MacPhail & Bothwell, 1992), podendo a fortificação alimentar de Fe contribuir para a redução desta carência nutricional (Cook & Reusser, 1983).

1.2 OBJECTIVO

O principal objectivo desta tese foi o desenvolvimento de nanohidrogéis de proteínas do leite, com a incorporação de ferro para aplicação na indústria alimentar e na sua caracterização físico-química. Este trabalho focou-se na:

- Avaliação da eficácia do método de desenvolvimento dos nanohidrogéis;
- Estudo da influência do tempo, temperatura e pH no desenvolvimento do nanohidrogéis;
- Avaliação e quantificação da incorporação de ferro nos nanohidrogéis;
- Avaliação da libertação do ferro ao longo do tempo.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese está organizada em sete capítulos. Neste primeiro capítulo, são descritos três pontos: Motivação, Objectivos e Organização da Tese.

O Capítulo 2 faz a introdução ao tema da dissertação, onde se foca o método de obtenção dos nanohidrogéis, a proteína usada, o composto adicionado e as técnicas de caracterização.

No Capítulo 3, abordam-se os materiais e os métodos utilizados na obtenção e caracterização dos nanohidrogéis.

Quanto ao Capítulo 4, é o capítulo onde se mostram os resultados obtidos, desde o desenvolvimento até à caracterização do nanohidrogel, assim como a sua discussão.

Finalmente, no Capítulos 5, apresentam-se as principais conclusões e sugerem-se trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO

2.1 A NANOTECNOLOGIA E A ÁREA ALIMENTAR

A nanotecnologia é um novo campo da ciência que envolve fabrico, transformação e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas de controlo da forma e tamanho na escala nanométrica (Peters, et al., 2011). Não é apenas o estudo de estruturas na escala nanométrica, mas também a aplicação prática desse conhecimento. Geralmente, a nanotecnologia refere-se a uma série de técnicas para manipulação directa de materiais, organismos e sistemas numa escala até cerca de 100 nanómetros – um nanómetro (nm) corresponde a um bilionésimo de um metro (m).

As nanotecnologias oferecem novos e mais poderosos meios para manipular e controlar a matéria ao nível dos átomos, moléculas, genes e células. A Nanotecnologia pode ser entendida não tanto como um campo técnico-científico separado e distinto, mas sim como uma nova plataforma técnico-científica, na qual uma gama de disciplinas existentes - como biotecnologia molecular, química, ciência de materiais e tecnologias da informação - são capazes de mudar o seu foco para o nível molecular (ETC Group, 2003).

A nanotecnologia é entendida como uma das tecnologias-chave deste século, visto possuir um grande potencial para gerar novos produtos, e com inúmeros benefícios e vantagens. Os materiais de tamanho nanométrico apresentam diferentes propriedades, comparativamente aos de tamanho superior – micro e macro, resultantes do seu tamanho, sendo mais vantajosos. Essas diferenças incluem força física, reactividade química, condutância eléctrica, magnetismo e efeitos ópticos (Joseph & Morrison, 2006).

Esta tecnologia está a ser cada vez mais utilizada na área alimentar, tanto no desenvolvimento de embalagens como na produção de alimentos (Kuzma & VerHage, 2006; Sanguansri & Augustin, 2006). Isto é conseguido através do desenvolvimento de tecnologias nano-químicas, nano-biotecnologias e tecnologias de nano-informação (Hinsliff, 2009). No sector da indústria alimentar, o desenvolvimento de uma nova gama de técnicas de processamento e aditivos está em curso que, por diversas vezes, visam modificar o sabor e a textura dos alimentos, velocidade de processamento, tolerância ao calor, validade, perfil nutricional e biodisponibilidade de nutrientes (Moraru, Panchapakesan, Huang, Takhistov, Liu, & Kokini, 2007). O desenvolvimento e a comercialização desses produtos alimentares funcionais são enquadrados no paradigma reduzido nutricionalmente do “nutricionismo” que, actualmente, domina a relação de entendimento científico e popular entre alimentação e saúde (Scrinis, 2008).

Tal como Sanguansri e Augustin referem, a nanotecnologia não só irá aumentar a capacidade dos tecnólogos alimentares para desenvolver alimentos fraccionados nos seus componentes à nano-escala, mas também irá fornecer novas técnicas para a reconstituição e transformação desses componentes individuais, antes de serem reagrupados para formar alimentos “processed-reconstituted” (Sanguansri & Augustin, 2006).

2.2 BIOPOLÍMEROS

Na indústria alimentar, há um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas de libertação para encapsular, proteger e libertar compostos funcionais em alimentos (Aguilera, 2000; Augustin, Sanguansri, Margetts, & Young, 2001; McClements, Decker, & Weiss, 2007; Mezzenga, Schurtenberger, Burbidge, & Michel, 2005; Sanguansri & Augustin, 2006). Esses sistemas devem ser preparados com reagentes de grau alimentar, edíveis e biodegradáveis de forma a serem degradados pelo organismo mas, ao mesmo tempo tendo um valor nutritivo associado. Uma hipótese promissora são os materiais à base de biopolímeros, tais como polissacarídeos e proteínas (Benichou, Aserin, & Garti, 2002; Burey, Bhandari, Howes, & Gidley, 2008; Chen, Remondetto, & Subirade, 2005; Dickinson, 2003; Malone & Appelqvist, 2003; Norton & Frith, 2001; Sundar, Kundu, & Kundu, 2010).

2.2.1 PROTEÍNAS

Biopolímeros alimentares, especificamente proteínas, são amplamente utilizados em alimentos formulados, devido ao seu elevado valor nutritivo. São assim reconhecidos como biopolímeros de grau alimentar. As proteínas alimentares têm excelentes propriedades que lhes permitem ser aplicadas como ingredientes na indústria alimentar, tais como: emulsificante, gelificante, formação de espuma e, capacidade de ligação à água, além de outras propriedades funcionais (Bryant & McClement, 1998; Clark A. H., 1998; Walstra, 2003).

A selecção de proteínas, polissacarídeos e outros componentes para formar partículas poliméricas depende de vários factores: (i) capacidade dos componentes para formarem partículas; (ii) requisito funcional para as partículas (por exemplo, tamanho, carga e estabilidade às condições ambientais; (iii) estatuto legal, custo, facilidade de uso, consistência dos ingredientes e operações de transformação (Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006).

Proteínas são polímeros biológicos, compostos por aminoácidos e com uma variedade de estruturas gerais diferentes (por exemplo, proteínas fibrosas e globulares (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). A estrutura molecular adoptada por uma proteína específica depende da sua sequência de aminoácidos e condições ambientais, por exemplo, exposição a diferentes temperaturas, pressões, solventes, pH e composições iónicas (Phillips, Whitehead, & Kinsella, 1994).

Vários factores devem ser considerados ao seleccionar uma ou mais proteínas para desenvolver sistemas biopoliméricos. Primeiro, é importante estabelecer as condições onde as moléculas proteicas têm capacidade de se associar a outras proteínas ou não, formando estruturas, por exemplo condições de solução e ambientais: pH, temperatura e concentração de proteína. Isso, geralmente, requer o conhecimento das características físico-químicas específicas das proteínas envolvidas, como as temperaturas de desnaturação térmica (para proteínas globulares), ponto isoeléctrico (pI), sensibilidades para iões monovalentes ou multivalentes específicos, ou susceptibilidade para enzimas específicas ou reacções químicas *cross-linking* ou de degradação. Em segundo lugar, muitas vezes é importante estabelecer as características eléctricas das moléculas proteicas envolvidas, visto que as interacções electrostáticas são frequentemente utilizadas na formação da estrutura, que pode ser convenientemente descrita pelo potencial-zeta

versus perfil de pH. A carga eléctrica nas proteínas vai desde positiva abaixo do seu pI , a zero no pI ou a negativa acima do pI . Mesmo que a carga numa proteína seja zero no seu pI , ainda existem regiões positivas e negativas na superfície proteica, e portanto, podem ser envolvidas em interações electrostáticas atractivas e/ou repulsivas. Em terceiro lugar, é geralmente importante conhecer a natureza das partículas biopoliméricas que se podem formar depois da associação proteica, como a sua morfologia (globular, fibrosa), propriedades físicas (densidade, índice de refração), tamanho, carga e estabilidade (por exemplo, ao pH, força iónica, temperatura e enzimas). Estes factores determinam como as partículas podem ter impacto nas características ópticas, funcionais, reológicas e na estabilidade dos produtos em que são incorporados (LaClair & Etzel, 2010).

A gelificação de proteínas e, particularmente de proteínas globulares (por exemplo, da clara do ovo, de soja e proteínas do soro do leite), têm atraído muita atenção ao longo dos anos, facto que se deve à sua importância físico-química e industrial (Bryant & McClement, 1998; Ziegler & Foegeding, 1990). As proteínas do soro do leite (como a β -lactoglobulina e a lactoferrina, por exemplo) têm sido muito usadas em produtos alimentares devido ao seu elevado valor nutricional e à sua capacidade de gelificação (Xiong & Kinsella, 1990).

2.2.1.1 LACTOFERRINA

A lactoferrina bovina (bLf) pertence às proteínas globulares, é uma glicoproteína, da família das transferrinas, de cadeia simples com um peso molecular de cerca de 80 KDa e, aproximadamente, 700 aminoácidos (Levay & Viljoen, 1995; Öztas Yesim & Özgünes, 2005). A Lf é um transportador de ferro – tem alta afinidade para o Fe – e pode ser encontrada em duas formas diferentes: hololactoferrina, saturada de ferro e apolactoferrina, sem ferro. A sua estrutura consiste em dois lóbulos (C – Carboxi e N – Amino) com uma capacidade reversível de ligação ao ferro, de dois átomos por molécula de Lf (um átomo por cada lóbulo), com um HCO_3^- sendo sinergicamente ligado com cada ião Fe^{3+} . A Lf tem uma capacidade de ligação ao Fe duas vezes maior que a das transferrinas, que podem servir, em alguns casos, como dadoras de iões Fe^{3+} para a Lf. Dois iões férricos podem ser ligados por uma molécula de Lf. Um ião carbonato está sempre ligado, simultaneamente, com um ião férrico pela Lf (Aisen & Liebman, 1972; Metz-Boutique, et al., 1984). Quando o Fe está ligado à molécula de Lf, é adoptada uma conformação mais fechada, comparativamente à proteína sem ferro ligado (Levay & Viljoen, 1995). O pI da Lf

é bastante elevado, cerca de 8–9, e pode ser explicado por uma única região fundamental na região N-terminal da Lf, que pode ligar moléculas ácidas (Brock, 2002; Levay & Viljoen, 1995; Moguilevsky, Retegui, & Masson, 1985).

A Lf pode ser eliminada do organismo de duas maneiras distintas: através de um receptor – endocitose mediada por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e outras células pertencentes ao sistema reticuloendotelial) com subsequente transferência de Fe para a ferritina – ou através da absorção directa pelo fígado. A endocitose realizada por células de Kupffer, células endoteliais do fígado e hepatócitos contribuem para a remoção da Lf (Levay & Viljoen, 1995).

Além da capacidade de se ligar ao Fe, o principal interesse na Lf reside nas suas diferentes propriedades biológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-tumoral, imunológica e actividades enzimáticas (Brock, 2002).

Quanto à capacidade antimicrobiana da Lf, esta participa em reacções imunes específicas, mas de forma indirecta (Legrand, Ellass, Carpentier, & Mazurier, 2005). Devido à sua posição estratégica sobre a superfície mucosa, representa assim, um dos primeiros sistemas de defesa contra agentes microbianos, que invadem o organismo, principalmente através dos tecidos da mucosa. A Lf afecta o crescimento e a proliferação de uma grande variedade de agentes infecciosos, incluindo bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, vírus, protozoários ou fungos (Kirkpatrick, Green, Rich, & Schade, 1971).

A capacidade de ligação ao Fe, que é um dos elementos essenciais para o crescimento das bactérias, é responsável pelo efeito bacteriostático da Lf (Arnold, Brewer, & Gauthier, 1980). A falta de Fe inibe o crescimento das bactérias dependentes de Fe como a *Escherichia coli*. Pelo contrário, a Lf pode servir como dadora de Fe, de forma a ajudar o crescimento de algumas bactérias com baixo Fe como *Lactobacillus* sp. ou *Bifidobacterium* sp., geralmente consideradas como benéficas (Petschow, Talbott, & Batema, 1999; Sherman, Bennett, Hwang, & Yu, 2004).

Outro meio inibidor de bactérias é através de receptores para a região N-terminal da Lf, descobertos na superfície de alguns microrganismos. A ligação da Lf a estes receptores induz a

morte celular de bactérias Gram-negativas, devido a uma interrupção na parede celular. Em bactérias Gram-positivas, a actividade bactericida é mediada por interacções electrostáticas entre a camada lipídica, de carga negativa, e a superfície da Lf, de carga positiva, que causam alterações na permeabilidade da membrana (Leitch & Willcox, 1998).

A Lf, também tem efeito antiviral. A sua principal contribuição consiste na sua ligação aos glicosaminoglicanos da membrana celular. Assim, a Lf evita que os vírus entrem nas células e a infecção é parada numa fase precoce (Ward, Paz, & Conneely, 2005).

Contra vários parasitas, a Lf também pode ser útil. Crê-se que esta proteína rompa a membrana dos parasitas, causando subsequentes alterações entre o hospedeiro e o parasita (Omata, et al., 2001). Ainda, a competição de Fe, entre o parasita e a Lf, é a base da actividade antiparasitária contra *Pneumocystis carinii*, por exemplo (Cirioni, Giacometti, Barchiesi, & Scalise, 2000). Por outro lado, alguns parasitas como *Tritrichomonas foetus* são capazes de usar a Lf como dadora de iões (Tachezy, Kulda, Bahnikova, Suchan, Razga, & Schrevel, 1996).

Relativamente à capacidade anti-tumoral, estudos científicos têm mostrado que a Lf também exhibe esta actividade. A proteína mostrou inibir o desenvolvimento de metástases em ratos e, também ser capaz de deter o crescimento de células cancerígenas na glândula mamária humana, por exemplo (Bezault, Bhimani, Wiprovnick, & Furmanski, 1994; Wolf, 2003).

A Lf tem, também, a capacidade de funcionar como uma enzima em algumas reacções. Esta, é a proteína do leite com os níveis mais elevados de actividade da amilase, DNase, RNase e ATPase (Devy, Das, & Pandir, 1994). Mas a base para as várias actividades enzimáticas da Lf é desconhecida. No entanto, pode ser atribuída às variações na natureza da proteína: graus de glicosilação e estrutura terciária (holo- ou apo- Lf), por exemplo (Furmanski, Li, & Fortuna, 1989).

2.2.1.2 A LACTOFERRINA NA FORMAÇÃO DOS NANOHIIDROGÉIS

A Lf pode ser usada na formação de nanohidrogéis, sendo a gelificação, geralmente, alcançada através de tratamento térmico. No processo de agregação são envolvidas várias forças, que incluem efeitos hidrofóbicos e interacções de Van der Waals, ligações de hidrogénio e interacções covalentes (Ziegler & Foegeding, 1990). Dependendo da técnica de preparação, os

géis podem exibir propriedades estruturais diferentes, que estão fortemente relacionadas com a estrutura molecular agregada (Lefèvre & Subirade, 2000). No entanto, o calor necessário para produzir os géis implica que não sejam usados ingredientes sensíveis ao calor.

A Lf, bem como todas as proteínas globulares, desnaturam em solução aquosa quando aquecida. Acima de uma determinada concentração de proteína, há a formação de géis com estruturas e propriedades mecânicas diferentes, dependendo da concentração de sal e pH da solução (Clark A. H., 1998).

2.3 FORMAÇÃO DOS NANOHIIDROGÉIS

Para que as proteínas, como a Lf, gelifiquem, são necessários tratamentos térmicos ou a adição de agentes orgânicos desnaturantes (por exemplo, ureia) (Xiong & Kinsella, 1990). Um processo particularmente interessante é a *cold-gelation*. Este método, requer um passo de aquecimento, durante o qual a proteína desnatura e polimeriza. Depois, segue-se o passo de arrefecimento e, subsequente adição de sal [como Cloreto de Cálcio (CaCl_2), Sulfato de Ferro (II) (FeSO_4), Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Magnésio (MgCl_2), Sulfato de Sódio (Na_2SO_4), Sulfato de Magnésio (MgSO_4), Cloreto de Ferro (III) (FeCl_3), etc.] (Roff & Foegeding, 1996). A formação de nanohidrogéis a frio (*cold-gelation*) abre oportunidades interessantes para as proteínas alimentares como transportadoras de compostos nutritivos e no desenvolvimento de ingredientes funcionais inovadores (Remondetto, Paquin, & Subirade, 2002).

A seguir é apresentado um fluxograma com todo o processo de gelificação das proteínas com adição de sal (Figura 2-1).

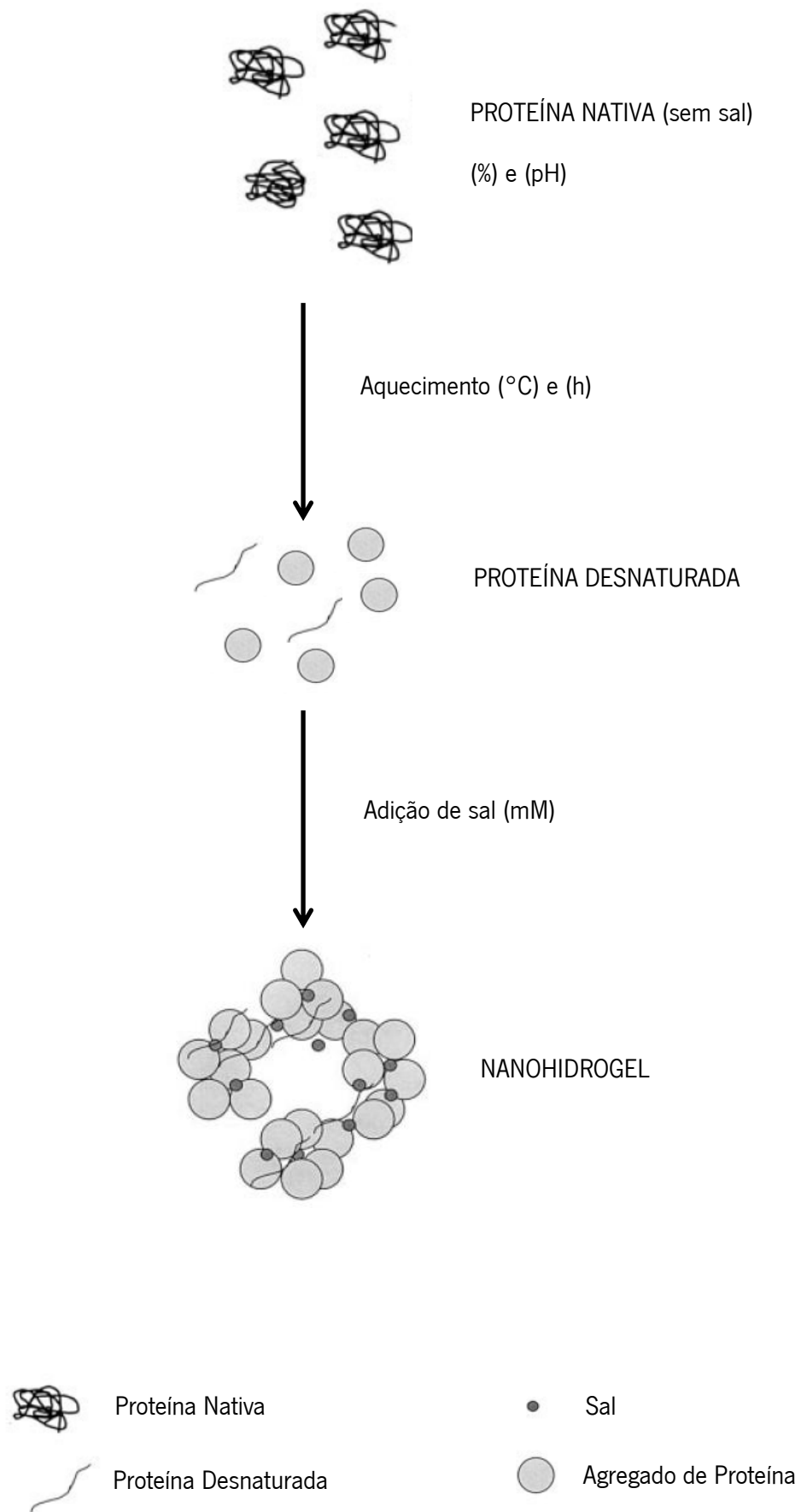


Figura 2–1. Processo de formação dos nanohidrogéis com sal.

2.4 FERRO E SAÚDE

A deficiência em Fe (anemia) afecta cerca de 2 biliões de pessoas no mundo (Remondetto, Paquin, & Subirade, 2002; Kosse, Yeung, Gil, & Miller, 2001). A estratégia ideal é incluir na dieta uma larga variedade de alimentos ricos em Fe e aumentar a sua absorção (Mason, Lotfi, Dalmiya, Spethuramen, & Deitchler, 2001). No entanto, o Fe incorporado em sistemas complexos como alimentos tem vários problemas, como a oxidação e a precipitação, resultando numa baixa bioeficácia (van der Meer, Bovee-Oudenhoven, Sesink, & Kleibeuker, 1998). Então, os sistemas alimentares que conseguirem, efectivamente, transportar e proteger o Fe representarão um campo de grande interesse.

2.4.1 NANOHIIDROGÉIS COM FERRO

Na indústria alimentar, o uso de nanohidrogéis a partir de proteínas, de grande valor nutricional, constitui uma estratégia interessante para a protecção de micronutrientes como o Fe. Além disso, a presença de aminoácidos é necessária para aumentar a bioeficácia do Fe. Por esta razão, alimentos que contenham Fe e aminoácidos são, do ponto de vista nutricional, muito vantajosos. Assim, a formação de matrizes de grau alimentar à base de proteínas, capazes de encapsular/ligar e proteger o micronutriente (neste caso, o Fe), tem um grande potencial na indústria alimentar (Wapnir, 1990; Benito & Miller, 1998).

Os nanohidrogéis desenvolvidos a partir da Lf, bem como das proteínas do leite em geral, são biodegradáveis e não necessitam de qualquer agente de reticulação para a sua concepção. Por estas razões, podem ser aplicados na indústria alimentar, na indústria farmacêutica e de cosmética (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHIIDROGÉIS

Os nanohidrogéis, são geralmente caracterizados pelo seu tamanho, morfologia e carga superficial. Para a caracterização, são usadas técnicas avançadas de microscopia como a Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) e/ou a Microscopia de Força Atómica (AFM). As

técnicas de microscopia electrónica são muito úteis para verificar a forma geral dos nanohidrogéis.

O diâmetro médio, a distribuição do tamanho e a carga dos nanohidrogéis, afectam a estabilidade física e a distribuição *in vivo* destes (Mu & Seow, 2006). O método mais usado, actualmente, para determinar o tamanho e a carga dos nanohidrogéis é o Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) (Berne & Pecora, 1975).

Além do tamanho, da carga e da morfologia dos nanohidrogéis, também a sua estabilidade e estrutura devem ser verificadas.

2.5.1 TAMANHO E CARGA ELÉCTRICA

As dimensões das partículas/nanohidrogéis em suspensão coloidal são geralmente expressas como Distribuição do Tamanho das Partículas (DTP) ou como Diâmetro médio da partícula (d) e Índice de Polidispersividade (PDI).

Quanto às características eléctricas dos nanohidrogéis, estas são determinadas pelas características eléctricas dos diversos componentes usados na sua formação, assim como pelo pH, composição iónica e constante dieléctrica do meio circundante. Os nanohidrogéis podem ter cargas eléctricas altamente positivas, bem como bastante negativas, dependendo da sua composição e das condições ambientais (Matalanis, Jones, & McClements, 2011). Quando o pH do meio for inferior ao pI , a carga dos nanohidrogéis é positiva; se o pH for superior ao pI , a carga dos nanohidrogéis é negativa; caso o pH seja igual ao pI , a carga dos nanohidrogéis é zero (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

2.5.1.1 DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

O DLS é amplamente utilizado para determinar o tamanho das nanopartículas em suspensão na gama micro e nano, bem como a carga eléctrica/Potencial Zeta (PZ) (Berne & Pecora, 1975). As partículas em suspensão sofrem movimentos aleatórios quando são atingidas por um feixe de luz (laser). A intensidade de luz detectada é dependente da velocidade de difusão, que por sua vez, é governada pelo tamanho das partículas. Este método tem muitas vantagens: rápido;

quase automático e não requer uma vasta experiência. Também, os custos de desenvolvimento são modestos. Além destas vantagens, o uso do DLS possibilita a análise de amostras que contêm distribuições amplas de espécies diferindo largamente nas massas moleculares (por exemplo, uma proteína nativa e vários tamanhos de agregados), e a detecção de quantidades muito pequenas de espécies de maior massa (<0,01 % em muitos casos) (Takahashi, Kato, Saito, Matsuyama, & Kinugasa, 2008).

2.5.2 ESTABILIDADE

Para qualquer sistema de libertação, é essencial que o sistema seja estável durante todo o ciclo de vida do produto. Além disso, os nanohidrogéis não devem afectar negativamente o tempo de prateleira normal dos produtos. Os nanohidrogéis podem tornar-se instáveis por uma variedade de mecanismos, incluindo a separação gravitacional (desnaturação ou sedimentação), agregação (floculação ou coalescência), alterações volumétricas (aumento ou diminuição do tamanho da NP) e dissociação (erosão ou desintegração). A instabilidade dos nanohidrogéis depende das suas características, tais como composição, tamanho, carga e estrutura, bem como das condições ambientais (como temperatura, pH, e força iónica) (Matalanis, Jones, & McClements, 2011). A estabilidade é determinada pelo tamanho, PDI e PZ dos nanohidrogéis ao longo do tempo, pH ou temperatura. Para avaliar ao tamanho, PDI e PZ, usa-se o DLS.

2.5.3 PROPRIEDADES ÓPTICAS

A aparência é um dos atributos mais importantes para um produto alimentar. O impacto dos nanohidrogéis – propriedades ópticas – tem consequências importantes na sua utilização em diferentes tipos de alimentos. Por exemplo, alguns produtos, como bebidas claras, devem ser transparentes. Por outro lado, iogurtes ou molhos cremosos, por exemplo, devem ser opacos. Ao controlar o tamanho e o índice de refração dos nanohidrogéis, estes podem ser incorporados em alimentos, sem afectar as suas propriedades ópticas (McClements, 2002).

A determinação da turbidez numa solução permite conhecer as propriedades ópticas da solução. A turbidez é a medida da dificuldade de um feixe de luz atravessar uma determinada quantidade de amostra, usando um método espectrofotométrico. A turbidez é causada por partículas sólidas em

suspensão (colóides, matéria orgânica, etc.) numa solução (Matalanis, Jones, & McClements, 2011).

2.5.4 MORFOLOGIA

O tamanho e a morfologia dos nanohidrogéis exercem uma profunda influência sobre as propriedades físicas e químicas que determinam a sua interacção com os sistemas ambiental e biológicos. Afim de analisar a morfologia dos nanohidrogéis, bem como das nanopartículas em geral, existem algumas técnicas, como as técnicas microscópicas. Por exemplo, o TEM e o AFM, juntamente com a análise do tamanho e da distribuição das partículas, determinam a morfologia e a rugosidade da superfície dos nanohidrogéis.

2.5.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

O TEM permite obter as características superficiais da amostra. A preparação da amostra para o TEM pode ser complexa e demorada, devido à necessidade de uma camada ultra fina para a transmissão de electrões. A amostra é depositada num suporte de grelha ou filme. De modo a que a amostra resista ao vácuo e facilitar a manipulação, pode ser necessário usar um qualquer material de coloração negativo, como o acetato de uranilo, por exemplo. Outro modo alternativo, é expor a amostra a temperaturas de azoto líquido após a incorporação em gelo vítreo. Caso estes meios não sejam necessários, basta apenas secar a amostra com papel absorvente, depois de alguns minutos no suporte. As características da superfície da amostra são obtidas quando um feixe de electrões é transmitido através de uma amostra ultra fina (Reimer & Kohl, 2008).

2.5.4.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA

AFM é outra ferramenta usada para caracterizar uma variedade de superfícies, incluindo os nanohidrogéis, a nível atómico e é uma das principais formas de microscópicos de varrimento por sonda. A principal vantagem da AFM é a sua capacidade de imagem para amostras não condutoras sem qualquer tratamento específico, permitindo assim a imagem de micro e nanoestruturas. Este método, pode ser realizado em condições ambientais. O varrimento com

uma forte sonda em toda a superfície e, depois, monitorizar e compilar as interações na extremidade da amostra, fornece a imagem da superfície desta (Magonov, 1993).

2.5.5 ESTRUTURA

A análise de alterações na estrutura das amostras (sem ferro e com ferro, por exemplo) é fundamental para compreender a natureza das modificações que ocorrem na proteína em termos de ligação química.

2.5.5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER

O FTIR fornece informações sobre os detalhes estruturais da amostra. A amostra utilizada para a caracterização é geralmente liofilizada. O princípio básico que rege esta técnica é que as ligações e os grupos de ligações vibram a frequências características. A molécula que é exposta aos raios infravermelhos (IV) absorve energia em frequências que caracterizam essa molécula. A análise FTIR realiza-se pela iluminação da amostra com um feixe modulado infravermelho. A transmitância da amostra e a reflectância de raios IV em diferentes frequências são traduzidas num campo de absorção de IV, que é então analisado e comparado com a assinatura conhecida de materiais identificados na biblioteca FTIR (Haris & Severcan, 1999; Settle, 1997).

2.5.6 LIGAÇÃO E LIBERTAÇÃO DE UM COMPOSTO

Os nanohidrogéis também podem ser caracterizados pela sua capacidade de ligação e de libertação de um composto (neste caso, o Fe). Após a separação dos nanohidrogéis, por centrifugação e filtração, do resto da solução, é usada uma técnica analítica, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ou Espectroscopia de Absorção Atómica (EAA), entre outras. A eficiência de ligação refere-se ao rácio entre a quantidade de composto ligado e de composto total absorvido (teórico) pelos nanohidrogéis.

Os ensaios de libertação, após a separação dos nanohidrogéis, são usados por um período de tempo, afim de analisar o mecanismo de libertação de um composto.

2.5.6.1 MÉTODO ANALÍTICO

2.5.6.1.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

EAA permite determinar quantitativamente, com sensibilidade suficiente, mais de 60 elementos. É um método instrumental comum para analisar metais e alguns metalóides.

A sua aplicação é apropriada para determinações de rotina, mesmo com operadores relativamente pouco treinados. Este método é rápido, possui elevada selectividade e tem custos relativamente moderados (Skoog, West, & Holler, 1992).

Na absorção atómica, mede-se a quantidade de radiação que é absorvida, no comprimento de onda de ressonância de um determinado elemento, após atravessar uma nuvem de átomos. À medida que o número de átomos, existentes no caminho que a luz atravessa, aumenta, a quantidade de luz absorvida também aumenta. Então, medindo a quantidade de luz (ou radiação) absorvida, torna-se possível a determinação quantitativa do analito (elemento) presente, de acordo com a Lei de Beer (Beaty & Kerber, 1993).

Neste método, utiliza-se uma fonte de luz específica para cada elemento que se pretende quantificar. Assim, e com a selecção cuidadosa dos comprimentos de onda é permitido determinar quantitativamente um determinado elemento na presença de outros (Beaty & Kerber, 1993).

A nuvem atómica necessária às medições em absorção atómica é produzida através do fornecimento de energia térmica suficiente à amostra, de forma a permitir a dissociação dos compostos químicos – moléculas em átomos livres (Beaty & Kerber, 1993).

O método baseia-se na aspiração da amostra que é lançada numa chama, devidamente alinhada com o feixe de luz do comprimento de onda de interesse. Assim, usando a chama em condições adequadas, a maioria dos átomos mantém-se no seu estado fundamental, ficando aptos a absorver energia no comprimento de onda característico da lâmpada (Beaty & Kerber, 1993).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENVOLVIMENTO DOS NANOHIIDROGÉIS

3.1.1 MATERIAIS

A lactoferrina foi obtida da DMV International (EUA) e o Cloreto de Ferro (III) anidro, com um grau de pureza de 97 %, obtido da Panreac (Barcelona, Espanha).

3.1.2 FORMAÇÃO DOS NANOHIIDROGÉIS

O trabalho iniciou-se com o estabelecimento das condições de formação dos hidrogéis num sistema macro, onde a gelificação é visível. Após se determinarem as condições ideais para a geração dos hidrogéis (sistema macro), seguiu-se a fase onde se fez a adaptação dessas condições para o sistema nano, de modo a se obterem os nanohidrogéis.

Numa primeira fase, começou-se por dissolver 9,5 % de lactoferrina, em água desionizada. A proteína dissolve-se, em agitação, durante cerca de 5 horas (h). Após a total dissolução, mede-se o pH da solução e ajusta-se para o pH pretendido, usando soluções ácido-base [Ácido Clorídrico (HCl) e Hidróxido de Sódio (NaOH), respectivamente, ambas 1 mole/litro (mol/L)]. Depois de acertar o pH, coloca-se a solução à temperatura (T) pretendida durante o tempo estabelecido. Depois de aquecida, volta-se a medir o pH e, caso seja necessário, ajusta-se para o pH pretendido. Adiciona-se um sal à solução, e deixa-se arrefecer a solução, à temperatura ambiente (T_{amb}), durante 4 h.

Com o objectivo de determinar as melhores condições para a formação dos nanohidrogéis, fizeram-se vários ensaios, entre os quais se analisou a influência do tipo de sal, influência da concentração de sal, influência da temperatura e do tempo de aquecimento, influência do pH e influência da concentração de proteína. Testaram-se vários valores de pH, pois, dependendo do pH da solução há maior ou menor agregação das proteínas devido à repulsão electrostática. Também se variou a temperatura e o tempo de aquecimento, uma vez que a desnaturação das proteínas é superior numa determinada temperatura, após algum tempo de aquecimento. O sal induz a gelificação, por isso é importante determinar o tipo e a concentração mínima em que há a melhor gelificação da Lf (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011; Remondetto, Paquin, & Subirade, 2002; Tokle & McClements, 2011).

Na tabela seguinte (Tabela 3–1), apresentam-se as condições experimentais na formação dos nanohidrogéis até se chegar ao sistema final (0,2 % Lf, pH 7, 20 min, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃). O sistema final é aquele que permite a gelificação da Lf com menor tamanho (nanohidrogéis) e estável.

Tabela 3–1. Condições experimentais para a formação dos nanohidrogéis

Nº	Proteína	Concentração de proteína (%)	Tempo de aquecimento (min)	Temperatura (°C)	pH	Tipo de sal	Concentração de sal (mol/L)
1	Lf	9,5	30	80	5	FeSO ₄	0,02
2	Lf	9,5	45	85	5	FeSO ₄	0,02
3	Lf	9,5	45	85	2	FeSO ₄	0,02
4	Lf	9,5	45	85	4	FeSO ₄	0,02
5	Lf	9,5	45	85	7	–	0
6	Lf	9,5	45	85	9	–	0
7	Lf	9,5	45	85	12	FeSO ₄	0,02
8	Lf	9,5	45	85	12	–	0
9	Lf	9,5	45	85	12	FeSO ₄	0,005
10	Lf	9,5	45	85	12	FeSO ₄	0,01
11	Lf	9,5	45	85	12	FeCl ₃	0,02
12	Lf	9,5	45	85	12	CaCl ₂	0,02
13	Lf	9,5	45	85	4	FeCl ₃	0,02
14	Lf	9,5	45	85	4	FeCl ₃	0,04
15	Lf	9,5	45	85	4	CaCl ₂	0,02
16	Lf	9,5	45	85	4	FeCl ₃	0,035
17	Lf	9,5	45	85	4	FeCl ₃	0,05
18	Lf	5,0	45	85	4	FeCl ₃	0,0184
19	Lf	2,5	45	85	4	FeCl ₃	0,0092
20	Lf	1	45	85	4	FeCl ₃	0,0037
21	Lf	0,5	45	85	4	FeCl ₃	0,0018
22	Lf	0,4	45	85	4	FeCl ₃	0,0015
23	Lf	0,3	45	85	4	FeCl ₃	0,0011
24	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0007
25	Lf	0,1	45	85	4	FeCl ₃	0,0004
26	Lf	0,05	45	85	4	FeCl ₃	0,0002
27	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0011
28	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0014
29	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0017
30	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,002
31	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0023
32	Lf	0,2	45	85	4	FeCl ₃	0,0026
33	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0,035
34	Lf	0,2	20	75	4	FeCl ₃	0,035
35	Lf	0,2	20	75	10	FeCl ₃	0,035
36	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0
37	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0,01
38	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0,025
39	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0,04
40	Lf	0,2	20	75	7	FeCl ₃	0,055
41	Lf	0,2	20	60	7	FeCl ₃	0,035
42	Lf	0,2	20	70	7	FeCl ₃	0,035
43	Lf	0,2	20	80	7	FeCl ₃	0,035
44	Lf	0,2	20	90	7	FeCl ₃	0,035

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHIROGÉIS

3.2.1 DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

Na determinação do tamanho e da carga eléctrica dos nanohidrogéis, foi usado o DLS [Nano-Zs, Malvern Instruments, Reino Unido (RU)], cuvette de vidro (12mm square glass cell for 90, sizing with circular aperture and stopper – Malvern Instruments, RU), cuvette (Green disposable zeta cell, Malvern Instruments, RU).

A técnica DLS foi usada para analisar o tamanho, o PDI, o PZ dos nanohidrogéis e verificar a existência de um perfil de tamanhos, na avaliação, tanto da estabilidade (térmica, pH e ao longo do tempo) como da capacidade de resistência à liofilização dos nanohidrogéis produzidos.

No início deste trabalho, usou-se o DLS para determinar em que condições haveria a formação dos nanohidrogéis. Então, prepararam-se várias soluções de Lf, de acordo com a Tabela 3–1, retirou-se 1mL de amostra, colocou-se numa cuvette e analisou-se o tamanho, o PDI e o PZ, vendo qual o melhor perfil no DLS, a 25 °C. Após se determinarem as condições ideais (0,2 % Lf, pH 7, 20 min, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃) para a formação dos nanohidrogéis, foi então, avaliada a estabilidade (térmica, pH e ao longo do tempo) e a capacidade de os nanohidrogéis produzidos resistirem à liofilização.

Para avaliar a estabilidade térmica, preparou-se uma solução (segundo as condições ideais) e analisaram-se rampas de temperatura no DLS. As temperaturas usadas foram dos 4 °C–70 °C, com uma taxa de 8 °C. Assim, depois de preparada a solução, foram colocados 2 mL de amostra numa cuvette de vidro e analisou-se o tamanho dos nanohidrogéis, no DLS, a 25 °C.

Quanto à estabilidade dos nanohidrogéis ao pH, esta foi estudada de duas formas distintas. Primeiramente, o pH da solução de nanohidrogéis foi variado de 2 até 12. A cada pH, foi retirado 1 mL da solução e analisado quanto ao tamanho e PDI, no DLS, a 25 °C. A outra forma, usada para determinar a estabilidade ao pH, foi com a adição das soluções de nanohidrogéis a soluções com diferentes pHs. Foram utilizadas soluções com pHs entre 2 até 12, tendo sido, a solução de nanohidrogéis, adicionada na proporção 1/10. Da solução resultante, foi retirado 1 mL e analisado o tamanho e o PDI dos nanohidrogéis, no DLS, a 25 °C.

Com o objectivo de avaliar a estabilidade ao longo do tempo, foram analisados o tamanho, o PDI e o PZ dos nanohidrogéis, ao longo de 12 semanas. Nas 2 primeiras semanas, analisou-se o tamanho, o PDI e o PZ diariamente. A partir da 3^a semana, inclusive, o tamanho, o PDI e o PZ dos nanohidrogéis foram analisados semanalmente. Então, de modo a efectuar a estabilidade ao longo do tempo, foram feitas cinco réplicas da solução de nanohidrogéis, segundo as condições ideais (0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl₃). Nos dias determinados para analisar as amostras, retirou-se 1 mL e analisou-se (tamanho e carga) no DLS, a 25 °C. As cinco soluções foram, entretanto, acondicionadas à temperatura de 4 °C, na ausência de luz.

A capacidade dos nanohidrogéis resistirem à liofilização também foi estudada. Neste caso, foi preparada uma solução de nanohidrogéis que após a liofilização foi rehidratada. Adicionou-se água desionizada (volume igual ao que estava inicialmente, antes da liofilização) de forma a obter a mesma concentração de nanohidrogéis e homogeneizou-se a amostra, agitando a amostra, no ar, com movimento verticais (para cima e para baixo). Seguidamente, retirou-se 1 mL da amostra e, pelo DLS, a 25 °C, analisou-se o tamanho e o PDI dos nanohidrogéis.

3.2.2 TURBIDEZ

A turbidez das soluções foi determinada por um espectrofotómetro UV/Visível (Synergy HT, Bio-Tek, EUA).

A turbidez das soluções (0,2 % Lf, pH 7) foi analisada e, para isso, durante o aquecimento da Lf, retiraram-se 400 µL a cada 5 minutos, dos 0 minutos aos 20 minutos e, depois do NaCl adicionado, retiraram-se mais 400 µL da solução. As amostras retiradas foram colocadas numa placa Elisa (200 µL em cada poço) e analisadas no espectrofotómetro a 600 nm. Para o branco, usou-se água desionizada.

Já com o objectivo de analisar a turbidez em vários tempos de aquecimento dos nanohidrogéis, formados segundo as condições ideais, foi preparada uma solução de Lf (0,2 % Lf, pH 7) e, durante um período de 60 minutos de aquecimento (75 °C) da solução de Lf foram retirados

600 μL , a cada 5 minutos. As amostras recolhidas foram postas numa placa Elisa (200 μL em cada poço) e analisadas a 600 nm. Para o branco, usou-se água desionizada.

Também, a turbidez, variando a temperatura de aquecimento de formação dos nanohidrogéis, foi analisada. Foram preparadas cinco soluções (0,2 % Lf, pH 7, 20 min, 0,035 mol/L FeCl_3) e, cada uma, aquecida a uma temperatura diferente (60 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C e 90 °C). De cada solução, foram retiradas amostras de 600 μL a cada 5 minutos, do início (0 min) até ao fim do aquecimento (20 min) e, também, depois da adição do sal. As amostras recolhidas foram postas numa placa Elisa (200 μL em cada poço) e analisadas a 600 nm. Para o branco, usou-se água desionizada.

Por último, o efeito da concentração de sal na turbidez da solução de nanohidrogéis foi igualmente analisado. Para que tal fosse possível, prepararam-se seis soluções de Lf (0,2 % Lf, pH 7, 20 min, 75 °C), onde foram adicionadas diferentes concentrações de sal (0 mol/L, 0,01 mol/L, 0,025 mol/L, 0,035 mol/L, 0,04 mol/L e 0,05 mol/L FeCl_3). De cada solução, foram retirados 600 μL , de 5 em 5 minutos, entre os 0 minutos e os 20 minutos de aquecimento, assim como, depois de adicionado o sal. As amostras recolhidas foram postas numa placa Elisa (200 μL em cada poço) e, posteriormente, analisadas a 600 nm. Para o branco, usou-se água desionizada.

3.2.3 MORFOLOGIA

Para analisar a morfologia dos nanohidrogéis foram usadas as técnicas AFM [Nanoscope III Multimode (Digital Instruments, EUA), 10 μm \times 10 μm scan size] e TEM (ZEISS EM 902 A, Zeiss, Alemanha).

3.2.3.1 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA

Foi preparada uma solução de Lf (0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0007 mol/L FeCl_3) e, depois, colocada uma gota desta solução numa lâmina de vidro. A amostra (na lâmina) foi deixada secar e, mais tarde, levada ao AFM para analisar a morfologia dos “nanohidrogéis”.

3.2.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

Foi preparada uma solução de Lf, segundo as condições consideradas ideais (0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl₃) e, foi colocada uma gota desta solução, numa grelha. Deixou-se secar durante 2 minutos (permitindo que os nanohidrogéis ficassem presos na grelha). Colocou-se a grelha no TEM e observou-se a morfologia dos nanohidrogéis.

3.2.4 ESTRUTURA

Com o objectivo de estudar a estrutura dos nanohidrogéis, foi utilizada a técnica FTIR (Perkin Elmer precisely Spectrum 100, FTIR Spectrometer, 16 scans, EUA), recorrendo a uma prensa (SPECAC, Reino Unido) e a Brometo de Potássio (KBr) – Panreac, Barcelona, Espanha – na formação de pastilhas.

Foram preparadas 4 amostras [solução com 0,2 % Lf diluída em água desionizada, sem aquecimento e sem sal; solução com 0,2 % de Lf, aquecida 20 min, a 75 °C, sem Fe; solução de nanohidrogéis (0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl₃) e solução de FeCl₃ – 0,035 mol/L de sal dissolvido em água desionizada]. Estas soluções foram preparadas com o objectivo de ver as alterações estruturais nos nanohidrogéis pelo aquecimento e pela adição de sal). Após a preparação das amostras, estas foram liofilizadas. Posteriormente à sua secagem, as amostras foram retiradas e guardadas num local seco à temperatura ambiente. Para análise pelo FTIR foi necessário preparar uma pastilha de cada amostra. Para a preparação das pastilhas, misturou-se uma pequena parte da amostra (aproximadamente 2 mg) liofilizada com KBr, até ficar homogéneo. Seguidamente, levaram-se as amostras a uma prensa para a preparação final das pastilhas. Em seguida, e por último, as pastilhas foram colocadas no FTIR.

3.2.5 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DO FERRO À LACTOFERRINA

Afim de determinar a capacidade de ligação do Fe aos nanohidrogéis, foi realizada uma separação por peso molecular, usando filtros (Amicon Ultra – 0,5 mL 10 K, Millipore, EUA), onde os nanohidrogéis com o Fe ligado ficam no filtro e o Fe livre atravessa o filtro. Para analisar a libertação do Fe usou-se uma manga de diálise (Spectra/Por Biotech Cellulose Ester Dialise Membranes – MWCO: 100-500 Da, Spectrum Laboratories, EUA), de modo a que o Fe seja o único que ultrapasse a membrana. Na separação dos nanohidrogéis, do Fe não ligado, foi usada uma centrifugadora (Hettich Mikro 120, EUA).

Na caracterização dos nanohidrogéis, também é importante determinar a capacidade de ligação do ferro aos nanohidrogéis de Lf. Preparam-se as soluções de Lf (0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl₃) de modo a formar os nanohidrogéis e fizeram-se várias filtrações de forma a separar o Fe ligado do Fe livre.

Então, no início do processo de separação, e para efeitos de cálculo, pesou-se o Eppendorf e o filtro, separadamente. A seguir, adicionaram-se 500 µL de amostra ao filtro e pesou-se tudo (Eppendorf + filtro + amostra). Centrifugou-se a 14000 rpm, durante 20 minutos. Retirou-se o Eppendorf e voltou-se a pesar, individualmente, o filtro e o Eppendorf. Adicionaram-se 100 µL de água desionizada, ressuspensando-a (remover qualquer tipo de resíduo que tenha ficado entre os nanohidrogéis) e pesou-se tudo junto. Novamente, centrifugou-se a 14000 rpm, durante 15 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o Eppendorf e, pesou-se o Eppendorf e o filtro, em separado. Tendo assim o Fe livre separado dos nanohidrogéis, guardaram-se os resíduos num Eppendorf novo. Para finalizar, lavou-se e secou-se, rapidamente, o Eppendorf, verteu-se o filtro neste e centrifugou-se a 10000 rpm, durante 5 minutos. Depois da centrifugação concluída, retirou-se o Eppendorf (com os nanohidrogéis), pesou-se (sem o filtro) e adicionou-se água desionizada até perfazer o peso inicial da amostra (500 µL) – Peso final da amostra de nanohidrogéis com Fe ligado é igual ao peso inicial da solução de nanohidrogéis com Fe ligado + Fe livre.

3.2.6 QUANTIFICAÇÃO DO FERRO

De modo a quantificar o Fe ligado e o Fe livre, usou-se um Espectrómetro de Absorção Atómica (Varian SpectrAA – 250 Plus, EUA) e solução padrão de Fe (1,000 ± 0,002 g/L, Panreac, Espanha).

Foram preparadas soluções-padrão de Fe com concentrações diferentes para calibrar o aparelho. Para a gama de concentrações 1,5 – 200 mg/L, foram preparadas cinco soluções-padrão (2 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 100 mg/L e 200 mg/L) e para a gama de concentrações

0,06 – 15 mg/L foram preparadas outras cinco soluções-padrão (0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L e 10 mg/L).

Para se determinar a concentração de Fe presente nas amostras, foram feitas duas curvas de calibração com as soluções padrão (de concentração conhecida) – uma para a gama de maior concentrações e outra para a de menores concentrações. Os dois tipos de amostra (nanohidrogéis e resíduos) foram, então, analisados. A amostra com o Fe ligado foi analisada na gama de menor concentração (0,06 – 15 mg/L), enquanto que a amostra com o Fe livre, foi analisada na gama de maior concentração (1,5 – 200 mg/L). Na gama de maior concentração a equação da recta é $y = 225,07x$ (0,06 – 15 mg/L). Na gama inferior, a equação da recta é $y = 12,614x$ (1,5 – 200 mg/L).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, usou-se o programa SigmaStat 3.1, da Systat Software Inc. (EUA). A comparação entre amostras foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida da múltipla comparação pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE NANOHIROGÉIS (parte 1)

Para o desenvolvimento dos nanohidrogéis, formou-se inicialmente um hidrogel (sistema macro) e, a partir das condições (concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento, concentração de sal) ótimas para a sua formação, diminuir a razão proteína/sal até poder obter hidrogel no tamanho nanométrico.

Em anexo, estão apresentados os ensaios realizados até à determinação das condições ótimas para a obtenção dos nanohidrogéis, a partir das condições a que se obteve um hidrogel (9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,035 mol/L FeCl₃).

Na determinação das condições ótimas para a formação do hidrogel de Lf, mantiveram-se todas as condições constantes (9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO₄), variando apenas o pH (2, 4, 5, 7, 9, 12) e, verificou-se que não havia formação de gel.

Não verificando a gelificação nestes pHs com FeSO₄, foi decidido determinar se o tipo de sal tinha influência na gelificação tanto a pH 4 como a pH 12. Então, todas as condições foram mantidas, variando o tipo de sal (usou-se em substituição o FeCl₃ e CaCl₂). A pH 12, o tipo de sal não teve qualquer influência na gelificação. No entanto, a pH 4, verificou-se que após a adição de FeCl₃ houve um aumento na viscosidade da solução.

Perante estes resultados, avaliou-se a influência da concentração (0,02 mol/L, 0,035 mol/L, 0,04 mol/L e 0,05 mol/L) de FeCl₃ na gelificação, mantendo as restantes condições (9,5 % Lf,

pH 4, 85 °C, 45 min). A concentração mínima de sal a que houve gelificação foi 0,035 mol/L. Então, consideraram-se como as condições óptimas para a formação de hidrogel de Lf: 9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,035 mol/L FeCl₃.

A partir destas condições (sistema macro), avaliou-se a influência da concentração (5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % ou 0,05 %) de Lf, mantendo a razão proteína/sal na obtenção de nanohidrogéis. Foi visível gelificação apenas na concentração de Lf igual a 5 %. Usou-se o DLS para determinar o tamanho e a PDI dos nanohidrogéis, e confirmar a sua formação caso tivessem sido formados. Perante os resultados obtidos (tamanho, PDI e perfil de distribuição de tamanhos – Anexo 1) pelo DLS, determinou-se que a concentração de Lf para a formação dos nanohidrogéis seria 0,2 % (melhor tamanho/perfil de distribuição de tamanhos). O PDI, entre as diferentes concentrações de Lf, não teve diferenças estatísticas.

Para esta concentração de proteína e, mantendo as restantes condições, avaliou-se a influência da concentração de sal (0,0007 mol/L, 0,0011 mol/L, 0,0014 mol/L, 0,0017 mol/L, 0,0023 mol/L, 0,0026 mol/L) na obtenção de nanohidrogéis. Foi determinado que a adição de 0,0007 mol/L seria a melhor, pelo perfil de distribuição das partículas (resultados não apresentados), pois a polidispersividade e o tamanho não tinham diferenças estatisticamente significativas (Anexo 1).

Assim, concluiu-se que as condições óptimas para a formação dos nanohidrogéis seriam: 0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0007 mol/L. Com o objectivo de determinar as propriedades estruturais dos nanohidrogéis formados usou-se o AFM. Ao contrário do que se esperava, as estruturas formadas, segundo estas condições, não eram nanohidrogéis, pois as imagens obtidas no AFM não mostraram a formação de bolas, mas sim, de uma espécie de cristais (Anexo 1).

4.2 DESENVOLVIMENTO DE NANOHIROGÉIS (parte 2)

Em 2011, Bengoechea *et al.* formaram nanohidrogéis de lactoferrina com NaCl (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). As condições (0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min) usadas pelos autores são favoráveis à formação de nanohidrogéis. Estas condições foram usadas para a formação de nanohidrogéis Lf-Fe, de forma a avaliar o uso de FeCl₃ na formação de nanohidrogéis, isto é, o NaCl (usado por Bengoechea *et al.*) foi substituído pelo FeCl₃ de forma a avaliar a capacidade de gelificação deste sal de ferro, mantendo as outras condições iguais (concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento). Com o objectivo de confirmar as condições usadas por Bengoechea *et al.*, avaliou-se, também, a influência da concentração de Lf, temperatura e tempo de aquecimento.

De modo a comparar o efeito da temperatura e da concentração de sal em soluções com 0,2 % de Lf e a pH 7, as soluções de Lf foram aquecidas a 75 °C durante 20 min, sendo usado o DLS para medir os tamanhos das partículas e os PDIs (Tabela 4–2). O aquecimento da solução de Lf altera significativamente o tamanho das partículas e melhora o PDI. A adição de sal (0,035 mol/L) não tem influência estatisticamente significativa ($p > 0,05$), nem no tamanho, nem no PDI dos nanohidrogéis (Tabela 4–2).

Tabela 4–2. Tamanho e polidispersividade de soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 7) sem aquecimento e sem sal, com aquecimento e sem sal e com aquecimento e com sal

SOLUÇÃO	TAMANHO (nm)	PDI
0,2 % Lf, pH 7	572,6 ± 316,9 ^a	0,537 ± 0,247 ^a
0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min	86,5 ± 1,18 ^b	0,196 ± 0,001 ^b
0,2 % Lf, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl ₃	110,0 ± 0,40 ^{ab}	0,218 ± 0,005 ^{ab}

^{a, b} – Letras diferentes (na coluna) são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Em seguida, a influência da temperatura de aquecimento, do pH e da concentração de FeCl₃ foram avaliadas pelo DLS e através da turbidez. O tempo de aquecimento também foi investigado pela alteração de turbidez das soluções.

4.2.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Para avaliar a influência da temperatura de aquecimento da Lf na gelificação das proteínas, mantiveram todas as condições, variando apenas a temperatura (60, 70, 75, 80, 90 °C). Aos 75 °C, os nanohidrogéis formados apresentaram tamanhos próximos dos cerca de 100 nm (Figura 4–2). Dos 75 para os 80 °C houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no tamanho dos nanohidrogéis. Este efeito pode ser atribuído ao facto de existir um maior número de moléculas de proteína globular reactivas a temperaturas mais elevadas e que a frequência de colisão das proteínas aumenta com a temperatura (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). Os valores de PDI entre os 70 e os 90 °C, não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) mas apresentam valores inferiores ($p < 0,05$) ao valor de PDI obtido para uma temperatura de aos 60 °C (Figura 4–3). Este facto pode ser explicado pelo facto da desnaturação da Lf só ocorrer após os 60 °C (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). Os valores PZ são positivos, sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre eles, em todas as temperaturas avaliadas (Figura 4–4). Este facto é explicado pelo pH da solução que está abaixo do pl da Lf. Se o pH da solução estiver abaixo do pl, o PZ é positivo; se o pH da solução estiver acima do pl, o PZ é negativo; se o pH da solução for igual ao pl, o PZ é zero (Brock, 2002; Levay & Viljoen, 1995).

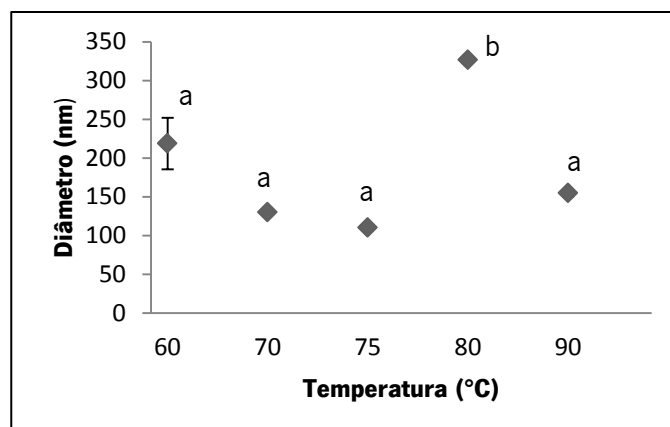


Figura 4–2. Influência da temperatura *versus* tamanho dos nanohidrogéis. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

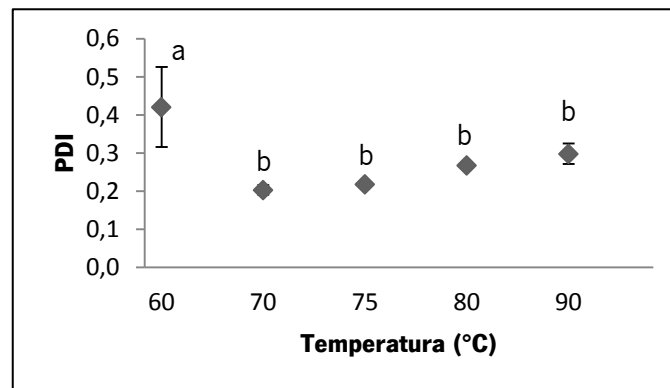


Figura 4–3. Polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃) a várias temperaturas (60, 70, 75, 80, 90 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

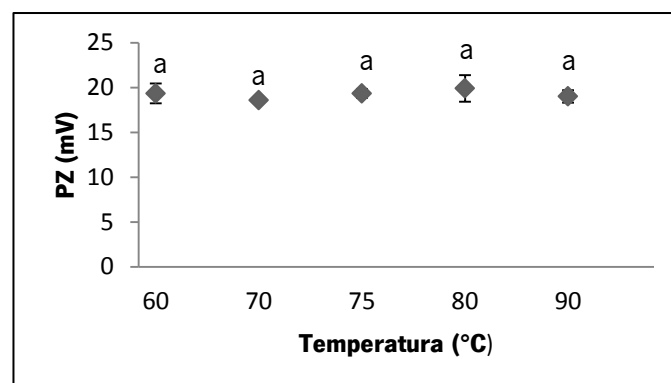


Figura 4–4. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃) a várias temperaturas (60, 70, 75, 80, 90 °C). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

A turbidez das soluções de Lf foi avaliada a várias temperaturas de aquecimento, afim de obter informações acerca da agregação das proteínas ao longo do aquecimento (Figura 4–5). A turbidez, entre os 60 e os 80 °C manteve-se constante, próximo de zero, durante os 20 minutos. Pelo contrário, entre os 80 e os 90 °C, houve um grande aumento da turbidez para cerca de 1 cm⁻¹. O aumento da turbidez pode dever-se à agregação hidrofóbica das proteínas, induzida pela sua desnaturação térmica (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

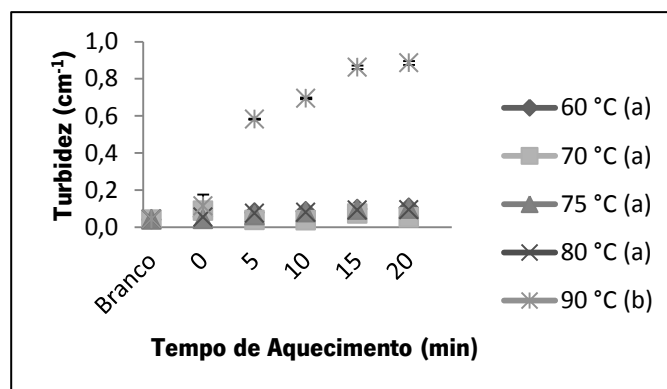


Figura 4–5. Efeito da temperatura de aquecimento (60, 70, 75, 80, 90 °C) na turbidez (a 600 nm) nas soluções de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7), aquecidas durante 20 minutos. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4.2.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE AQUECIMENTO

Também a influência do tempo de aquecimento foi avaliada através da alteração da turbidez. As soluções de Lf foram aquecidas durante 60 minutos a 75 °C e medida a turbidez ao longo do tempo (Figura 4–6). Entre os 0 e os 5 minutos houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na turbidez das soluções. Este aumento corresponde ao desdobramento da proteína que leva à agregação da Lf (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). Após os 5 minutos (até aos 60 minutos) a turbidez manteve-se constante, sugerindo que não houve alteração do gel. O tempo óptimo de aquecimento da proteína pode ser determinado por estes resultados. Se o tempo de aquecimento for reduzido, o processo de agregação da Lf poderá não ocorrer plenamente. Todavia, é importante ter em conta o tempo *versus* custos de energia, de modo a que este não seja demasiado, levando a custos elevados (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

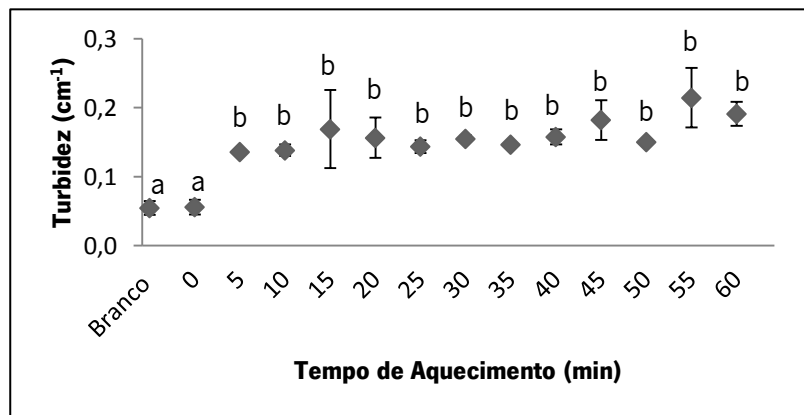


Figura 4–6. Efeito do tempo de aquecimento na formação dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C) na turbidez (a 600 nm) ao longo de 60 minutos. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4.2.3 INFLUÊNCIA DO pH

A influência do pH (4, 7 e 10) também foi avaliada. O pH 7 revelou ser o mais adequado à formação dos nanohidrogéis (Figuras 4–7, 4–8 e 4–9). A pH 7 os nanohidrogéis mostraram ser mais estáveis, tendo um PDI significativamente inferior ($p < 0,05$), comparativamente com os valores a pH 4 e pH 10. Este resultado deve-se ao facto da desnaturação das proteínas ser favorecida em condições de força iónica elevada, ou seja, próximo do pl (Clark, Judge, Richards, Stubbs, & Suggett, 1981; Stading, Langton, & Hermansson, 1993). Então, o tamanho ideal dos nanohidrogéis pode ser obtido pelo ajustamento do pH das soluções e, também pelo ajustamento da temperatura de aquecimento (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

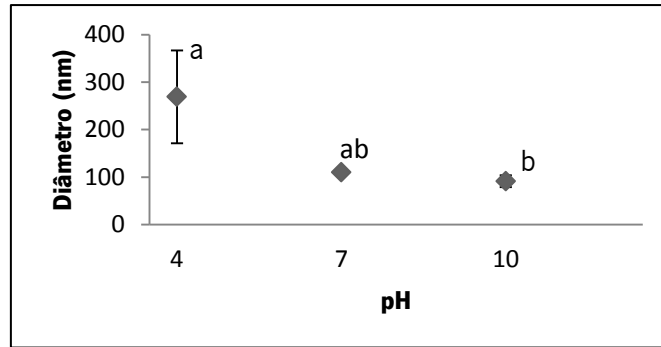


Figura 4-7. Influência do pH no tamanho dos nanohidrogéis formados (0,2 % lactoferrina, 20 minutos, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).

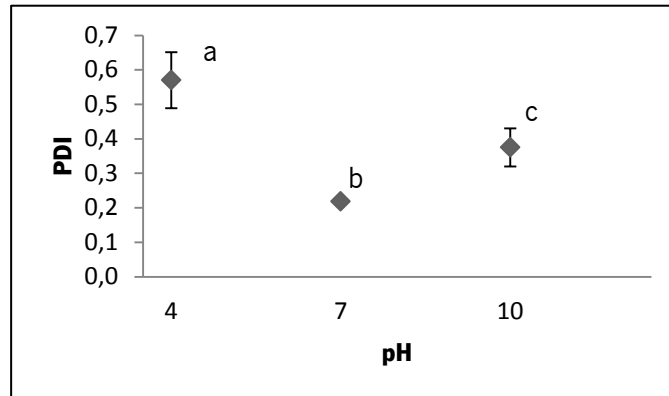


Figura 4-8. Polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, 20 minutos, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃) a pH 4, 7 e 10. a, b, c – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).

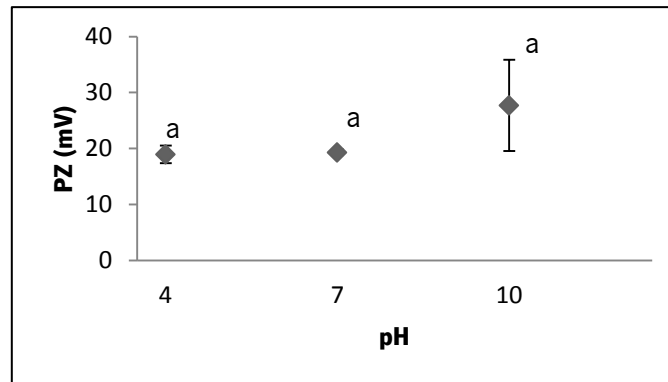


Figura 4–9. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, 20 minutos, 75 °C, 0,035 mol/L FeCl₃) a pH 4, 7 e 10. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

4.2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAL

A influência da concentração de FeCl₃ na estrutura foi estudada, através do DLS, sendo possível avaliar a distribuição dos tamanhos, PDI e PZ dos nanohidrogéis com concentrações de 0, 0,01, 0,025, 0,035, 0,04 e 0,055 mol/L de FeCl₃. A adição de sal mostrou levar a um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do tamanho dos nanohidrogéis, no entanto entre os 0,01 e os 0,055 mol/L de FeCl₃, o tamanho manteve-se constante, sem diferenças estatísticas (Figura 4-10). O PDI subiu significativamente, quando adicionados 0,055 mol/L. A estabilidade nos tamanhos dos nanohidrogéis, nestas concentrações de sal, pode ser atribuída ao facto de haver uma fraca repulsão electrostática entre os nanohidrogéis, devido ao seu PZ (McClements, 2005). Todavia, a solução de nanohidrogéis onde foram adicionados 0,035 mol/L de FeCl₃ foi mais estável (barra vertical – desvio padrão) – Figuras 4–10, 4–11 e 4–12. O sal tem como função a gelificação das proteínas após a sua desnaturação no tratamento térmico (Livney, 2010). O PZ não foi influenciado ($p > 0,05$) pela adição de sal.

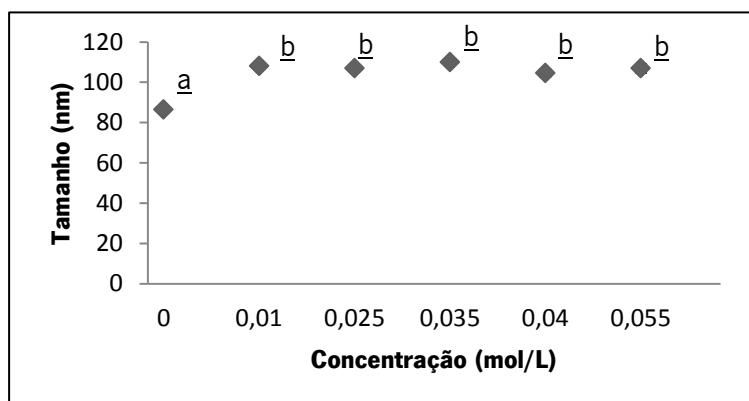


Figura 4–10. Influência da concentração de cloreto de ferro (III) no tamanho dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

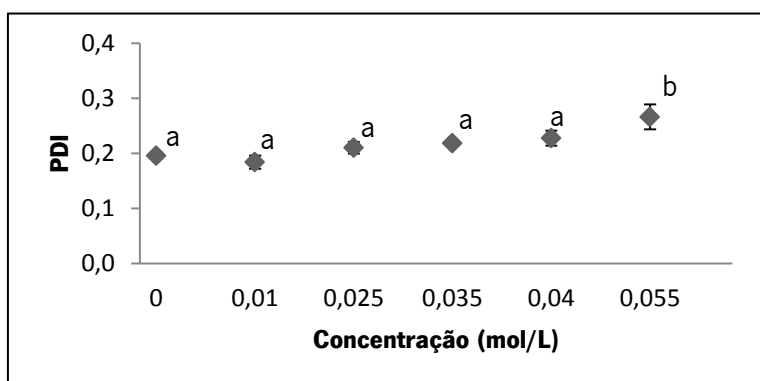


Figura 4–11. Influência da concentração de cloreto de ferro (III) no índice de polidispersividade dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

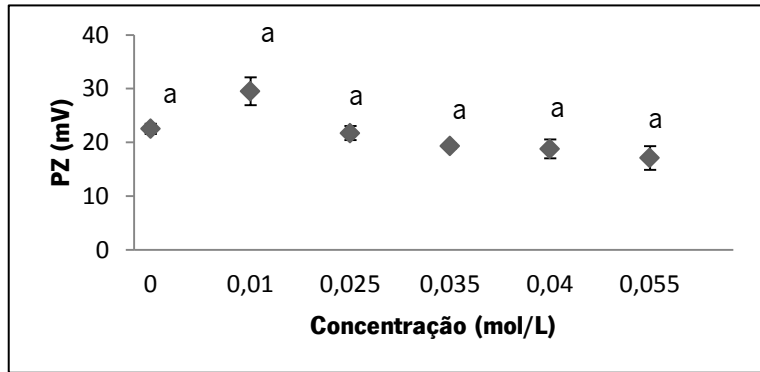


Figura 4–12. Potencial Zeta dos nanohidrogéis (0,2 % lactoferrina, pH 7, 20 minutos, 75 °C) a diferentes concentrações de cloreto de ferro (III) (0, 0,01, 0,025, 0,035, 0,04, 0,055 mol/L). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

Também, a influência da concentração de sal foi avaliada através da alteração da turbidez na solução de Lf. Na Figura 4–13 é evidenciado o efeito de diferentes concentrações de FeCl_3 (0,01, 0,025, 0,035, 0,04 e 0,055 mol/L) na turbidez das soluções de nanohidrogéis de Lf. Entre os 0,01 e os 0,055 mol/L a turbidez permanece estável (não há diferenças estatísticas), o que expressa a inalteração das propriedades ópticas dos nanohidrogéis.

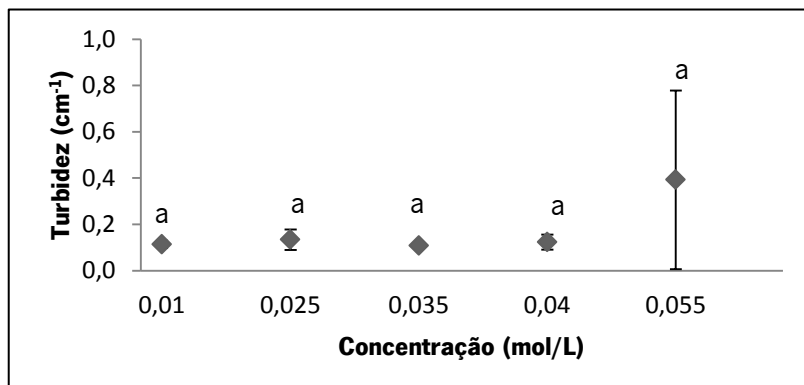


Figura 4–13. Efeito da adição de cloreto de ferro (III) (0,01, 0,025, 0,035, 0,04 e 0,055 mol/L) na turbidez (a 600 nm) de nanohidrogéis de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C, 20 minutos). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

Então, as condições escolhidas para a formação dos nanohidrogéis foram: 0,2 % lactoferrina, pH 7, 75 °C, 20 min, 0,035 mol/L FeCl₃. A seguir, é feita a caracterização dos nanohidrogéis formados segundo as condições escolhidas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOHIIDROGÉIS

4.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia electrónica de transmissão (Figura 4–14) permite confirmar a formação de nanohidrogéis obtidos (0,2 % Lf, pH 7, 85°C, 45 min, 0,035 mol/L FeCl₃). As Figuras 4–14 (a) e (b) correspondem à amostra do dia 1 com diferentes ampliações. É possível confirmar o tamanho dos nanohidrogéis obtidos pelo DLS (na ordem dos 100 nm) – partículas mais escuras de forma esférica. As Figuras 4–14 (c) e (d) foram obtidas no dia 11 após a formação dos nanohidrogéis, e correspondem a diferentes ampliações das amostras de nanohidrogel. Decorridos 10 dias, desde a primeira observação ao TEM, os resultados mantiveram-se iguais a nível de tamanhos como se pode verificar pelas imagens de TEM, também confirmado pelos resultados obtidos pelo DLS (tamanho e PDI), se comprova a estabilidade dos nanohidrogéis (Figura 4–15) – os nanohidrogéis têm, igualmente, cerca de 100 nm, não havendo agregação destes ao longo do tempo. A Figura 4–14 (d) mostra como o Fe está presente nos nanohidrogéis. Ao clarear a imagem, percebe-se que no interior das partículas, anteriormente, mais escuras estão pequenas bolas pretas. Este resultado sugere a ligação do Fe à Lf.

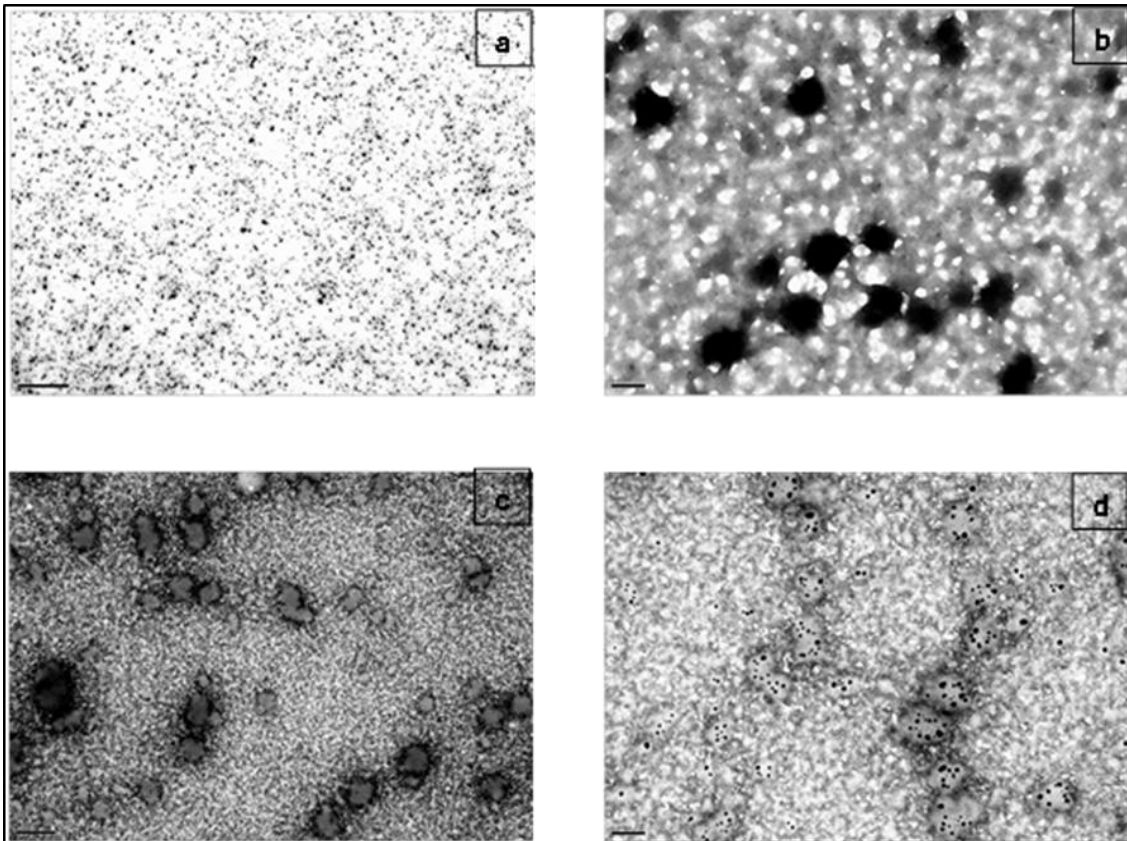


Figura 4–14. Fotografias de microscopia electrónica de transmissão dos nanohidrogéis produzidos a partir de soluções de lactoferrina (0,2 % lactoferrina, pH 7, 85 °C, 45 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃). **a)** dia 1 – ampliação 5 μm; **b)** dia 1 – ampliação 100 nm; **c)** dia 11 – ampliação 200 nm e **d)** dia 11 - ampliação 100 nm.

4.3.2 ESTABILIDADE

4.3.2.1 ESTABILIDADE AO LONGO DO TEMPO

A estabilidade dos nanohidrogéis ao longo do tempo é muito importante para a determinação do tempo de vida que estas estruturas se mantêm estáveis. Usou-se o DLS para determinar o tamanho, PDI e PZ, ao longo de 76 dias. Os resultados mostram que os nanohidrogéis formados têm uma grande estabilidade, sem diferenças estatísticas. O tamanho e o índice de polidispersividade foram sempre constantes, cerca de 100 nm e 0,300, respectivamente (Figura 4–15 e Figura 4–16). Os valores de PZ (Figura 4–17) foram sempre positivos, sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), justificado pela inalteração do pH, uma vez

que o pH da solução é inferior ao pl da Lf (Clark, Kavanagh, & Ross-Murphy, 2001; Stading, Langton, & Hermansson, 1993).

O tempo de armazenamento não mostrou afectar a durabilidade destes nanohidrogéis, verificando-se que no final de 76 dias os nanohidrogéis ainda mantêm o seu tamanho inicial.

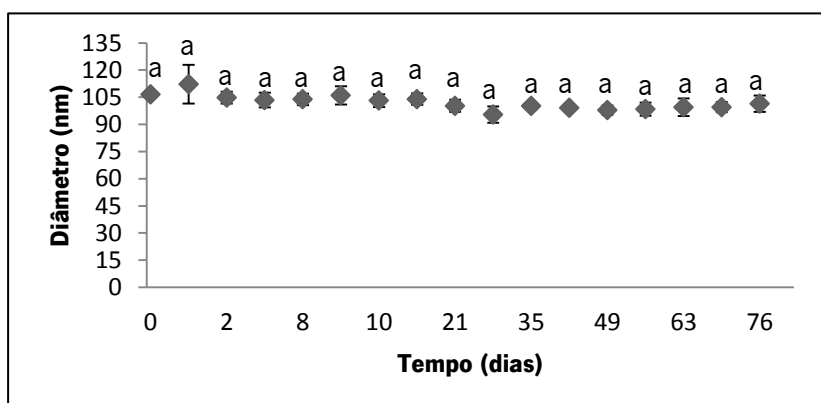


Figura 4–15. Tamanho dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

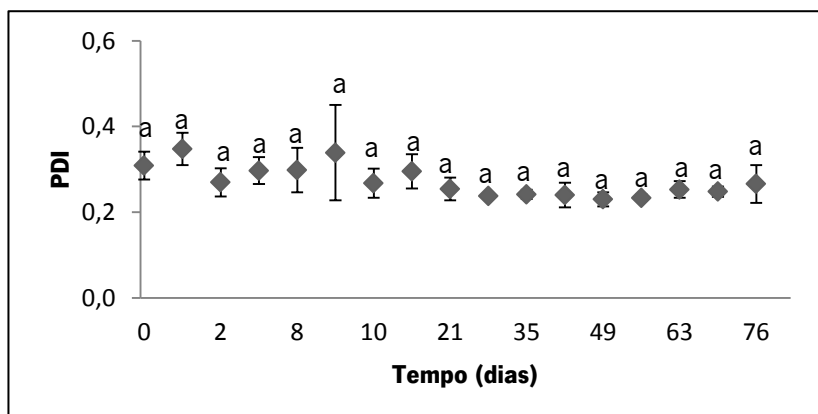


Figura 4–16. Polidispersividade dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

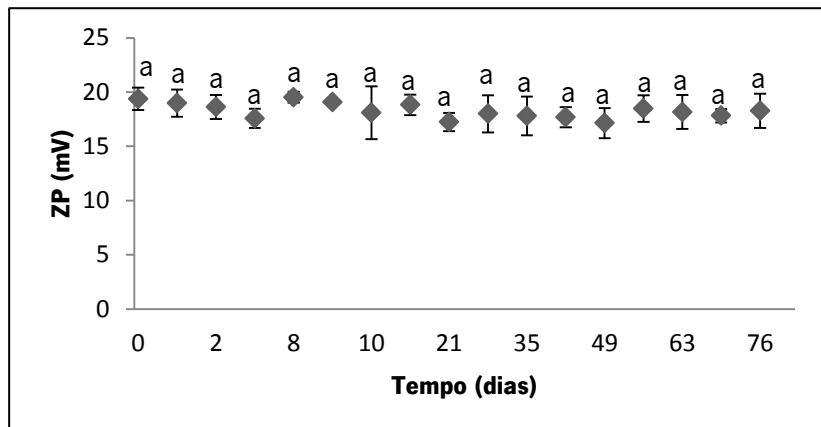


Figura 4–17. Potencial Zeta dos nanohidrogéis ao longo do tempo. a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

4.3.2.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica foi investigada, com o objectivo de perceber se haveria alteração dos nanohidrogéis com o aumento da temperatura. Este dado permite perceber em que tipo de alimentos e em que fase poderiam ser os nanohidrogéis adicionados a um determinado alimento, no caso de um alimento onde seja necessário um processamento térmico.

Os nanohidrogéis mostraram ser muito estáveis, estatisticamente, a variações de temperatura. Entre os 4 °C e os 60 °C o tamanho dos nanohidrogéis e o PDI não apresentam diferenças estatisticamente significativas. O tamanho é aproximadamente 150 nm (Figura 4–18) e o índice de polidispersividade (Figura 4–19) é baixo (aproximadamente 0,150). Entre os 60 °C os 70 °C, ocorre uma diminuição ($p < 0,05$) no tamanho dos nanohidrogéis para os 130 nm, havendo simultaneamente, um aumento ($p < 0,05$) nos valores de PDI. Poderá, este fenómeno, ser explicado por uma nova desnaturação térmica (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011).

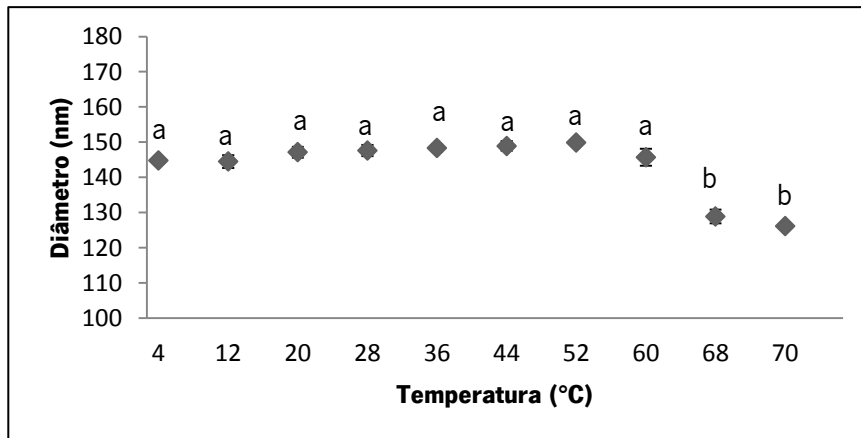


Figura 4-18. Tamanho dos nanohidrogéis entre os 4 °C e os 70 °C (de 8 °C em 8 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

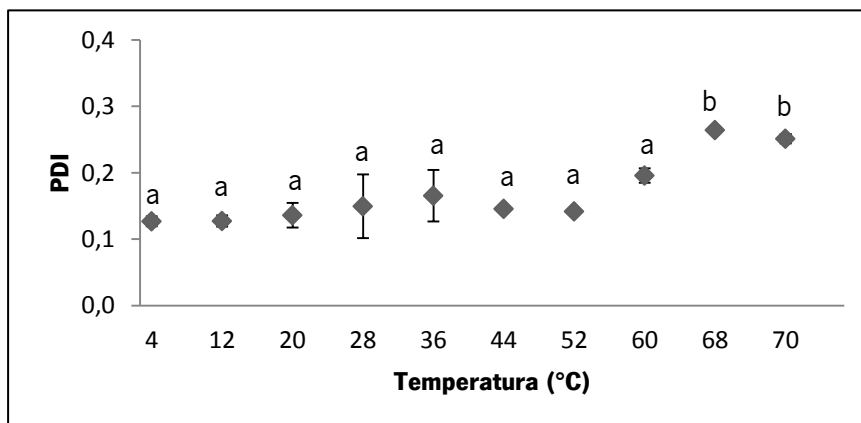


Figura 4-19. Polidispersividade dos nanohidrogéis entre os 4 °C e os 40 °C (de 8 °C em 8 °C). a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4.3.2.3 ESTABILIDADE AO pH

A avaliação da estabilidade dos nanohidrogéis ao pH foi realizada com o intuito de verificar a que alimentos (com determinado pH) os nanohidrogéis poderiam ser adicionados.

A avaliação ao pH foi feita de duas formas distintas. No primeiro modo, ajustou-se a solução de nanohidrogéis para o pH a que se pretendia avaliar o tamanho e o PDI. No entanto, formaram-se

precipitados castanhos, pH 3 – pH 12, (Figura 4–21), excepto a pH 2 (pH da solução de nanohidrogéis) – Figura 4–20.



Figura 4–20. Solução de nanohidrogéis a pH 2.



Figura 4–21. Solução de nanohidrogéis a pH 12.

No segundo modo de avaliação da estabilidade dos nanohidrogéis ao pH, simulou-se a adição dos nanohidrogéis a um alimento [neste caso, uma solução com pH ajustado – entre 2 (Figura 4–22) e 12 (Figura 4–23)]. Ao adicionar parte da solução de nanohidrogéis a uma solução de água desionizada, com o pH ajustado, na proporção 1/10 (dose limite da ingestão de ferro – 40 mg) o tamanho dos nanohidrogéis manteve-se constante (cerca de 120 nm) e com baixo PDI (aproximadamente 0,300), entre o pH 2 e o pH 11 (Figura 4–24 e Figura 4–25). A boa estabilidade dos nanohidrogéis pode dever-se à formação de fortes ligações hidrofóbicas ou covalentes irreversíveis entre as moléculas de Lf após a desnaturação destas (Steijns & Van Hooijdonk, 2000; Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). A pH 12, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no tamanho dos nanohidrogéis para um valor de aproximadamente de 224 nm e no PDI, que se pode dever à baixa força iónica a este pH (Stading, Langton, & Hermansson, 1993; Clark, Judge, Richards, Stubbs, & Suggett, 1981).

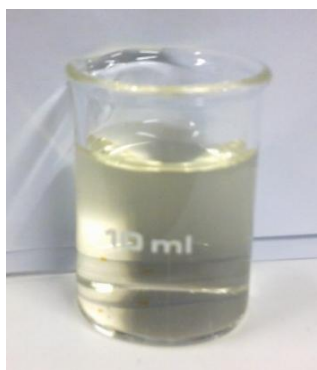


Figura 4-22. Solução (pH 2) com nanohidrogeis adicionados.



Figura 4-23. Solução (pH 12) com nanohidrogeis adicionados.

O tamanho e o PDI dos nanohidrogeis, em diferentes pHs são mostrados nas Figuras 4-24 e 4-25, respectivamente. Os nanohidrogeis são bastante estáveis, mantendo o seu tamanho, mesmo quando adicionados a soluções ajustadas, a diferentes pHs (excepto a pH 12).

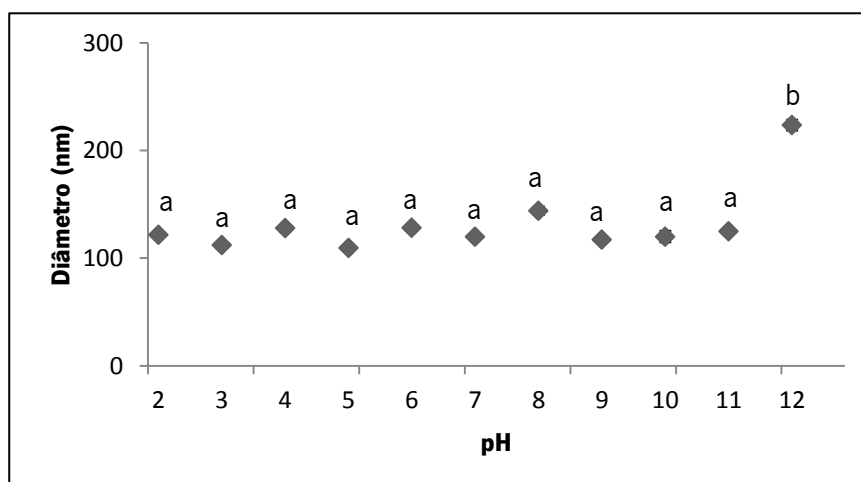


Figura 4-24. Tamanho dos nanohidrogeis em diferentes pHs. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

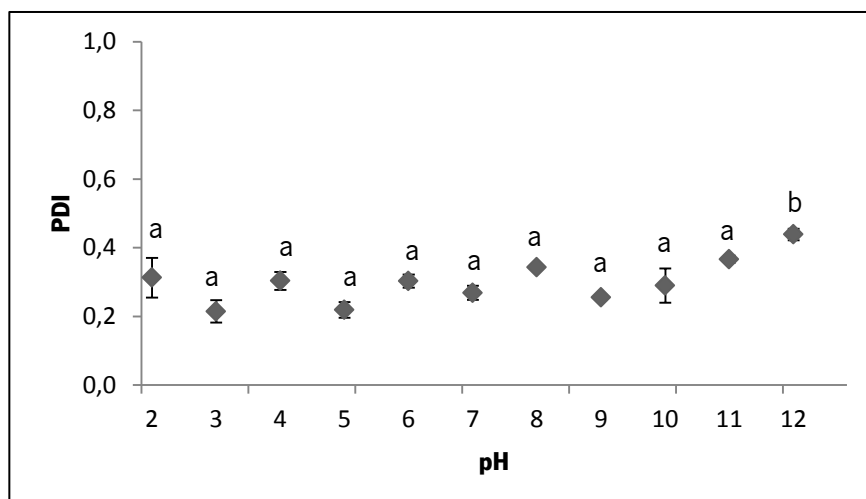


Figura 4–25. Polidispersividade dos nanohidrogéis em diferentes pHs. a, b – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

4.3.3 RESISTÊNCIA À LIOFILIZAÇÃO

O efeito da liofilização nos nanohidrogéis, de Lf, formados foi investigado de modo a perceber se estes poderiam ser submetidos à liofilização, como forma de os reservar/conservar até serem necessários para adicionar aos alimentos. Aquando da necessidade de utilização, estes seriam rehidratados. O tamanho e o PDI dos nanohidrogéis, antes e depois da liofilização, são apresentados na Tabela 4–3. É possível verificar que os nanohidrogéis mantêm o tamanho e o PDI após a liofilização, pois não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras. Assim, a liofilização pode ser usada para preservar os nanohidrogéis, em pó, para posterior utilização.

Tabela 4–3. Tamanho e índice de polidispersividade dos nanohidrogéis antes e depois da liofilização

	TAMANHO Diâmetro (nm)	PDI
ANTES DA LIOFILIZAÇÃO	$112,2 \pm 0,3^a$	$0,304 \pm 0,011^a$
DEPOIS DA LIOFILIZAÇÃO	$155,0 \pm 6,0^a$	$0,395 \pm 0,076^a$

^a – Letras iguais (na coluna) são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

4.3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A Figura 4–26 mostra o espectro FTIR de quatro amostras distintas – Cloreto de Ferro (III), Lactoferrina, Nanohidrogel sem sal (FeCl_3) e Nanohidrogel com sal (FeCl_3). Na amostra de cloreto de ferro (III), a região entre 3653 e 3035 cm^{-1} corresponde à presença dos grupos O–H, referentes à humidade do KBr usado na formação das pastilhas. As bandas 2975 – 2950 cm^{-1} e 1736 – 1512 cm^{-1} indicam a presença de grupos CH_3 e de grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), respectivamente (Larkin, 2011; Haris & Severcan, 1999; Mattos, Viganó, Dutra, Diniz, & Iha, 2002; Delor, Lacoste, Lemaire, Barrois-Oudin, & Cardinet, 1996).

Quanto à proteína (Lf), a banda 3740 – 3176 cm^{-1} indica a presença do grupo O–H relativo à humidade do KBr; a banda entre 3000 e 2950 cm^{-1} evidencia a presença de grupos CH_3 ; os picos 1675 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} podem ser atribuídos à insaturação $\text{C}=\text{C}$ e o pico em 1118 cm^{-1} indica o estiramento da ligação $\text{C}-\text{CH}_2$ (Larkin, 2011; Mattos, Viganó, Dutra, Diniz, & Iha, 2002; Socrates, 2001).

No nanohidrogel formado sem a adição de FeCl_3 , as bandas 3570 – 3230 cm^{-1} , 3000 – 2925 cm^{-1} , assinalam a presença do grupo O–H (humidade do KBr) e do CH_3 , respectivamente. Os picos 1663 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} indicam insaturação $\text{C}=\text{C}$ e o pico 1118 cm^{-1} o estiramento da ligação $\text{C}-\text{CH}_2$ (Larkin, 2011; Mattos, Viganó, Dutra, Diniz, & Iha, 2002; Socrates, 2001).

Por último, a banda 3700 – 3000 cm^{-1} , presente no nanohidrogel com FeCl_3 , mostra a presença do grupo O–H (humidade relativa ao KBr); o pico 2966 cm^{-1} evidencia a presença de grupos CH_3 ; a banda 1717 – 1580 cm^{-1} é relativa à presença de grupos carbonilo $\text{C}=\text{O}$ e o pico 1118 cm^{-1} à presença de grupos CH_3 (Larkin, 2011; Haris & Severcan, 1999; Mattos, Viganó, Dutra, Diniz, & Iha, 2002; Delor, Lacoste, Lemaire, Barrois-Oudin, & Cardinet, 1996; Socrates, 2001).

Perante os resultados, quando o FeCl_3 está presente, há formação de compostos carbonilados ($\text{C}=\text{O}$) – amostra FeCl_3 e nanohidrogel com sal. Também, com presença deste sal, a insaturação $\text{C}=\text{C}$ deixa de existir (nanohidrogel com sal), já que está presente nas amostras de lactoferrina e do nanohidrogel sem adição de sal.

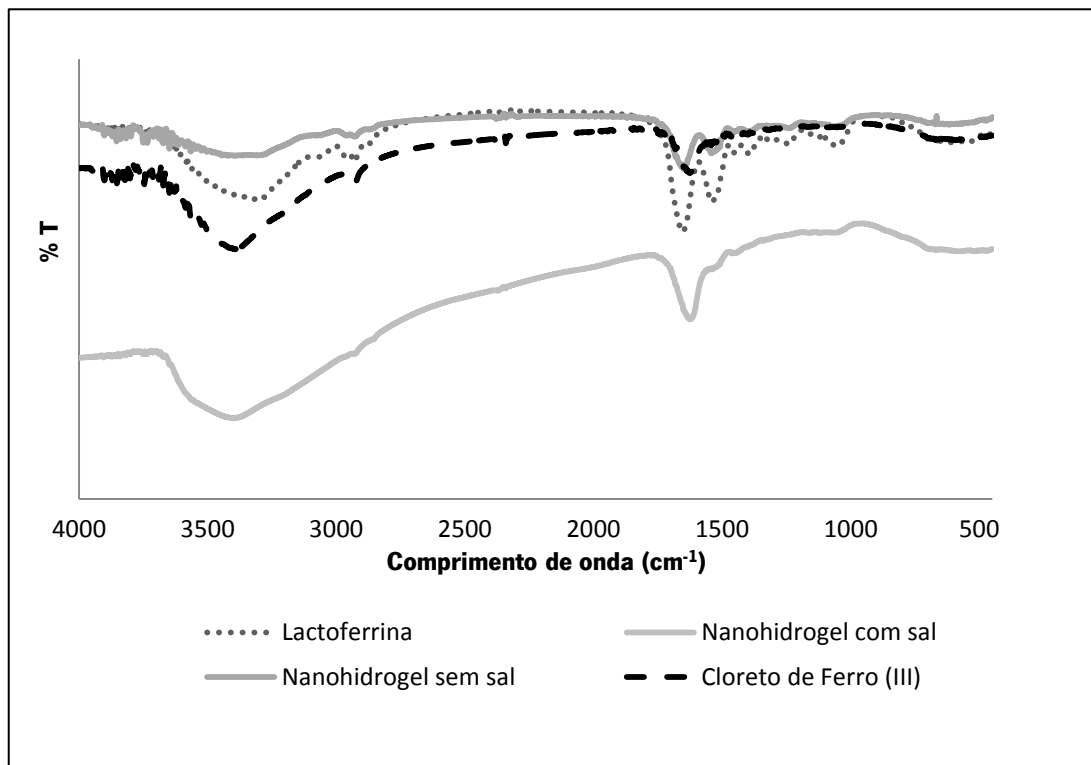


Figura 4–26. Espectro FTIR, em transmitância (% T), de quatro amostras analisadas na região espectral entre 400 e 4000 cm^{-1} .

4.3.5 LIGAÇÃO DO FERRO

Para a quantificação do Fe ligado à Lf, nos nanohidrogéis, usou-se a espectroscopia de absorção atômica. Após a separação do ferro não ligado ao nanohidrogel, quantificou-se a concentração de Fe presente nos nanohidrogéis. Através do método espectroscópico, verificou-se que, aproximadamente 20 % do ferro adicionado aos nanohidrogéis ficou ligado. No Anexo 2, faz-se referência ao modo como se calculou a ligação do Fe ao nanohidrogel.

A eficiência de ligação em trabalhos de outros autores é muito variável (4 – 90 %), dependendo do tipo de composto ligado e do substrato que compõe a matriz (Ofokansi, Winter, Fricker, & Coester, 2010; Remondetto, Beyssac, & Subirade, 2004; Cui, et al., 2007; Temmerman, Domeester, Vos, & Smedt, 2011).

4.3.6 LIBERTAÇÃO DO FERRO

O ferro adicionado aos nanohidrogéis de Lf mostrou-se ser bastante estável. Na medição da condutividade do meio, verificou-se um ligeiro aumento. Porém, este não é significativo, tendo em conta o ferro total presente nos nanohidrogéis. A ligação do Fe à Lf é bastante forte (Steijns & Van Hooijdonk, 2000), levando a que este fique ligado ao longo do tempo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

5.1 CONCLUSÃO

Esta tese mostra que a lactoferrina é uma proteína com capacidade de formar nanohidrogéis, controlando o pH, a temperatura e o tempo de aquecimento. As condições ideais para a obtenção de nanohidrogéis de lactoferrina e ferro foram: 0,2 % proteína, pH 7, 75 °C, 20 minutos, 0,035 mol/L FeCl₃.

Para a indústria alimentar o factor estabilidade é muito relevante, pois determina o tempo de vida útil do produto. Os nanohidrogéis formados são muito estáveis, tanto à temperatura como ao pH e, também, ao longo do tempo. Entre os 4 °C e os 60 °C os nanohidrogéis mantiveram o tamanho, mas entre os 60 °C e os 70 °C houve alteração (do tamanho). Então, pode-se concluir que estes nanohidrogéis podem ser aplicados em alimentos que necessitem, tanto de elevadas (até 60 °C), como de baixas temperaturas na sua produção. Também, os nanohidrogéis permaneceram inalterados quando adicionados a uma solução com pH entre 2 e 11. Só a pH 12, houve alteração no tamanho dos nanohidrogéis. Assim, pode-se concluir que os nanohidrogéis podem ser aplicados a alimentos com vários pHs (2–11). Também, durante 12 semanas, o tamanho dos nanohidrogéis foi estável.

O ferro é um nutriente essencial, o qual foi possível introduzir nos nanohidrogéis de lactoferrina formados. Este elemento tem uma ligação bastante forte a esta proteína globular, por isso é excelente para enriquecimento de produtos alimentares. Aproximadamente 20 % do Fe adicionado aos nanohidrogéis ficou ligado, tendo portanto o potencial para ser libertado no organismo uma vez ingerido.

Assim, os nanohidrogéis obtidos nesta tese são, à partida, óptimos para a indústria alimentar – são estáveis durante 12 semanas, ajudam a enriquecer os alimentos com ferro e podem melhorar a textura dos alimentos.

5.2 PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

No futuro, como forma de dar continuidade ao trabalho realizado, deveriam ser realizados estudos de quantificação do ferro libertado em diferentes condições ambientais (pH e temperatura), tendo em vista analisar o comportamento do nanohidrogel num sistema gastrointestinal. Para isso, será necessário simular as condições do meio a que os nanohidrogéis, depois de ingeridos, estão sujeitos. Na boca, o pH é neutro (6,4 a 7,5); no estômago – pH ácido (± 2); no intestino delgado – pH básico (7,8 a 8,2). Também, será importante estudar a influência das enzimas na degradação dos nanohidrogéis. Isto é, que alterações existem nos nanohidrogéis na presença de enzimas. Os nanohidrogéis sendo produzidos a partir da lactoferrina, as proteases poderão actuar sobre eles. A pepsina é uma enzima digestiva que actua em pH ácido (estômago) e desdobra proteínas em péptidos mais simples. A tripsina e a quimotripsina são, também, enzimas digestivas, mas actuam no intestino delgado.

Com o objectivo de confirmar a hipótese de haver ferro no interior dos nanohidrogéis formados, deveria ser usada a microscopia electrónica de transmissão, com análise estrutural.

Numa fase mais avançada seria interessante testar a incorporação dos nanohidrogéis num alimento, com o objectivo de verificar o seu comportamento em sistemas reais.

REFERÊNCIAS

- Aguilera, J. M. (2000). Microstructure and food product engineering. *Food Technology*, 54, 56.
- Aisen, P., & Liebman, A. (1972). Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 257, 314–323.
- Arnold, R. R., Brewer, M., & Gauthier, J. (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity*, 28, 893–898.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., & Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia*, 53, 220-223.
- Baker, E. N., Anderson, B. F., Baker, H., Day, C. L., Haridas, M., Noris, G. E., et al. (1994). Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357, 1-12.
- Beaty, R., & Kerber, J. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in atomic absorption spectrophotometry*. USA: Perkin Elmer Corporation.
- Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4^a ed.). Berlin: Springer.
- Bengoechea, C., Peinado, I., & McClements, D. (2011). Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. *Food Hydrocolloids*, 1354-1360.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Proteinepolysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, 93-123.
- Benito, P., & Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutrit Res*, 18, 581-603.
- Berne, B., & Pecora, R. (1975). *Dynamic Light Scattering*. New York: Wiley.

- Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J., & Furmanski, P. (1994). Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Research*, *54*, 2310–2312.
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, *80*(1), 1-6.
- Bryant, C., & McClement, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, *9*, 143–151.
- Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., & Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*, 361-377.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 184-190.
- Chen, L. Y., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2005). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. In *1st International symposium on delivery of functionality in complex food systems* (pp. 272-283). Lausanne, Switzerland.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Barchiesi, F., & Scalise, G. (2000). Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*, 577–582.
- Clark, A. H. (1998). Gelation of globular proteins. In S. E. Hill, D. A. Leward, & J. R. Mitchel (Edits.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 77–142). Aspen, Gaithersburg.
- Clark, A., Judge, F., Richards, J., Stubbs, J., & Suggett, A. (1981). Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *International Journal of Peptide Research*, *17*, 380-392.
- Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation - theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, *15*, 383-400.
- Cook, J. D., & Reusser, M. E. (1983). Iron fortification : an update. *American Journal of Clinical Nutrition*, *38*(4), 648-659.

Cui, F., He, C., Yin, L., Qian, F., He, M., Tang, C., et al. (2007). Nanoparticles Incorporated in Bilaminated Films: A Smart Drug Delivery System for Oral Formulations. *Biomacromolecules*, *8*, 2845-2850.

Cui, F., He, C., Yin, L., Qian, F., He, M., Tang, C., et al. (2007). Nanoparticles Incorporated in Bilaminated Films: A Smart Drug Delivery System for Oral Formulations. *Biomacromolecules*, *8*, 2845-2850.

Deleers, M., Pathak, Y., & Thassu, D. (2007). *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. New York, USA: Informa Healthcare.

Delor, F., Lacoste, J., Lemaire, L., Barrois-Oudin, N., & Cardinet, C. (1996). Photo- and thermal ageing of polychloroprene: Effect of carbon black and crosslinking. *Polymer Degradation and Stability*, *53*, 361-369.

Devy, A. S., Das, M. R., & Pandir, M. W. (1994). Lactoferrin contains structural motifs of ribonuclease. *Biochem Biophys Acta*, *114*, 299–306.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*, 25-39.

ETC Group. (2003). *The Big Down. Atomtech: Technologies Converging at the Nano-Scale*. Canada: ETC Group.

Furmanski, P., Li, Z. P., & Fortuna, M. B. (1989). Multiple molecular forms of human lactoferrin. *J Exp Med*, *170*, 415-429.

Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, *60*, 1638-1649.

Haris, P., & Severcan, F. (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *7*, 207–221.

Hinsliff, G. (8 de Fevereiro de 2009). New science could defeat food crises. *The Observer*.

Joseph, T., & Morrison, M. (Maio de 2006). Nanotechnology in Agriculture and Food. *Institute of Nanotechnology*, 1-15.

Kirkpatrick, C. H., Green, I., Rich, R., & Schade, A. L. (1971). Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*, *124*, 539–544.

- Kosse, J., Yeung, A., Gil, A., & Miller, D. (2001). A rapid method for iron determination in fortified foods. *Food Chemistry*, *75*, 371-376.
- Kuzma, J., & VerHage, P. (2006). *Nanotechnology in agriculture and food production*. Washington, DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- LaClair, C. E., & Etzel, M. R. (2010). Ingredients and pH are key to clear beverages that contain whey protein. *Journal of Food Science*, *75*, C21-C27.
- Larkin, P. (2011). *Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. USA: Elsevier.
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate b-lactoglobulin gels. *Biopolymers*, *54*, 578–586.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., & Mazurier, J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*, 2549–2559.
- Leitch, E., & Willcox, M. (1998). Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*, *47*, 837–842.
- Levay, P. F., & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, *80*, 252-267.
- Livney, Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*, 73-83.
- MacPhail, A. P., & Bothwell, T. H. (1992). The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. In S. J. Fomon, & S. Zlotkin, *Nutritional anemias* (Vol. Nestle nutritional workshop series 30, pp. 1-12). New York: Raven Press.
- Magonov, S. (1993). Surface Characterization of Materials at Ambient Conditions by Scanning Tunneling Microscopy (STM) and Atomic Force Microscopy (AFM). *Appl. Spectrosc. Rev.*, *28*, 1-121.
- Malone, M. E., & Appelqvist, I. A. (2003). Gelled emulsion particles for the controlled release of lipophilic volatiles during eating. *Journal of Controlled Release*, *90*, 227-241.
- Mason, J., Lotfi, M., Dalmiya, N., Spethuramen, K., & Deitchler, M. (2001). The Micronutrient Report: Current Progress and Trends in the Control of Vitamin A, Iodine, and Iron Deficiencies. In *The Micronutrient Initiative* (pp. 21-65). Ottawa.

Matalanis, A., Jones, O., & McClements, D. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 1-16.

Mattos, E., Viganó, I., Dutra, R., Diniz, M., & Iha, K. (2002). Aplicação de metodologias FTIR de transmissão e fotoacústica à caracterização de materiais altamente energéticos - parte II. *Quim. Nova*, 25, 722-728.

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsifications: Principals, Practice and Techniques* - 2ª edição. (ed. D. J. McClements), CRC Press, Boca Raton, FL, Capítulo 4.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72, R109-R124.

McClements, D., Monahan, F., & Decker, E. (1993). Disulfide bond formation affects stability of whey-protein isolate emulsions. *Journal of Food Science*, 58, 1036-1039.

Metz-Boutique, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., et al. (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 145, 659–676.

Mezzenga, R., Schurtenberger, P., Burbidge, A., & Michel, M. (2005). Understanding foods as soft materials. *Nature Materials*, 4, 729-740.

Moguilevsky, N., Retegui, L. A., & Masson, P. L. (1985). Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochemical Journal*, 229, 353-359.

Moraru, C., Panchapakesan, C., Huang, Q., Takhistov, P., Liu, S., & Kokini, J. (2007). Nanotechnology: A new frontier in food science. *Food Technology*, 57, 24–29.

Mu, L., & Seow, P. (2006). Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system. *Colloids and Surfaces B*, 47, 90-97.

Norton, I. T., & Frith, W. J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15, 229-239.

Ofokansi, K., Winter, G., Fricker, G., & Coester, C. (2010). Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, 1–9.

- Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J., & Matyjaszewski, K. (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci*, *33*, 448-477.
- Omata, Y., Satake, M., Maeda, R., Saito, A., Shimazaki, K., Yamauchi, K., et al. (2001). Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferricin. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *63*, 187–190.
- Öztaş Yesim, E. R., & Özgünes, N. (2005). Lactoferrin: a multifunctional protein. *Advances in Molecular Medicine*, *1*, 149-154.
- Palzer, S. (2009). Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends Food Sci Technol*, *20*, 194-200.
- Peters, R., Dam, G., Bouwmeester, H., Helsper, G. A., Kammer, F., Ramsch, R., et al. (2011). Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *Trends in Analytical Chemistry*, *30*, 100-112.
- Petschow, B. W., Talbott, R. D., & Batema, R. P. (1999). Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology*, *48*, 541–549.
- Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). *Structure-function properties of food proteins*. San Diego: Academic Press.
- Reimer, L., & Kohl, H. (2008). *Transmission electron microscopy: physics of image formation*. USA: Springer.
- Remondetto, E., Beyssac, E., & Subirade, M. (2004). Iron Availability from Whey Protein Hydrogels: An in Vitro Study. *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 8137-8143.
- Remondetto, G. E., Paquin, P., & Subirade, M. (2002). Cold gelation of b-lactoglobulin in the presence of iron. *Journal of Food Science*, *67*, 586–595.
- Roff, C., & Foegeding, E. (1996). Dicationic-induced gelations of pre-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *10*, 193-198.
- Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, *17*, 547-556.
- Scrinis, G. (2008). On the ideology of nutritionism. *Gastronomica*, *8*, 39–48.

- Settle, F. A. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall PTR.
- Sherman, M. P., Bennett, S. H., Hwang, F. F., & Yu, C. (2004). Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and Lactobacillus GG. *Biometals*, *17*, 285–289.
- Skoog, D., West, D., & Holler, F. (1992). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (6^a ed.). Saunders college publishing.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies*. John Wiley and Sons, Ltd.
- Stading, M., Langton, M., & Hermansson, A.-M. (1993). Microstructure and rheological behaviour of particulate b-lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, *7*, 195-212.
- Steijns, J., & Van Hooijdonk, A. C. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, *84*, S11-S17.
- Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, *11*, 1-13.
- Tachezy, J., Kulda, J., Bahnikova, I., Suchan, P., Razga, J., & Schrevel, J. (1996). Tritrichomonas foetus: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology*, *83*, 216–228.
- Takahashi, K., Kato, H., Saito, T., Matsuyama, S., & Kinugasa, S. (2008). Precise Measurement of the Size of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering with Uncertainty Analysis. *Part. Part. Syst. Charact.*, *25*, 31-38.
- Temmerman, M., Domeester, J., Vos, F., & Smedt, S. (2011). Encapsulation Performance of Layer-by-Layer Microcapsules for Proteins. *Biomacromolecules*, A-G.
- Tokle, T., & McClements, D. (2011). Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating. *Food Hydrocolloids*, *25*, 976-982.
- van der Meer, R., Bovee-Oudenhoven, I., Sesink, A., & Kleibeuker, J. (1998). Milk products and intestinal health. *Int Dairy J*, *8*, 163-170.
- Walstra, P. (2003). Studying food colloids: Past, present and future. In E. Dickinson, & T. van Vlie (Edits.), *Food colloids, biopolymers and materials* (pp. 391–400). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

- Wapnir, R. (1990). Nutritional factors, proteins, and the absorption of iron and cobalt. In R. Wapnir (Ed.), *Protein nutrition and mineral absorption* (pp. 99-129). New York: CRC Press.
- Ward, P., Paz, E., & Conneely, O. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*, 2540–2548.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(3), 97-104.
- Wolf, J. L. (2003). Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, *65*, 245–249.
- Xiong, Y., & Kinsella, J. (1990). Mechanism of urea-induced whey protein gelation. *J Agric Food Chem*, *38*, 1887-1891.
- Yu, S., Yao, P., Jiang, M., & Zhang, G. (2006). Nanogels Prepared by Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins. *Biopolymers*, *83*, 148-158.
- Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The gelation of proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, *34*, 203-298.

ANEXOS

ANEXO 1

DESENVOLVIMENTO DOS NANOHIIDROGÉIS

Para o desenvolvimento dos nanohidrogéis, tentou-se, primeiro obter as condições (concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de aquecimento, concentração e tipo de sal) optimizadas para o sistema macro e, a partir daí, reduzir a concentração de proteína/sal até obter géis com tamanho nanométrico.

Então, na tentativa de obter um gel de Lf, após a dissolução desta proteína, ajustou-se o pH da solução para 5. Perante as condições experimentais – 9,5 % Lf, pH 5, 80 °C, 30 min, 0,02 mol/L FeSO₄ (adicionados depois das 4 h de arrefecimento) – não houve formação de gel. Não houve qualquer alteração na viscosidade da solução, tanto depois do aquecimento como depois da adição de sal.

Com o objectivo de verificar o efeito do tempo e da temperatura de aquecimento, mantiveram-se as condições do ensaio anterior e usou-se a temperatura de 85 °C durante 45 min (Tabela 3–1). Verificou-se que, depois de adicionado o sal, a solução ficou com alguma viscosidade, no entanto, não houve formação de gel.

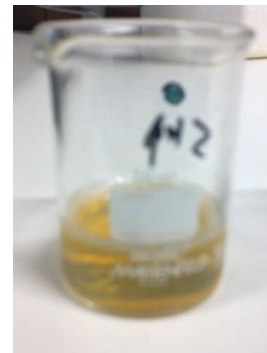


Figura A–27. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 2, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO₄.

Avaliação do pH

Mantendo as condições do segundo ensaio (9,5 % Lf, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO₄) e, afim de avaliar a influência do pH na gelificação, prepararam-se soluções com diferentes pHs (2, 4, 5, 7, 9 e 12). A pH 2 (Figura A–27), a pH 4 (Figuras A–28 e A–29) e a pH 5 não houve formação de gel, nem qualquer outra alteração significativa na solução. A pH 7 (Figura A–30), houve desnaturação da proteína – uma parte da solução formou um precipitado. A pH 9 (Figura A–31), houve total desnaturação da proteína, tendo ocorrido a formação de um precipitado. A pH 12, a

solução foi gelificando ao longo do aquecimento, com alteração da cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento), e libertando um odor semelhante a “ovos podres” – odor forte e desagradável do grupo sulfidril (McClements, Monahan, & Decker, 1993)– (Figura A–37. (A) e (B); Figura A–38. (A) e (B)). Após adicionar o sal, a solução ficou escura (Figura A–32).



Figura A–28. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 4, antes do aquecimento.



Figura A–29. Solução com 9,5 % de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO_4 .

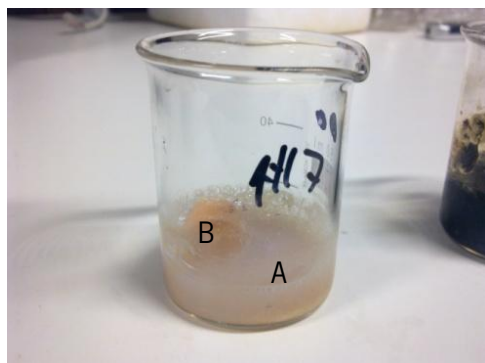


Figura A–30 Solução de lactoferrina, pH 7, 85 °C, 45 minutos, sem sal. A) Água + proteína; B) Agregado de proteína.

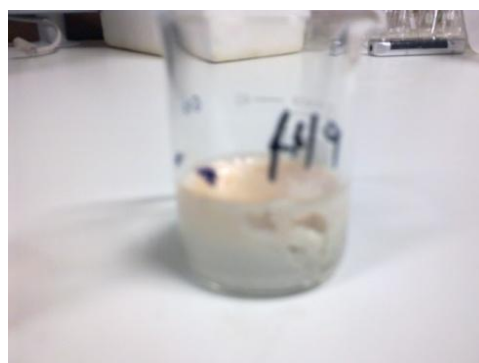


Figura A–31. Solução de lactoferrina, pH 9, 85 °C, 45 minutos, sem sal adicionado.



Figura A-32. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeSO_4 .



Figura A-33. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, sem adição de sal.

Com o objectivo de avaliar a influência da concentração de sal, prepararam-se várias soluções (pH 12, 9,5 % Lf, 85 °C, 45 min) alterando apenas a concentração de sal adicionado (0, 0,005, 0,01, 0,02 mol/L). Sem adição de sal, a solução (gelificou durante o aquecimento) ficou com cor verde (Figura A-33). Quando se adicionaram os 0,005 mol/L de FeSO_4 , a solução escureceu (verde escuro) (Figura A-34). O mesmo aconteceu depois de adicionar os 0,01 mol/L do sal de Fe, mas o tom final foi ainda mais escuro (Figura A-35). Já, após a adição dos 0,02 mol/L de FeSO_4 , a solução ficou preta, como já tinha sido dito anteriormente (Figura A-32).

Assim, quanto maior for a concentração de sal, mais escura se torna a solução. Este facto deve-se à cor do Fe – marrom/castanho – que, em contacto com a solução a torna preta (Figura A-35).

Apesar das diferentes concentrações de sal, a única diferença entre as soluções é a coloração, que estas apresentam depois de adicionado o FeSO_4 .



Figura A-34. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,005 mol/L de FeSO_4 .



Figura A-35. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos, 0,01 mol/L de FeSO_4 .

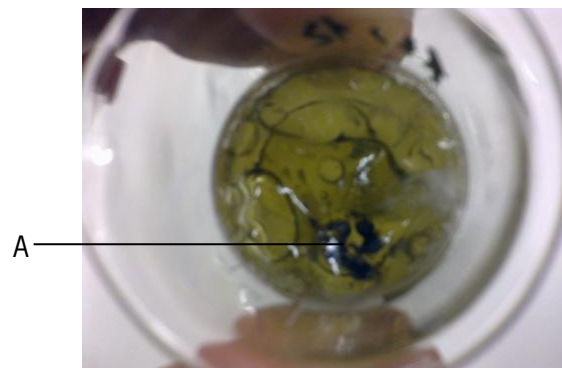


Figura A-36. Adição de FeSO_4 à emulsão de lactoferrina (9,5 %), pH 12, 85 °C, 45 minutos.
A) Cristais de sal.

Influência do tipo de sal – pH 12

Perante os resultados anteriores (a pH 12) e, mantendo as mesmas condições experimentais (9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min), testou-se a influência do tipo de sal nesse pH. De forma a comparar com o FeSO_4 , testou-se outro sal de Fe (FeCl_3) e CaCl_2 . Tal como aconteceu com o FeSO_4 , depois de adicionar o FeCl_3 , a solução tornou-se preta. Pelo contrário, com CaCl_2 , a solução manteve a sua coloração inalterada – verde.

Mais uma vez, comprovou-se que, pelo facto de o Fe ter um tom castanho, torna a solução (verde) num tom escuro (desde verde escuro até preto, dependendo da concentração de sal de Fe adicionado), pois como sal de cálcio (Ca), sendo branco, não há alteração de cor e, com o FeCl_3 , a solução também escurece (Figura A-39. (A) e (B)).

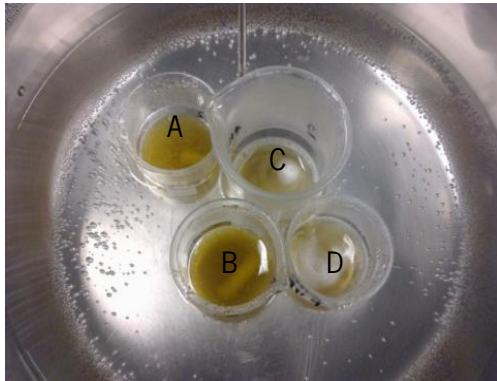


Figura A-37. Início do aquecimento de 4 soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos. (A) e (B) – pH 12; (C) e (D) – pH 4.



Figura A-38. Aquecimento de 4 soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos, 20 minutos após o início do aquecimento. (A) e (B) – pH 12; (C) e (D) – pH 4.

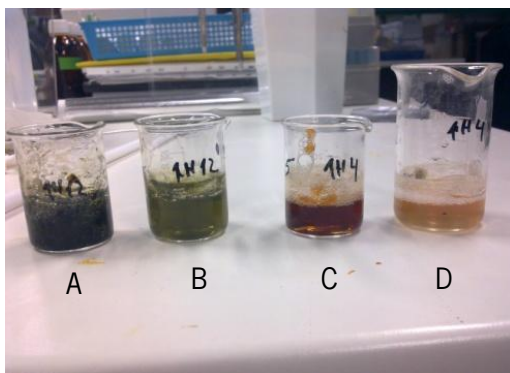


Figura A-39. Soluções de lactoferrina (9,5 %), 85 °C, 45 minutos. A) pH 12, 0,02 mol/L FeCl_3 ; B) pH 12, 0,02 mol/L de CaCl_2 ; C) pH 4, 0,02 mol/L FeCl_3 e D) pH 4, 0,02 mol/L CaCl_2 .



Figura A-40. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,02 mol/L de FeCl_3 .

Influência do tipo de sal – pH 4

A influência do tipo de sal em soluções de lactoferrina 9,5 % (pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L sal) foi investigada. Os sais testados, comparando com o FeSO_4 (ensaio 6), foram o FeCl_3 e o CaCl_2 . Enquanto que, com o FeSO_4 e o CaCl_2 , não houve qualquer alteração na solução, com o FeCl_3 notou-se um ligeiro aumento na viscosidade desta (Figura A-40). Quanto à coloração da solução, o FeCl_3 faz com que esta fique mais escura – de laranja (antes da adição de sal) passa a castanho – depois da adição de sal. Já, o CaCl_2 não altera a cor da solução, tendo esta mantendo-se laranja (Figura A-37. (C) e (D); Figura A-38. (C) e (D); Figura A-39. (C) e (D)).

Influência da concentração de sal

Tendo em conta a alteração na viscosidade da solução (9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeCl_3), testou-se a influência da concentração de sal, mantendo as outras condições do ensaio iguais. Comparativamente aos 0,02 mol/L de sal, avaliaram-se outras três concentrações – 0,035 mol/L, 0,04 mol/L e 0,05 mol/L.

A solução com os 0,035 mol/L de FeCl_3 gelificou, assim como as outras com 0,04 mol/L e 0,05 mol/L de FeCl_3 (Figura A-41, Figura A-42 e Figura A-43).

Então, para o sistema macro, tendo-se variado as condições de formação dos géis (pH, tempo e temperatura de aquecimento, concentração de sal, tipo de sal e concentração de proteína) e, perante os resultados obtidos, determinaram-se como sendo as condições ideais à formação de gel de lactoferrina, as seguintes: **9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,035 mol/L FeCl_3 .**



Figura A-41. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,035 mol/L de FeCl_3 .

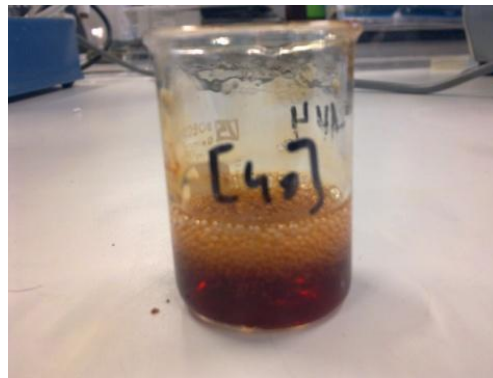


Figura A-42. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,04 mol/L de FeCl_3 .



Figura A-43. Solução de lactoferrina (9,5 %), pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,05 mol/L de FeCl_3 .

Avaliação da concentração da proteína

Com o objectivo de estudar a possibilidade de produção de géis ao tamanho nano, com as condições optimizadas para o sistema macro, a concentração de proteína foi diminuída e as soluções obtidas caracterizadas.

Assim, foram testadas várias concentrações (5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % ou 0,05 % Lf de proteína, mantendo as outras condições inalteradas – diminuindo a concentração de sal mas, mantendo a razão proteína/sal (17:1).

Comparativamente à solução com as condições definidas como ideais, a solução com 5 % de Lf (pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0184 mol/L FeCl_3), também gelificou e, devido ao sal, ficou acastanhada. Quanto às restantes concentrações (2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %), não houve, visualmente, gelificação e, foram ficando cada vez mais transparentes (quanto menor a concentração de proteína/sal, maior a transparência da solução). Estas observações podem ser verificadas nas Figura A-44; Figura A-45; Figura A-46; Figura A-47; Figura A-48; Figura A-49).

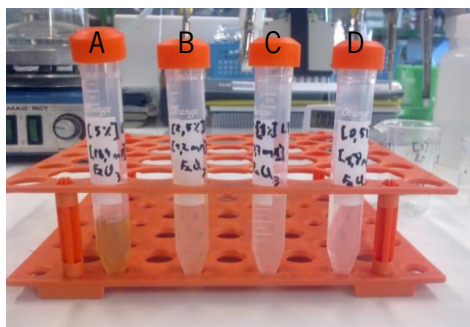


Figura A-44. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 5 % lactoferrina; B) 2,5 % lactoferrina; C) 1 % lactoferrina; D) 0,5 % lactoferrina.

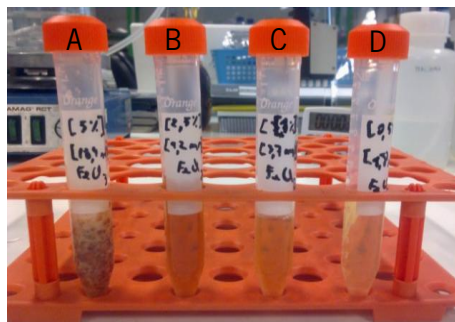


Figura A-45. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 5 % lactoferrina + 0,0184 mol/L FeCl_3 ; B) 2,5 % lactoferrina + 0,0092 mol/L FeCl_3 ; C) 1 % lactoferrina + 0,0037 mol/L FeCl_3 ; D) 0,5 % lactoferrina + 0,0018 mol/L FeCl_3 .

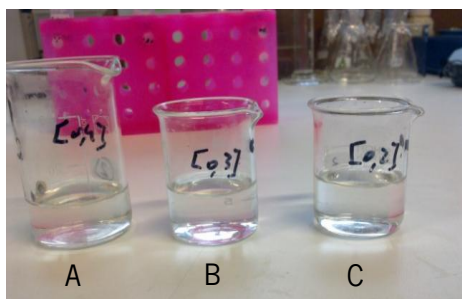


Figura A-46. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 0,4 % lactoferrina; B) 0,3 % lactoferrina; C) 0,2 % lactoferrina.

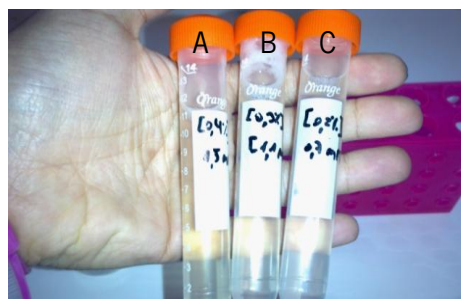


Figura A-47. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 0,4 % lactoferrina + 0,0015 mol/L FeCl_3 ; B) 0,3 % lactoferrina + 0,0011 mol/L FeCl_3 ; C) 0,2 % lactoferrina + 0,0007 mol/L FeCl_3 .

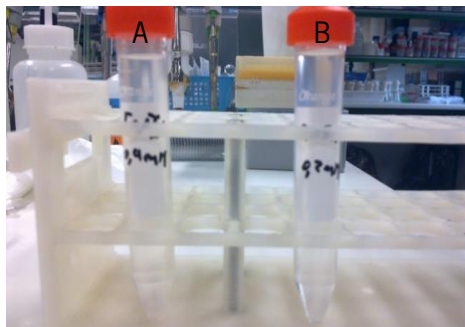


Figura A-48. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, antes da adição de sal. A) 0,1 % lactoferrina; B) 0,05 % lactoferrina.

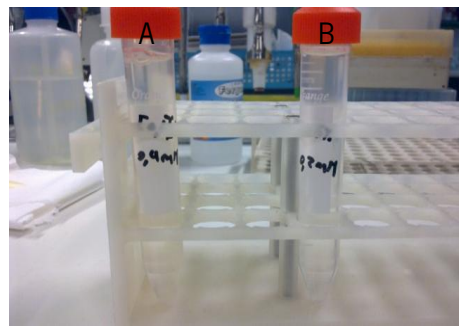


Figura A-49. Solução de lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, depois da adição de sal. A) 0,1 % lactoferrina + 0,0004 mol/L FeCl_3 ; B) 0,05 % lactoferrina + 0,0002 mol/L FeCl_3 .

As soluções (2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3%, 0,2 %, 0,1 % ou 0,05 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min e respectivas concentrações de FeCl_3), em que não foram visualmente observadas alterações, foram avaliadas no DLS (tamanho e PDI) com o objectivo de verificar a influência da concentração de Lf na alteração da estrutura da solução, através da medição do tamanho hidrodinâmico e polidispersividade. Na Tabela A-4, e nas Figuras 4-50 e 4-51 são mostrados os tamanhos e as polidispersividades (PDIs) obtidos da solução e, nas Figuras A-52, A-53, A-54, A-55, A-56, A-57, A-58, A-59 são mostrados os perfis de distribuição dos tamanhos nas soluções preparadas.

Pela análise dos resultados (tamanho, PDI e perfil de distribuição), definiu-se que a concentração ideal de proteína para a formação dos nanohidrogéis seria 0,2 % Lf (pH 4, 85°C, 45 min).

Tabela A-4. Tamanho e polidispersividade das soluções de proteína para diferentes concentrações de Lactoferrina

SOLUÇÃO	TAMANHO	PDI
Concentração Proteína (%)	Diâmetro (nm)	
2,5 % Lf + 0,0092 mol/L FeCl ₃	214,2 ± 3,7 ^a	0,515 ± 0,007 ^a
1 % Lf + 0,0037 mol/L FeCl ₃	201,3 ± 8,4 ^a	0,525 ± 0,024 ^a
0,5 % Lf + 0,0018 mol/L FeCl ₃	163,5 ± 7,9 ^b	0,461 ± 0,020 ^a
0,4 % Lf + 0,0015 mol/L FeCl ₃	131,4 ± 8,9 ^c	0,559 ± 0,096 ^a
0,3 % Lf + 0,0011 mol/L FeCl ₃	190,1 ± 47,2 ^c	0,537 ± 0,141 ^a
0,2 % Lf + 0,0007 mol/L FeCl ₃	120,7 ± 5,2 ^c	0,537 ± 0,020 ^a
0,1 % Lf + 0,0004 mol/L FeCl ₃	252,9 ± 10,1 ^d	0,633 ± 0,087 ^a
0,05 % Lf + 0,0002 mol/L FeCl ₃	167,2 ± 20,8 ^c	0,649 ± 0,016 ^a

^{a, b, c, d} – Letras diferentes (na coluna) são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).

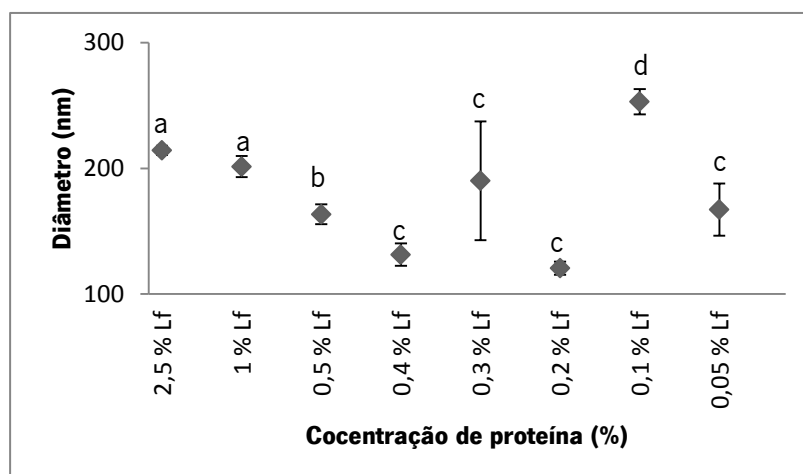


Figura A-50. Tamanho médio das partículas – Efeito da Concentração de Lactoferrina – a pH 4, 85 °C, 45 minutos. a, b, c, d – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si (p<0,05).

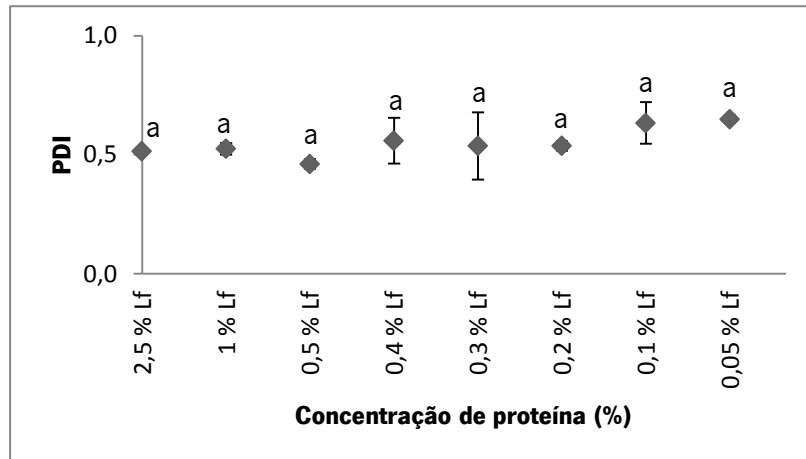


Figura A-51. Polidispersividade das soluções – Efeito da Concentração de Lactoferrina – a pH 4, 85 °C, 45 minutos. a, b, c, d – Letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

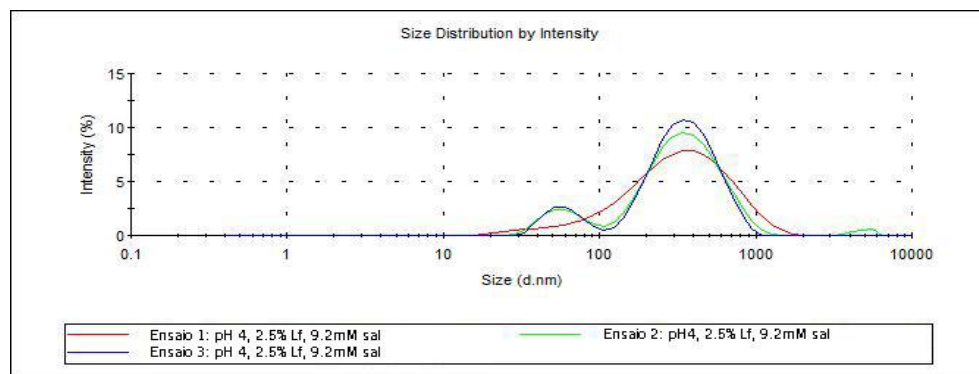


Figura A-52. Perfil da solução de 2,5 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0092 mol/L de FeCl_3 .

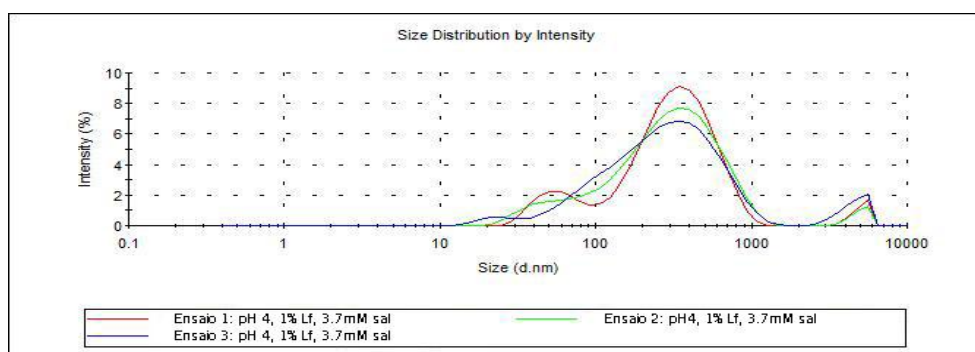


Figura A-53. Perfil da solução de 1 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0037 mol/L de FeCl_3 .

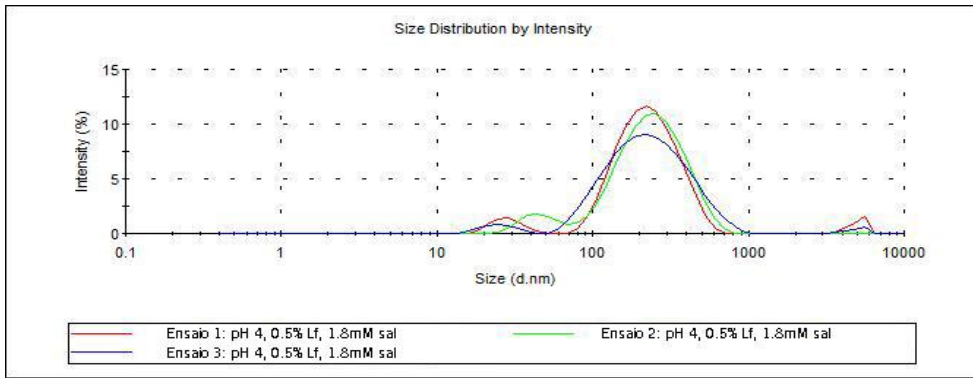


Figura A-54. Perfil da solução de 0,5 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0018 mol/L de FeCl₃.

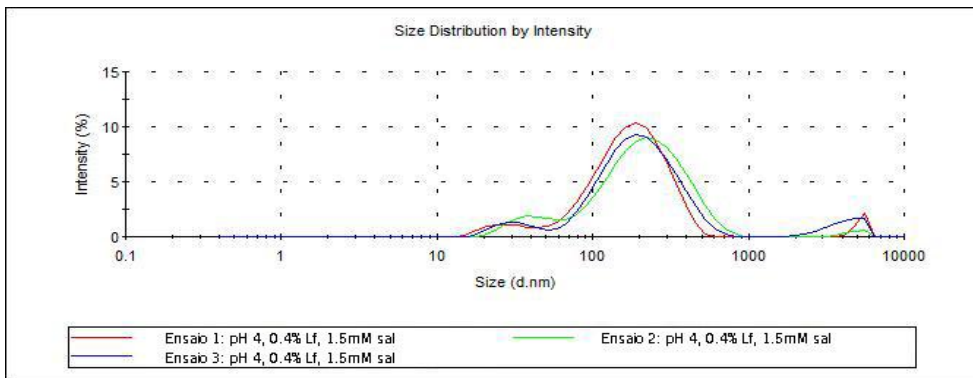


Figura A-55. Perfil da solução de 0,4 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0015 mol/L de FeCl₃.

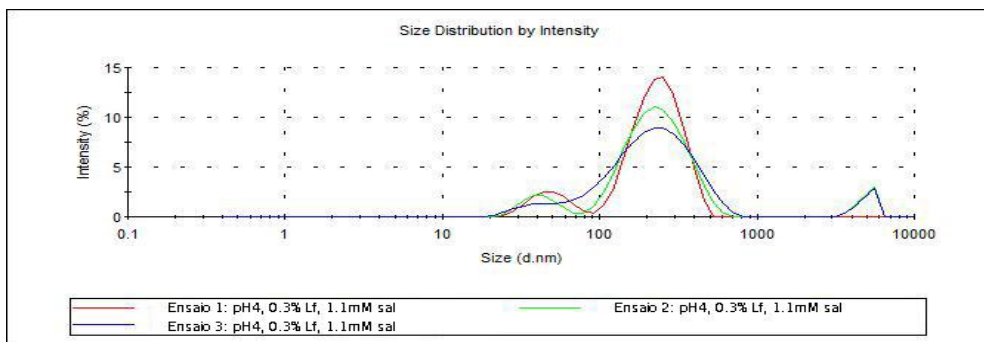


Figura A-56. Perfil da solução de 0,3 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0011 mol/L de FeCl₃.

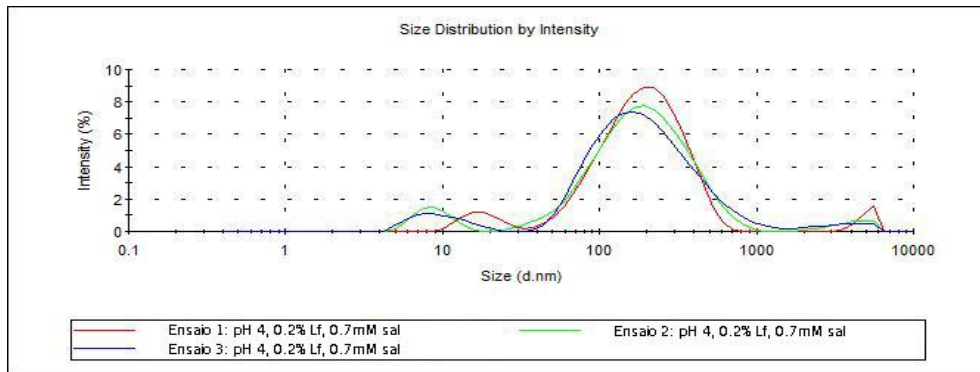


Figura A-57. Perfil da solução de 0,2 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0007 mol/L de FeCl_3 .

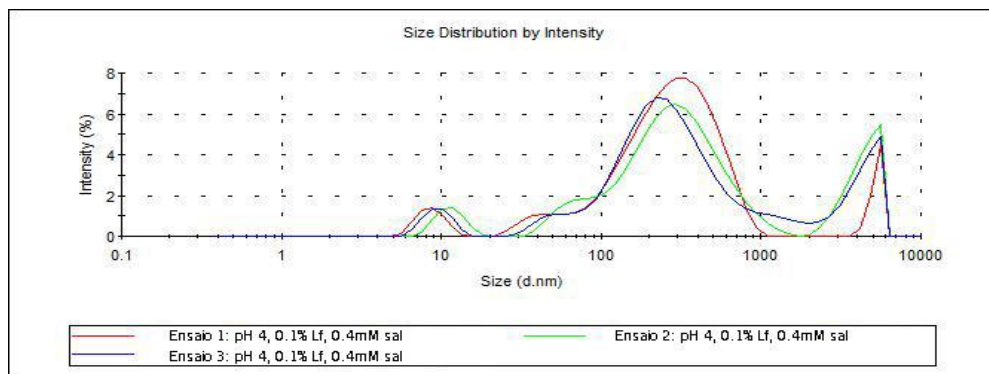


Figura A-58. Perfil da solução de 0,1 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0004 mol/L de FeCl_3 .

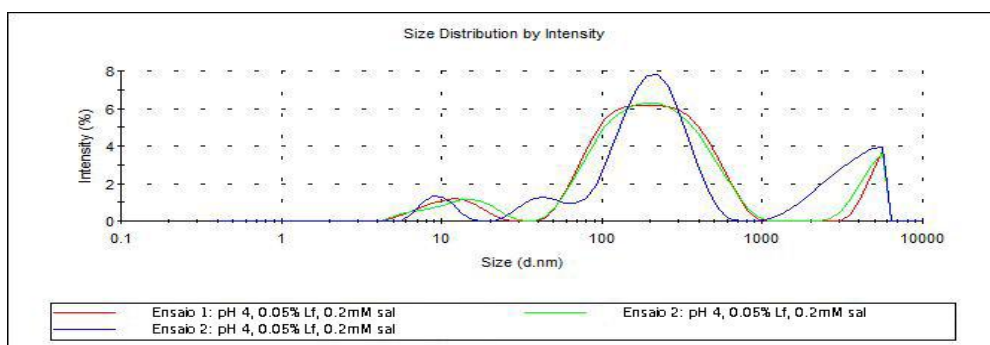


Figura A-59. Perfil da solução de 0,05 % lactoferrina, a pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0002 mol/L de FeCl_3 .

Influência da concentração de sal para uma solução de 0,2 % de proteína

Com o objectivo de avaliar a influência da concentração de FeCl_3 nas soluções, variou-se a concentração de sal e determinaram-se os tamanhos e a polidispersividade das soluções.

A influência da concentração de sal (0,0007 mol/L, 0,0011 mol/L, 0,0014 mol/L, 0,0017 mol/L, 0,0023 mol/L, 0,0026 mol/L) foi avaliada em soluções com 0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min. Na Tabela A-5 e nas Figuras A-60 e A-61 são mostrados os resultados obtidos pelo DLS (tamanho, PDI e carga das partículas) das soluções de Lf. Nas figuras A-58 e A-59, pode-se comparar o tamanho e a polidispersividade das soluções, respectivamente.

Pela análise destes resultados, a solução que mostrou melhores resultados foi a de menor concentração de sal (0,0007 mol/L), onde as partículas apresentaram um diâmetro médio de $120,7 \pm 5,2$ nm e um PDI de $0,537 \pm 0,020$ (entre as soluções, foi o PDI mais baixo). A concentração de sal não mostra ter, estatisticamente, influência nem no tamanho das partículas, nem no PDI.

Tabela A-5. Tamanho e polidispersividade nas soluções de proteína – Influência da Concentração de FeCl_3

SOLUÇÃO	TAMANHO	PDI
Concentração Sal (mol/L)	Diâmetro (nm)	
0,0007	$120,7 \pm 5,2^a$	$0,537 \pm 0,020^a$
0,0011	$116,7 \pm 4,9^a$	$0,722 \pm 0,217^a$
0,0014	$125,3 \pm 2,8^a$	$0,640 \pm 0,109^a$
0,0017	$144,3 \pm 15,9^a$	$0,809 \pm 0,231^a$
0,002	$133,7 \pm 5,6^a$	$0,679 \pm 0,200^a$
0,0023	$148,2 \pm 6,5^a$	$0,672 \pm 0,174^a$
0,0026	$134,8 \pm 20,5^a$	$0,855 \pm 0,152^a$

^a – Letras iguais (na coluna) são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

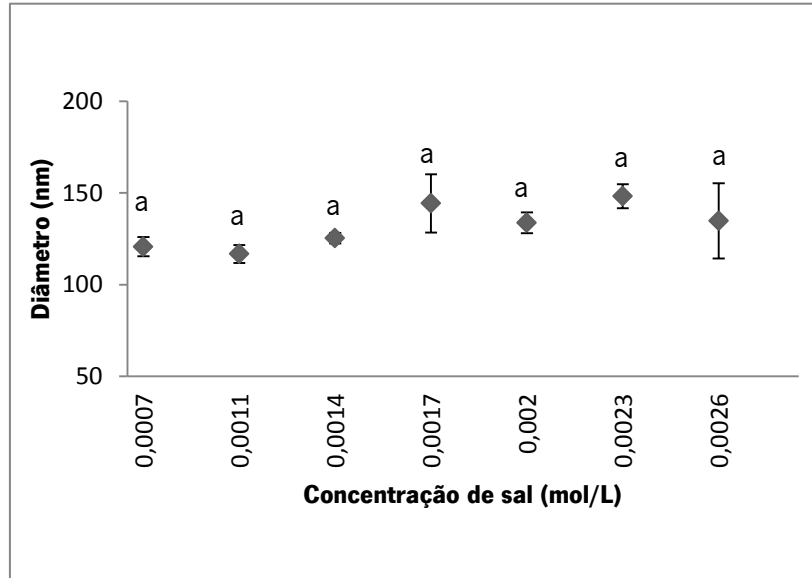


Figura A-60. Tamanho médio das partículas em soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 4, 85 °C, 45 minutos) – Influência da Concentração de Sal (FeCl_3). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

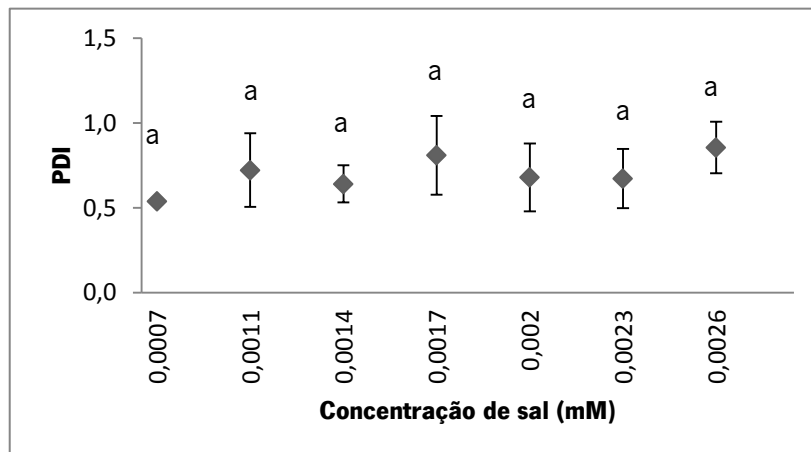


Figura A-61. Polidispersividade das soluções de lactoferrina (0,2 %, pH 4, 85 °C, 45 minutos) – Efeito da Concentração de Sal (FeCl_3). a – Letras iguais são estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$).

Após ter sido testada a influência do FeCl_3 na solução com 0,2 % de Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, ficou então definido que as condições ótimas para a formação dos nanohidrogéis seriam: **0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0007 mol/L.**

A Tabela A-6 resume todos os ensaios realizados afim de alcançar o sistema ótimo para a obtenção de nanohidrogéis de lactoferrina.

Tabela A-6. Tabela-resumo dos ensaios realizados para a formação dos nanohidrogéis, a partir das condições para a obtenção de um hidrogel (sistema macro)

Nº ENSAIO	CONDIÇÕES	RESULTADOS
1	9,5 % Lf, pH 5, 80 °C, 30 min, 0,02 mol/L FeSO ₄	A solução não gelificou
2	9,5 % Lf, pH 5, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO ₄	A solução não gelificou
3	9,5 % Lf, pH 2, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO ₄	A solução não gelificou.
4	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO ₄	A solução não gelificou
5	9,5 % Lf, pH 7, 85 °C, 45 min, sem sal	Formação de um agregado (em parte); a restante solução ficou em estado líquido.
6	9,5 % Lf, pH 9, 85 °C, 45 min, sem sal	Agregação da solução
7	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeSO ₄	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento). Após a adição de sal, a amostra ficou preta.
8	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, sem sal	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento).
9	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, 0,005 mol/L FeSO ₄	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor

		forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento). Após a adição de sal, a amostra ficou preta.
10	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, 0,01 mol/L FeSO ₄	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento). Após a adição de sal, a amostra ficou preta.
11	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeCl ₃	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento). Após a adição de sal, a amostra ficou preta.
12	9,5 % Lf, pH 12, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L CaCl ₂	A solução gelificou durante o aquecimento, libertando um odor forte e desagradável. Ao longo do aquecimento, a solução alterou a sua cor inicial (laranja) para verde (no fim do aquecimento). Após a adição de sal, a amostra permaneceu verde.
13	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L FeCl ₃	A solução não gelificou, mas notou-se um aumento considerável na viscosidade. Depois da adição de sal, a amostra

		passou de laranja para laranja escuro/castanho claro.
14	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,04 mol/L FeCl ₃	A solução gelificou. Antes do aquecimento, a solução era laranja e, após a adição de sal, a amostra ficou acastanhada.
15	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,02 mol/L CaCl ₂	A solução não gelificou. A cor da amostra permaneceu laranja, após a adição do sal.
16	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,035 mol/L FeCl ₃	A solução gelificou. A amostra passou da cor laranja para castanha, depois de adicionado o sal.
17	9,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,05 mol/L FeCl ₃	A solução gelificou. A amostra passou da cor laranja para castanha, depois de adicionado o sal
18	5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0184 mol/L FeCl ₃	A solução gelificou. A amostra passou da cor laranja para castanha, depois de adicionado o sal.
19	2,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0092 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. A amostra passou da cor laranja claro para laranja escuro, depois de adicionado o sal.
20	1 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0037 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. A amostra passou da cor laranja muito claro para laranja, depois de adicionado o sal.

21	0,5 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0018 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. A amostra passou da cor laranja muito claro para laranja.
22	0,4 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0015 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Tanto antes como depois da adição de sal, a amostra apresentou uma coloração transparente.
23	0,3 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0011 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Tanto antes como depois da adição de sal, a amostra apresentou uma coloração transparente.
24	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0007 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Tanto antes como depois da adição de sal, a amostra apresentou uma coloração transparente.
25	0,1 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0004 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Tanto antes como depois da adição de sal, a amostra apresentou uma coloração transparente.
26	0,05 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0002 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Tanto antes como depois da adição de sal, a amostra apresentou uma coloração transparente.
27	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0011 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel.

		Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com o sal, tornou-se laranja muito claro.
28	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0014 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com o sal, tornou-se laranja muito claro.
29	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0017 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com a adição do sal tornou-se laranja muito claro.
30	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,002 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com a adição do sal tornou-se laranja muito claro.
31	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0023 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com a adição do sal tornou-se laranja claro.
32	0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0026 mol/L FeCl ₃	A olho nu, não se visualizou formação de gel. Antes da adição de sal, a amostra era transparente mas, com a adição do sal tornou-se laranja claro.

Caracterização – AFM

Após se definirem as condições ótimas (0,2 % Lf, pH 4, 85 °C, 45 min, 0,0007 mol/L) para a formação dos nanohidrogéis, preparou-se uma solução e, com o objectivo de determinar as propriedades estruturais dos nanohidrogéis formados, usou-se o método AFM (Figura A-62).

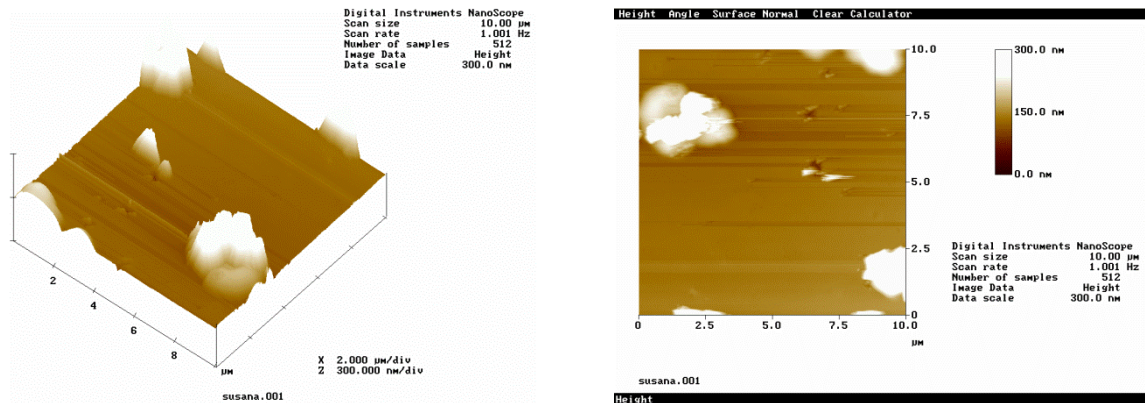


Figura A-62. Imagens AFM de soluções de lactoferrina após o processo de gelificação (0,2 % lactoferrina, pH 4, 85 °C, 45 minutos, 0,0007 mol/L) – 10 × 10 µm.

Pela observação das imagens, não houve a formação de nanohidrogéis (superfície esférica). As imagens sugerem a formação de cristais, tendo em conta a estrutura resultante.

ANEXO 2

A quantificação do Fe foi realizada por EAA. Foram feitas calibrações para diferentes gamas de concentrações e, pela equação da recta de calibração para a gama de concentrações 0,06 – 15 mg/L (nanohidrogéis) foi $y = 12,614x$ e um $R^2 = 0,995$. Substituindo o x pelo valor da concentração obtido por EAA, chegou-se à concentração de Fe presente na solução (2,5 mg/L – 4 %). No entanto, há que ter em conta o factor diluição 5X, durante o processo de separação do Fe ligado aos nanohidrogéis do Fe livre na solução. Então, tendo em conta o factor diluição, o Fe ligado corresponde a $20,1 \pm 0,5$ %.

A confirmar os 20 %, aproximadamente, de Fe ligado está a percentagem de Fe livre na solução (cerca de 79 %). Não havendo factor diluição a ter em conta, bastou substituir o x na equação $y = 225,07x$, com um $R^2 = 0,9818$. Assim, a percentagem de Fe livre na solução é de 79 %, aproximadamente, o que confirma o resultado obtido para os nanohidrogéis.