



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0606909-6 A2**



(22) Data de Depósito: 23/02/2006
(43) Data da Publicação: 09/03/2010
(RPI 2044)

(51) *Int.Cl.:*
A23L 1/0524 (2010.01)
C08L 5/00 (2010.01)

(54) Título: **COMPOSIÇÕES HIDROCOLÓIDE E AQUOSA GELIFICADA OU ESPESADA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, ENCAPSULADO, USO DE PEPTÍDEOS, E, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO HIDROCOLÓIDE**

(30) Prioridade Unionista: 24/02/2005 EP 05075452.2

(73) Titular(es): CSM NEDERLAND B.V.

(72) Inventor(es): FREDDIE VAN DE VELDE

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2006050034 de 23/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/091101 de 31/08/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES HIDROCOLÓIDE E AQUOSA GELIFICADA OU ESPESADA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, ENCAPSULADO, USO DE PEPTÍDEOS, E, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO HIDROCOLÓIDE. De acordo com a presente invenção, as composições hidrocolóides são fornecidas compreendendo polissacarídeos aniônicos, assim como uma quantidade de material peptídico. Estas composições hidrocolóides podem ser adequadamente usadas para gelificar e/ou viscosificar sistemas aquosos. Interações entre ditos polissacarídeos aniônicos e ditos peptídeos em sistemas aquosos resultam em redes de polímeros reticulados. De acordo com a presente invenção os peptídeos são tipicamente obtidos hidrolisando-se composições proteicas e opcional e subsequentemente isolando-se ou purificando uma fração catiônica delas. O uso dos presentes sistemas aquosos gelificados e/ou viscosificados em, por exemplo, produtos alimentícios, bebidas, encapsulados e composições farmacêuticas e/ou cosméticas é descrito aqui.

“COMPOSIÇÕES HIDROCOLÓIDE E AQUOSA GELIFICADA OU ESPESSADA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, ENCAPSULADO, USO DE PEPTÍDEOS, E, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO HIDROCOLÓIDE”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de gelificação e/ou viscosificação de composições hidrocolóides. Mais em particular, refere-se ao uso de materiais peptídicos como agentes de reticulação, para gelificar e/ou viscosificar composições polissacarídicas aniônicas aquosas. Assim, as
10 composições hidrocolóides compreendendo polissacarídeos aniônicos, tais como uma quantidade de material peptídico, são fornecidas pela presente invenção, assim como sistemas aquosos gelificados e/ou viscosificados, incluindo, por exemplo, produtos alimentícios compreendendo ditas composições hidrocolóides.

15 FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

Para aplicação de hidrocolóides, tais como proteínas e polissacarídeos, nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, as interações entre as moléculas hidrocolóides são da maior relevância. Muitos hidrocolóides são capazes de viscosificar sistemas aquosos e/ou formar
20 hidrogéis. Hidrogéis são redes de hidrocolóides contendo água, mostrando comportamento semelhante a sólido com resistência característica, dependente de sua concentração e dependente da dureza e da fragilidade da estrutura do(s) hidrocolóide(s) presente(s).

Em sua definição mais geral, um gel é descrito como uma
25 mistura de pelo menos dois componentes, um dos quais é um líquido, presentes em uma quantidade substancial. Além disso, os géis apresentam um comportamento de sólido ou semelhante a sólido. A fim de expor este comportamento de sólido ou semelhante a sólido, o menor componente tem que formar uma rede tridimensional de enchimento de espaço. Por causa da

coexistência desta estrutura de rede dentro de uma fase líquida, um gel comporta-se como um sólido elástico em baixos valores de tensão, porém acima de uma tensão de deformação finita eles transformam-se em um líquido viscoso.

5 Os hidrogéis são tipicamente preparados por dispersão e hidratação de hidrocolóides, opcionalmente aquecendo e esfriando. Subseqüentemente os hidrocolóides formam uma rede tridimensional de polímeros com substâncias químicas ou físicas reticuladas entre várias cadeias poliméricas, resultando em um hidrogel macroscópico. Tais reticulados entre
10 as cadeias poliméricas podem ser quaisquer interações químicas ou físicas, incluindo ligação covalente, ligação iônica, ligação de hidrogênio, associações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo e interações Van der Waals. Portanto, os géis podem ser divididos em dois grupos, dependendo dos tipos de interações que possuam a estrutura de rede juntas.

15 Géis químicos são formados através de reticulado covalente de soluções diluídas de polímeros ou óxidos inorgânicos e, por causa da natureza covalente da rede, sua formação é termicamente irreversível. Um exemplo de reticulado covalente de ácidos policarboxílicos pode ser encontrado em FR 2 752 843. Em dito documento, um agente de reticulação, compreendendo pelo
20 menos dois grupos amina, por exemplo, polilisina ou poliornitina, é usado. O processo compreende combinar os ácidos policarboxílicos, um agente ativador e o agente de reticulação sob tais condições que ligações covalentes entre os ácidos policarboxílico e o agente de reticulação sejam formadas. Os co-polímeros reticulados assim formados são insolúveis em sistemas aquosos
25 e são obtidos como um precipitado. A formação de um gel (químico) usando-se estes co-polímeros reticulados não está descrita na FR 2 752 843.

Em géis físicos, as subunidades constituindo a estrutura de rede são mantidas juntas por interações não covalentes. Muitos géis formados por polímeros, proteínas, tensoativos, pequenas moléculas orgânicas e até

argilas minerais, pertencem a esta classe.

Em geral, a formação de géis físicos, baseados em polissacarídeos aniônicos, baseia-se em agentes de reticulação catiônicos, para reticular as cadeias tendo grupos funcionais aniônicos tais como $-\text{SO}_3$ e $-\text{COOH}$, em uma rede.

A maioria comumente usada de agentes de reticulação incluem íons metálicos mono- ou multivalente. Para a maioria dos tipos de polissacarídeos aniônicos, os cátions divalentes são mais eficazes em promover gelificação, enquanto que outros tipos são mais eficazmente gelificados usando-se cátions metálicos monovalentes. Os cátions metálicos trivalentes são com freqüência constatados causarem precipitação. Tanto a resistência do gel como a temperatura de fusão aumentam com o aumento da concentração do cátion metálico.

O uso de compostos poliméricos orgânicos, tendo um ou mais resíduos catiônicos, para polissacarídeos aniônicos reticulados, foi descrito. Na US 4.996.150 os sistemas de biocatalisadores encapsulados em contas consistindo de polissacarídeo aniônico e polímero catiônico são descritos. O polímero catiônico pode ser qualquer polialcano amina e/ou polialcano imina.

A US 4.138.292 descreve microorganismos e enzimas imobilizantes em uma matriz de gel obtida contatando-se uma solução aquosa de um polissacarídeo sulfatado com íons amônio, um íon metálico, uma amina solúvel em água ou um solvente orgânico miscível em água. De acordo com este documento, exemplos representativos de tais polissacarídeos incluem carragenano, furcellarano e sulfato de celulose. Aminas orgânicas adequadas para gelificar ou solidificar o polissacarídeo incluem alquilenodiaminas de 1-20 átomos de carbono, hidroxamatos, hidrazidas alquil-ésteres ou amidas de ácidos amino básicos, peptídeos e polialquilenos iminas. Exemplos apropriados de peptídeos que podem ser empregados de acordo com a US 4.138.292 compreendem lisil-lisina, histidil-lisina, histidil-

arginina, histidil-arginil-lisina e polilisina.

As propriedades específicas de um hidrogel, isto é, com respeito à viscosidade, elasticidade, dureza, aparência, etc., são afetadas por vários fatores, incluindo a escolha do polissacarídeo, a escolha de agente de reticulação, pH, teores de sólidos, etc. Também a necessidade de controlar a taxa de gelificação é bem reconhecida afetar, por exemplo, a resistência mecânica e o tamanho de poro do gel obtido. Para muitas aplicações, tais como em formulações biomédicas, farmacêuticas, alimentícias e cosméticas, a necessária/preferida taxa de gelificação situa-se dentro de parâmetros relativamente estreitos. Fatores que foram relatados controlar a taxa de gelificação incluem, por exemplo, a solubilidade dos compostos contendo cátion; concentração de cátion; mistura/relação de compostos contendo cátion; concentração de polímeros; temperatura de gelificação; aplicação de cisalhamento, etc.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores, como resultado de extensiva pesquisa e experimentação, verificaram que as composições aquosas compreendendo polissacarídeos aniônicos podem ser adequadamente gelificadas e ou espessadas usando-se peptídeos reticulados. Mais particularmente, são providas composições hidrocolóides compreendendo um polissacarídeo aniônico e peptídeos, em que ditos peptídeos são tipicamente obtidos hidrolisando-se as composições proteicas e opcional e subseqüentemente isolando-se ou purificando-se uma fração catiônica delas. Além disso, o uso dos sistemas hidrocolóides presentes como um agente espessante e/ou gelificante é descrito.

As composições compreendendo polissacarídeos e proteínas por microencapsulação de materiais particulados por coacervação complexa são bem conhecidas na técnica da química de colóides. Em geral a coacervação refere-se ao fenômeno de separação de fase de dispersões

coloidais em duas fases líquidas, isto é, uma fase pobre em polímeros (colóides) e rica em solvente e uma fase compreendendo gotículas de coacervado concentradas em polímeros. A coacervação de colóides pode ser realizada por numerosas maneiras, incluindo mudança da temperatura ou do pH ou pela adição de um segundo composto polimérico. Tipicamente, a tendência de ocorrer formação de complexo polimérico e separação de fase aumenta com a densidade de carga dos polímeros e peso molecular (MW) do polímero. Um aumento de MW do polímero reduz a densidade de carga requerida para coacervação.

A preparação de medicamentos distribuídos em microcápsulas pela formação de complexo de poli(L-lisina) e alginato ou carragenano foi descrita por Thu et al (“Alginate polycation microcapsules I. Interaction between alginate and polycation”, *Biomaterials*, 17 (1996), 1031-1040) e Girod et al (“Polyelectrolyte complex formation between iota-carrageenan and poly(L-lysine) in dilute aqueous solutions: a spectroscopic and conformational study”, *Carbohydrate Polymers* 55 (2004) 37-45) respectivamente. Em seu trabalho Girod et al estudou a interação entre poli-lisina (PLL) e iota-carragenano no domínio de concentrações, onde os complexos formados são solúveis. Estudos em sistemas de separação de fase, compreendendo PLL e iota-carragenano, especialmente considerando o efeito de parâmetros, tais como pH, força iônica, densidades cargas e peso molecular na medida da separação de fase, foram descritos anteriormente.

A formação complexa de hidrolisados de caseína com pectina de beterraba e/ou amido de baixa sacarificação foi descrita por Tokaev et al (“Study of complex formation by food proteins by gel filtration and ultracentrifugation”, *FSTA base de dados* 89-1-10-a0021; IFIS (1987)). Mais particularmente Tokaev et al. estudaram a formação destes complexos solúveis, usados utilizando-se filtragem gel, assim como a estabilidade de emulsões compreendendo-as por análises de sedimentação. Visto que os

complexos formados podem ser separados por filtragem gel, inevitavelmente eles existem como elementos distintos (ou coacervados) dentro do sistema aquoso. De acordo com Tokaev et al. a caseína hidrolisada contém 20-25 kDa de fragmentos peptídicos.

5 Os sistemas descritos por Girod et al. e Tokaev et al. não podem formar géis. Espessantes e/ou gelificantes das composições hidrocolóides presentes em sistemas aquosos não envolvem fase de separação macroscópica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 Assim, a presente invenção, em um primeiro aspecto, refere-se a composições hidrocolóides gelificantes e/ou espessantes compreendendo, com base no peso seco de ditas composições, 1-95 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 1-95 % em peso de peptídeos reticulados, tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, em que ditos peptídeos
15 compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5-40 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendidos nos peptídeos.

Os termos “espessado”, e “espessamento”, como aqui usados, referem-se à aumentada viscosidade de um sistema ou composição aquoso e
20 ao aumento da viscosidade (ou viscosificação) das composições aquosas, respectivamente. Por isso estes termos são usados aqui intercambiavelmente com os termos “viscosificado” e “viscosificação” respectivamente.

A expressão “polissacarídeo aniônico”, como aqui usada, refere-se a qualquer tipo de polissacarídeo compreendendo grupos funcionais
25 que possam carregar uma ou mais cargas negativas em sistemas aquosos, por exemplo, grupos carboxila, grupos fosfato e/ou grupos sulfato. Os polissacarídeos aniônicos podem ser derivados de quaisquer fontes e/ou podem ser obtidos por modificação, por exemplo, derivatização de um polissacarídeo. Preferivelmente os polissacarídeos aniônicos de acordo com a

presente invenção são selecionados do grupo compreendendo carragenanos, alginatos, ágar, pectinas, pectinas modificadas, goma gelana, goma xantana, furcellarano, derivados de celulose, particularmente carboximetil celulose (CMC) e sulfato de celulose, sulfato de dextrano, amidos modificados, exopolissacarídeos e suas misturas.

De acordo com outra forma de realização a presente composição compreende polissacarídeos aniônicos contendo em média não mais do que 1,5 dos acima mencionados grupos funcionais (aniônico) por monossacarídeo, mais preferivelmente não mais do que 1,0.

O presente inventor verificou que qualquer polissacarídeo aniônico, que possa ser usado para viscosificar e/ou gelificar sistemas aquosos, na presença de cátions metálicos, pode adequadamente também sê-lo na presença de peptídeos reticulados de acordo com a presente invenção. Portanto, de acordo com uma mesma mais preferida forma de realização, a presente composição hidrocolóide gelificante e/ou espessante, compreendendo polissacarídeo aniônico, é selecionada de carragenanos, CMC, pectinas, goma xantana, goma gelana, ágar ágar e suas misturas, ainda mais preferivelmente de carragenanos, CMC, goma xantana, goma gelana, ágar ágar e suas misturas.

De acordo com uma mais preferida forma de realização, uma composição hidrocolóide gelificante é fornecida em que o polissacarídeo aniônico é selecionado de κ -carragenano, ι -carragenano, carragenano κ/ι -híbrida, goma gelana e suas misturas.

Geralmente é sabido que sistemas compostos de mais do que um polissacarídeo exibem uma incomparável complexidade de propriedades não aditivas, que resultam em eficiência de espessamento, ou reologias híbridas e texturas com vantagens sensoriais e de processamento. Por isso, a composição hidrocolóide pode adequadamente compreender misturas dos polissacarídeos aniônicos acima mencionados e polissacarídeos catiônicos ou

não iônicos.

A composição hidrocolóide fornecida pela presente invenção compreende pelo menos 1 % em peso de polissacarídeos aniônicos, com base no peso seco de dita composição, até mais preferivelmente pelo menos 5 %
5 em peso, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 % em peso e muitíssimo preferivelmente pelo menos 25 % em peso. Preferivelmente a quantidade dos polissacarídeos aniônicos não excede, com base no peso seco da composição, 95 %, mesmo mais preferivelmente não excede 90 % em peso, mais preferivelmente não excede 75% em peso.

10 Como mencionado aqui acima, a presente composição hidrocolóide compreende 1-95 % em peso de peptídeos reticulados tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, ditos peptídeos compreendendo uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5-40 % em mol. De acordo com uma forma preferida de realização, ditos
15 peptídeos são obtidos hidrolisando-se uma composição proteica, opcionalmente seguida por isolamento de uma fração catiônica dela. Composições proteicas originadas de qualquer fonte adequada podem ser usadas de acordo com a presente invenção.

Portanto, de acordo com uma particularmente preferida forma
20 de realização, os presentes peptídeos reticulados são compreendidos em uma composição proteica hidrolisada ou em uma fração catiônica isolada dela, em que dita composição proteica compreende uma ou mais proteínas selecionadas de proteínas de cereais, proteínas de clara de ovo, proteínas do leite, incluindo caseínas e, proteínas do soro do leite, proteínas de soja,
25 proteínas de ervilha, proteínas de batata, proteínas de milho, gelatinas e suas misturas.

As proteínas acima mencionadas podem ser hidrolisadas em qualquer meio conhecido pelo profissional qualificado, que usualmente inclui tratamento enzimático, por exemplo, com tripsina ou pepsina, ou hidrolização

química, por exemplo, usando-se ácido clorídrico, seguido por neutralização com hidróxido. De acordo com a presente invenção, é particularmente preferido hidrolisar enzimaticamente a composição proteica, muitíssimo preferivelmente usando-se pepsina. Esta enzima é sabido gerar fragmentos catiônicos adequados de proteínas, tais como caseínas e lactoferrina.

De acordo com a presente invenção, é essencial que a proteína não seja completamente hidrolisada, isto é, em aminoácidos livres. Como mencionado aqui acima, os peptídeos têm uma massa molecular dentro de uma faixa de 0,3-12 kDa, em uma mesmo mais preferida forma de realização, dita massa molecular estando dentro da faixa de 0,5-10 kDa. Em uma mais preferida forma de realização, dita massa molecular está dentro da faixa de 0,5-8,0 kDa.

Ao contrário de quaisquer descrições da técnica anterior relativas ao uso de peptídeos sintéticos para gelificar polissacarídeos aniônicos, os presentes peptídeos de reticulação não compreendem unicamente resíduos aminoácidos tendo uma cadeia lateral catiônica. Mais especificamente, os presentes peptídeos reticulados compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina de 2,5 - 40 % em mol, baseados em uma quantidade total de resíduos aminoácidos compreendendo ditos peptídeos, preferivelmente dita quantidade na faixa de 2,5 - 25 % em mol, mais preferivelmente de 5 - 25 % em mol, muitíssimo preferivelmente de 10 - 25 % em mol.

Visto que os presentes peptídeos reticulados são tipicamente obtidos hidrolisando-se uma composição proteica, ditos peptídeos reticulados tipicamente não compreendem quaisquer outros resíduos aminoácidos, a não ser aqueles que possam ser codificados pelas seqüências de ácidos nucleicos da natureza, isto é, outros exceto aqueles selecionados de Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr e Val. Assim, de acordo com uma particularmente preferida forma de realização, os

presentes peptídeos reticulados compreendem pelo menos 90 % em mol, mais preferivelmente pelo menos 95 % em mol, ainda mais preferivelmente pelo menos 98 % em mol, muitíssimo preferivelmente pelo menos 99 % em mol de resíduos aminoácidos que podem ser codificados por uma ou mais seqüências de ácidos nucleicos.

A composição hidrocolóide pode compreender outros materiais protéicos, além de 1-95 % em peso de peptídeos reticulados definidos acima. O termo 'materiais protéicos' como usado aqui, refere-se a qualquer tipo de material compreendendo proteínas, peptídeos e/ou aminoácidos livres.

Tipicamente, em vez de empregar um hidrolisado de proteína compreendendo o presente peptídeo como tal, uma fração catiônica de uma proteína hidrolisada pode ser usada de acordo com a presente invenção. Dita fração pode ser purificada ou isolada do hidrolisado usando-se qualquer método convencional conhecido do profissional qualificado. O termo 'fração catiônica' como aqui usado, refere-se a uma fração caracterizada por um conteúdo relativamente alto, em comparação ao material de partida, de resíduos aminoácidos tendo cadeias laterais catiônicas, isto é, histidina, arginina e lisina. Tipicamente, as presentes frações catiônicas de proteínas hidrolisadas compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 10 - 25 % em mol. Métodos adequados de purificar ou isolar uma fração catiônica incluem cromatografia preparativa de troca de íons, filtração de eletro membrana, eletrodialise.

A composição hidrocolóide fornecida pela presente invenção compreende, com base no peso seco de dita composição, pelo menos 1,0 % em peso, preferivelmente pelo menos, 5,0 % em peso dos peptídeos reticulados, como definido acima, até mais preferivelmente pelo menos 10 % em peso, muitíssimo preferivelmente pelo menos 25 % em peso. Preferivelmente, a quantidade de ditos peptídeos reticulados não excede 95 %

em peso, baseados no peso seco da composição, mesmo mais preferivelmente não excede 90 % em peso, muitíssimo preferivelmente não excede 75 % em peso.

De acordo com a presente invenção os polissacarídeos aniônicos e os peptídeos reticulados são empregados em uma relação em peso variando de 1,0:15,0 a 15,0:1,0, mais preferivelmente de 1,0:10,0 a 10,0:1,0, ainda mais preferivelmente de 1,0:5,0 a 5,0:1,0.

Outra forma preferida de realização da presente invenção, refere-se a uma composição hidrocolóide como definida aqui antes, em que a relação em peso de ditos polissacarídeos aniônicos e ditos peptídeos é escolhida, de modo que a composição compreenda lisina, histidina e arginina em uma quantidade de 0,01-75 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos, muitíssimo preferivelmente em uma quantidade de 0,1-25 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos, muitíssimo preferivelmente 1-20 mmol por grama de ditos polissacarídeos.

De acordo com uma forma particularmente preferida de realização, as presentes composições hidrocolóides não compreendem quaisquer agentes de acoplamento, tais como aqueles tradicionalmente usados na síntese de peptídeos. Mais particularmente, as composições hidrocolóides da invenção não compreendem quaisquer carbodiimidas, derivadas de quinolina e/ou misturas de anidridos, tal como cloroformatos.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um processo de preparação de uma composição hidrocolóide, esse processo compreende hidrolisar uma composição proteica a um tal grau que peptídeos tendo uma massa molecular média dentro da faixa de 0,3-12 kDa sejam obtidos, tipicamente em um grau de hidrólise (DH) entre 5-40 %, e combinando-se dita composição proteica hidrolisada com polissacarídeos aniônicos em uma relação variando de 1,0:15,0 a 15,0:1,0. O termo “grau de hidrólise” (DH) refere-se à porcentagem de ligações peptídicas separadas. O método para

determinar DH é o método de colorimetria TNBS descrito em Adler-Nissen, J., "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", J. Agric. Food Chem., Vol. 27, No. 6, 1979, pg. 1256-62. Quanto mais uma proteína é hidrolisada (mais elevado DH), menor o peso molecular médio; o perfil peptídico muda conseqüentemente. Preferivelmente o grau de hidrólise é entre 7-30 % em mol. Como mencionado aqui antes, é preferido que dita composição proteica seja hidrolisada enzimaticamente, muitíssimo preferivelmente usando-se pepsina. As condições e o tempo de incubação necessário para o grau desejado de hidrólise pode ser facilmente determinado pela pessoa qualificada.

De acordo com uma preferida forma de realização dito processo ainda compreende isolar uma fração catiônica da proteína hidrolisada e combinar dita fração com os presentes polissacarídeos aniônicos.

Ainda outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição hidrocolóide obtenível pelo processo aqui descrito acima.

Visto que, de acordo com a presente invenção, os polímeros de polissacarídeos aniônicos são reticulados por peptídeos, a presente composição hidrocolóide é caracterizada pelo fato de poder ser empregada usando-se baixas concentrações de sais. Portanto, de acordo com uma forma preferida de realização a composição compreende não mais do que 10 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos de cátions metálicos selecionados de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , mais preferivelmente não mais do que 6 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos.

De acordo com a presente invenção, as composições aquosas gelificadas ou espessadas são fornecidas compreendendo a presente composição hidrocolóide. Mais particularmente, um aspecto da invenção refere-se a composições aquosas gelificadas ou espessadas, baseadas no peso

total da composição, 0,01-10 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 0,01-40 % em peso de peptídeos reticulados, tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, em que ditos peptídeos compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5-40 % em mol, com base na
5 quantidade total de resíduos aminoácidos compreendidos em ditos peptídeos.

De acordo com uma forma preferida de realização, os presentes sistemas aquosos gelificados ou espessados são preparados combinando-se a composição hidrocolóide com dito sistema aquoso. Preferivelmente, o pH do sistema aquoso varia de 3,0 - 8,5, mais
10 preferivelmente de 4,0 - 8,0, muitíssimo preferivelmente 4,0 - 7,0. O sistema aquoso pode ser aquecido e/ou forças de cisalhamento podem ser aplicadas nele quando adicionando-se a composição hidrocolóide, a fim de melhorar a hidratação dos polissacarídeos aniônicos. Se a dispersão aquosa da composição hidrocolóide for permitida esfriar e/ou se a força de cisalhamento
15 não for mais aplicada, o sistema aquoso começará a viscosificar ou solidificar.

As presentes composições hidrocolóides podem adequadamente ser utilizadas para incorporação em vários tipos de gêneros alimentícios para fornecer textura, estrutura, viscosidade, elasticidade e/ou estabilidade. Portanto, outro aspecto da presente invenção refere-se a um
20 gênero alimentício compreendendo, com base no peso total do alimento, 0,01-95 % em peso de uma composição hidrocolóide aquosa gelificada ou espessada, como definido aqui anteriormente. Tipicamente o gênero alimentício é contínuo em água. Exemplos adequados incluem sobremesas, recheios, sorvetes e bebidas.

25 Visto que, de acordo com a presente invenção, as composições gelificadas ou espessadas são adequadamente preparadas sem a adição de cátions metálicos, ditos hidrogéis podem vantajosamente ser empregados em gêneros alimentícios pouco salgados, isto é, gêneros alimentícios compreendendo pouco ou nenhum NaCl, tais como aqueles tipicamente

empregados em dietas usadas por pessoas que sofrem de insuficiência cardíaca, enfraquecimento da função do fígado, pressão sanguínea alta, doença de rins crônica e aguda, etc. Assim, uma particularmente preferida forma de realização da invenção refere-se a gêneros alimentícios compreendendo a presente composição hidrocolóide aquosa, dito gênero alimentício compreendendo não mais do que 30 mM, preferivelmente não mais do que 15 mM de cátions metálicos selecionados de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

As presentes composições hidrocolóides podem ser adequadamente usadas para imobilizar enzimas e/ou microorganismos que são usados para catalisar várias conversões, aprisionando-os dentro de uma matriz de gel. Alternativamente, a presente composição hidrocolóide pode ser usada para preparar microcápsulas compreendendo agentes terapêuticos e/ou diagnósticos, por exemplo, para controlada liberação de medicamento. Portanto, outro aspecto da presente invenção refere-se a um encapsulado compreendendo um ingrediente ativo contido em uma matriz compreendendo 0,5 - 95 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 0,5 - 95 % em peso de peptídeos tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, em que ditos peptídeos compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5 - 40 % em mol, baseados na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendida em ditos peptídeos. Ingredientes ativos que podem vantajosamente ser encapsulados em uma matriz de acordo com a presente invenção incluem medicamentos, vacinas, enzimas, hormônios, oligonucleotídeos, vitaminas, etc.

Em ainda uma forma de realização alternativa, a presente composição hidrocolóide aquosa pode ser usada para preparar uma composição cosmética ou uma composição terapêutica para aplicação tópica de pele. Portanto, ainda outro aspecto da presente invenção refere-se a composições hidrocolóides aquosas como definido aqui antes,

compreendendo um agente terapêutico ou cosmético.

Outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso de peptídeos tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa e compreendendo uma quantidade total de lisina, histidina e arginina 2,5-40 %
5 em mol, baseados na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendido nos peptídeos, como definido aqui antes, para melhorar as características gelificantes e viscosificantes de polissacarídeos aniônicos.

A invenção é ainda ilustrada nos seguintes exemplos, que não são destinados a serem de maneira alguma limitantes do escopo da invenção
10 como reivindicada.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Uma proteína hidrolisada comercialmente disponível, Hyfoama 66 (ex Quest B.V. Naarden, the Netherlands), foi adicionada a
15 soluções aquosas de ι-carragenano (0,5 % p/v) em diferentes valores de pH (pH 5,8, pH 7,0 e pH 8,0) em uma quantidade de 25 mg/ml. As características (isto é, a distribuição do peso molecular dos fragmentos e a quantidade (% em mol) de histidina, arginina e lisina compreendida no hidrolisado) da Hyfoama 66 foram determinadas em um outro
20 experimento. Estes resultados são apresentados no exemplo 2. A Hyfoama 66 foi dissolvida nas soluções de carragenano por aquecimento a 60 °C. A formação de gel em tubos Eppendorf (2 ml) à temperatura ambiente foi visualmente verificada.

Foi observado que ι-carragenano forma géis de Hyfoama 66 de
25 concentrações de 25 mg/ml em pH 5,8 e pH 7,0 e pH 8,0.

Exemplo 2

As frações catiônicas foram preparadas de 4 proteínas hidrolisadas, Hyfoama 66, caseinato de sódio, lactoferrina e proteína de clara do ovo (EWP). O efeito das frações peptídicas sob gelificação de

carragenano foi testado. Além disso, as frações peptídicas catiônicas foram analisadas em composição de aminoácido e em distribuição de peso molecular por GPC.

10 gramas de caseinato de sódio e EWP e lactoferrina foram
5 hidrolisados com pepsina (5 % em proteína, pH 3) por incubação por 4 horas a 37 °C. A pepsina foi inativada ajustando-se o pH a 7,0. A diálise (MWCO 100) dos hidrolisados foi realizada antes da isolamento cromatográfica da fração catiônica e após a isolamento desta fração. A diálise foi continuada até a condutividade [$\mu\text{S}/\text{cm}$] alcançar um valor estável. Os hidrolisados
10 dessalinizados e suas frações catiônicas foram congelados e liofilizados. Os três hidrolisados dessalinizados preparados recentemente e Hyfoama 66 foram fracionados. Os hidrolisados dessalinizados foram dissolvidos em tampão de Na-acetato 50mM pH 4,5. O material não solúvel foi removido por centrifugação e filtração (0,45 μm) e o filtrado foi empregado em uma coluna
15 guarnecida com HiTrap SP (Amersham) pelo uso do sistema cromatográfico Akta (Amersham). Após a lavagem da coluna com o mesmo tampão, a fração catiônica foi diluída com tampão de Na-acetato 50 mM pH 4,5 contendo 1 M NaCl.

A distribuição de peso molecular foi determinada pelo uso de
20 cromatografia de exclusão de tamanho (método de pesquisa de alimento NIZO: Visser et al in Journal of Chromatography 599 (1992) 205-209). Com o uso de proteínas marcadoras com conhecidas massas moleculares, os tempos de eluição correspondentes com fragmentos de proteínas tendo massas moleculares de 5 e 10 kDa foram determinados. Estes tempos de eluição
25 foram usados para dividir os fragmentos em três classes, > 10 kDa, entre 10 e 5 kDa e <5 kDa. A tabela 1 mostra a distribuição nestas três classes dos diferentes hidrolisados e suas frações catiônicas. As frações catiônicas obtidas dos hidrolisados foram todas enriquecidas em fragmentos tendo uma massa molecular > 5 kDa.

Tabela 1: Distribuição de massa molecular de hidrolisados e suas frações catiônicas.

Amostra	Área (% de área total)		
	Área>10 kDa	10 kDa>área>5 kDa	Área<5 kDa
Hidrolisados de caseinato de sódio	26	18	56
Hidrolisados de lactoferrina	33	18	49
Hidrolisados de EWP	48	13	39
Hyfoama 66	39	21	40
Fração catiônica de caseinato de sódio	18	38	44
Fração catiônica de lactoferrina	39	28	33
Fração catiônica de EWP	53	18	28
Fração catiônica de Hyfoama 66	57	22	22

A determinação da composição de aminoácido em hidrolisados e sua fração catiônica foi realizada por Ansynth service B.V. de acordo com o método de hidrólise ácida. Os amino ácidos catiônicos percentuais (Lis, His e Arg) nos hidrolisados e as suas frações catiônicas são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Amino ácidos catiônicos em percentagem em mol nas diferentes origens proteicas e nas suas frações catiônicas.

Amostra	% em mol de Lis-His-Arg/total	
	Proteína	Fração catiônica
Hyfoama	5,3	10,4
NaCas	11,7	18,9
Kip-eiwit	12,3	17,1
Lactoferrina	15,9	18,8

O efeito das frações catiônicas preparadas no comportamento de gelificação de polissacarídeos aniônicos foi avaliado com capa e iota carragenano. A formação de gel em tubos Eppendorf (2 ml) à temperatura ambiente foi verificada visualmente, por decantação. Na tabela 3 são fornecidos os resultados da avaliação do efeito de peptídeos catiônicos na gelificação de carragenanos. Com a faixa de concentração aplicada em todos os casos, a gelificação pôde ser observada como resultado da adição das frações catiônicas. Dependendo da concentração da fração catiônica, foi encontrada diferença nas características do gel,. Diferenças na aparência foram encontradas. As frações catiônicas derivadas de EWP e lactoferrina provocaram a formação de um gel turvo, enquanto que as frações catiônicas de Hyfoama 66 e caseinato de sódio resultam em géis transparentes.

Tabela 3: Efeito de diferentes frações peptídicas catiônicas no comportamento de gelificação da carragenano capa e carragenano iota (0,5 % (p/v)).

Fração catiônica	Concentração da fração catiônica [mg]/[ml] em carragenano capa 0,5 %		
	10	25	Observações
Hyfoama	+	+/-	Transparente
Na-Cas	+	-	Transparente
EWP	+	++	Turvo
Lactoferrina	++	++	Turva

Fração catiônica	Concentração da fração peptídica catiônica [mg]/[ml] em carragenano iota 0,5 %		
	10	25	Observações
Hyfoama	+	+	Transparente
Na-Cas	+	+	Transparente
EWP	+	+	Turvo
Lactoferrina	+	+	Turva

Contagem:

- nenhuma gelificação
- +/- gelificação fraca/precipitação
- + gel fraco
- ++ gel forte

Exemplo 3

Uma fração catiônica de lactoferrina foi aplicada para avaliar o efeito em outros polissacarídeos aniônicos. Uma série de cinco preparações de polissacarídeo aniônico foi avaliada. A formação de gel em tubos Eppendorf (2 ml) à temperatura ambiente foi checada visualmente. Os resultados são mostrados na Tabela 4. Foi observado que a gelificação de carragenano ι/κ -híbrida, goma xantana e gelana pode ser induzida pela adição da fração peptídica catiônica dos hidrolisados de lactoferrina.

Tabela 4: Efeito da fração peptídica catiônica de lactoferrina no comportamento de gelificação de diferentes polissacarídeos aniônicos (0,5 % (w/v)).

Polissacarídeo	10 mg/ml	50 mg/ml	Observações
1. Carragenano ι/κ -híbrida	V	+	Gel fraco turvo
2. Xantana	V	+V	Aumento de viscosidade
3. Pectina LM	-	V	
4. Goma gelana	++	++	Gel transparente
5. Ágar-Ágar	Partículas de gel	Partículas de gel	

- nenhuma gelificação
- +/- gelificação fraca/precipitação
- + gel fraco
- ++ gel forte
- V aumento de viscosidade

Exemplo 4

Proteínas intactas e preparadas sinteticamente de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países baixos) foram aplicadas para avaliar seu efeito em κ -, ι - e λ -carragenano (0,5 % (p/p)). O comportamento destas misturas foi inspecionado visualmente em tubos Eppendorf (1,5 ml) à temperatura ambiente. Os resultados são mostrados na Tabela 5. A formação de complexo foi observada em todos os casos. A formação de complexo na mistura da carragenano aniônica e do peptídeo catiônico ou poli-L-lisina resultou na formação de um material na solução turvo, esbranquiçado ou avermelhado no caso do citocromo c.

Tabela 5: Efeito de peptídeos e poli-L-lisina no comportamento de carragenanos (0,5% (w/v)).

Proteína	Carragenano		
	κ	ι	λ
Citocromo c	Formação de complexo	Formação de complexo	Formação de complexo
Lisozima	Formação de complexo	Formação de complexo	Formação de complexo
Poli-L-lisina 13 kDa	Formação de complexo	Formação de complexo	Formação de complexo
Poli-L-lisina 405 kDa	Formação de complexo	Formação de complexo	Formação de complexo

REIVINDICAÇÕES

1. Composição hidrocolóide, caracterizada pelo fato de compreender, com base no peso seco de dita composição, 1-95 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 1-95 % em peso de peptídeos tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, em que ditos peptídeos compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5-40 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendidos nos peptídeos.
2. Composição hidrocolóide de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato do polissacarídeo aniônico ser selecionado de carragenanos, alginatos, ágar, pectinas, pectinas modificadas, goma gelana, goma xantana, furcellarano, derivados de celulose, particularmente carboximetil celulose (CMC) e sulfato de celulose, sulfato de dextrano, amidos modificados, exo-polissacarídeos e suas misturas;
3. Composição hidrocolóide de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato da relação em peso de ditos polissacarídeos aniônicos e ditos peptídeos variar de 1:15 a 15:1.
4. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato da relação em peso de ditos polissacarídeos aniônicos e ditos peptídeos ser escolhida de modo que a composição compreenda lisina, histidina e arginina em uma quantidade de 0,01 – 75 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos.
5. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de compreender não mais do que 10 mmol por grama de polissacarídeos aniônicos de cátions metálicos selecionados de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .
6. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato dos peptídeos terem uma massa molecular dentro da faixa de 0,5 – 8,0 kDa.

7. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato dos peptídeos compreenderem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 5 – 25 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendida em ditos peptídeos.

8. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato do peptídeo estar compreendido em uma composição proteica hidrolisada.

9. Composição hidrocolóide de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato da composição proteica compreender uma ou mais proteínas selecionadas de proteínas de cereais, proteínas de clara de ovo, proteínas do leite, proteínas de soja, proteínas de ervilha, proteínas de batata, proteínas de milho, gelatinas e suas misturas.

10. Composição hidrocolóide de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato do polissacarídeo aniônico ser selecionado de κ -carragenano, ι -carragenano, carragenano ι/κ -híbrida, goma gelana e suas misturas.

11. Composição aquosa gelificada ou espessada, caracterizada pelo fato de compreenderem, com base no peso total da composição, de 0,01 – 10 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 0,01 – 40 % em peso de peptídeos, tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3 – 12 kDa, em que ditos peptídeos compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5 - 40 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendidos nos peptídeos e a relação em peso de polissacarídeos aniônicos e de peptídeos variar de 1:15 a 15:1.

12. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de compreender 0,01 – 95 % em peso, com base no peso total do produto alimentício, de uma composição aquosa gelificada ou espessada como definida na reivindicação 11.

13. Produto alimentício de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato do produto alimentício compreender não mais do que 30 mM de cátions metálicos selecionados de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

5 14. Encapsulado, caracterizado pelo fato de compreender um ingrediente ativo contido em uma matriz compreendendo 0,5 – 95 % em peso de polissacarídeos aniônicos e 0,5 – 95 % em peso de peptídeos, tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3-12 kDa, em que ditos peptídeos compreendem uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5 – 40 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos
10 compreendidos em tais peptídeos.

15 15. Uso de peptídeos tendo uma massa molecular dentro da faixa de 0,3 – 12 kDa e compreendendo uma quantidade total de lisina, histidina e arginina entre 2,5 – 40 % em mol, com base na quantidade total de resíduos aminoácidos compreendidos nos peptídeos, caracterizado pelo fato ser para melhorar as características de gelificação e viscosificação dos polissacarídeos aniônicos.

20 16. Processo de preparação de uma composição hidrocolóide, caracterizado pelo fato de compreender hidrolisar uma composição de proteína a um tal grau que os peptídeos, tendo uma massa molecular média dentro da faixa de 0,3 – 12 kDa, são obtidos combinando-se dita composição proteica hidrolisada com polissacarídeos aniônicos, em uma relação variando de 1,0:15,0 a 15,0:1,0.

17. Composição hidrocolóide, caracterizada pelo fato de ser obténível pelo processo como definido na reivindicação 16.

RESUMO

“COMPOSIÇÕES HIDROCOLÓIDE E AQUOSA GELIFICADA OU
ESPESSADA, PRODUTO ALIMENTÍCIO, ENCAPSULADO, USO DE
PEPTÍDEOS, E, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO
5 HIDROCOLÓIDE”

De acordo com a presente invenção, as composições
hidrocolóides são fornecidas compreendendo polissacarídeos aniônicos, assim
como uma quantidade de material peptídico. Estas composições hidrocolóides
podem ser adequadamente usadas para gelificar e/ou viscosificar sistemas
10 aquosos. Interações entre ditos polissacarídeos aniônicos e ditos peptídeos em
sistemas aquosos resultam em redes de polímeros reticulados. De acordo com
a presente invenção os peptídeos são tipicamente obtidos hidrolisando-se
composições proteicas e opcional e subsequente isolando-se ou
purificando uma fração catiônica delas. O uso dos presentes sistemas aquosos
15 gelificados e/ou viscosificados em, por exemplo, produtos alimentícios,
bebidas, encapsulados e composições farmacêuticas e/ou cosméticas é
descrito aqui.