

NANOPARTÍCULAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA EM ÁGUA: EFEITO DA FORÇA IÔNICA E DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E SURFACTANTE

Samira J. Fayad^{a,*}, Betina G. Z. Ramos^b, Valdir Soldi^a e Edson Minatti^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil

^bNanovetores – Encapsulados de Alta Tecnologias, 88030-000 Florianópolis – SC, Brasil

Recebido em 24/07/2014; aceito em 17/09/2014; publicado na web em 27/10/2014

NANOPARTICLES FROM SOYBEAN PROTEIN ISOLATE BY COACERVATION IN WATER: EFFECT OF IONIC STRENGTH AND CONCENTRATION OF PROTEIN AND SURFACTANT. Soft nanoparticles of size 200-400 nm were obtained from soybean protein isolate (SPI). The particles were formed and suspended in water by the coacervation of aqueous suspensions of SPI in hostile buffered aqueous solutions in the presence of surfactants. We investigate the effect of storage, ionic strength, and concentrations of SPI and surfactant on nanoparticle size and zeta potential. Transmission electron microscopy images and scattering techniques (SLS/DLS) revealed that the particles are spherical, with hydrophilic chains at the surface.

Keywords: soy bean protein; colloidal nanoparticles; biopolymer.

INTRODUÇÃO

Com mais de 90% de proteína, a Proteína Isolada de Soja (SPI) é a forma mais refinada entre os derivados protéicos comuns.^{1,2} Produto praticamente livre de carboidratos e de gordura, a SPI é constituída pelas proteínas de armazenamento da soja e compreende um conjunto de macromoléculas de tamanhos e estruturas variadas.³ Trata-se, em grande parte, de uma mistura de glicininas e β -conglucinininas (também conhecidas como frações 11S e 7S, respectivamente) que representam mais de 85% de proteínas presentes na soja.² Devido aos seus efeitos benéficos (redução do colesterol e prevenção de doenças cardíacas), a proteína isolada de soja tem sido extensivamente utilizada como alternativa nutricional, funcional ou econômica em substituição a outros tipos de proteínas tradicionais em alimentos como bebidas, produtos de panificação, cereais, carne de frango, carne de gado e produtos de pescado.^{3,4}

As cadeias de SPI podem ser facilmente reticuladas em solução a partir do simples aquecimento.⁵ Usando-se desta propriedade, recentemente obtivemos micropartículas de SPI capazes de encapsular óleo inseticida.⁶ Em outro trabalho, Wang e colaboradores usaram SPI para a obtenção nanopartículas, por meio da reticulação com glutaraldeído.⁷

Biocompatíveis e biodegradáveis, os sistemas com nanopartículas de biopolímeros vêm sendo desenvolvidos visando aplicações para fins terapêuticos e de liberação de fertilizantes e inseticidas.^{8,9} Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas de biopolímeros, que normalmente levam a suspensões coloidais aquosas. O método de coacervação simples envolve a separação do material polimérico da sua solução através de alterações das características do meio que causam a dessolvatação da macromolécula; isto pode ser obtido, por exemplo, por meio de mudança de pH, temperatura, força iônica, adição de um não solvente, sal ou outro polímero incompatível.¹⁰⁻¹² O uso de surfactantes com longas cadeias hidrofílicas pode oferecer um mecanismo extra de estabilidade cinética às dispersões obtidas, tal como é o caso dos sorbitóis polietoxilados, os Tweens.¹³

Durante o armazenamento de suspensões coloidais de biopolímeros, alguns processos podem ocorrer precocemente, tais como degradação química ou desnaturação física do biopolímero ou das

demas moléculas presentes no meio, além da agregação das partículas, resultando na floculação ou precipitação do material protéico.¹⁴ Consequentemente, a limitada estabilidade cinética é uma limitação para aplicações industriais das suspensões aquosas de nanopartículas com biopolímeros.⁸ Todavia, o ajuste de algumas variáveis na preparação das nanopartículas pode levar a um aumento significativo da estabilidade cinética.^{8,15-17}

Neste trabalho, usamos a metodologia de coacervação em solução aquosa para a obtenção de nanopartículas formadas pela SPI e acompanhamos os efeitos de algumas variáveis nos métodos de preparação através da caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas obtidas. Ainda, estudamos a estabilidade cinética das suspensões coloidais, com o intuito de compreender os mecanismos dos processos degradativos. As misturas foram feitas na presença do surfactante Tween 80 que, com um HLB em torno de 15, é capaz de oferecer proteção estérica efetiva contra processos degradativos, como os de coagulação ou floculação nas dispersões.¹⁸

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

A SPI (Supro 500E) utilizada foi gentilmente fornecida pela Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. e usada como recebida. O surfactante Tween 80 (monooleato de sorbitanoetoxilado) foi usado como adquirido da VETEC Química Fina LTDA, Brasil. O ácido acético glacial e o acetato de sódio usados para preparar a solução tampão, assim como o hidróxido de sódio usado para ajustar o pH das soluções, foram adquiridos da empresa Nuclear, Brasil.

Preparação das partículas

Inicialmente, preparamos soluções aquosas de SPI em diferentes concentrações - 0,1% a 0,5% (m/v) - com pH ajustado para 10 (valor acima do ponto isoelétrico da SPI,² i.e., acima do valor de pH no qual a mistura proteica apresenta carga elétrica líquida igual a zero e é insolúvel em meio aquoso) por meio da adição de NaOH(aq) 1,5 mol L⁻¹ e mantivemos sob agitação a 25 °C durante 12 horas. Preparamos também as soluções tampão hostil, i.e., solução tampão

*e-mail: samirajfayad@gmail.com

com pH ajustado para menor solubilidade possível da SPI e favorecer a coacervação. As soluções tampão ácido acético/acetato de sódio tiveram o pH ajustado para 5 pela adição de NaOH(aq) 1,5 mol L⁻¹, contendo 0,5% ou 1,0% (m/m) de surfactante Tween 80. A força iônica do meio foi calculada levando em consideração as concentrações e as cargas de todos os ânions e cátions presentes no sistema.

Depois de prontas as soluções, 85 mL da solução tampão hostil foram submetidos a um dispersor (Quimis) sob uma velocidade de agitação de 6000 rpm e 3 mL de solução aquosa de SPI foram então adicionados por gotejamento. A mistura final permaneceu sob agitação por 1 minuto. A composição de cada amostra é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das amostras estudadas

Amostra	c _{SPI} / % (m/v)	I _{tampão} / mmol L ⁻¹	c _{Tween80} / % (m/m)
A1	0,1	1, 2 ou 20	0,5 ou 1,0
A2	0,2	1, 2 ou 20	0,5 ou 1,0
A3	0,3	1, 2 ou 20	0,5 ou 1,0
A4	0,4	1, 2 ou 20	0,5 ou 1,0
A5	0,5	1, 2 ou 20	0,5 ou 1,0

Distribuição de tamanho e potencial Zeta das partículas

A determinação da distribuição de tamanho das partículas de SPI foi realizada a 25 °C, por meio de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um equipamento Zetasizer Nano da Malvern. O instrumento opera com laser de He-Ne, λ = 633 nm e a detecção é feita em um único ângulo de 173°.

As medidas do potencial Zeta médio das partículas foram realizadas a 25 °C, pela técnica de microeletroforese associada à anemometria Doppler de laser, submetendo-se a amostra a um campo elétrico no equipamento Zetasizer Nano da Malvern.

Armazenamento e estabilidade cinética das suspensões coloidais

O estudo da estabilidade cinética das dispersões foi realizado dentro de um intervalo de 122 dias. As amostras ficaram condicionadas em geladeira a uma temperatura de 4,0 ± 0,5 °C. As medidas de distribuição de tamanho e potencial Zeta das suspensões foram realizadas a 25 °C.

Em todas as medidas, as alíquotas foram pegadas em lugares indiscriminados e aleatórios das dispersões, sendo que variações da posição de coleta no frasco não mostraram diferenças significativas nos resultados. Entretanto, após 90 dias de estocagem, uma ligeira cremagem foi observada; por isso, nas medidas após este tempo as alíquotas foram coletadas na parte inferior do frasco.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para a realização das medidas de microscopia, uma pequena quantidade da amostra foi depositada em grades recobertas de carbono e secas por 24 horas. As imagens das amostras foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 da JEOL, pertencente o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

Espalhamento de luz dinâmico e estático

A dependência angular do espalhamento de luz dinâmico I=I(q,t)

e do espalhamento de luz estático I=I(q) da amostra A2 (c_{SPI} = 0,2%, I = 1 mmol L⁻¹, c_{tween80} = 0,5%) foi investigada pelo uso de um Goniômetro ALV-7002 multicorrelador, com faixa de detecção de 32° a 150° e operando com laser de 22 mV Ne/Ar 638,2 nm. As amostras foram colocadas em uma cubeta cilíndrica de 5 mL sem diluição e as medidas foram feitas entre 40° a 140°, em intervalos de 10°, durante 300s. Todas as medidas foram realizadas em temperatura controlada de 25 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da força iônica na distribuição de tamanho e polidispersidade das partículas

A solução que promove a coacervação é a solução tampão hostil, que consiste em uma solução de surfactante tamponada em pH = 5 (ponto isoelétrico da SPI).² A força iônica (I) da solução tampão foi ajustada e apresentou grande efeito nas características das dispersões, como ilustrado na Figura 1. O aumento da força iônica do meio levou ao aumento do diâmetro médio e da polidispersidade das partículas (valores inseridos nas colunas), passando estas a ter dimensões micrométricas quando I = 20 mmol L⁻¹. O aumento da força iônica promove a contração da camada elétrica difusa de íons ao redor das partículas (Equação 1 – na qual κ⁻¹ é o comprimento de Debye, k_B é a constante de Boltzmann, ε é a constante de permissividade do meio, T é a temperatura termodinâmica, e é a carga elementar, I é a força iônica do meio, F é a constante de Faraday)¹⁹ e, conseqüentemente, diminui o potencial de repulsão V_R (Equação 2 – na qual x é a distância entre as partículas, a é o raio da partícula, ψ é o potencial elétrico da superfície das partículas).¹⁹ Desta maneira, processos degradativos tal como a floculação e coagulação das partículas justificam o aumento do tamanho e a alta polidispersidade nas formulações com maior força iônica.

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon k_B T}{2eIF} \right)^{1/2} \quad (1)$$

$$V_R(x) = 2\pi\epsilon a\psi_0^2 \ln(1 + 2e^{-\kappa x}) \quad (2)$$

É importante observar que, tal como indica a Figura 1, a

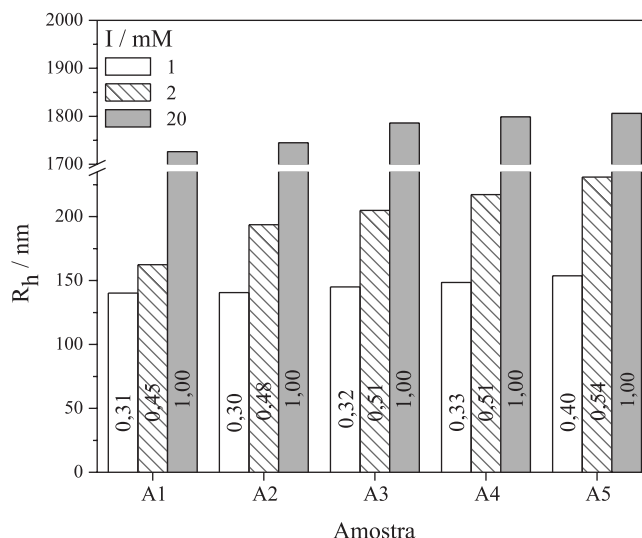


Figura 1. Raio hidrodinâmico aparente e polidispersidade em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80

concentração de SPI(aq) não teve um efeito muito pronunciado no tamanho das partículas, ao menos na faixa estudada.

Efeito da força iônica no potencial Zeta das partículas

O potencial Zeta (ζ) de todas as partículas foi sempre negativo, como apresentado na Tabela 2, indicando que mesmo em pH = 5 a carga residual das cadeias de SPI era negativa. De acordo com o Jaramillo e colaboradores,² o ponto isoelétrico da SPI é 4,6. Em pH = 5 provavelmente algumas cadeias encontram-se sob a forma negativa, justificando os valores iniciais de potencial zeta observados. A concentração de proteína também exerce um efeito no valor do potencial Zeta: para uma mesma força iônica, o aumento da concentração de SPI (série A1 a A5) aumentou o valor de ζ , indicando a formação de partículas com maior densidade de carga superficial em concentrações mais elevadas de proteína.

O aumento da força iônica levou à diminuição do potencial ζ . Isto pode ser compreendido pelo fato de que a expressão para o potencial ζ (Equação 3 – na qual Q_E é a cargas da unidade eletrocinética) mostra uma dependência direta com o comprimento de Debye.²⁰ Como visto anteriormente, o aumento da força iônica leva a uma diminuição do comprimento de Debye e, conseqüentemente, a uma diminuição do potencial Zeta.

$$\zeta = \left(\frac{Q_E}{4\pi\epsilon\alpha(1 + \kappa\alpha)} \right) \quad (3)$$

Tabela 2. Potencial Zeta das nanopartículas em função da força iônica da solução tampão hostil com 0,5% (m/m) de Tween 80

Amostra	ζ / mV		
	$I_{\text{tampão}} / \text{mmol L}^{-1}$		
	1	2	20
A1	-26,6	-15,3	-8,4
A2	-27,0	-16,5	-8,99
A3	-29,5	-18,1	-9,22
A4	-31,4	-19,7	-9,7
A5	-32,8	-22,4	-

Efeito da concentração de surfactante na distribuição de tamanho e polidispersidade das partículas

Para auxiliar na dispersão das partículas, o surfactante Tween 80 estava presente na solução tampão hostil. Desta maneira, o surfactante poderia ser adsorvido tão logo os coacervatos eram formados. A Figura 2 apresenta os valores do Raio hidrodinâmico e da polidispersidade (valores inseridos das colunas) das partículas obtidas em diferentes concentrações de SPI, para dois sistemas com diferentes concentrações de surfactante – 0,5% e 1,0% (m/m) de Tween 80. Embora o efeito do aumento da concentração de surfactante não seja muito pronunciado, levou à diminuição do tamanho médio e da polidispersidade nas formulações com até 0,2% de SPI e ao aumento do tamanho e da polidispersidade nas formulações mais concentradas. Tal comportamento pode estar relacionado à estequiometria da adsorção das moléculas de surfactante na superfície das partículas formadas durante o processo de coacervação. Quando a concentração de proteína é pequena, as moléculas de Tween 80 atuam como agentes de estabilização estérica, prevenindo a floculação das partículas. O excesso de Tween 80 solubilizado na fase aquosa (sob a forma de micelas não adsorvidas na região interfacial) atua

como um agente de estabilização por depleção osmótica:²¹ quando duas partículas se aproximam e deslocam as moléculas da água entre elas, a concentração local de Tween na fase aquosa fica subitamente maior do que no resto da solução, tornando termodinamicamente espontânea a migração de moléculas de água para o espaço entre as partículas, evitando sua agregação. Ambos os processos levam a partículas menores. A alta polidispersidade nas formulações com concentração maior pode ter origem na maior probabilidade cinética de colisão entre cadeias de SPI na formação do coacervato. O aumento da concentração do surfactante parece não garantir nem a formação de partículas nem a diminuição da polidispersidade. Além disso, com o maior número de macromoléculas em solução, durante a coacervação, uma mesma cadeia de SPI pode fazer parte de duas ou mais partículas, levando a um processo de floculação-coagulação via ponte.²² Ainda, o aumento da concentração de SPI leva ao aumento da área superficial para adsorção de surfactante; isto diminui a estabilização por depleção osmótica, pois há menos moléculas de Tween 80 dissolvidas na fase aquosa. Ambos os processos levam a um aumento do tamanho das partículas.

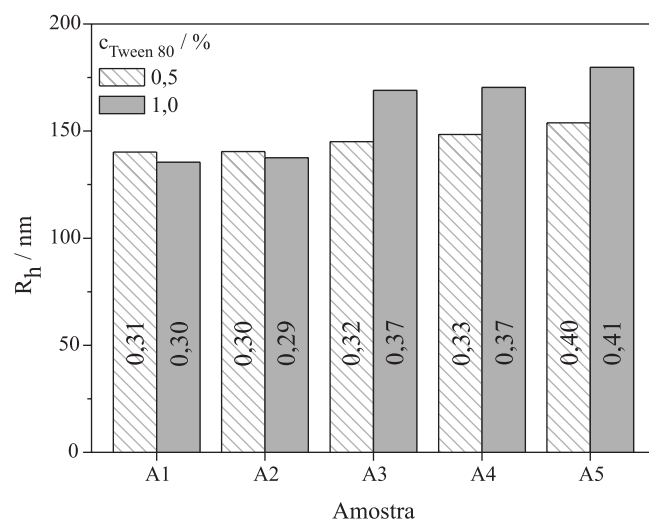


Figura 2. Raio hidrodinâmico aparente e polidispersidade em função da concentração de SPI na presença de diferentes concentrações de Tween 80 na solução tampão hostil

Efeito da concentração de surfactante no potencial Zeta das partículas

O aumento na concentração de surfactante nas soluções não provocou diferenças significativas nos valores de potencial Zeta das partículas (Tabela 3), exceto nas formulações com maior concentração de SPI, nas quais os valores de ζ medidos foram ligeiramente menores quando a concentração de Tween 80 era de 1% (m/m). Uma vez que o aumento da concentração de surfactante levou ao aumento do tamanho das partículas obtidas com as soluções de concentrações de SPI mais altas (mostrado na Figura 2), a diminuição dos valores de ζ é explicada pela Equação 3, que indica que o potencial eletrocinético é inversamente proporcional ao raio das partículas (a).

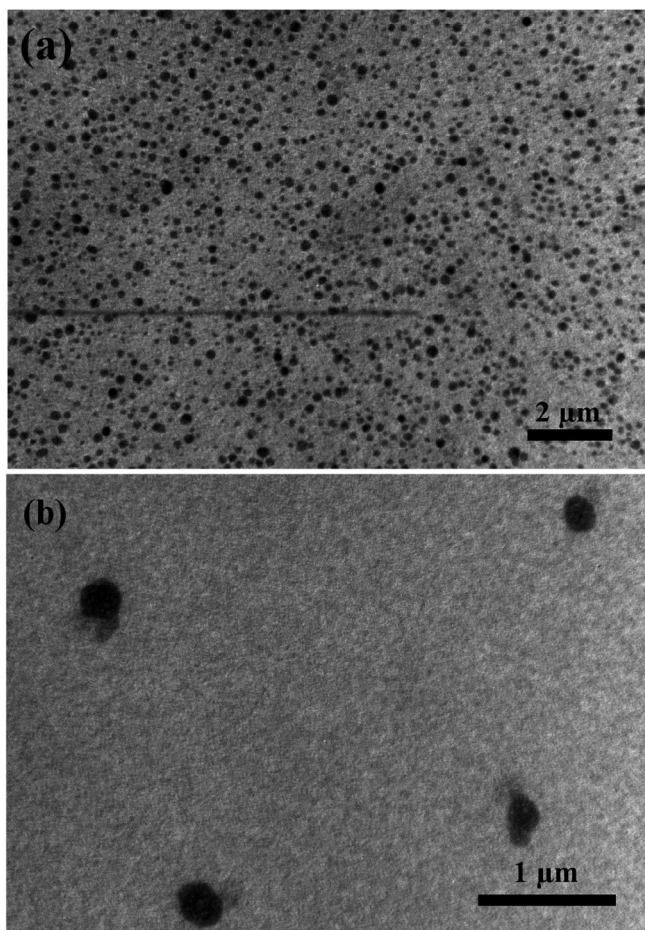
Análise morfológica via microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As micrografias das partículas preparadas a partir da suspensão aquosa de SPI 0,2% (amostra A2 com 0,5% Tween 80 e $I = 1 \text{ mmol L}^{-1}$) são apresentadas na Figura 3. As micrografias revelaram nanopartículas compactas esféricas, com diâmetro variando

Tabela 3. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI na presença de diferentes concentrações de Tween 80 na solução tampão hostil

Amostra	ζ / mV	
	$c_{\text{Tween80}} / \%$	
	0,5	1,0
A1	-26,6	-26,9
A2	-27,0	-27,4
A3	-29,5	-28,6
A4	-31,4	-30,2
A5	-32,8	-30,1

entre 150 a 400 nm - valores similares aos observados via Zetasizer (Figura 2). Ainda, por meio da análise de TEM, constatou-se que o material formador das nanopartículas apresentava difratometria típica de organizações amorfas, algo comumente observado em nanoagregados da matéria mole.

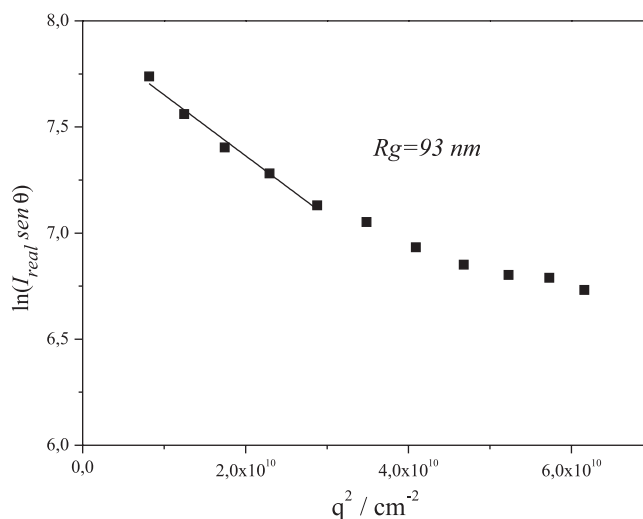
**Figura 3.** Micrografias obtidas por TEM das nanopartículas com SPI 0,2%, na presença de 0,5% de Tween 80 e $I = 1 \text{ mmol L}^{-1}$

Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)

De maneira complementar às técnicas de imagem direta, estudamos também a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz das suspensões de nanopartículas de SPI. A Figura 4 apresenta a curva de Guinier (Equação 4 – na qual $I(\theta)$ é a intensidade do espalhamento de luz, q é o vetor de onda de espalhamento de luz e R_g é o raio de giração)⁶ para os dados da amostra A2 (0,5% de Tween 80

e força iônica igual a 1 mmol L^{-1}). A má correlação linear dos pontos é um indicativo da relevante polidispersidade do sistema; somente sistemas monodispersos resultam em uma perfeita correlação linear desta função, no limite $q \rightarrow 0$.

$$\ln I(\theta) = \ln I_0(\theta) - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \quad (4)$$

**Figura 4.** Gráfico de Guinier para a dependência angular da intensidade espalhamento de luz estático da amostra A2. O valor de raio de giração médio inserido foi calculado de acordo com a Equação 4

Como previamente mostrado,⁶ o R_g das cadeias de SPI em suspensão aquosa é de 24 nm; o tamanho médio das nanopartículas de SPI, como expresso na Figura 4, é 93 nm. Isto significa que, em média, uma nanopartícula de formulação A2 é formada por grupos de 4 unidades protéicas de SPI.

A Figura 5 apresenta a dependência angular da frequência média de relaxação das curvas de autocorrelação de DLS e o respectivo raio hidrodinâmico médio, calculado com base na Equação de Stokes-Einstein (Equação 5 – onde R_h é o raio hidrodinâmico, η é a viscosidade do solvente e D_0 é o coeficiente de difusão translacional),²³ para esta mesma amostra. Novamente, a notória ausência de uma correlação linear perfeita entre os pontos indica polidispersidade relevante no sistema. Na figura, dois ajustes dos dados experimentais estão indicados. No primeiro caso (linha tracejada), D_0 é o limite da função Γ vs q^2 quando $q \rightarrow 0$ e pondera sobretudo as partículas maiores, que predominam no espalhamento a baixos ângulos. A linha cheia indica o mesmo ajuste mas incluindo todos os ângulos medidos. Neste caso o D_0 é um valor médio obtido dos vários modos de difusão existentes no sistema.

$$R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_0} \quad (5)$$

A diferença entre valor de $\langle R_h \rangle$ determinado pelas técnicas de DLS e Zetasizer deve-se ao fato que este último, apesar de também utilizar espalhamento de luz, não é capaz de medir a dependência angular. Operando em um único ângulo $\theta = 173^\circ$, o Zetasizer utiliza uma aproximação conhecida como “backscattering”,²⁴ que é parcialmente válida para sistemas monodispersos e, em sistemas polidispersos, tende a superestimar o valor do raio hidrodinâmico, dada a maior contribuição de partículas grandes na intensidade de espalhamento neste ângulo.²⁵

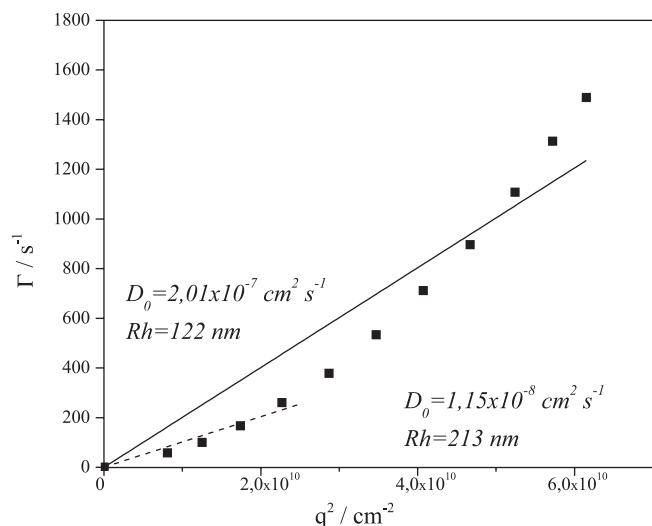


Figura 5. Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do DLS da amostra A2. O valor de raio hidrodinâmico R_h e o coeficiente de difusão D_0 estão inseridos na figura

Estudo da estabilidade cinética das suspensões coloidais

Acompanhamos o efeito de armazenamento no tamanho e na polidispersidade das nanopartículas. Estes valores – na presença de 0.5% de Tween 80 e $I = 1 \text{ mmol L}^{-1}$ – são apresentados, em diferentes intervalos de tempo de armazenamento, na Figura 6. É possível ver que durante a estocagem houve um aumento sistemático do diâmetro médio das nanopartículas, para todas as composições investigadas.

Observamos também que houve um aumento do tamanho médio das partículas quase linear com o tempo de estocagem até as medidas efetuadas no 64º dia. Para todos os sistemas, entretanto, observamos uma ligeira diminuição no tamanho nas medidas feitas no 122º dia. Acreditamos que o aumento inicial pode ser atribuído a vários processos degradativos da suspensão que levam à floculação e posterior agregação das nanopartículas. Na medida em que as partículas crescem muitas acabam sedimentando e/ou floculando, já que a dispersão browniana não é mais possível. Consequentemente, restam dispersas na fase aquosa apenas as partículas menores, que ainda não sofreram cremagem.

Outra propriedade que investigamos durante o tempo de

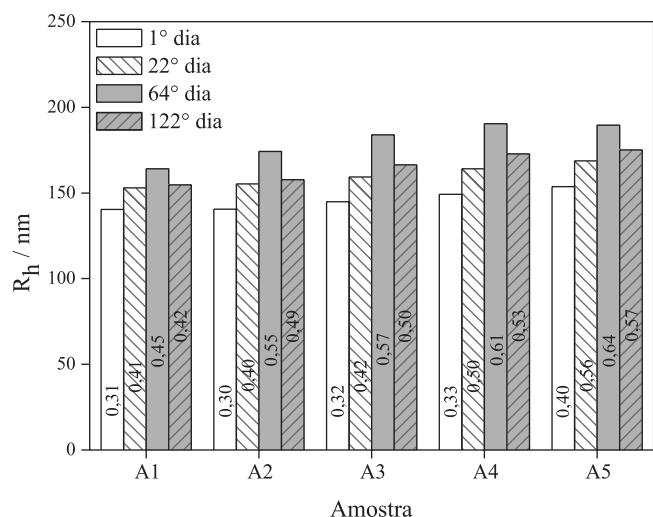


Figura 6. Radio hidrodinâmico aparente e polidispersidade das nanopartículas em função da concentração de SPI e do tempo de estocagem

armazenamento foi o potencial Zeta das dispersões. Como mostra a Tabela 4, ζ foi sempre negativo para todas as nanopartículas, indicando que mesmo com o armazenamento a carga residual das cadeias de SPI presentes na superfície das partículas continuou negativa. Todavia, houve uma intensa diminuição de ζ com o tempo de estocagem das nanopartículas; isto está de acordo com o que foi observado em relação ao tamanho das partículas, isto é, processos de agregação entre as partículas ocorreram, provocando o aumento no tamanho e consequente diminuição do potencial eletrocinético. A contínua neutralização do potencial Zeta reflete a desestabilização das suspensões coloidais, pois baixas forças repulsivas não evitam a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

Tabela 4. Relação entre a razão ρ e a morfologia das partículas (adaptado da referência 22)

Topologia	Razão ρ
Esfera idealmente homogênea	0,779
Vesícula	> 1,0
Polímero envelado	> 1,5

Tabela 5. Potencial Zeta das nanopartículas em função da concentração de SPI e do tempo de estocagem

Amostra	ζ / mV			
	1º dia	22º dia	64º dia	122º dia
A1	-26,6	-22,6	-16,1	-8,5
A2	-27,0	-22,4	-17,3	-7,3
A3	-29,5	-23,6	-17,6	-7,1
A4	-31,4	-23,7	-17,8	-7,9
A5	-32,8	-24,6	-18,3	-8,0

CONCLUSÃO

O método de coacervação foi eficaz no preparo de dispersões coloidais de nanopartículas de SPI com diâmetro médio por volta de 200 nm. A qualidade das partículas e das dispersões foi bastante influenciada pelas variáveis estudadas: o aumento da força iônica na fase aquosa hostil levou à diminuição do potencial Zeta e ao aumento da distribuição de tamanho das partículas; já o aumento da concentração do surfactante causou aumento do tamanho e diminuição da carga das partículas nas formulações com maior concentração de SPI, e em menores concentrações de proteína o efeito do surfactante foi o oposto.

Ao menos na faixa estudada, a concentração de proteína não teve efeito pronunciado no tamanho ou morfologia das partículas. Todavia, as partículas formadas em concentrações mais elevadas de proteína tinham maior potencial Zeta. O estudo de estabilidade cinética das suspensões de nanopartículas de SPI indicou que os processos degradativos ocorrem em pequena escala nos primeiros dois meses de armazenamento; após esse período, processos de desestabilização são refletidos como neutralização do potencial Zeta e diminuição na distribuição de tamanho das nanopartículas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, UFSC, Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) e Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda.

REFERÊNCIAS

1. Akesowan, A.; *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 4586.
2. Jaramillo, D. P.; Roberts, R. F.; Coupland, J. N.; *Food Res. Int.* **2001**, *44*, 911.
3. Cassini, A. S.; Tessaro, I. C.; Marczak, L. D. F.; Pertile, C.; *J. Cleaner Prod.* **2010**, *18*, 260.
4. The Solae Company, <http://www.solae.com.br>, acessada em Fevereiro 2013.
5. Petruccelli, S.; Anon, M. C.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 3035.
6. Fayad, S. J.; Zanetti-Ramos, B. G.; Barreto, P. L. M.; Soldi, V.; Minatti, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1012
7. Teng, Z.; Luo, Y.; Wang, Q.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2712.
8. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Feitas, L. L.; Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
9. Ghormade, V.; Deshpande, M. V.; Paknikar, K. M.; *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 792.
10. Lazko, J.; Popineau, Y.; Legrand, J.; *Colloids Surf., B* **2004**, *37*, 1.
11. Shimokawa, K.; Saegusa, K.; Wada, Y.; Ishii, F.; *Colloids Surf., B* **2013**, *104*, 1.
12. Khaledi, M. G.; Jenkins, S. I.; Liang, S.; *Langmuir* **2013**, *29*, 2458.
13. Züge, L. C. B.; Haminiuk, C. W. I.; Maciel, G. M.; Silveira, J. L. M.; Scheer, A. P.; *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 72.
14. Zou, L.; Akoh, C. C.; *Food Chem.* **2013**, *141*, 2486.
15. Guterres, S. S.; Alves, M. P.; Pohlmann, A. R.; *Drug Target Insights* **2007**, *2*, 147.
16. Mkedder, I.; Travelet, C.; Durand-Terrasson, A.; Halila, S.; Dubreuil, F.; Borsali, R.; *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 934.
17. Cheow, W. S.; Hadinoto, K.; *Colloids Surf., B* **2011**, *85*, 214.
18. Al-Sabagh, A. M.; *Colloids Surf., A* **2002**, *204*, 73.
19. Benítez, E. I.; Genovese, D. B.; Lozano, J. E.; *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 100.
20. Shaw, D. J.; *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, 4th ed., Butterworth-Heinemann: Oxford, 1992.
21. Mao, Y.; Cates, M. E.; Lekkerkerker, H. N. W.; *J. Phys. A* **1995**, *222*, 10.
22. Kim, Y. D.; Nam, S. W.; *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *269*, 205.
23. Ouarti, N.; Viville, P.; Lazzaroni, R.; Minatti, E.; Schappacher, M.; Deffieux, A.; Putaux, J. L.; Borsali, R.; *Langmuir* **2005**, *21*, 9085.
24. Niederquell, A.; Kuentz, M.; *Int. J. Pharm.* **2013**, *446*, 70.
25. Wen, Y. H.; Lin, P. C.; Hua, C. C.; Chen, S. A.; *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 14369.