

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE GOLTZ

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA COM PECTINA E
CARBOXIMETILCELULOSE SEPARADAMENTE POR CALORIMETRIA DE
TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

CURITIBA

2014

CAROLINE GOLTZ

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA COM PECTINA E
CARBOXIMETILCELULOSE SEPARADAMENTE POR CALORIMETRIA DE
TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia
de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr. Luciana Igarashi Mafra.
Co-orientador: Prof.^o Dr. Marcos R. Mafra.

CURITIBA

2014

G629a

Goltz, Caroline

Avaliação da interação da β -lactoglobulina-pectina e carboximetilcelulose separadamente por calorimetria de titulação isotérmica / Caroline Goltz. – Curitiba, 2014.

81f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientador: Luciana Igarashi Mafra -- Coorientador: Marcos R. Mafra.

Bibliografia: p. 72-81.

1. Compostos complexos. 2. Proteínas. 3. Polissacarídeos. 4. Pectina. 5. Calorimetria. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Luciana Igarashi III. Mafra, Marcos R.. IV. Título.

CDD: 546:25

CAROLINE GOLTZ

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA COM
PECTINA E CARBOXIMETILCELULOSE SEPARADAMENTE
POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora:


Prof.^a Dr.^a LUCIANA IGARASHI MAFRA
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. EVERSON ALVES MIRANDA
Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP


Prof. Dr. MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA
Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Curitiba, 14 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e desafios que me foram dados durante a vida, por sempre estar ao meu lado iluminando os meus caminhos e me dando força nos momentos difíceis. Nada foi ao acaso, obrigada Senhor!!!

Aos meus pais, Gilberto e Roseli Goltz, por me terem dado a vida, além de todo o amor e carinho incondicional. Por me motivarem a seguir em frente e por serem exemplos de caráter, transmitindo assim os valores que carregarei para o resto da minha vida. E aos meus irmãos, Germano e Larissa Goltz, pelo companheirismo e pelos momentos vividos juntos.

Aos meus orientadores Dr.^a Luciana Igarashi-Mafra e Dr. Marcos Rogério Mafra por acreditarem em mim, pela orientação e dedicação durante todo o trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Às amigas, Cíntia, Laís e Lizandra, pelo companheirismo e amizade durante os momentos de alegria e de tristeza. Sem vocês o mestrado não seria o mesmo!

Às Técnicas do Laboratório de Análises Térmicas, Andrea e Patrícia, por tamanha paciência, atenção e dedicação durante todo o período do trabalho.

Aos amigos do LATOS, Anderson, Danielle, Elaine, Érika, João, Giovanna, Heron, Thiago e Sheila, por todos os conselhos e pelo companheirismo. Posso dizer que muitas vezes me sinto numa grande família com vocês!

Aos amigos e colegas, Adriano, Aline, Aline F., Ana Paula, Daniele S., Fernanda, Fernanda P., Gerson, Paloma, Priscila, Manoela, Marcelo pelos momentos de descontração nas horas vagas e pelas trocas de conhecimento e auxílio.

Ao meu namorado Rafael, pelo companheirismo, carinho e compreensão em todos os momentos.

Ao Laboratório de Fixação de Nitrogênio - Bioquímica e ao professor Dr. Marco Aurélio, pelo tempo e atenção dedicados, pelo auxílio nas análises e pelas valiosas informações.

Ao Laboratório de Análise de Pectina e à Prof. Dra. Carmem, pelo auxílio e dedicação.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - PPGEAL, Paulo Krainski, pela paciência e auxílio durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela disponibilização dos recursos físicos e financeiros. E, em especial à todos os professores do programa.

A CAPES por conceder a bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e inescrutáveis os seus caminhos! Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.”

Romanos 11:33 e 36

RESUMO

A aplicação de complexos formados a partir de proteínas e polissacarídeos em sistemas alimentares vem sendo amplamente estudada visando o seu emprego em processo de encapsulação de bioativos, estabilização de emulsões, produção de biofilmes, dentre outros. A β -lactoglobulina (BLG) é a proteína mais abundante no soro de leite e apresenta como principal característica a presença de um sítio de ligação na forma de " β -barril", que permite a ligação com pequenas moléculas hidrofóbicas, e de uma superfície externa polar, que possibilita a formação de complexos com macromoléculas hidrofílicas, como no caso dos polissacarídeos. A formação dos complexos proteína-polissacarídeo é dependente de fatores tais como pH, temperatura, concentração e principalmente da estrutura molecular dos constituintes. Este trabalho teve como objetivo estudar as interações moleculares de complexos proteína (BLG) - polissacarídeos (CMC ou pectina) empregando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e a análise de turbidez em diferentes valores de pH (3, 4, 6 e 7), bem como avaliar a influência da presença do β -caroteno na formação dos complexos. Foi também avaliado o efeito do tratamento térmico da BLG visando a sua desnaturação e possíveis alterações nas interações moleculares desta com os polissacarídeos (CMC e pectina). Os resultados das análises de ITC mostraram que há uma maior interação entre os constituintes no pH 3 e 4. No pH 6 as interações foram desprezíveis, assim como no pH 7, devido provavelmente à repulsão eletrostática entre as biomoléculas. As análises de turbidez confirmaram os resultados obtidos por ITC. A presença do β -caroteno reduziu a interação entre os biopolímeros, provavelmente pelo fato de que menos sítios de ligação restaram após a sua incorporação no sistema. O tratamento térmico empregado na BLG não provocou alterações nas interações moleculares medidas por ITC. Portanto, foi possível comprovar a influência do pH na formação dos complexos proteína-polissacarídeo, por meio das técnicas de ITC e turbidimetria, cujo entendimento é fundamental para o seu emprego na indústria.

Palavras-chave: *complexos, β -lactoglobulina, carboximetilcelulose, pectina, calorimetria de titulação isotérmica (ITC).*

ABSTRACT

The use of complexes from proteins and polysaccharides in food systems has been widely studied with a view to its use in the encapsulation of bioactive, stabilizing emulsions, production of biofilm, among other process. β -lactoglobulin (BLG) is the most abundant protein in the whey and presents as main characteristic the presence of a binding site in the form of " β -barrel " which allows connection with small hydrophobic molecules and an external polar surface, which allows the formation of complexes with hydrophilic macromolecules, such as polysaccharides. The formation of protein-polysaccharide complex is dependent on factors such as pH, temperature, concentration and specially the molecular structure of the constituents. In this work we studied the molecular interactions of complexes between protein (BLG) and polysaccharides (pectin or CMC) using isothermal titration calorimetry (ITC) and turbidity analysis at different pH values (3 ,4 ,6 and 7), and finally to evaluate the influence of the presence of β -carotene in the complexes formation. It was also evaluated the effect of thermal treatment of BLG seeking their denaturation and possible changes in this molecular interactions with polysaccharides (CMC and pectin). The results of the analysis of ITC showed that there is more interaction between constituents in pH 3 and 4. At pH 6 interactions were negligible, as in pH 7, probably due the electrostatic repulsion between the biomolecules. The turbidity analysis confirmed the results obtained by ITC. The presence of β -carotene reduced the interaction between biopolymers, probably because fewer binding sites remaining after its incorporation into the system. The heat treatment employed in BLG did not cause changes in molecular interactions measured by ITC. Therefore, it was possible to demonstrate the influence of pH on the formation of polysaccharide-protein complexes, using the techniques of ITC and turbidity, whose understanding is critical to its polar application in the industry.

Key-words: complexes, β -lactoglobulin, carboxymehtyl cellulose, pectin, isothermal titration calorimetry (ITC).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivo	18
1.1.1	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Proteínas	19
2.1.1	Desnaturação	21
2.1.2	Métodos de quantificação de proteínas	22
2.2	Soro de leite	24
2.2.1	β -Lactoglobulina	27
2.2.1.1	β -lactoglobulina: membro da família das lipocalinas	28
2.2.1.2	Comportamento térmico da β -lactoglobulina	29
2.2.1.3	Aplicação industrial da β -lactoglobulina	30
2.3	Polissacarídeos	32
2.3.1	Propriedades dos polissacarídeos	33
2.3.2	Classificação dos polissacarídeos	34
2.3.2.1	Carboximetilcelulose (CMC)	36
2.3.2.2	Pectina	37
2.4	β-caroteno	39
2.5	Complexos de proteínas-polissacarídeos	40
2.6	Análises térmicas	42
2.6.1	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	42
2.6.1.1	Avaliação dos parâmetros termodinâmicos obtidos das análises de ITC	44
2.7	Considerações Finais da Revisão da Literatura	47

3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Material	48
3.2	Métodos	49
3.2.1	Preparo das soluções biopoliméricas.....	49
3.2.2	Determinação da concentração da β -lactoglobulina por espectrofotometria.....	50
3.2.3	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	51
3.2.4	Medidas de turbidez versus pH.....	51
3.2.5	Tratamento térmico	52
3.2.6	Dicroísmo circular.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	Concentração das soluções em função do pH	54
4.2	Avaliação do efeito do pH na formação dos complexos de proteína-polissacarídeo por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	55
4.3	Turbidez	61
4.4	Efeito do tratamento térmico na interação da BLG com a CMC	63
4.5	Dicroísmo circular (CD)	64
4.6	Efeito da presença do β-caroteno na complexação da BLG com os polissacarídeos (CMC ou pectina)	66
5	CONCLUSÃO	70
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA HIERÁRQUICA DAS PROTEÍNAS.....	20
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA DA β -LACTOGLOBULINA.....	27
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPORTAMENTO TÉRMICO PROPOSTO PARA A β -LACTOGLOBULINA EM pH 6,8.....	30
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS HOMOGLICANAS (A E B) E HETEROGLICANAS (C E D), AS QUAIS PODEM SER LINERES (A E C) OU RAMIFICADAS (B E D). NA FIGURA CADA COR REPRESENTA UMA UNIDADE DE MONOSSACARÍDEO.....	35
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DA AMILOSE (A), AMILOPECTINA (B), GLICOGÊNIO (C), CELULOSE (D) E PECTINA (E).	36
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CARBOXIMETILCELULOSE.....	37
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA. NESTE CASO CADA MONÔMERO ESTÁ REPRESENTADO NA FORMA DE ÁCIDO α -1, 4-D-GALACTURÔNICO.	38
FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CAROTENO.	39
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA LIGAÇÃO TÍPICA LIGANTE/RECEPTOR.	42
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.	43
FIGURA 11 – FIGURA ESQUEMÁTICA QUE MOSTRA OS DIFERENTES MECANISMOS DE INTERAÇÃO QUE PODEM SER OBSERVADOS PARA UMA MESMA ENERGIA DE GIBBS: (A) LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO COM	

PENALIDADE CONFORMACIONAL ($\Delta H > 0$ E $\Delta S < 0$), (B) INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS DOMINANTES EM RELAÇÃO A UM CUSTO ENTÁLPICO ($\Delta H < 0$ E $\Delta S > 0$) E (C) PEQUENAS CONTRIBUIÇÕES DE INTERAÇÕES TANTO ENTÁLPICAS QUANTO HIDROFÓBICAS ($\Delta H = \Delta S$).46

FIGURA 12 – FIGURA ILUSTRATIVA DO EFEITO DO AUMENTO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO K_A , SENDO $A < B < C$46

FIGURA 13 - EXEMPLO ILUSTRATIVO DAS CURVAS OBTIDAS NA ANÁLISE DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO OBTIDOS DA INTEGRAÇÃO DE CADA INJEÇÃO (PARTE INFERIOR).56

FIGURA 14 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (2742 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (75 μM) E DE (B) CMC (10 μM) NO pH 3,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA...57

FIGURA 15 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (10 μM) E DE (B) CMC (2,5 μM) NO pH 4,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA...58

FIGURA 16 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (2002 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (150 μM) E DE (B) CMC (50 μM) NO pH 6,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA...59

FIGURA 17 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (2987 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (15 μM) E DE (B) CMC (5 μM) NO pH 7,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.60

FIGURA 18 – DEPENDÊNCIA DA TURBIDEZ (A 600 nm) EM FUNÇÃO DO pH DA MISTURA DE BLG/PECTINA (A) E DA MISTURA DE BLG/CMC (B), AMBAS NA RAZÃO DE MISTURA DE 1:10. AS BARRAS INDICAM A AMPLITUDE DAS DUPLICATAS.....62

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 μM) (A) SEM AQUECIMENTO E (B) SUBMETIDA AO TRATAMENTO TÉRMICO DE 68 °C/50 MIN NAS SOLUÇÕES DE CMC (2,5 μM) EM pH 4,0 À 25 °C. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.64

FIGURA 20 - VARREDURA (190 – 250 NM) DO ESPECTRO DE UV-CD DA B-LACTOGLOBULINA APÓS TRATAMENTO TÉRMICO À 68 °C POR 50MIN E SEM AQUECIMENTO EM pH 4.....65

FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 μM) (A) SEM β -CAROTENO E (B) COM β -CAROTENO NA SOLUÇÃO DE CMC (2,5 μM) EM pH 4,0 À 25 °C. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.67

FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 μM) (A) SEM β -CAROTENO E (B) COM β -CAROTENO NA SOLUÇÃO DE PECTINA (10 μM) EM pH 4,0 À 25 °C. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.68

INDICE DE TABELAS

TABELA 1 -	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	23
TABELA 2 -	APLICAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS.....	25
TABELA 3 -	CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.	26
TABELA 4 -	PRINCIPAIS ESTRUTURAS E FONTES DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS.	33
TABELA 5 -	DEPENDÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE BLG, CMC E PECTINA EM FUNÇÃO DO pH.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a_a	Atividade de água
ALG	α -Lactoglobulina
BLG	β -Lactoglobulina
BSA	Albumina de soro bovino
BSG	Goma da semente de manjeriço
CMC	Carboximetilcelulose
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio (mg. L ⁻¹)
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
HM	<i>High methoxyl</i> (alta metoxilação)
IGA	Imunoglobulina
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
LM	<i>Low methoxyl</i> (baixa metoxilação)
MM	Massa molar
PS	Polissacarídeos
UV	Radiação ultravioleta
WPC	Concentrado proteico do soro
WPI	Isolado proteico do soro

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs	Absorbância, nm
Da	Daltons
Hz	Hertz, s ⁻¹
K _a	Constante de afinidade
<i>n</i>	Estequiometria de ligação
N	Normal, N
ΔC _p	Variação da capacidade calorífica, J kmol ⁻¹ K ⁻¹
ΔG	Variação da energia de Gibbs, J kmol ⁻¹
ΔH	Variação da entalpia de ligação, J kmol ⁻¹
ΔS	Variação da entropia da ligação, J kmol ⁻¹ K ⁻¹
ΔT	Variação da temperatura, °C

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite bovino é a porção aquosa obtida da produção do queijo após a precipitação da maior parte das proteínas por meio da ação de ácidos ou enzimas (ex: renina e pepsina). Em média, cerca de 90% do leite utilizado na fabricação de queijo é constituído pelo soro. Além do grande volume produzido, o soro de leite é visto na indústria alimentícia como um resíduo altamente poluente, com uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que varia de 30 - 45 g.L⁻¹ (ANTUNES & GOMES, 1990). Inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de buscar alternativas para o aproveitamento deste resíduo devido à sua composição nutricional rica em proteínas (HARAGUCHI *et al.*, 2006; LUCENA *et al.*, 2006).

As principais proteínas do soro de leite são a α -lactoalbumina, as imunoglobulinas, a albumina de soro bovino e a β -lactoglobulina (BLG), sendo esta última, o seu maior constituinte proteico. Assim como as demais proteínas, a BLG além da função nutricional confere propriedades sensoriais e de textura quando aplicada em alimentos, por meio da sua capacidade de formar géis, espumas e emulsões. A principal característica dessa proteína é a presença de um sítio de ligação interno hidrofóbico, chamado de β -barril, sendo à superfície externa dessa cavidade formada por cadeias laterais de aminoácidos tanto hidrofóbicos quanto polares. Essa característica possibilita a interação desta proteína com diferentes ligantes polares e apolares.

A complexação da β -lactoglobulina com polissacarídeos tem apresentado resultados promissores na aplicação industrial, sob a forma de agentes encapsulantes de compostos bioativos, tais como vitaminas, probióticos, peptídeos bioativos e antioxidantes, de estabilizantes de emulsões e na produção de biofilmes. A principal propriedade dos polissacarídeos é a sua fácil hidratação e formação de géis, além da sua atuação como crioestabilizadores. Quando complexados com proteínas, os polissacarídeos influenciam o comportamento térmico do complexo formado, aumentando a sua estabilidade térmica, aumentam a viscosidade em fase aquosa, além de serem responsáveis pelas modificações nas propriedades reológicas interfaciais dos complexos. Estas moléculas, também chamadas de biopolímeros, quando complexadas e incorporadas com compostos bioativos podem ser utilizadas como agentes encapsulantes, substitutas de gordura e modificadoras

da textura proporcionando o desenvolvimento de novos alimentos funcionais que podem ter benefícios fisiológicos ou reduzir os riscos de doenças.

Muitos estudos têm mostrado avanços na complexação de proteínas e polissacarídeos permitindo a identificação dos principais parâmetros físico-químicos que controlam a formação dos complexos, tais como: pH, força iônica, razão de mistura, concentração e densidade de carga dos polímeros (SCHMITT & TURGEON, 2011). As principais técnicas empregadas no estudo da formação dos complexos proteína-polissacarídeo são a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), a análise de dispersão dinâmica da luz, o potencial de cargas elétricas (ζ), a análise de ITC, bem como a análise de turbidez. Estudos recentes avaliam o processo de complexação da β -lactoglobulina com diferentes polissacarídeos, tais como a goma acácia, a pectina de alto e de baixo grau de metoxilação, a carragenana e o alginato de sódio (ABERKANE *et al.*, 2012; GIRARD *et al.*, 2003; HARNSILAWAT *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2010a) utilizando análises complementares dentre as quais se destaca a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A análise de ITC é utilizada para determinar o tipo e a magnitude das energias envolvidas com a finalidade de fornecer informações referentes às interações entre os biopolímeros.

Dentro deste contexto foram estudados os complexos formados por BLG e pectina, bem como carboximetilcelulose, sendo que em relação a este último não foram encontrados dados na literatura. Portanto, utilizou-se a complexação da BLG com pectina como um modelo referencial deste trabalho. Além disto, buscou-se avaliar a influência da incorporação de um terceiro elemento na formação dos complexos, no caso o β -caroteno, assim como avaliar as possíveis alterações na interação da proteína com os polissacarídeos, relacionadas ao emprego de um tratamento térmico na proteína.

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi determinar a formação dos complexos constituídos pela proteína do soro de leite, a β -lactoglobulina, e os polissacarídeos carboximetilcelulose e pectina, isoladamente, em diferentes condições de pH, como também avaliar a influência da temperatura e da presença de um antioxidante (β -caroteno) na formação dos complexos.

1.1.1 Objetivos específicos

Para atingir este objetivo foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar o perfil das interações moleculares dos complexos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- Determinar a influência do pH (3, 4, 6 e 7) na formação dos complexos por ITC e por análise de turbidez;
- Determinar a influência do efeito do tratamento térmico na estabilidade e conformação da BLG, e conseqüentemente, na formação dos complexos;
- Determinar a influência da incorporação do β -caroteno na formação dos complexos com CMC/pectina. Tendo em vista que o consumo de carotenoides entre brasileiros é abaixo da média considerada ideal, o estudo da incorporação deste antioxidante é uma ferramenta relevante no desenvolvimento de alimentos funcionais que possam melhorar a eficiência da encapsulação e preservar a bioatividade deste composto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo foi realizada uma breve descrição das proteínas com enfoque na β -lactoglobulina purificada do soro de leite bovino, dos polissacarídeos com ênfase na carboximetilcelulose e na pectina, e do β -caroteno, visando um maior conhecimento e compreensão destas moléculas utilizadas no estudo em questão. O presente capítulo contempla também as principais análises térmicas envolvidas na determinação das propriedades físico-químicas dos complexos proteína-polissacarídeo, com ênfase na análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

2.1 Proteínas

As proteínas são polímeros altamente complexos, constituídas de uma ou mais cadeias polipeptídicas formadas por aminoácidos unidos por ligações amida substituídas (DAMODARAN *et al.*, 2010; NELSON & COX, 2004). Além de desempenhar um papel central nos sistemas biológicos, na área de alimentos as proteínas contribuem significativamente em suas propriedades físicas e sensoriais, por meio da sua capacidade de formar ou estabilizar géis, espumas, emulsões e estruturas fibrilares (BELITZ, 2009).

Ao todo existem 20 aminoácidos essenciais e cada aminoácido possui uma cadeia lateral com propriedades químicas distintas podendo se ligar em diferentes combinações e sequências. A partir desses diferentes blocos de construção são formados produtos amplamente diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos, penas, chifres, proteínas do leite, antibióticos, venenos e uma miríade de outras substâncias biológicas com atividades distintas (NELSON & COX, 2002).

A estrutura das proteínas está descrita hierarquicamente em quatro grupos para melhor definir a sua estrutura geral e as suas propriedades. Na FIGURA 1 está a representação esquemática da estrutura hierárquica das proteínas, sendo esta dividida em primária, secundária, terciária e quaternária.

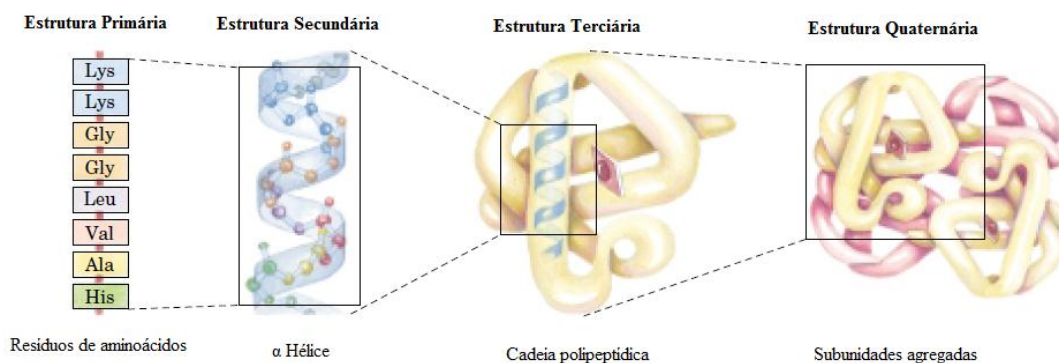


FIGURA 1 - ESTRUTURA HIERÁRQUICA DAS PROTEÍNAS.
 FONTE: adaptado de Nelson & Cox (2002).

A estrutura primária é a sequência linear dos resíduos de aminoácidos que formam as cadeias polipeptídicas desconsiderando outros tipos de ligações como as interações causadas pelas forças de van de Waals e ligações de hidrogênio (BOBBIO & BOBBIO, 2003; NELSON & COX, 2004). Sendo a sequência em que os resíduos de aminoácidos estão ligados, o fator determinante das propriedades físico-químicas, estruturais, biológicas, nutricionais e funcionais das proteínas (DAMODARAN *et al.*, 2010; WALSTRA, 2003). A estrutura secundária é o arranjo das cadeias polipeptídicas ao longo de uma dimensão, as quais estão torcidas, dobradas ou enroladas sobre si mesmas, podendo adquirir inúmeras conformações (BOBBIO & BOBBIO, 2003; NELSON & COX, 2004). Dentro desse grupo, as proteínas podem ser encontradas sob duas formas predominantes conhecidas como β -folha ou α -hélice. A conformação helicoidal (α -hélice) é estabilizada por ligações de hidrogênio, porém as interações de van der Waals também estão envolvidas, formando o que se chama de transição cooperativa (cada uma das ligações envolvidas é fraca, porém coletivamente elas são suficientes para estabilizar a estrutura). Na β -folha, a cadeia peptídica é quase que totalmente estendida e levemente torcida. Nesta conformação muitas ligações de hidrogênio são formadas, as quais também estabilizam a estrutura pelo princípio da cooperatividade (WALSTRA, 2003). A estrutura terciária é a maneira pela qual a cadeia polipeptídica está encurvada ou dobrada em três dimensões, formando uma estrutura compacta e firmemente enovelada (NELSON & COX, 2004). Essa estrutura é estabilizada por ligações covalentes, como as ligações de dissulfeto, e, por ligações eletrovalentes devido à atração exercida sobre si. Neste contexto, as proteínas são classificadas em globulares ou fibrilares (WALSTRA, 2003). As proteínas globulares são as que

possuem formas aproximadas esféricas ou elipsoidais, sendo que grande parte das enzimas são classificadas como proteínas globulares. Já as proteínas fibrilares são moléculas em forma de bastonetes que contém cadeias polipeptídicas lineares torcidas, funcionando, invariavelmente, como proteínas estruturais, tais como o colágeno e a elastina, que promovem a sustentação estrutural da célula e dos tecidos (DAMODARAN *et al.*, 2010). Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades (cadeias polipeptídicas), o arranjo tridimensional dessas cadeias é descrito pela estrutura quaternária. A conformação tridimensional formada não é alterada em meio aquoso ou em soluções diluídas de sais, fator de grande importância, já que as reações biológicas das proteínas ocorrem nestes meios (BOBBIO & BOBBIO, 2003).

O conhecimento das características estruturais das proteínas é importante para o entendimento da formação dos complexos com os polissacarídeos. Os sítios de ligação da proteína estão diretamente associados aos aminoácidos que as constituem, bem como a sua estrutura.

2.1.1 Desnaturação

A desnaturação é a perda da estrutura terciária da proteína, a qual pode ser uma mudança reversível ou irreversível na sua conformação nativa sem a clivagem das ligações covalentes, exceto as pontes de dissulfeto. Qualquer tratamento que quebre as ligações de hidrogênio e as ligações hidrofóbicas ou reduza as forças iônicas leva a desnaturação proteica. Diversos fatores podem desencadear a desnaturação, tais como: temperatura, alteração do pH, adição de solventes orgânicos, sais, ureia ou detergentes.

Normalmente, a desnaturação é dita reversível quando a cadeia peptídica é estabilizada em seu estado desdobrado pelo agente desnaturante e após a remoção deste agente ela retorna a sua conformação nativa ao passo que a desnaturação irreversível, ocorre quando a cadeia polipeptídica desdobrada é estabilizada por interações com outras cadeias fazendo com que não haja possibilidade do retorno a sua conformação nativa (BELITZ *et al.* 2009; DAMODARAN *et al.*, 2010). A perda da conformação nativa proteica, geralmente, tem importantes consequências tais como: a perda da atividade biológica, diminuição da solubilidade, aumento da reatividade

com outros compostos ou com grupos da própria proteína, aumento na susceptibilidade de ataque por enzimas proteolíticas e aumento no raio hidrodinâmico (WASLTRA, 2003).

O aquecimento é um dos principais procedimentos tecnológicos que afetam a estrutura das proteínas e as suas propriedades funcionais na maioria das formulações de alimentos (RELKIN & LAUNAY, 1990). De acordo com o estudo de Relkin & Launay (1990), a desnaturação térmica da β -lactoglobulina pode ser modelada como uma reação de segunda ordem para as concentrações entre 3,5 – 24% no pH 3,2, implicando na dimerização das moléculas de proteína parcialmente desnaturadas. Os resultados obtidos neste estudo, em relação aos parâmetros cinéticos desta desnaturação, indicam que as interações entre as cadeias peptídicas desempenham um importante papel em todo o processo de desnaturação.

2.1.2 Métodos de quantificação de proteínas

Normalmente, a quantificação do conteúdo proteico é obtida por meio da determinação de um elemento ou de um grupo pertencente à proteína, sendo que os elementos geralmente são carbono ou nitrogênio e os grupos são os aminoácidos e as ligações peptídicas (CECCHI, 2003). Os principais métodos utilizados na quantificação de proteínas são os conhecidos pelos nomes de *Kjeldahl*, biureto, *Bradford* e espectrofotométrico conforme descrito na TABELA 1. O método de Kjeldahl é considerado um método elementar porque determina o nitrogênio orgânico total, isto é, o proteico e o não proteico, que são convertidos a sais de amônia. É a metodologia mais empregada para a quantificação de proteína em alimentos. Ao contrário do método de Kjeldahl, o método de biureto está baseado na análise de grupos e determina diretamente a quantidade do conteúdo proteico. Este método envolve a reação do reativo de biureto com as proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. A análise é realizada em um espectrofotômetro, sendo que a intensidade de cor formada é proporcional à quantidade de proteína (CECCHI, 2003). A metodologia de Bradford consiste na reação da proteína com o corante "*Coomassie brilliant blue*" BG-250, provocando o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente

em 595 nm (BRADFORD, 1976; COMPTON & JONES, 1985). O método espectrofotométrico envolve medidas em espectrofotômetro UV-visível à 280 nm, visto que a maioria das proteínas possui absorção neste comprimento de onda devido à presença dos aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e fenilalanina (CECCHI, 2003).

TABELA 1: MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.

Método	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Referências
<i>Kjeldahl</i>	Análise elementar Determina o nitrogênio orgânico total	Não necessita de uma curva padrão	Necessita de um fator de conversão de nitrogênio Método indireto pois determina o N total	CECCHI, 2003.
<i>Biureto</i>	Análise de grupos Método colorimétrico que envolve uma reação com a ligação peptídica	Específico, simples, rápido e barato	Necessita de uma curva padrão A coloração pode variar de acordo com o tipo de proteína que está sendo analisada	CECCHI, 2003.
<i>Bradford</i>	Método colorimétrico que envolve a reação de aminoácidos com o corante “ <i>Coomassie brilliant blue</i> ”	Específico, simples e rápido	Necessita de uma curva padrão	BRADFORD, 1976; COMPTON & JONES, 1985
<i>Espectrofotométrico</i>	Medidas em espectrofotômetro UV-visível à 280 nm	Rápido, simples e não-destrutivo	Não apresenta interferência com sais de amônio.	CECCHI, 2003.

2.2 Soro de leite

O soro de leite é a porção aquosa obtida da produção do queijo. Ele pode ser chamado de “soro doce” ($\text{pH} \geq 5,6$) se for proveniente da produção do coágulo de queijos como *cheddar*, suíço e *mozzarella*, ou “soro ácido” ($\text{pH} \leq 5,1$) se for obtido da fabricação de queijos tipo *cottage* e ricota (UBIC-CONSULTING, 2013). Esses dois tipos de soro de leite possuem aplicações industriais e funcionalidades distintas, devido às diferenças no perfil de minerais e acidez, além das propriedades sensoriais (FARIAS, 2011).

Segundo dados Alliance Commodities a produção mundial de soro de leite é 190 milhões de toneladas, expressas em soro líquido (EQUIPE MILKPOINT, 2012). Há algum tempo, vem sendo estudadas aplicações para este subproduto da fabricação de queijos, visto que o soro apresenta a característica de ser altamente poluente por possuir uma taxa de DBO entre 30-45 g.L^{-1} . Quando lançado como efluente, 50.000 litros de soro equivalem ao esgoto de uma cidade de 25.000 habitantes (ANTUNES & GOMES, 1990).

Para contornar esta situação, o soro de leite vem sendo comercializado como concentrado proteico do soro de leite (*WPC - whey protein concentrate*) ou isolado proteico do soro de leite (*WPI - whey protein isolate*), sendo que o mercado de proteínas do soro de leite movimenta anualmente cerca de US\$ 3,8 bilhão (EQUIPE MILKPOINT, 2012). Estes produtos (*WPC* ou *WPI*) possuem alta concentração de aminoácidos sulfurados em comparação com as proteínas vegetais, como as da soja, e, por isso, são muito desejáveis como ingredientes nutricionais (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O *WPC* é comercialmente produzido utilizando o processo de ultrafiltração e diafiltração com membranas. Estas membranas possuem uma faixa de porosidade de 10 a 50 kDa, para o fracionamento das proteína de soro de leite a partir dos compostos de baixa massa molecular, tais como a lactose, sais minerais, proteínas não-nitrogenadas e vitaminas. Após o processo de ultrafiltração, o soro de leite concentrado líquido passa através de um evaporador e um secador de pulverização para remover a água até uma percentagem de 4-5%. No mercado, existem *WPC* com diferentes concentrações de proteína, destinadas a diferentes aplicações (UBIC-CONSULTING, 2013).

A produção de *WPI* pode ser realizada por dois processos: troca iônica (IE), seguida por concentração e secagem por pulverização; ou, microfiltração seguida por ultrafiltração (MF / UF) e subsequente secagem por pulverização (DESHLER, 1999).

As proteínas do soro, em seu estado nativo, são altamente solúveis em água em uma ampla faixa de pH e possuem numerosas vantagens nutricionais. A sua característica hidrofílica possibilita a melhora da retenção de água, além de promover firmeza na textura do alimento. Quando aplicadas em produtos formulados, elas desempenham função de emulsificantes, espessantes, geleificantes, além de possuírem a capacidade de formar espumas, de se ligar com a gordura, e de realçar a cor, o sabor e a textura dos alimentos (DAMODARAN *et al.*, 2010). Algumas das aplicações das proteínas do soro em produtos alimentícios estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 - APLICAÇÕES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS.

Categoria do alimento	Alimentos formulados com as proteínas do soro
Produtos de panificação	Pães, bolos, <i>muffins</i> e <i>croissants</i> .
Alimentos lácteos	logurte, queijos e pastas de queijos.
Bebidas	Refrigerantes, sucos de frutas, bebidas de laranja congeladas ou em pó e bebidas à base de leite aromatizado.
Sobremesas	Sorvetes, picolés de fruta e coberturas para sobremesas geladas.
Confeitos	Misturas aeradas para doces, merengues e bolos aerados.
Produtos cárneos	Salsichas, pão com recheio de carne e injeção de salmoura para fortificação.

Fonte: adaptado de Damodaran *et al.* (2010).

As principais proteínas que constituem o soro de leite são a α -lactoalbumina (ALG), a β -lactoglobulina (BLG), a imunoglobulina (IGA) e a albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*). Além disso, são encontrados no soro de leite, lactose, minerais e lipídios (MARQUES *et al.*, 2005; UBIC-CONSULTING, 2013). Na TABELA 3 são apresentadas as concentrações destas proteínas no soro de leite, as suas massas moleculares e seus respectivos pontos isoelétricos. Dependendo do processo de separação e purificação, a pureza e até mesmo as características das proteínas podem variar em função das condições adotadas nos mesmos. Alomirah & Alli (2004), estudaram as propriedades da BLG e da ALG extraídas de amostras de soro líquido, de isolado proteico de soro (WPI) ou concentrado proteico de soro (WPC) utilizando o mesmo processo de fracionamento. O processo de separação da BLG foi baseado na sua solubilidade em baixo pH e na presença de sal. De acordo com esse processo, foram registradas recuperações de 47-69% de β -lactoglobulina, com uma variação na pureza de 84-95%. Cheang & Zydney (2004) utilizaram um sistema de ultrafiltração de fluxo tangencial em duas fases para a purificação da ALG e BLG a partir da proteína de soro isolada (WPI). A separação foi conseguida utilizando membranas de 100 e 30 kDa em série (alterando as ordens numa segunda etapa) com o intuito de remover a BSA, sendo o tampão de concentração e a velocidade de filtração ajustados para cada fase. Em ambos os processos o rendimento de separação de BLG foi de 70%. Marques *et al.* (2005) desenvolveram um procedimento simples e brando para separar as proteínas do soro de leite. Eles utilizaram uma coluna de separação DEAE-trisacryl e posteriormente, utilizaram uma coluna de gel Sephadex G-25 para purificação das proteínas.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.

Proteínas	BLG	ALG	BSA	IG
Concentração no soro cru (g/L)	2 - 4	0,6 – 1,7	0,4	0,4 – 1,0
Conteúdo total de frações, %(m/m)	56 - 60	18 - 24	6 – 12	6 – 12
Massa Molecular (kDa)	18,3	14,4	66,0	≥ 146
Ponto isoelétrico	5,2	4,2 – 4,5	4,7 – 4,9	5,5 – 8,3

FONTE: Marques *et al.* (2005).

2.2.1 β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (BLG) foi a primeira proteína purificada da qual se obteve a composição completa de aminoácidos por meio da hidrólise completa das cadeias polipeptídicas. O trabalho de determinação dos aminoácidos foi finalizado em 1947 e mostrou que esta proteína possui 162 aminoácidos residuais (NELSON & COX, 2004).

A BLG (FIGURA 2) é uma proteína globular pequena de massa molar em torno de 18,3 kDa (SAWYER *et al.*, 1999), a qual é encontrada como a maior constituinte do soro de leite de ruminantes, aproximadamente 3 g.L^{-1} , mais que 50% do total de proteínas presente no soro de leite (MULVIHILL & DONOVAN, 1987) (FIGURA 2). Esta proteína existe na forma de muitos variantes genéticos (A - G), onde A e B são os mais comuns. Os dois aminoácidos nas posições 64 das sequências primárias são os responsáveis pela sua diferenciação ($\text{Asp}^{64}/\text{Gly}^{64}$ e $\text{Val}^{64}/\text{Ala}^{64}$ para os variantes A e B, respectivamente), os quais também são responsáveis pelas diferenças de solubilidade, além de outras propriedades (WIT *et al.*, 2009).

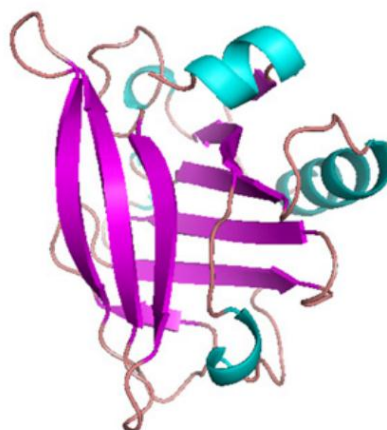


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ESTRUTURA DA β -LACTOGLOBULINA.
FONTE: Asthon *et al.* (2010).

Além disso, dependendo das condições ambientais onde a β -lactoglobulina está inserida, ela pode se apresentar como um octâmero, na faixa de pH de 3-5, como um dímero, na faixa de pH entre 5-8 e como um monômero em pH acima de 8, sendo que as unidades desses complexos são idênticas. Este comportamento de

associação dos monômeros sob diferentes condições de pH, força iônica, concentração de BLG e temperatura, foi estudado e comprovado por Verheuel *et al.* (1999), cujo estudo estava baseado na técnica de dispersão de nêutrons em um pequeno ângulo (SANS - *small-angle neutron scattering*). Segundo os autores, a β -lactoglobulina do tipo A apresentou maior tendência de formação à octâmeros do que a do tipo B, frente às mesmas condições testadas (VERHEUEL *et al.*, 1999).

Ao contrário da maioria das proteínas, a β -lactoglobulina ($pI = 5,2$), assim como a albumina sérica bovina ($pI = 5,3$), são altamente solúveis em seu ponto isoelétrico (pI). Esta característica está relacionada ao fato de que estas proteínas contêm grandes proporções de resíduos hidrofílicos superficiais em relação aos grupos não polares superficiais. Embora, a BLG seja eletricamente neutra em seu ponto isoelétrico (o número de cargas positivas é igual ao número de cargas negativas na superfície) ela ainda é solúvel no ponto isoelétrico. Isto ocorre porque as interações hidrofóbicas proteína-proteína são menores do que a hidrofilicidade e as forças de repulsão da hidratação que surgem nos resíduos carregados (DAMODARAN *et al.*, 2010).

2.2.1.1 β -lactoglobulina: membro da família das lipocalinas

A sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional indicam que a β -lactoglobulina é pertencente à família das proteínas lipocalinas, as quais podem se ligar a muitas moléculas hidrofóbicas pequenas, a receptores específicos da superfície celular, agir como transportadores específicos e formar complexos com macromoléculas solúveis em água (FLOWER, 1996). Estas proteínas têm em comum um motivo estrutural β em forma de barril. O centro desta estrutura forma uma cavidade apolar, devido a sua superfície ser formada por aminoácidos hidrofóbicos, e, além disso, pode existir uma outra cavidade hidrofóbica na estrutura, entre a α -hélice e a estrutura β -barril, que também proporciona a ligação dessa proteína com pequenas moléculas hidrofóbicas de diferentes afinidades (DAMODARAN *et al.*, 2010). Na superfície da BLG existem cadeias laterais de aminoácidos polares que possibilitam a interação da mesma com macromoléculas hidrofílicas (FLOWER, 1996; LaLONDE *et al.*, 1994). Isso faz com que a β -

lactoglobulina possa se ligar tanto a moléculas hidrofílicas quanto à moléculas hidrofóbicas.

2.2.1.2 Comportamento térmico da β -lactoglobulina

O comportamento térmico da BLG é complexo, pois varia com a temperatura, pH, tempo de aquecimento e concentração. Segundo De Wit *et al.* (2009), a dissociação de dímeros nativos e pequenas alterações conformacionais ocorrem até 55 °C em concentrações de proteína de 25 mg.ml⁻¹, e são reversíveis após resfriamento parcial, em pH 6,8. O desdobramento parcial da BLG em um “glóbulo fundido” e modificações irreversíveis dos monômeros, induzida por exposição dos grupos tióis, são observados entre 60°C a 70°C e acima de pH 6,8. Pequenos oligômeros são formados entre 65°C a 75°C, induzidos por meio de reações de oxidação tióis e por uma extensão limitada pelas reações de troca de dissulfeto. Em temperaturas abaixo de 100°C ocorre o desdobramento adicional da proteína e uma estrutura residual permanece. Os oligômeros são ampliados por associações não covalentes (hidrofóbico e associações induzidas pelo sal), os quais ocorrem predominantemente entre 75°C a 85°C, temperatura em que são realizados os tratamentos térmicos mais comuns. As associações hidrofóbicas são limitadas a temperaturas superiores a 85°C devido à mudança estrutural da água. Em temperaturas entre 125°C e 150°C ocorre o desdobramento da estrutura residual da proteína residual devido à decomposição química de ligações dissulfeto (FIGURA 3).

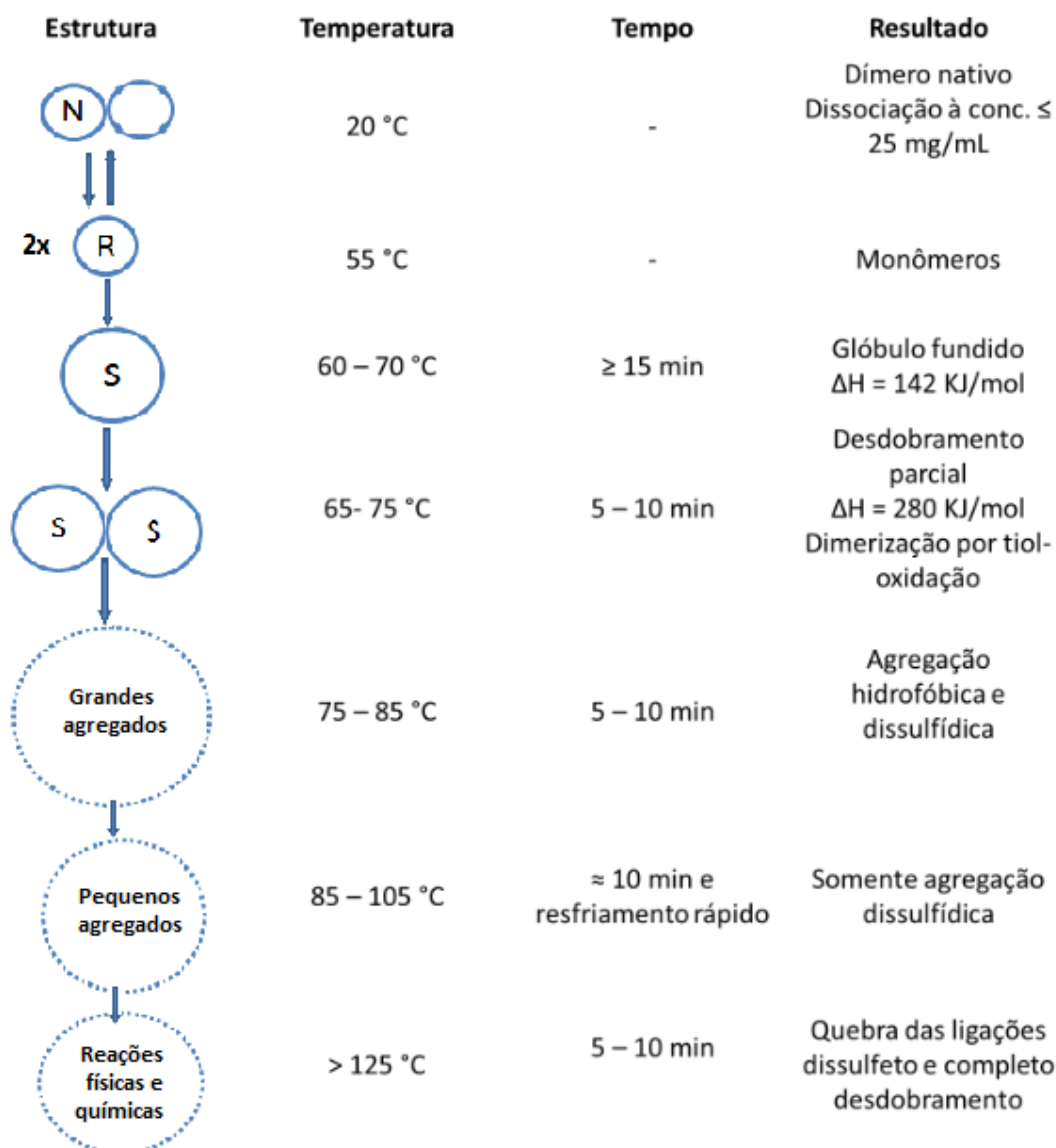


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPORTAMENTO TÉRMICO PROPOSTO PARA A β -LACTOGLOBULINA EM pH 6,8.
FONTE: adaptado de Wit *et al.* (2009).

2.2.1.3 Aplicação industrial da β -lactoglobulina

Devido à sua estrutura e características físico-químicas, a β -lactoglobulina possui propriedades de ligação com água, emulsificação, formação de espuma e geleificação, as quais são de suma importância na indústria alimentícia (de Wit, 1998). Por causa dessas propriedades, a BLG é foco de muitos estudos com o intuito de ampliar e melhorar a sua aplicação no âmbito industrial.

Uma das principais características da β -lactoglobulina é a presença da cavidade hidrofóbica na forma de β -barril (DAMODARAN *et al.*, 2010; FLOWER, 1996). Além da presença dessa cavidade, esta proteína apresenta uma plasticidade na região da entrada que permite a ligação de compostos hidrofóbicos de várias formas, que ao contrário das enzimas, fornece um exemplo de ligação com baixa especificidade, mas com elevada afinidade. Isto faz com que a BLG tenha um importante papel no desenvolvimento de novos produtos devido a sua facilidade de formar redes de proteína-ligante e de proteína-proteína (KONUMA *et al.*, 2007).

A β -lactoglobulina é aplicada na indústria de alimentos como uma proteína protetora natural dos ácidos graxos insaturados e saturados durante o processamento de alimentos (LOCH *et al.*, 2013; ZIMET & LIVNEY, 2009). Por meio de estudos termodinâmicos para avaliar a interação da β -lactoglobulina com os ácidos graxos saturados laurítico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), Loch *et al.* (2013) confirmaram que a estabilidade termodinâmica dos complexos de β -lactoglobulina com ácidos graxos saturados depende do comprimento da cadeia alifática do ligante e é influenciada pelas interações polares entre a proteína e o ligante. Neste caso, o ácido palmítico foi o que apresentou a maior interação, com uma constante de associação K_a igual a $20,43 \cdot 10^5$ M, devido ao fato de que a sua estrutura permite um melhor encaixe com a estrutura β -barril da proteína.

Estudos recentes também mostram o potencial da utilização da β -lactoglobulina em processos de encapsulação e incorporação de antioxidantes. Somchue *et al.* (2009) utilizaram a BLG como proteína-base para encapsular o α -tocoferol, visto que esta apresentou uma boa eficiência tanto no processo de encapsulação quanto no processo de liberação do composto ativo em questão. Neste estudo, eles utilizaram como material de revestimento das cápsulas o alginato de sódio, com o objetivo de prolongar a liberação do α -tocoferol nas condições intestinais simuladas.

Outra linha de pesquisa que tem tido resultados promissores na aplicação industrial, é a complexação da β -lactoglobulina com polissacarídeos. Segundo Baeza & Pilosof (2002), os polissacarídeos influenciaram o comportamento térmico do complexo formado sob a temperatura de 68 °C durante 10, 50, 70 e 90 minutos, uma vez que envolvem a proteína desnaturada e subsequentemente formam grandes agregados de proteína, o que aumenta a sua estabilidade térmica em pH neutro. Além disso, os polissacarídeos aumentam a viscosidade em fase aquosa e

são responsáveis pelas modificações nas propriedades reológicas interfaciais dos complexos (BOUYER *et al.*, 2012). Dentre os polissacarídeos mais estudados na complexação com proteínas estão: os alginatos (HARNSILAWAT *et al.*, 2006; HOSSEINI *et al.*, 2013), a carboximetilcelulose (ELIAS *et al.*, 2006), as gomas (as quais são descritas quimicamente como polissacarídeos naturais heterogêneos na sua composição) (JONES *et al.*, 2010a), e a pectina (GIRARD *et al.*, 2003, GIRARD *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2010a; WANG *et al.*, 2007a). Estes complexos são utilizados na estabilização de emulsões (BOUYER *et al.*, 2012; ELIAS *et al.*, 2006, SERFERT *et al.*, 2013), como agentes encapsulantes (SOMCHUE *et al.*, 2009) e também como biofilmes (BAEZA *et al.*, 2005).

2.3 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são formados pela interação de monossacarídeos ou seus derivados, os quais estão unidos entre si por ligações glicosídicas (BOBBIO & BOBBIO, 2003; BELITZ *et al.*; 2009). O grau de polimerização (DP) é igual ao número de unidades de monossacarídeos que formam o polissacarídeo (DAMODARAN *et al.*, 2010). Normalmente, estão incluídos nesta categoria, os derivados de amido, os quais, em alimentos, prevalecem sobre os polissacarídeos não-amidos, tais como celulose. Industrialmente, os polissacarídeos utilizados como agentes de viscosidade são extraídos de algas marinhas e plantas (LIMA *et al.*, 2001). A estrutura molecular da maioria dos polissacarídeos utilizados na indústria está bem definida, embora eles se apresentem em misturas complexas. Na TABELA 4, estão as principais estruturas e fontes dos principais polissacarídeos utilizados na indústria alimentícia (STEPHEN, 1995).

TABELA 4 - PRINCIPAIS ESTRUTURAS E FONTES DE ALGUNS POLISSACARÍDEOS.

Polissacarídeo	Principais Fontes	Estrutura molecular
Amido (amilose)	Grãos de cereais e tubérculos	Cadeia linear de D-glucopiranoses ligadas por $\alpha(1\rightarrow4)$
Amido (amilopectina)	Grãos de cereais e tubérculos	Cadeias ramificadas de α -D-glucopiranoses unidas em $\alpha(1\rightarrow4)$ por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$
Alginatos	Algas marrons (<i>Macrocystis</i> , <i>Ascophyllum</i> , <i>Laminaria</i> e <i>Ecklonia spp.</i>)	Cadeia linear de $(1\rightarrow4)$ ácido β -D-manurônico e ácido $-\alpha$ -L-gulorônico
Carboximetilcelulose	Celulose do algodão	Grupos de HO_2CCH_2 ligados em O-6 por ligações $(1\rightarrow4)$ - β -glucanas
Goma arábica	Exudado do tronco da <i>Acacia senegal</i>	Ácido L-arabino $(1\rightarrow3)$ e $(1\rightarrow6)$ - β -galactana, altamente ramificadas com L-ramnopiranoses ligadas por ácido D-galacturônico
Maltodextrinas	Amido de milho e batata	Amido hidrolisado por ácido e/ou enzimas (Massa Molar < 4000)
Pectina	Frutas cítricas e maçã	Unidades de ácido galacturônico interrompidas pela presença de um metilpentose, L-ramnose

FONTE: adaptado de STEPHEN (1995).

2.3.1 Propriedades dos polissacarídeos

Em alimentos, os polissacarídeos (gomas e hidrocolóides) modificam e controlam a mobilidade da água, e juntos, controlam muitas propriedades físico-químicas dos alimentos. São utilizados, principalmente, para espessar soluções aquosas, controlar as propriedades de fluxo e a textura de produtos líquidos e a

deformação de produtos semissólidos, além de serem considerados crioestabilizadores (DAMODARAN *et al.*, 2010).

A principal propriedade dos polissacarídeos é a sua fácil hidratação para produzir soluções aquosas que possuem alta viscosidade em baixas concentrações de goma, conhecida como géis (WHISTLER & BEMILLER, 1992). Isso se deve ao fato de que, a maioria dos polissacarídeos contém unidades glicosil, que em média, possuem três grupos hidroxila. Cada um desses grupos tem a possibilidade de formar ligações de hidrogênio com uma ou mais moléculas de água. Além disso, o átomo de oxigênio do anel do monossacarídeo e o átomo de oxigênio que liga o anel de açúcar a outra unidade, também pode formar ligações de hidrogênio com água. A viscosidade depende da massa molecular, da forma da cadeia e da flexibilidade da cadeia polimérica solvatada. Quanto mais linear é o polímero, mais viscosa será a solução formada quando comparada a um polissacarídeo ramificado de mesma massa molecular. Isso ocorre, porque os polissacarídeos lineares ocupam mais espaço quando comparados aos polímeros ramificados. Desta forma, ao ocorrer uma colisão entre eles, há uma maior fricção e consumo de energia, produzindo soluções altamente viscosas, ao contrário dos polímeros ramificados, que colidem com menos frequência (DAMODARAN *et al.*, 2010).

2.3.2 Classificação dos polissacarídeos

De acordo com o tipo de açúcares que constituem os polissacarídeos, eles são classificados em homoglicanas e heteroglicanas (FIGURA 4). As homoglicanas são constituídas de uma unidade estrutural de açúcar e as heteroglicanas são constituídas de várias unidades de açúcares (BELITZ *et al.*; 2009; DAMODARAN *et al.*, 2010).

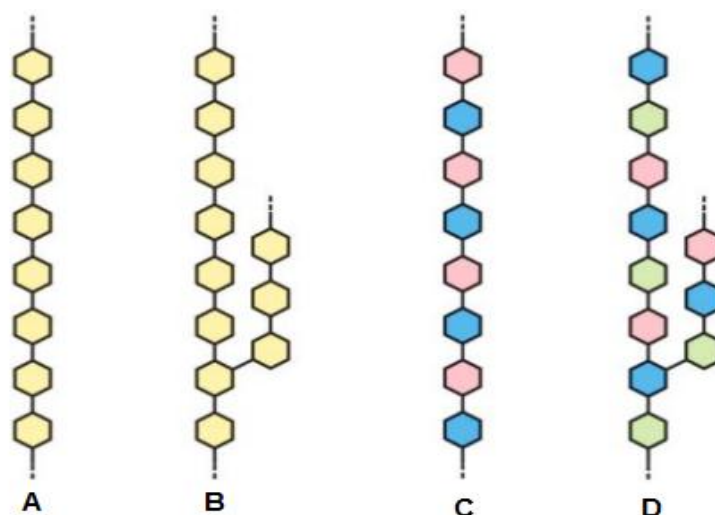


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DAS HOMOGLICANAS (A E B) E HETEROGLICANAS (C E D), AS QUAIS PODEM SER LINERES (A E C) OU RAMIFICADAS (B E D). NA FIGURA CADA COR REPRESENTA UMA UNIDADE DE MONOSSACARÍDEO. FONTE: Yamoto (2011).

As estruturas dos polissacarídeos variam grandemente conforme os monossacarídeos que podem estar ligados de forma linear (amilose) ou ramificados (amilopectina) (FIGURA 5 – A e B). Outra variante é a frequência dos locais de ramificação e o comprimento das cadeias laterais como no caso do glicogênio (FIGURA 5 - C). Além disso, a sequência dos resíduos dos monossacarídeos pode ser periódica, um período contendo uma ou várias unidades estruturais alternadas, como na amilose, no ácido hialurônico e na celulose, por exemplo, (FIGURA 5 - D), pode conter segmentos curtos ou longos com resíduos arranjados periodicamente e separados por segmentos não periódicos no caso do alginato, da pectina e das carragenanas (FIGURA 5 - E), ou ainda, a sequência pode não ser periódica ao longo de toda a cadeia (componentes de carboidratos nas glicoproteínas) (BELITZ *et al.*; 2009).

Assim como nas proteínas, os constituintes monoméricos e as estruturas que os polissacarídeos podem assumir influenciam diretamente na interação com outras moléculas durante a formação de complexos.

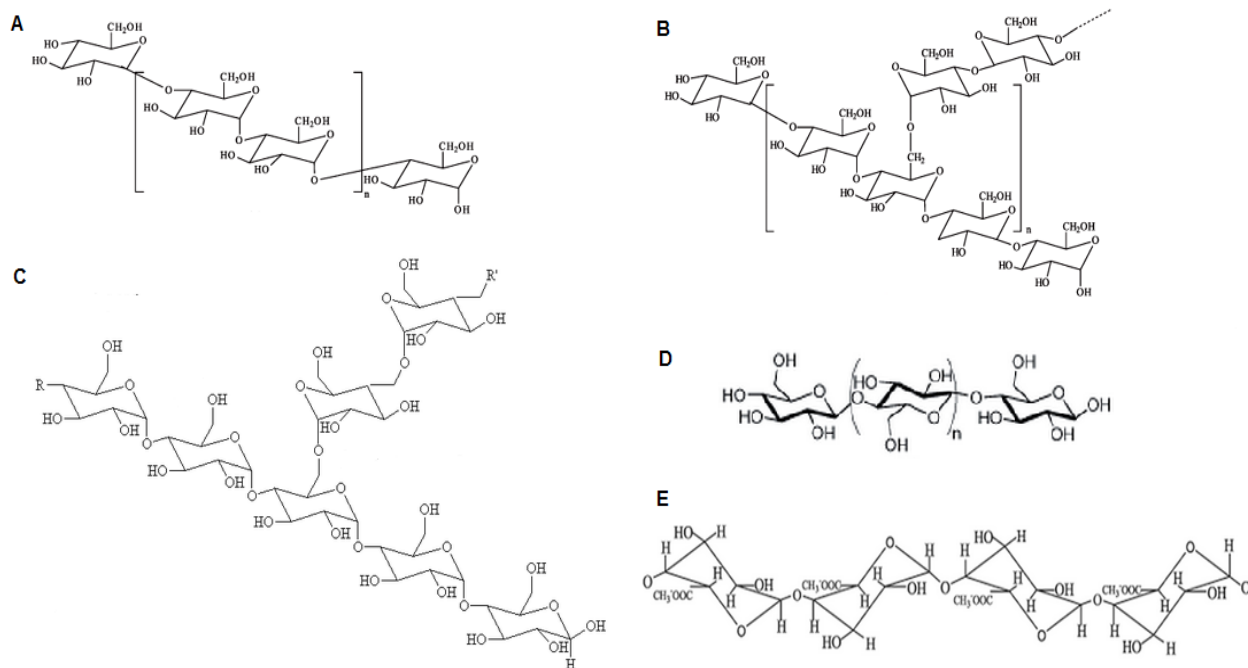


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DA AMILOSE (A), AMILOPECTINA (B), GLICOGÊNIO (C), CELULOSE (D) E PECTINA (E).
 FONTE: Chen & Burchell (1995); Corradini *et al.* (2005); Ferreira *et al.* (2009); Uenojo & Pastore (2007).

2.3.2.1 Carboximetilcelulose (CMC)

A carboximetilcelulose (CMC) é obtida por tratamento alcalino da celulose com hidróxido de sódio 18%, seguida da reação com ácido cloroacético para que ocorra a substituição de algumas hidroxilas por grupos carboximéticos ionizados (DAMODARAN *et al.*, 2010). As propriedades do produto dependem do grau de substituição (DS) o qual é definido como o número médio de grupos hidroxila esterificados ou eterificados por uma unidade de monossacarídeo, variando de 0,3-0,9 na maioria dos produtos comerciais, e do grau de polimerização (DP), variando de 500 - 2000. Carboximetilceluloses com baixos graus de substituição ($DS \leq 0,3$) são insolúveis em água, porém solúveis em álcalis, enquanto as com grau de substituição maior ($DS > 0,4$) são solúveis em água. O hidrocolóide mais utilizado como ingrediente alimentício apresenta DS de 0,7. Tanto a solubilidade quanto a viscosidade da carboximetilcelulose são dependentes do pH (BOBBIO & BOBBIO, 2003; BELITZ *et al.*; 2009; DAMODARAN *et al.*, 2010).

A CMC (FIGURA 6) estabiliza dispersões de proteínas, particularmente próximo ao seu pH isoeletrico (KELLER, 1984) . Em alimentos, é utilizada como

ligante inerte e espessante para melhorar a textura de muitos alimentos como geleias, queijos processados, produtos extrusados dentre outros. Em gelados comestíveis a carboximetilcelulose retarda a formação de cristais, estabilizando a sua textura macia e suave. Em produtos açucarados, a CMC diminui a cristalização indesejada da sacarose e inibe a retrogradação do amido. Além disso, a carboximetilcelulose melhora a estabilidade e as características de reidratação de muitos produtos desidratados (BELITZ *et al.*; 2009).

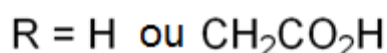
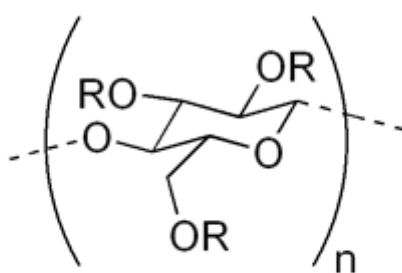


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CARBOXIMETILCELULOSE.
 FONTE: Porter (2009).

2.3.2.2 Pectina

A pectina é amplamente encontrada em plantas e sua composição e propriedades variam de acordo com a sua fonte de obtenção, o processo de preparação e os tratamentos posteriores (DAMODARAN *et al.*, 2010). Comercialmente, ela é produzida a partir da casca de frutas cítricas (20% - 40% da matéria seca) e do bagaço de maçã (10 % - 20% da matéria seca). Estruturalmente, a pectina consiste em uma cadeia polimérica formada de unidades estruturais de ácido galacturônico unidas por ligações α -1 \rightarrow 4 (FIGURA 7), podendo conter também ramnose, arabinose e galactose. No pH em torno de 3, na presença de íons de Ca^{2+} e também em altos valores de pH, as pectinas formam géis termicamente reversíveis. A habilidade de formar géis sobre estas condições é diretamente proporcional à massa molar e inversamente proporcional ao grau de

esterificação (DE), sendo este definido como a porcentagem de grupos carboxila esterificados com metanol. Além disso, a formação de géis também é influenciada pela distribuição dos grupamentos ésteres na molécula de pectina (BELITZ *et al.*; 2009).

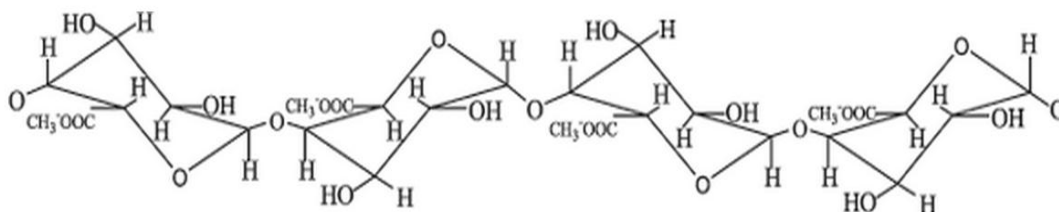


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA PECTINA. NESTE CASO CADA MONÔMERO ESTÁ REPRESENTADO NA FORMA DE ÁCIDO α -1, 4-D-GALACTURÔNICO.
FONTE: Uenojo & Pastore (2007).

As pectinas podem ser classificadas de acordo com o seu grau de metoxilação. As pectinas de baixo grau de metoxilação (LM) são preparações constituídas por menos da metade de grupos carboxilas sob a forma de éster metílico ($-\text{COOCH}_3$), enquanto que os demais grupos carboxílicos estão presentes na forma de uma mistura de ácidos livres ($-\text{COOH}$) e de sal ($-\text{COOH}^-\text{Na}^+$) (DAMODARAN *et al.*, 2010). São produzidas por desesterificação parcial de pectinas naturais por métodos enzimáticos ou químicos. Os métodos químicos utilizam ácidos, soluções aquosas de álcalis ou amônia e amônia em meio alcoólico. A geleificação das pectinas de baixa metoxilação ocorre facilmente na presença de íons divalentes, como Ca^{2+} , sem adição de ácido ou sacarose. Esta característica é ideal na fabricação de géis dietéticos, sendo necessário um teor de grupos metoxílicos de 3,5% (BOBBIO & BOBBIO, 2003). As pectinas de alto grau de metoxilação (HM) são definidas como preparações nas quais mais da metade dos grupos carboxila encontram-se sob a forma de éster metílico ($-\text{COOCH}_3$), e assim como nas pectinas LM, os demais grupos carboxílicos estão na forma de uma mistura de ácidos livres e de sal (DAMODARAN *et al.*, 2010). As soluções de pectina de alto grau de metoxilação requerem adição de açúcar (proporcional ao seu grau de metoxilação) e ácido. Industrialmente, a pectina é amplamente utilizada na produção de geleias e para estabilizar bebidas lácteas, iogurtes e sorvetes (BELITZ *et al.*; 2009).

2.4 β -caroteno

O β -caroteno (FIGURA 8) é pertencente ao grupo dos carotenoides, os quais possuem em comum a estrutura química de uma cadeia polienólica de 40 carbonos, derivada do isopreno. A presença de ligações duplas conjugadas no esqueleto do isopreno faz com que os carotenoides possam absorver o excesso de energia de outras moléculas a partir de um mecanismo não radioativo (PALOZZA & KRINSKY, 1992). Devido à presença dessas ligações duplas, os carotenoides possuem atividade antioxidante, a qual além de eliminar o oxigênio *singlete* (reativo), também está relacionada com o aumento da imunidade, proteção de queimaduras solares e inibição do desenvolvimento de alguns tipos de câncer (BURRIE, 1997). Os carotenoides são compostos lipofílicos (DAVIDSON, 1954), moderadamente estáveis ao calor, sujeitos à perda de cor por oxidação e são isomerizados com facilidade por calor, ácido ou luz. Como sua faixa de cor varia do amarelo ao vermelho, os comprimentos de onda para o seu monitoramento costumam estar entre 430 e 480 nm (DAMODARAN *et al.*, 2010).

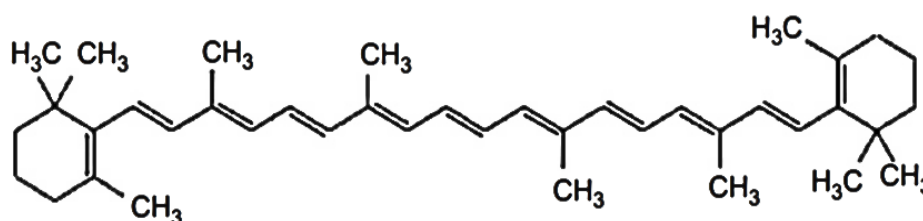


FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CAROTENO.
FONTE: Ribeiro *et al.* (2005).

Dentre os carotenoides, o β -caroteno é mais comum nos tecidos vegetais e o mais potente precursor da vitamina A. Em alimentos está presente no palmito, na cenoura, no óleo de palma, na abóbora, na manga, na abobrinha e no mamão, entre outros (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Segundo uma pesquisa realizada na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da USP, em Piracicaba, o consumo de carotenoides entre brasileiros está abaixo da média considerada ideal. Os níveis prudentes de ingestão de carotenoides totais são de 9.000 a 18.000 microgramas por dia. O estudo revelou que a média de consumo nacional foi de 4.117 microgramas por dia, abaixo dos

valores preconizados como seguros para uma vida saudável (AMANCIO & DA SILVA, 2012).

O β -caroteno apresenta algumas dificuldades de incorporação em formulações de alimentos devido a sua insolubilidade em água, sensibilidade à luz, oxigênio e calor. Além disso, quando aplicado na sua forma cristalina possui baixa bioatividade (DAMODARAN *et al.*, 2010; RIBEIRO & CRUZ, 2005). Muitos estudos vêm sendo realizados no sentido de viabilizar a aplicação desse antioxidante em alimentos, sendo, atualmente, a encapsulação (CAO-HOANG *et al.*, 2011; FERNANDEZ, *et al.*, 2009; SÁIZ-ABAJO *et al.*, 2013; SPADA *et al.*, 2012) a preparação de nanoemulsões (SILVA *et al.*, 2011; QIAN *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2008) e a formação de complexos (KIM *et al.*, 2013, MENSI *et al.*, 2013) as principais técnicas empregadas na sua incorporação.

2.5 Complexos de proteínas-polissacarídeos

Muitos estudos têm mostrado avanços na complexação de proteínas e polissacarídeos, permitindo a identificação dos principais parâmetros físico-químicos que controlam a formação dos complexos, tais como: pH, força iônica, razão de mistura, concentração e densidade de carga dos biopolímeros. Além disso, devido à grande variedade de biopolímeros existentes, os complexos proteína-polissacarídeo podem ser adaptados de acordo com a sua finalidade, bem como, de acordo com o tipo de compostos bioativos ou moléculas sensíveis em alimentos (SCHMITT & TURGEON, 2011).

Girard *et al.* (2003) utilizaram a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para determinar a constante de ligação, estequiometria, entalpia e entropia dos complexos de BLG com pectina de baixa (LM) e alta metoxilação (HM) em pH 4. De acordo com os resultados obtidos, a formação dos complexos ocorre em duas etapas, onde primeiramente são formados os complexos solúveis intrapoliméricos, por meio de um processo entálpicamente dirigido, e em seguida ocorre a agregação interpolimérica desses complexos, a qual é governada tanto por fatores entálpicos quanto entrópicos. As estequiometrias de ligação foram de 8,3 (BLG/pectina LM) e 6,1 (BLG/pectina HM) na primeira etapa, e de 16,5 (BLG/pectina LM) e 15,1 (BLG/pectina HM) na etapa seguinte.

Wang *et al.* (2007b) estudaram o efeito da concentração de cloreto de sódio na formação e dissociação de complexos de β -lactoglobulina/pectina pela técnica de titulação turbidimétrica. Neste caso, a adição de sal desempenhou um papel importante nos limites de pH da coacervação de β -lactoglobulina/pectina e promoveu a formação de agregados de β -lactoglobulina.

Harsilawat *et al.* (2006) utilizaram análises complementares, dentre as quais está a calorimetria de titulação isotérmica, com o objetivo de investigar as interações entre a β -lactoglobulina e o alginato de sódio em diferentes valores de pH. Os resultados mostraram a formação de grandes complexos no pH 3 e 4, de complexos solúveis no pH 5 enquanto, que nos valores de pH 6 e 7, não houve a formação de complexos devido à repulsão eletrostática entre as moléculas carregadas similarmente. Jones *et al.* (2010b) examinaram detalhadamente o efeito de densidade de carga aniônica das pectinas de alta metoxilação e de baixa metoxilação sobre a formação e estabilidade das nanopartículas de biopolímeros formadas por aquecimento com a β -lactoglobulina. De acordo com este estudo, as partículas de biopolímeros podem ser formadas a partir do tratamento térmico dos complexos associativos entre a β -lactoglobulina e pectinas de diferentes densidades de carga em pH 4,75 e acima da temperatura de desnaturação da BLG (em torno de 80 °C). Ainda neste estudo, foi possível observar que o tamanho e a estabilidade das partículas de biopolímeros dependem do tipo de pectina usada, sendo que as pectinas com alta metoxilação formaram partículas menores e mais estáveis quando comparadas com as pectinas de baixa metoxilação.

Aberkane *et al.* (2012) estudaram o processo de complexação da β -lactoglobulina (BLG) com goma acácia total (TAG) na presença de quercetina e utilizaram a calorimetria de titulação isotérmica para determinar o tipo e a magnitude das energias envolvidas. De acordo com os dados obtidos neste estudo, a presença de quercetina conduziu a um aumento na ligação entre a proteína e o polissacarídeo do sistema em questão, por meio de interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio) no primeiro momento, e posteriormente, por interações hidrofóbicas, devido à mudança no ambiente dos aminoácidos hidrofóbicos da BLG expressados por uma alta perda das suas estruturas β -folha.

2.6 Análises térmicas

Os protocolos calorimétricos possuem uma importante relevância para a maioria dos processos que envolvem a conservação de alimentos visto que muitos dos métodos de processamento empregados envolvem tratamento térmico (aquecimento, resfriamento e congelamento). As caracterizações térmicas dos sistemas alimentares e seus componentes conduzem a dados que podem ser diretamente relacionados com os protocolos de processamento (KALETUNÇ, 2009). Nos complexos de proteínas-polissacarídeos as análises térmicas são técnicas empregadas com o objetivo de determinar os seus parâmetros termodinâmicos (GIRARD *et al.*, 2003) e a sua estabilidade (LEE & HONG, 2009; JONES *et al.*, 2010a). Dentre as análises térmicas, as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), são as mais empregadas na avaliação da formação de complexos proteína-polissacarídeos.

2.6.1 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica mede diretamente o equilíbrio das ligações moleculares, por meio da determinação do calor envolvido na associação de um ligante com o seu parceiro de ligação (FIGURA 9). Em um único experimento, os valores de constante de ligação (K_a), a estequiometria (n), e a entalpia de ligação (ΔH_b) são determinados. A energia livre e a entropia de ligação são determinadas a partir da constante de associação (PIERCE *et al.*, 1999).

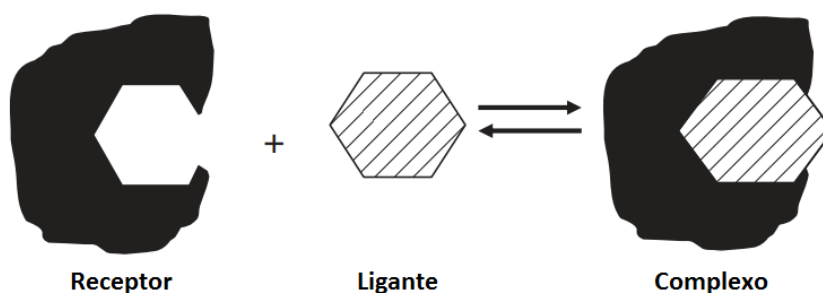


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA LIGAÇÃO TÍPICA LIGANTE/RECEPTOR. FONTE: adaptado de FREYER & LEWIS (2008).

O calorímetro é composto, basicamente, de uma célula de referência e uma célula de amostra. Pequenas alíquotas do composto de interesse são injetadas através de uma seringa à célula de amostra, medindo-se a energia liberada ou absorvida em função do tempo (HEERKLOTZ & SEELIG, 2000). Cada medida de fluxo de energia gera um pico que representa a energia associada à injeção de um volume da solução da seringa na solução presente na célula de amostra. À medida que a solução presente na célula de amostra vai atingindo a saturação, o sinal de energia liberada vai diminuindo até atingir a saturação completa. Na FIGURA 10 é mostrada uma representação esquemática do calorímetro de titulação térmica, onde (A), ilustra o momento antes do início da titulação. Neste instante, a célula da referência e da amostra permanecem na mesma temperatura. Durante as titulações, a célula de referência é mantida na temperatura inicial do experimento. Quando uma injeção é realizada (B), ocorre uma variação de temperatura da célula de amostra e, conseqüentemente, há um fornecimento ou uma remoção de energia do sistema no sentido de reestabelecer o equilíbrio térmico entre as células (De FREITAS, 2009).

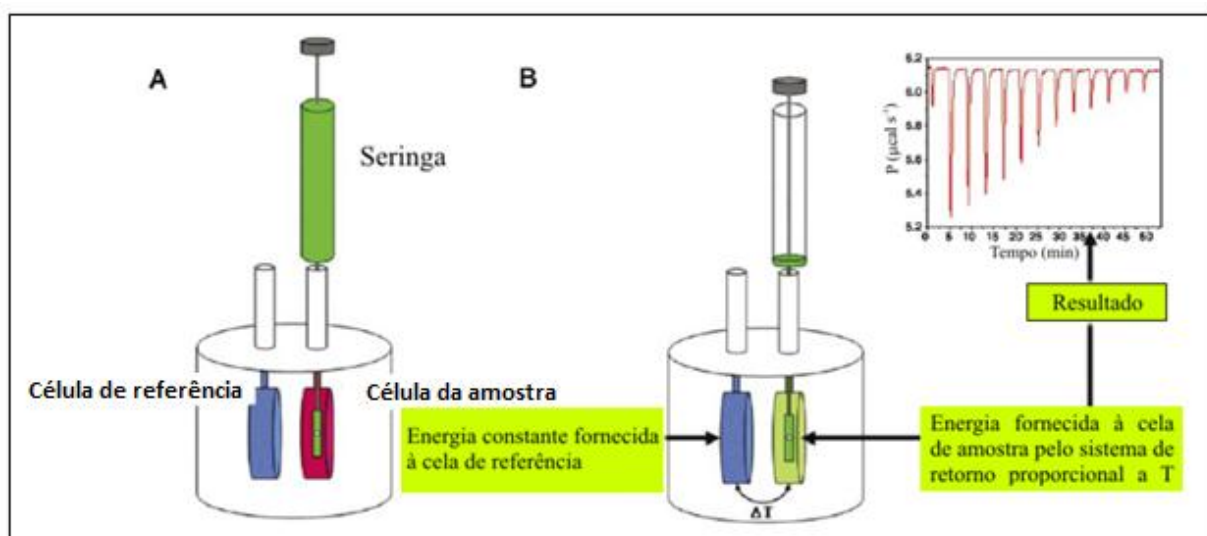


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM CALORÍMETRO DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA.

FONTE: De Freitas (2009).

A partir da curva obtida é possível determinar a variação da entalpia ΔH (em unidades de Joules por mol do componente) resultante do processo de mistura a ser estudado. A partir dessa informação chega-se aos outros parâmetros termodinâmicos desejados no estudo em questão, tais como a constante de ligação (K_a), a variação da entropia (ΔS) e a variação da energia de Gibbs (ΔG) (GOMES,

2009). Por meio dos dados coletados, a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é calculada usando a conhecida relação descrita pela Equação 1.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

As variações de entropia (ΔS) são calculadas usando a Equação 2.

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} (C_p/T) dT \quad (2)$$

Quando há variação de temperatura no sistema estudado, a capacidade calorífica (ΔC_p) pode ser calculada a partir das entalpias de ligação ΔH_m , utilizando a Equação 3 (ABERKANE *et al.*, 2012).

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H_m)}{dT} \quad (3)$$

A análise de titulação isotérmica é muito utilizada para avaliar a interação entre duas moléculas (AL-KADDAHA *et al.*, 2010). Além disso, é uma valiosa ferramenta para o entendimento das forças que estabilizam as conformações de dobramento das proteínas (PIERCE *et al.*, 1999).

2.6.1.1 Avaliação dos parâmetros termodinâmicos obtidos das análises de ITC

Os dados coletados na análise de ITC podem ser analisados utilizando uma variedade de abordagens para fornecer informações detalhadas sobre os eventos que acompanham a interação entre duas moléculas. Freiburger *et al.* (2012) chamaram as duas principais classes dos modelos de ligação de modelos fenomenológicos e de modelos mecanicistas. Os modelos fenomenológicos dependem apenas da estequiometria da interação e não fazem suposições sobre o mecanismo físico subjacente de ligação. Neste caso, quando há uma estequiometria de 1:1, os dados de ITC podem ser descritos por meio de dois parâmetros termodinâmicos: a constante de afinidade (K_a) e a variação da entalpia (ΔH). Estes

modelos têm como desvantagem a falta de dados que possam fornecer informações se a ligação ocorre realmente em um nível microscópico. Já os modelos mecanicistas fornecem hipóteses específicas sobre os processos físicos que não aparecem claramente em uma ligação. Estes modelos podem envolver de forma arbitrária um grande número de estados termodinâmicos e conter parâmetros termodinâmicos microscópicos descrevendo as variações de entalpia, de energia livre, e de capacidade calorífica. O desafio está em determinar o modelo correto a ser aplicado para descrever a interação molecular, visto que há uma variedade de diferentes modelos mecanicistas mutuamente exclusivos (modelos cuja ocorrência de um elimina a possibilidade de ocorrência do outro) que podem ser aplicados nas interações de uma determinada estequiometria (FREIRE *et al.*, 2009).

As mudanças entálpicas (ΔH) determinadas experimentalmente são relacionadas com as interações intermoleculares como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de Van der Waals (O'BRIEN & HANG, 2004).

Já as mudanças de entropia (ΔS) são relacionadas com as interações hidrofóbicas, visto que estão envolvidas com os graus relativos de desordem do sistema livre e do complexo ligante-receptor. A entropia do sistema pode ser favorável quando ocorre a liberação de moléculas de água da superfície hidrofóbica do ligante e do receptor (efeito hidrofóbico). Quando ocorrem mudanças conformacionais no sistema o processo é entropicamente desfavorável, sendo um indicativo de que ocorreram interações de “ajuste flexível” (CARBONELL & FREIRE, 2005; O'BRIEN & HANG, 2004).

Na FIGURA 11 está um esquema ilustrativo de diferentes mecanismos de interação entre duas moléculas para uma mesma variação da energia de Gibbs (ΔG), a qual está relacionada com a espontaneidade da interação. A entalpia negativa dominante ilustrada na FIGURA 11-A sugere que há um grande número de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre as moléculas. E, a entropia desfavorável implica em uma alteração conformacional que pode ser em uma ou em ambas as moléculas. Já a FIGURA 11-B, possui uma grande entropia positiva, o que sugere que esta interação é resultado do rearranjo causado pelo solvente e pelas forças hidrofóbicas. Na FIGURA 11-C há uma pequena redistribuição favorável das ligações de hidrogênio e uma modesta contribuição hidrofóbica global (O'BRIEN & HANG, 2004).

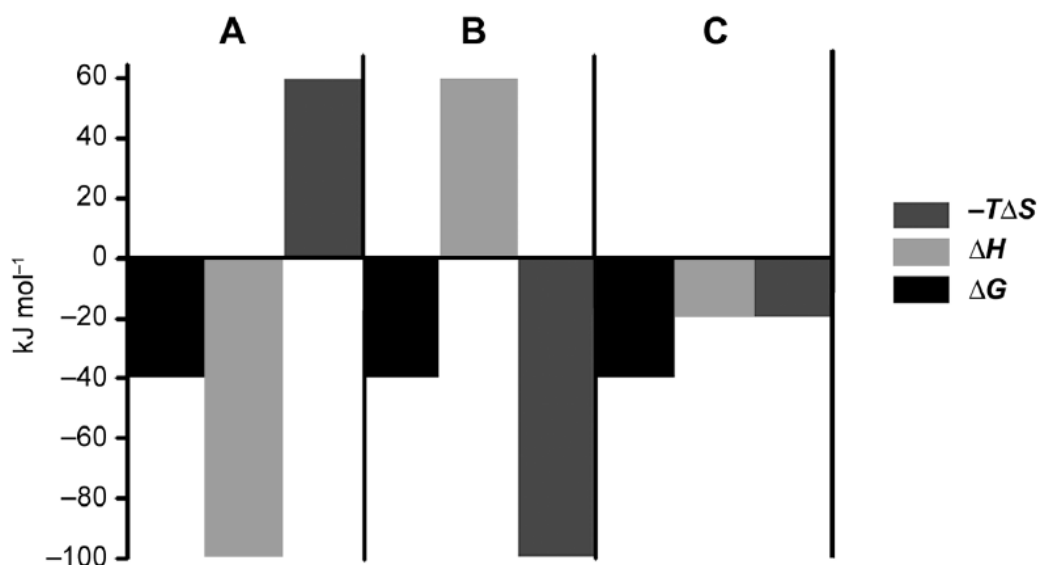


FIGURA 11 – FIGURA ESQUEMÁTICA QUE MOSTRA OS DIFERENTES MECANISMOS DE INTERAÇÃO QUE PODEM SER OBSERVADOS PARA UMA MESMA ENERGIA DE GIBBS: (A) LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO COM PENALIDADE CONFORMACIONAL ($\Delta H > 0$ E $\Delta S < 0$), (B) INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS DOMINANTES EM RELAÇÃO A UM CUSTO ENTÁLPICO ($\Delta H < 0$ E $\Delta S > 0$) E (C) PEQUENAS CONTRIBUIÇÕES DE INTERAÇÕES TANTO ENTÁLPICAS QUANTO HIDROFÓBICAS ($\Delta H = \Delta S$).

Fonte: O'Brien e Hang (2004).

Na FIGURA 12 estão ilustradas diferentes inclinações nas curvas obtidas por ITC. Quando maior a afinidade (K_a) entre as moléculas tituladas maior é a inclinação da curva de calorimetria de titulação isotérmica (SASSONIA, 2009) e melhores são os ajustes dos modelos para o tratamento dos dados termodinâmicos.

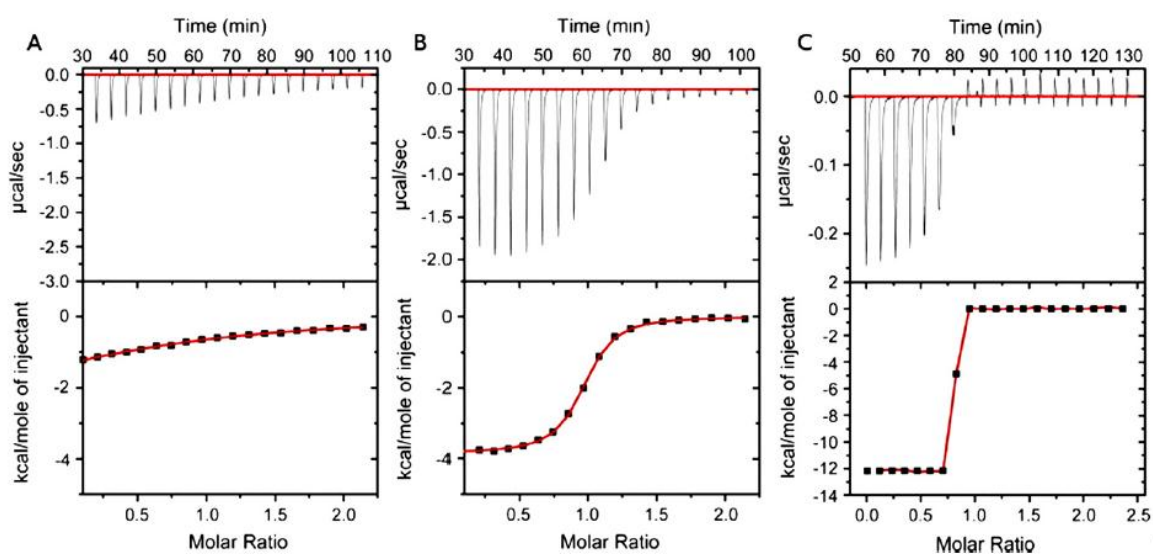


FIGURA 12 – FIGURA ILUSTRATIVA DO EFEITO DO AUMENTO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO K_A , SENDO $A < B < C$.

Fonte: Draczkowski *et al.* (2014).

Burgos *et al.* (2012) determinaram os parâmetros termodinâmicos que governam a dissociação e desdobramento da β -lactoglobulina por meio da técnica de DSC e compararam com os dados obtidos por ITC para estudar os aspectos termodinâmicos da interação proteína-proteína com a aplicação de um modelo termodinâmico. A comparação dos resultados mostrou a complementaridade entre as duas técnicas calorimétricas para uma análise aprofundada do processo de dissociação e desdobramento da proteína.

2.7 Considerações Finais da Revisão da Literatura

Neste capítulo procurou-se relatar o estado da arte acerca das moléculas que envolvem os complexos de proteína-polissacarídeo, com maior enfoque na proteína em questão (β -lactoglobulina), visto que as proteínas são determinantes no processo de formação de complexos.

Além disso, foram abordadas as principais análises térmicas que são utilizadas na determinação dos parâmetros termodinâmicos de formação dos complexos, com ênfase na análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), a qual foi utilizada no presente estudo.

Apesar de existirem muitos trabalhos relacionados à formação de complexos não foi constatado na literatura trabalhos a respeito da complexação da BLG com a carboximetilcelulose (CMC), a qual foi motivo de estudo deste trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados o material e os métodos utilizados no preparo das soluções biopoliméricas e nas análises subsequentes. No caso da proteína, em especial, foi necessária a determinação da sua concentração final em decorrência da formação de precipitado após o processo de centrifugação das soluções. A análise de calorimetria de titulação isotérmica foi a técnica empregada na avaliação dos complexos de proteína-polissacarídeos sob diferentes condições de pH, devido a sua rapidez de resposta, versatilidade e necessidade de uma pequena quantidade amostra. A análise de turbidimetria foi utilizada na avaliação da formação dos complexos com o objetivo de elucidar os resultados obtidos por ITC por ser uma técnica simples e de rápido retorno. Com o intuito de se avaliar a influência da temperatura na estrutura da proteína (BLG) e conseqüentemente, na interação da mesma com os polissacarídeos (CMC e pectina), a solução de BLG foi submetida a um tratamento térmico e posteriormente foi avaliada por meio das técnicas de dicroísmo circular e ITC.

3.1 Material

A β -lactoglobulina de leite bovino (pureza > 90%), a pectina de maçã de alto grau de esterificação (DE entre 70-75% e pureza > 90%), a carboximetilcelulose (pureza > 90%, MM ~ 250 000 e DS entre 0,8 – 0,95) e o β -caroteno tipo I (pureza de 93%) utilizados na formação dos complexos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich EUA. Todos os reagentes utilizados nas análises eram de grau analítico e foram armazenados conforme as instruções do fabricante.

No preparo dos sistemas em estudo, bem como das soluções tampão, foi utilizada a água tipo 1 (preparada em um sistema Milli-Q (*Millipore Corporation*®), a qual é necessária para uma quantificação sem a influência de impurezas. Nas diálises, foi utilizada uma membrana de 12 kDa (Sigma-Aldrich®).

Para o preparo dos tampões pH 3,0 e 4,0 foram utilizados os reagentes fosfato de sódio bibásico (Neon®) e ácido cítrico monohidratado (Vetec®). No caso, das soluções tampão pH 6,0 e 7,0, foram utilizados os sais fosfato de sódio

monobásico (Biotec ®) e fosfato de sódio bibásico (Neon ®). Todas as soluções tampão foram preparadas em uma concentração de 0,5 mol.L⁻¹.

3.2 Métodos

A influência do pH (3,0, 4,0, 6,0 e 7,0) nas interações da β -lactoglobulina com a carboximetilcelulose e com a pectina, foi estudada usando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e turbidez (τ). A análise de ITC foi usada para fornecer informações em relação às mudanças de entalpia associadas com as interações proteína-polissacarídeos. Além da análise de ITC, foi utilizada a análise de dicroísmo circular (CD), com o objetivo de avaliar a influência da temperatura na conformação e estabilidade da BLG sujeita à um tratamento térmico, assim como na formação dos complexos. A análise de turbidez foi usada para fornecer algumas informações sobre a composição dos complexos formados.

3.2.1 Preparo das soluções biopoliméricas

As soluções dos polissacarídeos (CMC e pectina) foram preparadas nas concentrações de 50 μ M (CMC) e 150 μ M (pectina). As soluções dos polissacarídeos foram agitadas constantemente em um agitador magnético a temperatura ambiente (25 °C) por 2h (CMC) e 3h (pectina) para a completa solubilização. De acordo com o fabricante a CMC possuía uma concentração de sódio entre 6,5 e 9,5 %. Para remover o excesso de sal e as possíveis impurezas, as soluções de pectina e CMC foram dialisadas em membrana de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra água tipo 1, por 24 h à 4 °C. Após a diálise, somente para as análises de ITC, as soluções dos polissacarídeos foram novamente dialisadas durante a noite contra a solução tampão (pH 3,0, 4,0, 6,0, ou 7,0) para equilibrar o pH e a força iônica das soluções (Girard *et al.*, 2003). O tampão da diálise foi preservado para os experimentos de ITC, bem como para ajustar a concentração das soluções durante os experimentos e para a solubilização da BLG na concentração inicial de 3000 μ M. A utilização do tampão proveniente da diálise se faz necessário para que todas as soluções possam estar nas mesmas condições e características termodinâmicas,

visto que diferenças de tampão interferem os resultados nos experimentos de ITC. As amostras foram centrifugadas a 14.103,57 g (14.500 rpm) usando uma centrífuga de tubos de polipropileno (Mini Spin Plus – Eppendorf). Alíquotas de 2 μ L da BLG centrifugada foram utilizadas para mensurar a sua concentração, usando um espectrofotômetro UV nas medidas de absorbância a 280 nm (NanoDrop 2000 - Thermo Scientific).

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura na conformação e estabilidade da BLG, e conseqüentemente, na interação com o polissacarídeo (CMC), uma das amostras da BLG foi submetida a um tratamento térmico a 68 °C por 50 minutos antes da análise de ITC em pH 4. Para confirmar os resultados obtidos no ITC, a mesma amostra foi analisada pela técnica de dicroísmo circular (CD).

Além da temperatura, foi avaliada também a influência da presença de um antioxidante (β -caroteno) na formação dos complexos proteína-polissacarídeo. O β -caroteno foi adicionado na solução de proteína (BLG) que foi titulada na solução de polissacarídeo (CMC), por meio da análise ITC em pH 4. A solução de β -caroteno foi preparada na concentração de 20 mM, utilizando álcool etílico absoluto (pureza de 99,8%) para a sua completa solubilização. Uma alíquota de 20 μ L da solução do carotenoide foi adicionada em 1,0 mL da solução de proteína previamente centrifugada.

3.2.2 Determinação da concentração da β -lactoglobulina por espectrofotometria

Pela praticidade e simplicidade, o método espectrofotométrico foi adotado para quantificar a concentração da β -lactoglobulina no presente estudo. Após o procedimento de centrifugação, as concentrações da proteína foram verificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 280 nm, sendo utilizadas alíquotas de 2 μ L, o coeficiente de extinção $\epsilon/1000 = 16,96 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e massa molar de 19,88 kDa. Os dados do coeficiente de extinção molar e massa molar da proteína foram obtidos do *software online* Protparam.

3.2.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Um calorímetro de titulação isotérmica (ITC 200, Microcal Inc., Northampton, EUA) foi utilizado para medir as variações de entalpia dos complexos de BLG e CMC/pectina em diferentes valores de pH (3,0, 4,0, 6,0 ou 7,0). Foram injetadas sequencialmente 38 alíquotas de 1 μL das soluções de BLG em 200 μL na solução de polissacarídeo (CMC ou pectina) contida na célula de titulação. A concentração da solução dos biopolímeros foi ajustada com o tampão preservado das diálises e variou em função do pH. Cada injeção teve uma duração de 2 s e um intervalo de 150 s entre as sucessivas injeções. A temperatura da solução da célula de titulação foi mantida a 25 °C e a solução foi agitada a 300 rpm em todos os experimentos para assegurar a homogeneização do sistema durante as titulações. As medidas de ITC foram conduzidas em duplicata e os resultados foram reportados como a média das titulações. O calor de diluição da titulação do branco da BLG com a solução tampão foi subtraída dos dados brutos. Os resultados foram reportados com a variação da entalpia igual em kcal por mol de BLG injetada na célula de reação. O *software* Microcal ORIGIN 7.0 ® do ITC foi utilizado para o tratamento dos dados coletados.

3.2.4 Medidas de turbidez versus pH

A dependência da turbidez (τ) das misturas das soluções biopoliméricas dialisadas em relação ao pH foi analisada de acordo com Ru *et al.* (2012), usando um espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu UV, 1800). As cubetas das amostras eram compostas de quartzo e possuíam um caminho ótico de 1 cm. O espectrofotômetro foi calibrado para medir 100% de transmitância (T) com água tipo 2. A turbidez foi dada em porcentagem e definida pela Eq. 2.

$$\tau = 100 - T(\%) \quad (2)$$

Foi utilizada uma solução de HCl 0,1 M para ajustar o pH da mistura das soluções de BLG (3000 μM) e pectina (50 μM) ou CMC (50 μM) numa razão de 1:10 (proteína:polissacarídeo). Após a adição de um pequena alíquota da solução de HCl,

a transmitância foi medida, e o pH foi monitorado com um pHmetro Oakton (Modelo 11 series, Singapura) calibrado com três tampões de pH 4, 7 e 10. Todas as soluções foram agitadas em vórtex antes das medidas de turbidez e pH. Os experimentos foram realizados a temperatura de 25 °C e repetidos duas vezes e os resultados foram apresentados como a média e amplitude.

3.2.5 Tratamento térmico

Com a finalidade de se avaliar o efeito da temperatura na estrutura da proteína e conseqüentemente na interação com os polissacarídeos, foi realizado um tratamento térmico na solução de BLG 3000 µM. Para tanto, alíquotas de 1,0 mL das soluções de BLG, solubilizadas em tampão citrato fosfato pH 4,0, foram acondicionadas em tubos de polipropileno (Eppendorf). Os tubos foram colocados em banho termostaticado com agitação mecânica (Dubnoff - Ethiktechnology) previamente aquecido à 68 ± 1 °C e foram retirados após 50 minutos (BAEZA & PILOSOFF, 2002). Na seqüência, as soluções foram resfriadas em temperatura ambiente (25 °C) e conduzidas para as análises de ITC e dicróismo circular.

3.2.6 Dicroísmo circular

O espectropolarímetro CD (J-815, Jasco International CO., Tokyo, Japan) equipado com uma unidade de controle de temperatura foi usado para avaliar a conformação e estabilidade da BLG após o tratamento térmico (68 °C por 50 min) em comparação com a BLG sem aquecimento. Os espectros foram obtidos usando cubetas de quartzo com caminho ótico de 0,01 cm e 1 cm de largura. O nitrogênio foi utilizado como gás de purga em um fluxo de 10 L.min⁻¹. A concentração de BLG utilizada nos experimentos foi de 0,385 mg.mL⁻¹ em pH 4. A elipticidade média dos resíduos (MRE) foi calculada utilizando um massa molecular de 19,883 kDa e um número de resíduos igual a 178 (Fonte: Sigma-Aldrich) (MATSUURA & MANNING, 1994) usando a relação da Eq. 1.

$$\text{MRE} = \frac{\theta \times 100 \times}{C \times l \times n} \quad (1)$$

Onde θ é o grau de elipticidade (deg), l é o comprimento ótico (cm), C é a concentração (mg/ml), M é o massa molecular (kDa) e n é o número de resíduos na proteína. A elipticidade residual molar média (MRE) é dada em $\text{deg.cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (CORRÊA & RAMOS, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do pH nas interações da β -lactoglobulina com a carboximetilcelulose e com a pectina foram estudadas usando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e turbidimetria (τ). A análise de ITC foi usada para fornecer informações em relação às mudanças de entalpia associadas com as interações proteína-polissacarídeos (seção 3.2.3). A análise de turbidez foi usada para confirmar as informações obtidas pela análise de ITC referentes à formação dos complexos proteína-polissacarídeo (seção 3.2.4).

4.1 Concentração das soluções em função do pH

Todas as soluções de β -lactoglobulina (BLG) foram preparadas inicialmente na concentração de 3000 μM . Após a centrifugação houve uma alteração nas concentrações das soluções da proteína em função do pH em que estavam acondicionadas. No pH 7 não foi observada a formação de precipitado e a concentração da BLG foi mantida ($2986,70 \pm 3,19 \mu\text{M}$). No pH 6, houve uma pequena formação de precipitado após a centrifugação e a concentração final ficou em torno de 2002 μM . No pH 3 e no pH 4 a formação do precipitado foi mais evidente. Sendo que no pH 4 foi observada a menor concentração de proteína após a centrifugação ($593,41 \pm 1,48 \mu\text{M}$). Provavelmente, isso se deve ao fato de que nesta faixa de pH a proteína se encontra muito próxima ao seu ponto isoelétrico (pI teórico de 4,93 segundo o *software online* ProtParam) e a carga líquida tende a ser mínima reduzindo a sua solubilidade e fazendo com que ocorra o processo de precipitação.

Esta diferença das concentrações pode ser explicada pelo fato de que a BLG se apresenta em diferentes estruturas quaternárias, dependendo das condições ambientais onde está inserida. Na faixa de pH entre 3-5, ela pode estar na forma de um octâmero por meio da associação dos dímeros, o que facilita o processo de precipitação da proteína pois possuem menores superfícies para a interação com a água. Na faixa de pH entre 5-8 a BLG pode se apresentar como um dímero, e como um monômero em pH acima de 8 e abaixo de 2, sendo que as unidades monoméricas são idênticas (VERHEUEL *et al.*, 1999). Na faixa de pH entre 9 e 13,

ocorre a desnaturação induzida da proteína (CASAL *et al.*, 1988; TAULIER & CHALIKIAN, 2001). Consequentemente, a interação da BLG com o meio depende de suas estruturas quaternárias, uma vez que quanto menor a estrutura, no caso monômero, maior é a superfície de interação com as soluções de tampão o que aumenta a sua solubilidade.

Em decorrência dessas diferenças de estruturas bem como das cargas líquidas dos biopolímeros estudados, a interação da BLG com os polissacarídeos também variou, sendo necessária a adaptação da concentração tanto das soluções de CMC quanto das soluções de pectina em toda a faixa de pH estudada. As concentrações utilizadas nos experimentos de ITC e as respectivas razões proteína:polissacarídeo estão descritas da TABELA 5.

TABELA 5 - DEPENDÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE BLG, CMC E PECTINA EM FUNÇÃO DO pH.

	BLG (μM)	CMC (μM)	*BLG:CMC	Pectina (μM)	*BLG:Pectina
pH 3,0	2742,21 \pm 9,89	10	274:1	75	37:1
pH 4,0	593,41 \pm 1,48	2,5	237:1	10	59:1
pH 6,0	2001,83 \pm 18,74	50	40:1	150	13:1
pH 7,0	2986,70 \pm 3,19	5	597:1	15	199:1

* Razão aproximada da proteína: polissacarídeo referente às concentrações iniciais das soluções biopoliméricas utilizadas nos experimentos de ITC.

4.2 Avaliação do efeito do pH na formação dos complexos de proteína-polissacarídeo por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

O propósito das análises de ITC foi avaliar a influência do pH (3, 4, 6 e 7) nas mudanças de entalpia de interação da β -lactoglobulina com CMC e com pectina sob as diferentes condições de pH. No decorrer das análises, foram utilizadas pequenas injeções de 1 μL (total de 38 injeções) conforme descrito na seção 3.2.3.

Na FIGURA 13 encontra-se ilustrada uma curva típica de ITC, obtida da titulação do titulante (BLG) com o receptor (CMC). No topo da figura encontra-se a curva referente ao calor ($\mu\text{cal/s}$) liberado após a injeção da BLG na célula contendo

a CMC. A parte inferior da figura refere-se à variação de entalpia (ΔH) que envolve a formação dos complexos. A razão molar da interação da proteína (BLG) em relação ao polissacarídeo, neste caso a CMC, é dada quando a saturação do sistema é atingida, ou seja, no primeiro ponto da curva onde a energia liberada na célula é igual a zero ($\Delta H = 0$) (Girard *et al.*, 2003). Neste caso, a razão de BLG:CMC é de aproximadamente 25:1. Os resultados revelaram que a complexação da proteína com os polissacarídeos é exotérmica porque em todos os experimentos foi observada a liberação de energia ($\Delta H < 0$) após cada injeção. De acordo com Ou & Muthukumar (2006), isto ocorre porque a formação de complexos entre polieletrólitos fracamente carregados é dirigida por uma entalpia negativa devido à atração eletrostática que ocorre entre as duas moléculas carregadas opostamente.

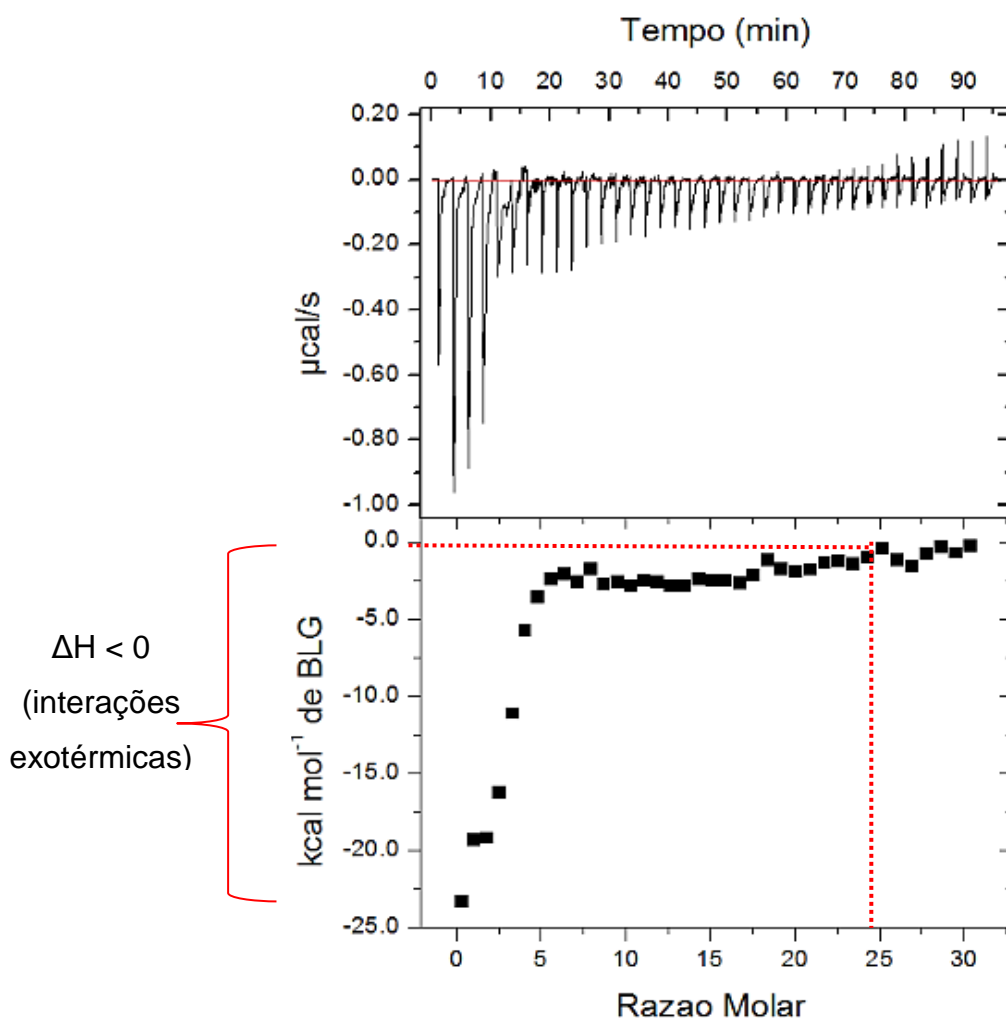


FIGURA 13 - EXEMPLO ILUSTRATIVO DAS CURVAS OBTIDAS NA ANÁLISE DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO OBTIDOS DA INTEGRAÇÃO DE CADA INJEÇÃO (PARTE INFERIOR).

De acordo com os resultados obtidos o pH 3 foi o que apresentou as maiores entalpias de ligação (FIGURA 14). No caso da interação da BLG-pectina (FIGURA 14A), a intensidade dos sinais foi prejudicada devido à alta concentração da pectina, que aumentou a viscosidade do sistema e reduziu a dispersão da proteína na célula. Com isso, o equilíbrio térmico entre as injeções reduziu drasticamente e ocorreram desvios na linha de base (GIRARD et al., 2003). Os dados de ITC sugerem que existe uma forte interação com entalpia negativa entre a proteína e a CMC e a pectina na primeira injeção com uma variação de entalpia de cerca de $-24 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para a CMC e de $-16 \text{ Kcal mol}^{-1}$ no caso da pectina.

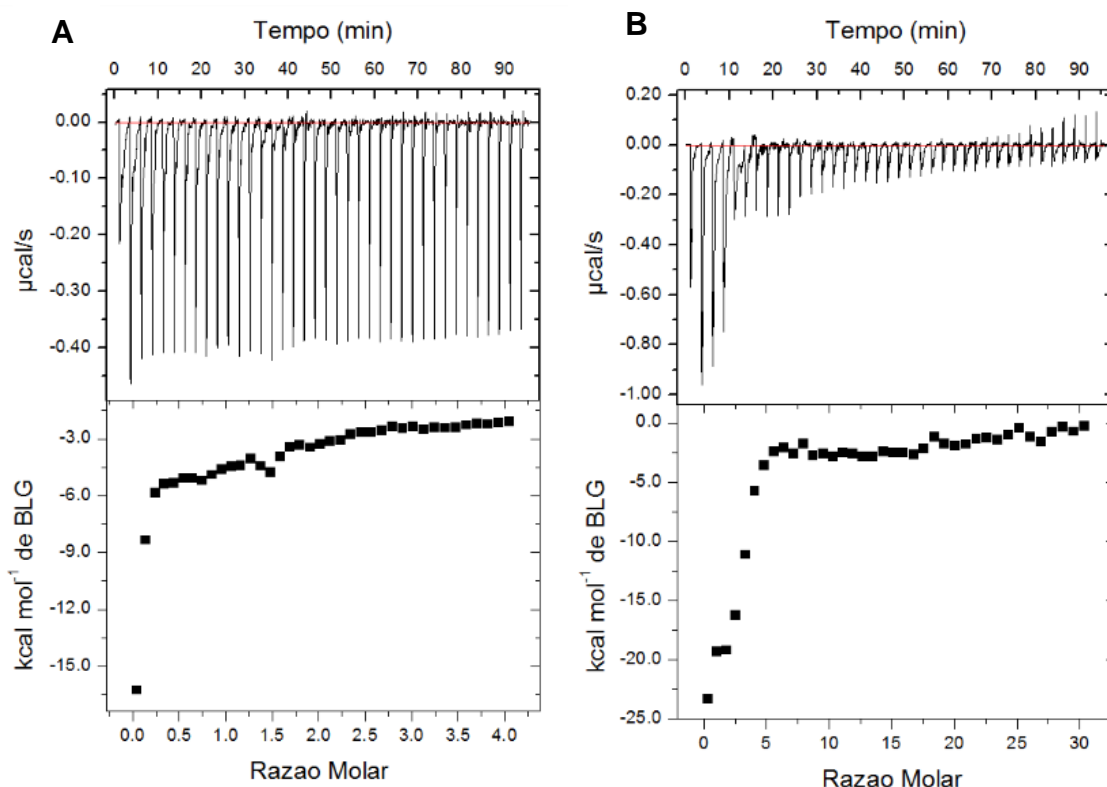


FIGURA 14 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG ($2742 \mu\text{M}$) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA ($75 \mu\text{M}$) E DE (B) CMC ($10 \mu\text{M}$) NO pH 3,0 À $25 \text{ }^\circ\text{C}$. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

No pH 4, a saturação do sistema composto pela BLG com a CMC (FIGURA 15B) e com a pectina (FIGURA 15A) foi atingida, já que a energia liberada pela célula foi praticamente nula após ~ 20 injeções ($\Delta H \sim 0 \text{ Kcal mol}^{-1}$). A razão molar de saturação do complexo BLG/CMC foi de aproximadamente 70:1 e de 13:1 para o sistema BLG/pectina. Nestas condições, a interação da CMC com a proteína

apresentou uma entalpia aproximadamente duas vezes maior, cerca de -4 Kcal mol^{-1} , do que a encontrada para a interação da BLG-pectina, de aproximadamente -2 Kcal mol^{-1} . Além disso, neste pH foi necessária uma concentração menor de polissacarídeo para que houvesse a interação. Isto pode ter ocorrido pelo fato de que nesta condição a carga negativa dos polissacarídeos é maior quando comparada com sua carga nos demais valores de pH e, também porque existem mais sítios de ligação disponíveis para as moléculas de proteína que está carregada positivamente (HARNSINALAWAT *et al.*, 2006). Girard *et al.* (2003) encontraram uma razão molar de BLG: pectina de 26:1, para a pectina de baixa metoxilação, e de 24:1 para a pectina de alta metoxilação, em pH 4 (tampão fosfato 5 mM). Esta diferença em relação aos resultados obtidos neste trabalho quando comparados com os resultados da literatura, pode ser explicada devido à diferenças no procedimento de extração, na fonte de obtenção e na localização da pectina no tecido da planta, os quais são fatores consideráveis nas propriedades físico-químicas da pectina (BARRERA *et al.*, 2002).

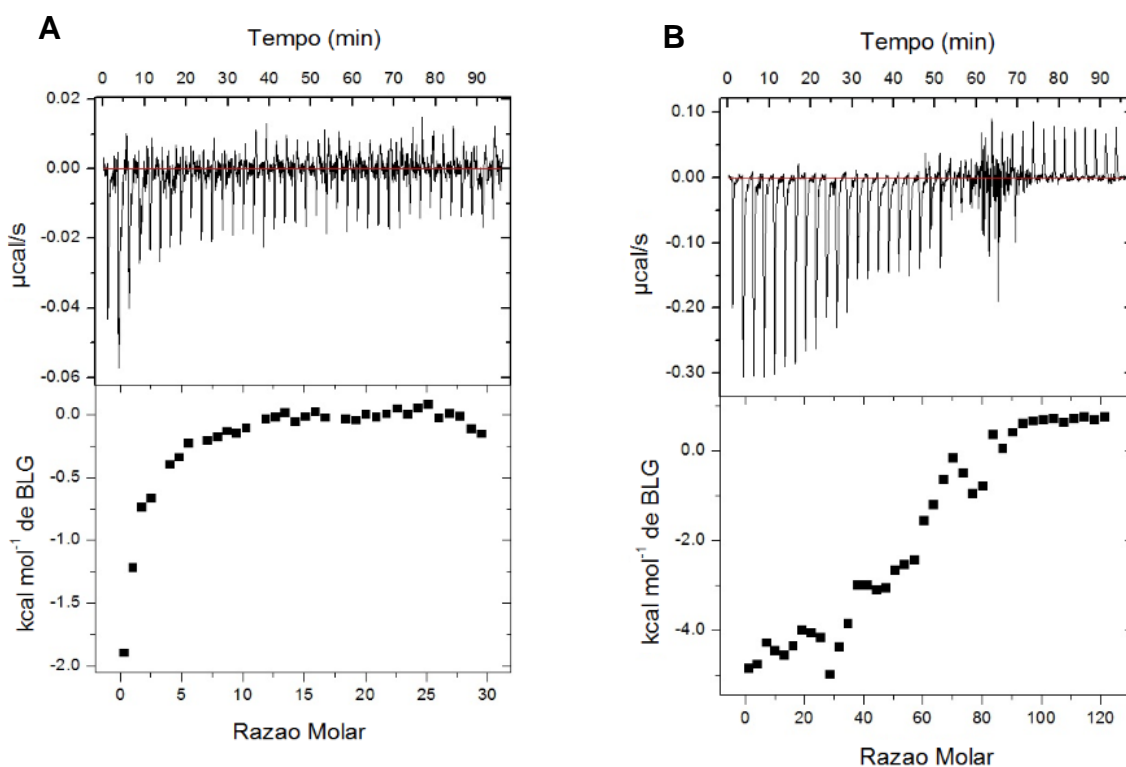


FIGURA 15 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (10 μM) E DE (B) CMC (2,5 μM) NO pH 4,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

No pH 6, foi observada uma pequena mudança de entalpia quando a solução de BLG foi titulada nas soluções CMC/pectina (FIGURA 16). Esta pequena interação entre as biomoléculas se deve ao fato de que ambas são carregadas negativamente neste valor de pH o que faz com que haja uma forte repulsão eletrostática entre elas (HARNSINALAWAT *et al.*, 2006). Da mesma forma, no pH 7 (FIGURA 17) as interações entre a BLG e os polissacarídeos foram praticamente inexistentes como pode-se observar nas isotermas de ligação onde os pontos aparecem de forma dispersa e com uma entalpia de baixa magnitude.

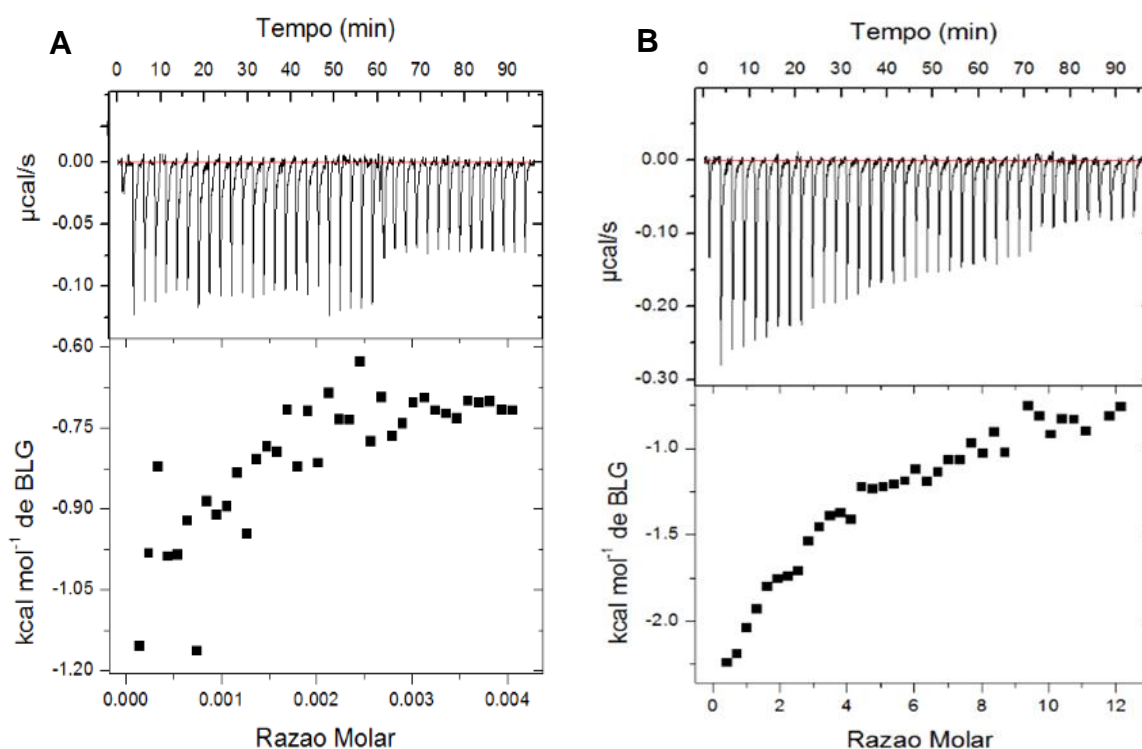


FIGURA 16 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (2002 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (150 μM) E DE (B) CMC (50 μM) NO pH 6,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

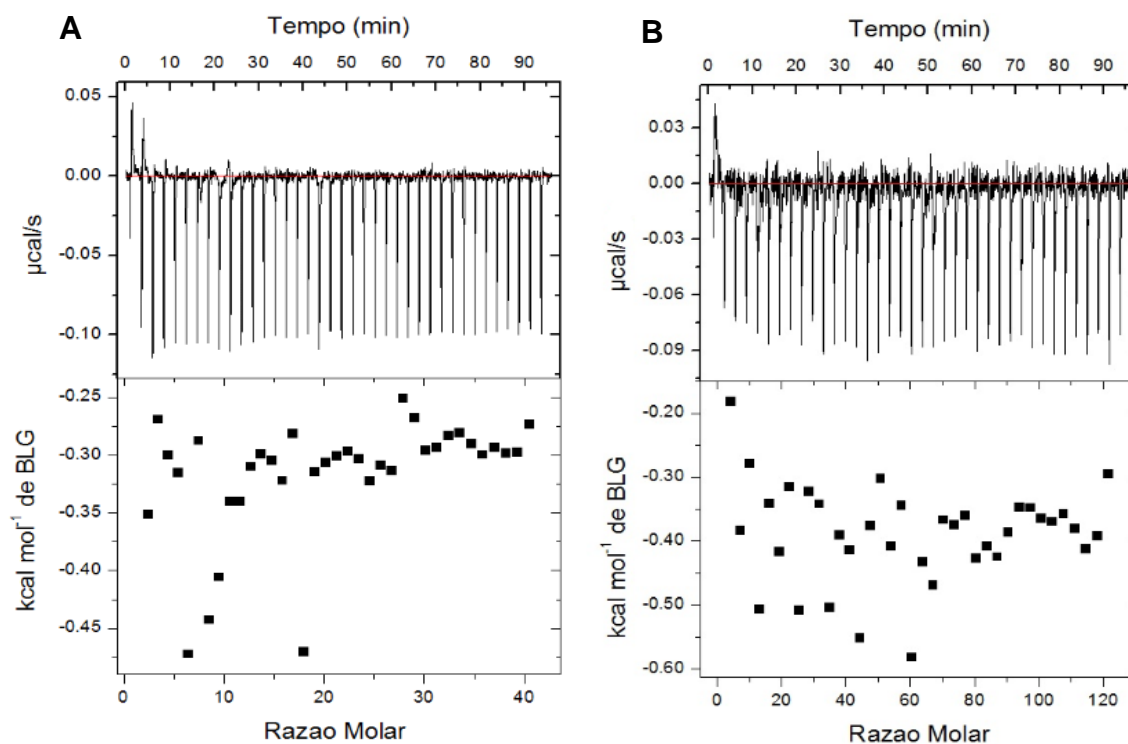


FIGURA 17 - CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (2987 μM) NAS SOLUÇÕES DE (A) PECTINA (15 μM) E DE (B) CMC (5 μM) NO pH 7,0 À 25 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

Os resultados obtidos nas análises de ITC evidenciaram a dependência do pH na interação da proteína com ambos os polissacarídeos. Após o término das titulações foi observada a formação de um precipitado nos valores de pH 3 e 4, a qual não foi notada nos valores de pH 6 e 7. Esta formação de precipitado indica que ocorreu a complexação da proteína com o polissacarídeo. Comparando-se os dois polissacarídeos em todos os experimentos, pode-se observar uma maior afinidade da BLG com a carboximetilcelulose, já que esta apresentou as maiores variações de entalpia quando comparada a pectina. Para compreender melhor a formação dos complexos frente os diferentes valores de pH estudados, foi realizada a análise de turbidez (seção 4.3).

4.3 Turbidez

O impacto do pH nas soluções de proteína-polissacarídeo (razão molar de 1:10) foi medido por meio da análise de turbidimetria em temperatura de 25 °C. Ambas as soluções de polissacarídeos foram preparadas na concentração de 50 μM com a finalidade de comparar o comportamento da CMC e a pectina frente às mesmas condições. A β -lactoglobulina (BLG) foi preparada na mesma condição inicial (3000 μM) proposta para a análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A solução de BLG/CMC (1:10) apresentou pH inicial em torno de 7,1 e turbidez próxima de 0% (FIGURA 18B), visto que ambas as soluções isoladas eram translúcidas. A solução de BLG/pectina (1:10) apresentou pH inicial próximo de 4,8, sendo necessário o ajuste do pH para em torno de 7,7 com solução de NaOH 0,5 M antes do início das leituras de turbidez. Como a solução de pectina apresentava coloração caramelo, a turbidez inicial da mistura apresentou um valor em torno de 20% (FIGURA 18A).

Ambas as soluções de proteína-polissacarídeos apresentaram-se visivelmente claras, com baixos valores de turbidez acima do pH 5 (FIGURA 18). De acordo com Jones *et al.* (2010), isto ocorre porque tanto a proteína quanto o polissacarídeo estão carregados negativamente nesta faixa de pH e ocorre uma repulsão eletrostática que dificulta o processo de complexação.

À medida que o pH diminuiu, até próximo de 3, a turbidez aumentou progressivamente podendo-se perceber a formação de uma dispersão coloidal turva das amostras, o que indica que os complexos foram formados e que foram suficientemente grandes para desviar a luz. Na faixa de pH entre 5 e 3, os agregados de proteína-polissacarídeos são formados pela atração eletrostática dos grupos catiônicos da superfície proteica com os grupos aniônicos dos polissacarídeos (GIRARD *et al.* , 2003; JONES & McCLEMENTS, 2011). Esses resultados corroboram com as análises de ITC, onde claramente percebeu-se uma maior interação das biomoléculas no pH 3 e no pH 4 quando comparada ao pH 6 e pH 7.

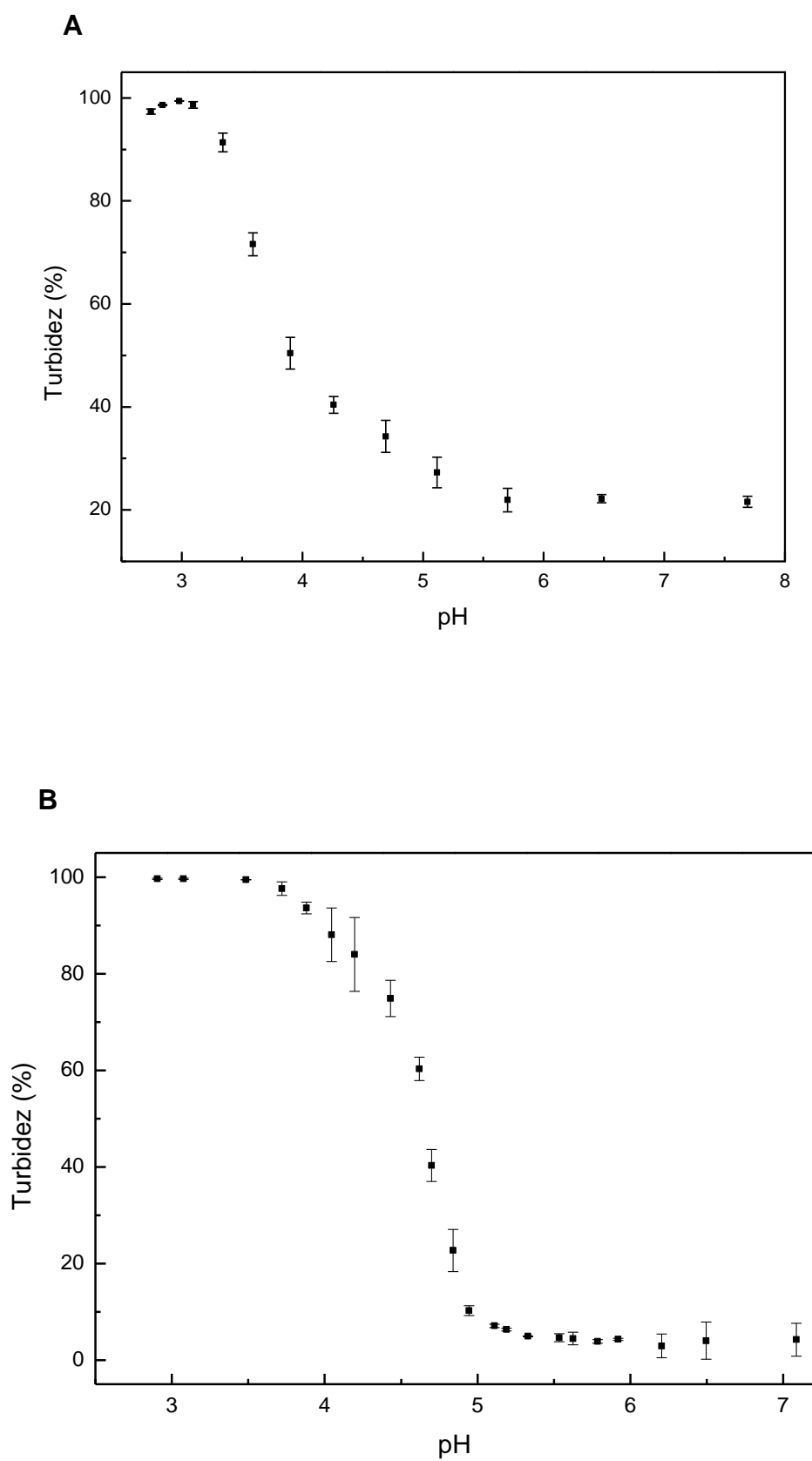


FIGURA 18 – DEPENDÊNCIA DA TURBIDEZ (A 600 nm) EM FUNÇÃO DO pH DA MISTURA DE BLG/PECTINA (A) E DA MISTURA DE BLG/CMC (B), AMBAS NA RAZÃO DE MISTURA DE 1:10. AS BARRAS INDICAM A AMPLITUDE DAS DUPLICATAS.

4.4 Efeito do tratamento térmico na interação da BLG com a CMC

Foi realizado um teste preliminar empregando-se um tratamento térmico a $82 \pm 1^\circ\text{C}$ por 50 minutos na solução de BLG, visto que a temperatura de desnaturação da BLG em torno do pH 4 é acima de 80°C (Jones *et al.*, 2010b). Porém após o tratamento térmico verificou-se a formação de um precipitado que compreendia toda a alíquota da solução de BLG inserida no tubo de polipropileno. Mesmo após a centrifugação, a separação do precipitado e do sobrenadante não foi possível. Desta forma, optou-se por dar continuidade no estudo utilizando-se o tratamento à 68°C por 50 minutos.

Sendo assim, a BLG foi submetida a um tratamento térmico a $68 \pm 1^\circ\text{C}$ por 50 minutos com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura na sua conformação e estabilidade e, conseqüentemente, nas interações com os polissacarídeos. Neste experimento, optou-se por escolher as melhores condições de interação tanto em relação ao tipo de polissacarídeo quanto ao pH. Portanto, o experimento foi realizado em pH 4 utilizando-se a CMC.

De acordo com os resultados obtidos, não houveram modificações nas interações entre as biomoléculas durante as titulações calorimétricas isotérmicas (FIGURA 19). Em ambos os casos a razão molar BLG:CMC foi de aproximadamente 65:1 e a variação de entalpia foi exotérmica, com um valor em torno de $-4,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ na primeira injeção. Com base nestes resultados, pode-se dizer que o tratamento térmico empregado não foi suficiente para causar modificações na estrutura da proteína.

Isto ocorre porque a estruturação proteica é um processo cooperativo, onde há interações intramoleculares responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da proteína. Esta estrutura é mantida até o instante em que ocorre a quebra de uma ligação determinante no processo de desnaturação. A partir daí, quebram-se todas as outras ligações e rapidamente se atinge a desnaturação da proteína, ocorrendo a sua perda de atividade biológica (MELO *et al.*, 1997). O grau de cooperatividade no processo de desnaturação é dependente do pH (quanto maior o grau de cooperatividade maior é a resistência da proteína ao processo de desnaturação) e é máximo em torno do ponto isoelétrico da proteína ($pI_{\text{(teórico, BLG)}} = 4,93$), onde a carga líquida da proteína é mínima. No pH próximo a 4, o grau de cooperatividade da BLG é máximo, conseqüentemente, a temperatura de

desnaturação térmica ($\sim 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a estabilidade térmica da proteína também são máximas (LIU *et al.*,1994).

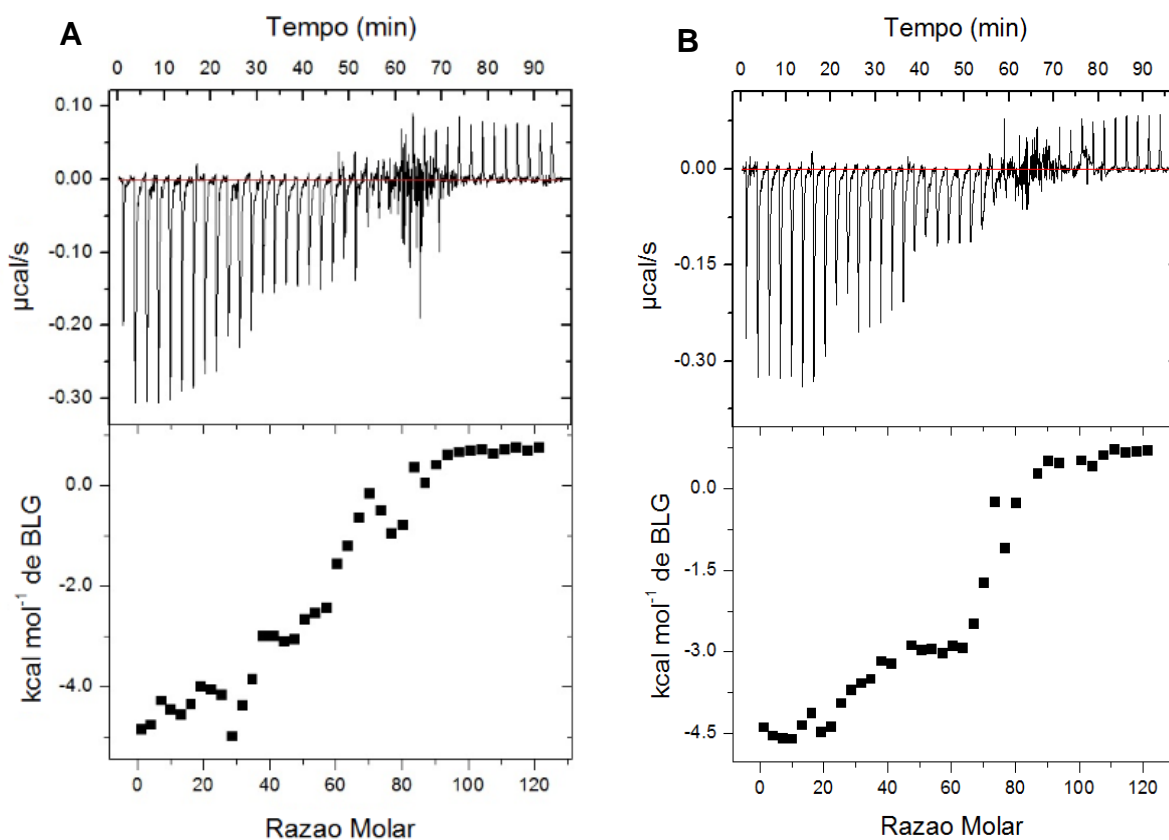


FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG ($593\text{ }\mu\text{M}$) (A) SEM AQUECIMENTO E (B) SUBMETIDA AO TRATAMENTO TÉRMICO DE $68\text{ }^{\circ}\text{C}/50\text{ MIN}$ NAS SOLUÇÕES DE CMC ($2,5\text{ }\mu\text{M}$) EM $\text{pH } 4,0$ À $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

4.5 Dicroísmo circular (CD)

A técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD) foi utilizada com o objetivo de fornecer informações referentes à conformação e estabilidade da BLG em $\text{pH } 4$ após o tratamento térmico da mesma a $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos.

A FIGURA 20 mostra a curva obtida após a varredura ($190\text{--}250\text{ nm}$) das amostras da BLG que passou por tratamento térmico em comparação com a BLG que não sofreu aquecimento. Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que o tratamento térmico empregado não foi suficiente para causar mudanças na estrutura

da proteína. Estes resultados corroboram com a análise de ITC, os quais não apresentaram diferenças nas interações da proteína termicamente tratada (68 °C/50 min) com a carboximetilcelulose quando comparada à BLG sem aquecimento (FIGURA 19).

De acordo com Côrrea & Ramos (2009), o espectro obtido neste experimento (FIGURA 20) é típico de uma proteína β -folha, com uma banda negativa entre 210 e 220 nm e uma banda positiva na faixa de 205 e 190 nm. Sendo que, a principal característica estrutural secundária da BLG é a predominância de uma série de β -folhas antiparalelas (MONACO *et al.*, 1987; PAPIZ *et al.*, 1986), com pouca ou nenhuma mudança conformacional na faixa de pH entre 2,75 - 6,4 (SU & JIRGENSONS, 1977), e um máximo negativo entre 216 e 218 nm (MATSUURA & MANNING, 1994; TAULIER & CHALIKIAN, 2001).

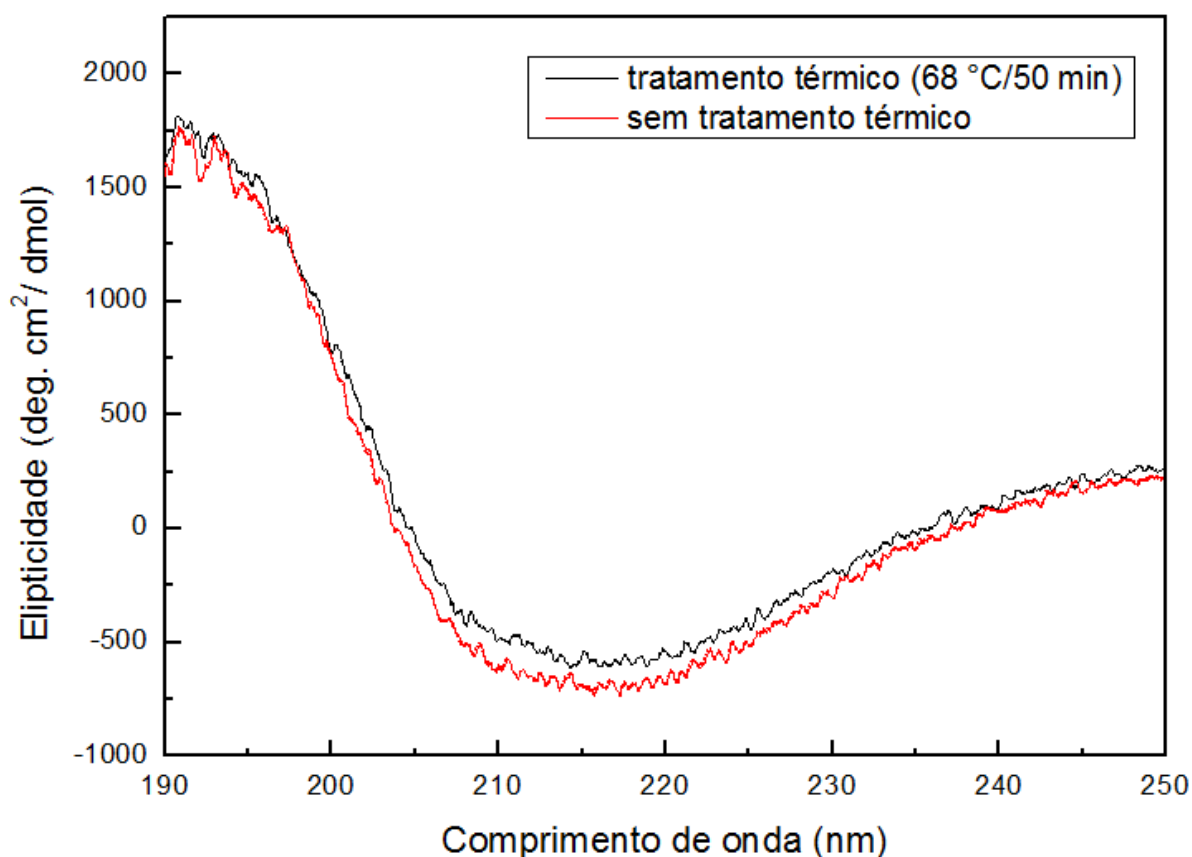


FIGURA 20 - VARREDURA (190 – 250 NM) DO ESPECTRO DE UV-CD DA B-LACTOGLOBULINA APÓS TRATAMENTO TÉRMICO À 68 °C POR 50MIN E SEM AQUECIMENTO EM pH 4.

4.6 Efeito da presença do β -caroteno na complexação da BLG com os polissacarídeos (CMC ou pectina)

A influência da presença do β -caroteno na interação com os polissacarídeos também foi avaliada pela técnica de ITC. Da mesma forma que se procedeu para a avaliação da influência da temperatura na conformação da BLG, bem como na formação dos complexos, optou-se por escolher o pH 4 e as mesmas concentrações de polissacarídeos utilizadas no experimento referente a este pH. Portanto, as concentrações da CMC e pectina foram de 2,5 μ M e 10 μ M, respectivamente.

As Figuras 21 e 22 ilustram a comparação das titulações com e sem a presença do β -caroteno na BLG. Com base nos resultados obtidos foi possível perceber a influência da adição do antioxidante (β -caroteno) na variação de entalpia dos sistemas estudados. A saturação do sistema não foi completa tanto para a CMC quanto para a pectina, visto que em ambos os sistemas a variação da entalpia não se aproximou de zero. Conseqüentemente, pode-se dizer, em ambos os casos, que são necessárias mais moléculas de BLG e β -caroteno (FIGURAS 21B e 22B) para que ocorra a completa saturação do sistema proteína-polissacarídeo, quando se compara com apenas a BLG em solução (FIGURAS 21A e 22A). Provavelmente, isso ocorre porque quando a BLG se liga ao carotenoide, sobram menos sítios de ligações disponíveis para as interações com os polissacarídeos.

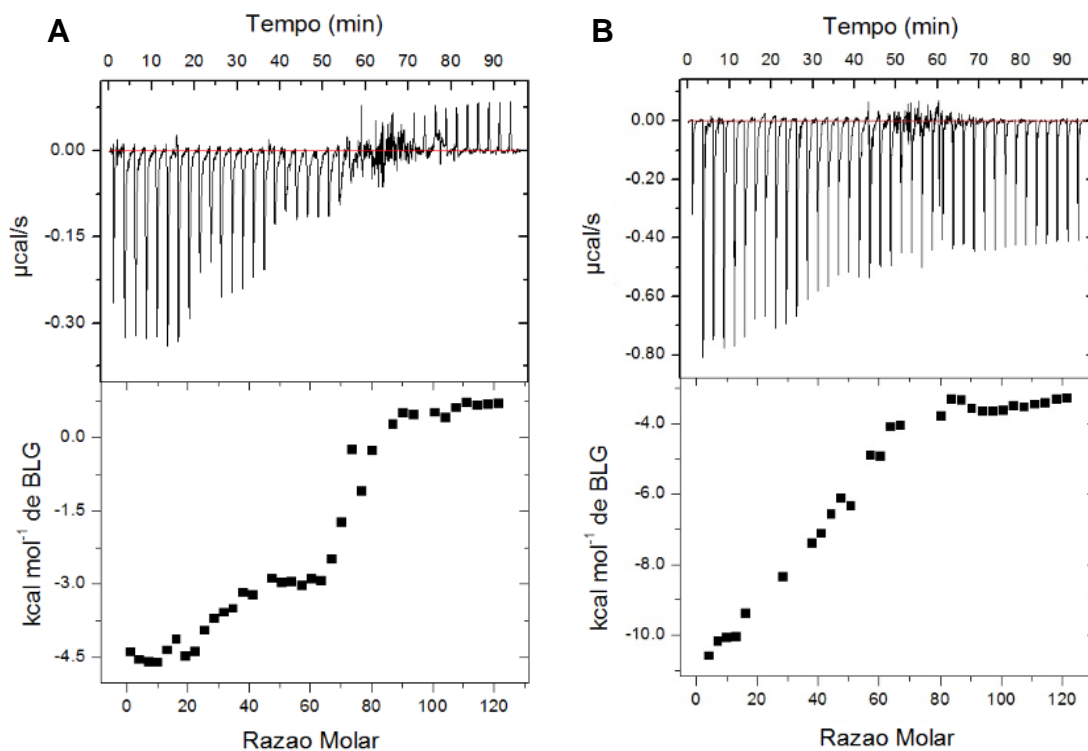


FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG (593 µM) (A) SEM β-CAROTENO E (B) COM β-CAROTENO NA SOLUÇÃO DE CMC (2,5 µM) EM pH 4,0 À 25 °C. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

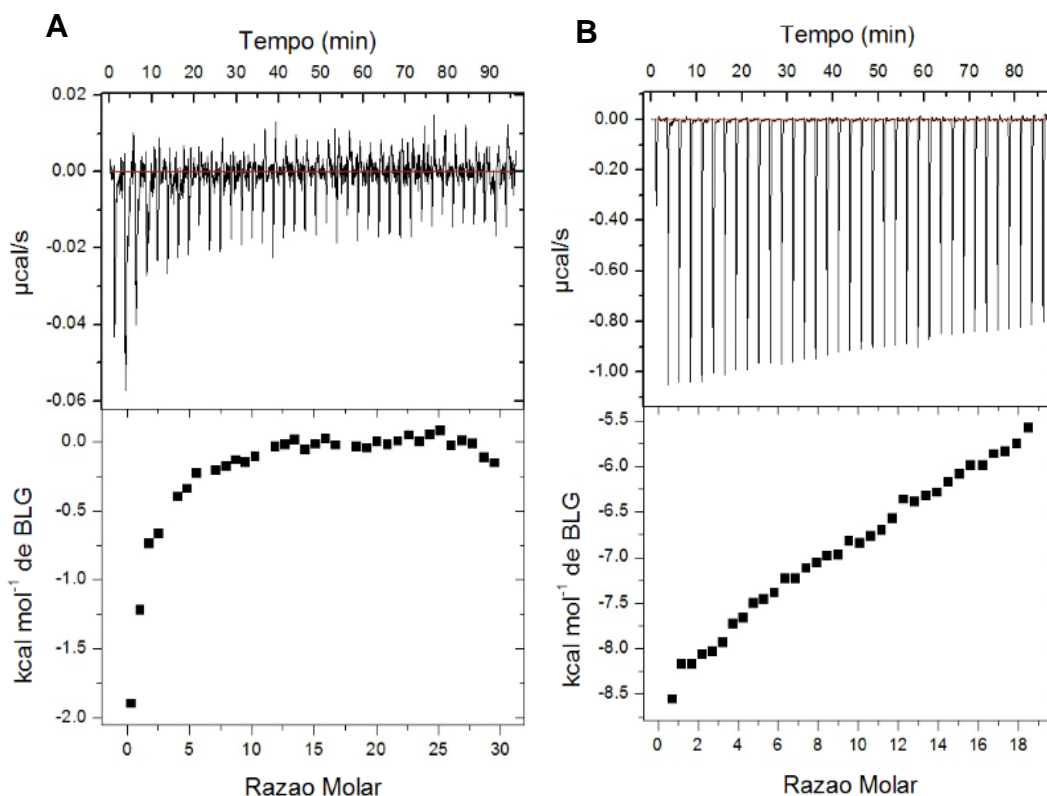


FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ITC (TOPO) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (PARTE INFERIOR) CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BLG ($593 \mu\text{M}$) (A) SEM β -CAROTENO E (B) COM β -CAROTENO NA SOLUÇÃO DE PECTINA ($10 \mu\text{M}$) EM pH 4,0 À 25°C . OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

De acordo com Dufour e Haertlé (1991), a BLG possui uma grande afinidade de ligação com o β -caroteno devido presença do sítio de ligação β -barril, o qual permite a interação com moléculas hidrofóbicas. Em seu trabalho eles encontraram a razão molar de β -caroteno e BLG de 1:2. Esta razão molar pode ser explicada pelo fato de que o β -caroteno possui dois ciclos β -ionona em sua extremidade, unidos por uma cadeia de isoprenóides, que pode interagir ao mesmo tempo com duas moléculas de BLG.

Com a finalidade de analisar a interação da BLG com o β -caroteno, foi realizada uma titulação do carotenoide (β -caroteno) contra a proteína (BLG) no ITC, porém sem sucesso. Neste experimento injeções de β -caroteno (solubilizado em etanol absoluto) foram tituladas na BLG (solubilizada em água) presente na célula. Devido à incompatibilidade dos solventes necessários para solubilizar ambas as moléculas, os resultados obtidos apresentaram desvios na linha de base e sofreram interferência devido à liberação de calor quando o álcool (solvente do β -caroteno) era titulado na água (solvente da BLG).

Os resultados obtidos neste experimento indicam a possibilidade de utilizar a BLG como material encapsulante do β -caroteno. Esta possibilidade da utilização da BLG como agente encapsulante foi verificada no trabalho de Mensi *et al.* (2013), onde se concluiu que a BLG possui características importantes no processo de encapsulação, pois exerce a função tanto de agente de proteção quanto de agente de liberação do carotenoide. Por conseguinte, esta propriedade de ligante com nutrientes que a BLG possui, tais como vitaminas e antioxidantes, é uma ferramenta útil no desenvolvimento de alimentos funcionais (Liang *et al.*, 2011).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho investigou-se a interação da BLG com os polissacarídeos CMC e pectina, separadamente, em diferentes condições de pH (3, 4, 6 e 7). Além disso, verificou-se a influência do tratamento térmico na conformação da BLG e, conseqüentemente, na formação dos complexos, bem como a influência da presença do β -caroteno no processo de complexação. Os resultados obtidos neste estudo forneceram informações relevantes para a aplicação industrial destes complexos.

Com base nos resultados obtidos nas análises de ITC, pode-se concluir que no pH 3 e no pH 4 existe uma maior interação entre a β -lactoglobulina e os polissacarídeos (CMC ou pectina) quando comparado ao pH 6 e 7. Esta maior interação foi observada nas isotermas de ligação que apresentaram uma maior variação de entalpia. Isso ocorre devido a atração eletrostática existente nesta faixa de pH, entre os grupos catiônicos da superfície proteica e os grupos aniônicos dos polissacarídeos e, assim os complexos proteína-polissacarídeo são formados. Os dados obtidos na análise de turbidez confirmam os resultados obtidos por ITC. Visto que, a partir do pH 5 até próximo ao pH 3, a turbidez aumentou progressivamente, concluindo-se assim, que houve a formação dos complexos, os quais foram suficientemente grandes para causar o desvio da luz.

O efeito da temperatura na conformação da BLG, o qual pode influenciar na formação dos complexos, também foi avaliado por ITC. Conforme observado nos termogramas não houveram alterações na interação da BLG com a CMC no pH 4. Os resultados da análise de dicroísmo circular demonstraram que o tratamento térmico empregado (68 °C por 50 min) não foi suficiente para modificar a estrutura secundária da proteína. Estes dados são relevantes, por exemplo, em um processo industrial onde é necessário o emprego de temperatura, tal como uma pasteurização lenta (62-65 °C por 30 min). Mesmo após o tratamento térmico, a proteína não apresentou alterações na sua estrutura e nas propriedades físico-químicas estudadas.

Da mesma forma, a análise de ITC foi empregada para avaliar o efeito da presença do β -caroteno, adicionado na solução de BLG, na formação dos complexos com CMC. Os resultados evidenciaram a redução da interação da BLG com o polissacarídeo, devido, provavelmente, à redução de sítios de ligação na

proteína ocasionada pela presença do antioxidante. Os resultados evidenciaram a grande afinidade de ligação da BLG com o β -caroteno em razão da presença do sítio de ligação β -barril, o qual permite a interação com pequenas moléculas hidrofóbicas, como é o caso do β -caroteno.

Portanto, foi possível comprovar a influência do pH na formação dos complexos BLG e CMC/pectina, por meio das técnicas de ITC e turbidimetria. Pode-se concluir também, que ambas as técnicas são adequadas para o estudo destes sistemas, pois fornecem informações que auxiliam na avaliação e conhecimento dos parâmetros que envolvem a formação destes complexos, proporcionando o dimensionamento e a viabilização do seu processo de fabricação.

Sendo assim, o estudo realizado embora seja muito fundamental, sugere que os complexos obtidos da interação da BLG com a CMC/pectina podem ser aplicados em sistemas alimentares, tais como na encapsulação de compostos bioativos, como no caso do β -caroteno; na estabilização de emulsões, uma vez que a BLG possui interação tanto com moléculas hidrofóbicas (β -caroteno) quanto com moléculas hidrofílicas (polissacarídeos). E, além dessas aplicações, as propriedades físico-químicas destes sistemas também possibilitam o seu emprego na produção de biofilmes, vencendo-se em primeiro momento os problemas tecnológicos inerentes a este processo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERKANE, L.; JASNIEWSKI, J.; GAIANI, C.; HUSSAIN, R.; SCHER, J.; SANCHEZ, C. Structuration mechanism of β -lactoglobulin e acacia gum assemblies in presence of quercetin. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 9-20, 2012.

AL-KADDAHA, S.; REDER-CHRIST, K.; KLOCEK, G.; WIEDEMANN, I.; BRUNSCHWEIGER, M.; BENDAS, G. Analysis of membrane interactions of antibiotic peptides using ITC and biosensor measurements. **Biophysical Chemistry**, v.152, p.145–152, 2010.

ALOMIRAH, H. F.; ALLI, I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 411–419, 2004.

AMANCIO, R.; Da SILVA, M. V. Consumo de carotenoides no Brasil: a contribuição da alimentação fora do domicílio. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, n.2 , p. 130-141, 2012.

ANTUNES, L. A. F.; GOMEZ, R. J. H. C. **Soro: perspectiva de uso industrial**. Apostila mimeografada da disciplina Ciência e Tecnologia do leite e derivados, UEL, Londrina, 54 p., 1990.

ASHTON, L.; DUSTING, J.; IMOMOH, E.; BALABANI, S.; BLANCH, E. W. Susceptibility of Different Proteins to Flow-Induced Conformational Changes Monitored with Raman Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 98, p.707–714, 2010.

BAEZA, R. I. PILOSOF, A. M. R. Calorimetric studies of thermal denaturation of β -lactoglobulin in the presence of polysaccharides. **LWT Science and Technology**, v.35, p. 393–399, 2002.

BAEZA, R.; SANCHEZ, C. C.; PILOSOF, A. M. R.; PATINO, J. M. R. Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air–water interface. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 239–248, 2005.

BARRERA, A.M.; RAMÍREZ, J.A.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; VÁZQUEZ, M. Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.441-447, 2002.

BELITZ, H. -D.; GROSH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th revised and extended ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 8-12, 46-48, 296, 314-315, 329, 2009.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3^a edição. São Paulo-Livraria Varela, 2003.

BOUYER, E.; MEKHLOFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J.-L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436(1-2), p. 359-378, 2012.

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

BURGOS, I.; DASSIE, S. A.; VILLARREAL, M. A.; FIDELIO, G. D. Thermodynamic and structural analysis of homodimeric proteins: Model of β -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 383-391, 2012.

BURRIE, B. J. β -Carotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 547-580, 1997.

CAO-HOANG, L.; FOUGÈRE, R.; WACHÉ, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 124, p. 42-49, 2011.

CARBONELL, T.; FREIRE, E. Binding Thermodynamics of Statins to HMG-CoA Reductase. **Biochemistry**, v. 44, p.11741-11748, 2005.

CASAL, H. L., KOEHLER, U., MANTSCH, H. H. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 957, p. 11-20, 1988.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2^a Ed. Rev. Campinas, SP. Editora da Unicamp, p. 60-67, 2003.

CHEANG, B.; ZYDNEY, A. L. A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. **Journal of Membrane Science**, v. 231, p. 159-167, 2004.

CHEN, Y-T., BURCHELL, A. Glycogen storage diseases. ***The metabolic basis of inherited disease***, 7th Ed., McGraw-Hill, New York, NY, 1995.

COMPTON, S. J. JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. ***Analytical Biochemistry***, v. 151, p. 369-74, 1985.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. ***Polímeros: Ciência e Tecnologia***, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. ***African Journal of Biochemistry Research***, v. 3, n. 5, p.164-173, 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. ***Química de Alimentos de Fennema***. 4. ed., Porto Alegre, Ed. Artmed, p. 95-98, 118, 125-126, 180-211, 217-218, 700, 2010.

DAVIDSON, J. Procedure for the extraction, separation, and estimation of major fat-soluble pigments of hay. ***Journal of Science and Food Agriculture***, v. 5, p. 1-7, 1954.

De FREITAS, R. F. ***Integração de Métodos em Quiminformática e Biocalorimetria para o Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi****. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2009.

De WIT J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. ***Journal of Dairy Science***, v. 81, p. 597–608, 1998.

De WIT, J. N. Thermal behaviour of bovine b-lactoglobulin at temperatures up to 150 °C. A review. ***Trends in Food Science & Technology***, v. 20, p.27-34, 2009.

DESHLER, M. ***Whey Protein Isolates - Production, Composition and Nutritional Facts - Comparing the nutritional implications of whey protein***, 1999. Disponível em: <http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_features/1999-03-01/whey-protein-isolates-production-composition-and-n/>. Acesso em 26/06/2013.

DRACZKOWSKI, P.; MATOSIUK, D.; JOZWIAK, K. Isothermal titration calorimetry in membrane protein research: Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 313– 325, 2014.

DUFOUR, E. HAERTLÉ, T. Binding of retinoids and β -carotene to β -lactoglobulin. Influence of protein modifications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1079, p. 316-320, 1991.

ELIAS, F. O.; CAPITANI, C. D.; MOLINA, S.; AÑÓN, M. C.; PACHECO, M. T. B. Propriedades emulsificantes de complexos de proteínas de soro de leite com polissacarídeos. **Brazilian Journal of Food Technology**, III JIPCA, p. 75-80, 2006.

EQUIPE MILKPOINT. **BRF anuncia joint venture para processamento de proteínas de soro de leite**. [2012] Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/brf-anuncia-joint-venture-para-processamento-de-proteinas-de-soro-de-leite-81301n.aspx>>. Acesso em: 07/04/2014.

FARIAS, O. A. C. de. **Soro de Leite em Pó: Brasil caminha para autossuficiência**. São Paulo, 2011. Disponível em: < <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/espaco-aberto/soro-de-leite-em-po-brasil-caminha-para-autossuficiencia-71038n.aspx>>. Acesso em 25/06/2013.

FERNANDEZ, A.; TORRES-GINER, S.; LAGARON, J. M. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.1427–1432, 2009.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FLOWER D. R. Review article: The lipocalin protein family: structure and function. **U.K. Biochemical Journal**, v. 318, p.1-14, 1996.

FREIBURGER, L. A.; AUCLAIR, K.; MITTERMAIER, A. K. Van 't Hoff global analyses of variable temperature isothermal titration calorimetry data. **Thermochimica Acta**, v. 527, p. 148– 157, 2012.

FREIRE, E.; SCHON, A.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A. Isothermal titration calorimetry: general formalism using binding polynomials, **Methods in Enzymology**, v. 455, p. 127–155, 2009.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interaction. **Methods in cell biology**, v. 84, p. 79-113, 2008.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high- methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 585-591, 2002.

GIRARD, M.; TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4450-4455, 2003.

GOMES, D. S. B. **Formação e caracterização de micelas reversas de (EO)13(PO)30(EO)13 em P-Xileno**. Dissertação de Mestrado em Física Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2009.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutrição**, v.19(4), p.479 - 488, 2006.

HARNSILAWAT, T.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D.J. Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 20 5,p. 577-585, 2006.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1508, p.69-85, 2000.

HOSSEINI, S. M. H.; EMAM-DJOMEH, Z. RAZAVI, S. H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; der MEEREN P. V. β -Lactoglobulinesodium alginate interaction as affected by polysaccharide depolymerization using high intensity ultrasound. **Food Hydrocolloids**, v. 32, p. 235-244, 2013.

JONES, O.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. V. Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 239–248, 2010a.

JONES, O. W.; LESMES, U.; DUBIN, P.; McCLEMENTS D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles

created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p.374–383, 2010b.

KALETUNÇ, **Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems**.IA: Wiley Blackwell, 2009.

KELLER, J. D. **Food Hydrocolloids**, Vol. II, M. Glicksman (ed.), CRC Press, Boca Raton, p. 43-109, 1984.

KIM, J-Y.; SEO, T-R.; LIM, L-T. Preparation of aqueous dispersion of β -carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 256-263, 2013.

KONUMA, T.; SAKURAI, K.; GOTO, Y. Promiscuous binding of ligands by β -lactoglobulin involves hydrophobic interactions and plasticity. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, p. 209–218, 2007.

LaLONDE, J. M.; BERNLOHR, D. A.; BANASZAK, L. J. The up-and-down beta-barrel proteins. *FASEB Journal*, v. 8, n.15, p.1240-1247, 1994.

LEE, A-C.; HONG, Y-H. Coacervate formation of α -lactalbumin–chitosan and β -lactoglobulin–chitosan complexes. **Food Research International**, v. 42, p. 733–738, 2009.

LIANG, L.; TREMBLAY-HÉBERT, V.; SUBIRADE, M. Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. **Food Chemistry**, v.126, p. 821–826, 2011.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3, p. 127, 2001.

LIU, T. X.; RELKIN, P.; LAUNAY, B. Thermal denaturation and heat-induced gelation properties of β -lactoglobulin. Effects of some chemical parameters. **Thermochimica Acta**, v. 246, p. 387-403, 1994.

LOCH, J. I.; BONAREK, P.; POLIT, A.; RIÈS, D.; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M.; LEWINSKI, K. Binding of 18-carbon unsaturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin—Structural and thermodynamic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 226– 231, 2013.

LUCENA, M. E.; ALVAREZ, S.; MENÉNDEZ, C.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R. Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates: Production of milk derivatives as a base for infant formulas. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 310–316, 2006.

MARQUES, D. P.; CUSTÓDIO, M. F.; GOULART, A. J.; GIORDANO, R. de C.; GIORDANO, R. de L. C.; MONTI, R. Separação das proteínas do soro de leite por DEAE-Trisacryl. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 2005.

MATSUURA, J. E.; MANNING, M. C. Heat-induced gel formation of β -lactoglobulin: a study on the secondary and tertiary structure as followed by circular dichroism spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1650-1656, 1994.

MELO, E. P.; AIRES-BARROS, M.R.; COSTA, S.M.B.; CABRAL, J.M.S. Thermal unfolding of proteins at high pH range studied by UV absorbance. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 34, p. 45–59, 1997.

MENSI, A.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; REBOUL, E.; BOREL, P.; GUYON, C.; LAMBALLERIE, M. DE; CHOBERT, J-M. Interlocking of β -carotene in beta-lactoglobulin aggregates produced under high pressure. **Food Chemistry**, v. 139, p. 253–260, 2013.

MONACO, H. L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P. Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol. **Journal of Molecular Biology**, v.197, p. 695-706, 1987.

MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. *Whey Proteins and their Thermal Denaturation*. **Irish Journal of Food Science Technology**, v.11, p. 43–75, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman and Company, New York and Basingstone, 3th edition, p. 117-129, 159-195, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman and Company, New York and Basingstone, 4th edition, p. 10, 12-18, 75-89, 2004.

OU, Z., & MUTHUKUMAR, M. Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: langevin dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, 124 (15), 2006.

O'BRIEN, R.; HAQ, I. **Biocalorimetry 2**. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. Edited by John E. Ladbury and Michael Doyle, John Wiley & Sons, p. 10-11, 2004.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. **Methods Enzymology**, v. 213, p. 403-420, 1992.

PAPIZ, M. Z.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E. E.; NORTH, A. C. T.; FINDLAY, J. B. C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES T. A.; NEWCOMER, M. E.; KRAULIS P. J. The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein. **Nature**, v.324, p. 383-385, 1986.

PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. **Methods**, v. 19, p. 213-221, 1999.

PORTER, B. Edible Coatings on Cut Fruit. Missouri University of Science and Technology: The coatings Institute, v. 6, issue 2. Disponível em: <http://coatings.mst.edu/v6i1/v6i2/>. Acesso em 31/03/2014. 2009.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1440–1447, 2012.

RELKIN, P.; LAUNAY, B. Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.1, p.19-32, 1990.

RIBEIRO, H. S., CRUZ, R. C. D. Biliquid foams containing carotenoids. **Engineering in Life Sciences**, v.5, n.1, p. 84–88, 2005.

RU, Q.; WANG, Y.; LEE, J.; DING, Y.; HUANG, Q. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. **Carbohydrate Polymers**, v.88, p. 838– 846, 2012.

SÁIZ-ABAJO, M-J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ, A.; ROMO-HUALDE, A.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1581–1587, 2013.

SASSONIA, R. C. **Caracterização termodinâmica de reações de nitrosação e interações protéicas por titulação calorimétrica Isotérmica. Tese de doutorado em Ciências**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 10-12, 2009.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G.; WU, S. Y-. β -Lactoglobulin a three-dimensional perspective. **International Journal of Food Science Technology**, v. 34, p. 409-418, 1999.

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

SERFERT, Y.; SCHRÖDER, J.; MESCHER, A.; LAACKMANND, J.; RÄTZKEE, K.; SHAIKHE, M. Q.; GAUKEL, V.; MORITZ, H.-U.; SCHUCHMANNB, H.P.; WALZEL, P.; DRUSCHF, S.; SCHWARZ, S. Spray drying behaviour and functionality of emulsions with β -lactoglobulin/pectin interfacial complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 438-445, 2013.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p.130–135, 2011.

SPADA, J. C.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAKA, L. D. F.; TESSARO, I. C. Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1166– 1173, 2012.

SOMCHUE, W.; SERMSRI, W.; SHIOWATANA, J.; SIRIPINYANOND, A. Encapsulation of a-tocopherol in protein-based delivery particles. **Food Research International**, v. 42, p. 909–914, 2009.

STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and Their Applications**. Marcel Dekker, New York, 1995.

SU, Y. T.; JIRGENSONS, B. Further studies on detergent induced conformational transitions in proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 181, p. 137-146, 1977.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. V. Characterization of pH-induced Transitions of β -Lactoglobulin: Ultrasonic, Densimetric, and Spectroscopic Studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 873-889, 2001.

UBIC CONSULTING. **Whey protein ingredient market**, 2013. Disponível em: <<http://www.ubic-consulting.com/template/fs/documents/Dairy-Ingredients/Milk-whey-protein-ingredient-market.pdf>>. Acesso em 25/06/2013.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VERHEUL M.; PEDERSEN J.S.; ROEFSS S.P.; De KRUIF K.G. Association behavior of native beta-lactoglobulin. **Biopolymers**, v. 49, n.1, p.11-20, 1999.

WALSTRA, P. **Physical Chemistry of Foods**. New York: Marcel Dekker, p. 203-249, 2003.

WANG, X.; LI, Y.; WANG, Y-W.; LAL, J.; HUANG, Q. Microstructure of β -lactoglobulin/pectin coacervates studied by small-angle neutron scattering. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 515-520, 2007a.

WANG, X.; WANG, Y-W.; RUENGRUGLIKIT, C.; HUANG, Q. Effects of salt concentration on formation and dissociation of β -lactoglobulin/pectin complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.10432–10436, 2007b.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivates**. 3rd edn. Academic Press, San Diego, 1992.

YAMOTO, M. **Açúcares estrutura e função** (2011). Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/QBQ0105%20Enfermagem/Aula_Carboidratos_Estrutura.pdf> Acesso em 28/04/2014.

YUAN, Y.; GAO, Y.; ZHAO, J.; MAO, L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v.41, p.61–68, 2008.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p.1120–1126, 2009.