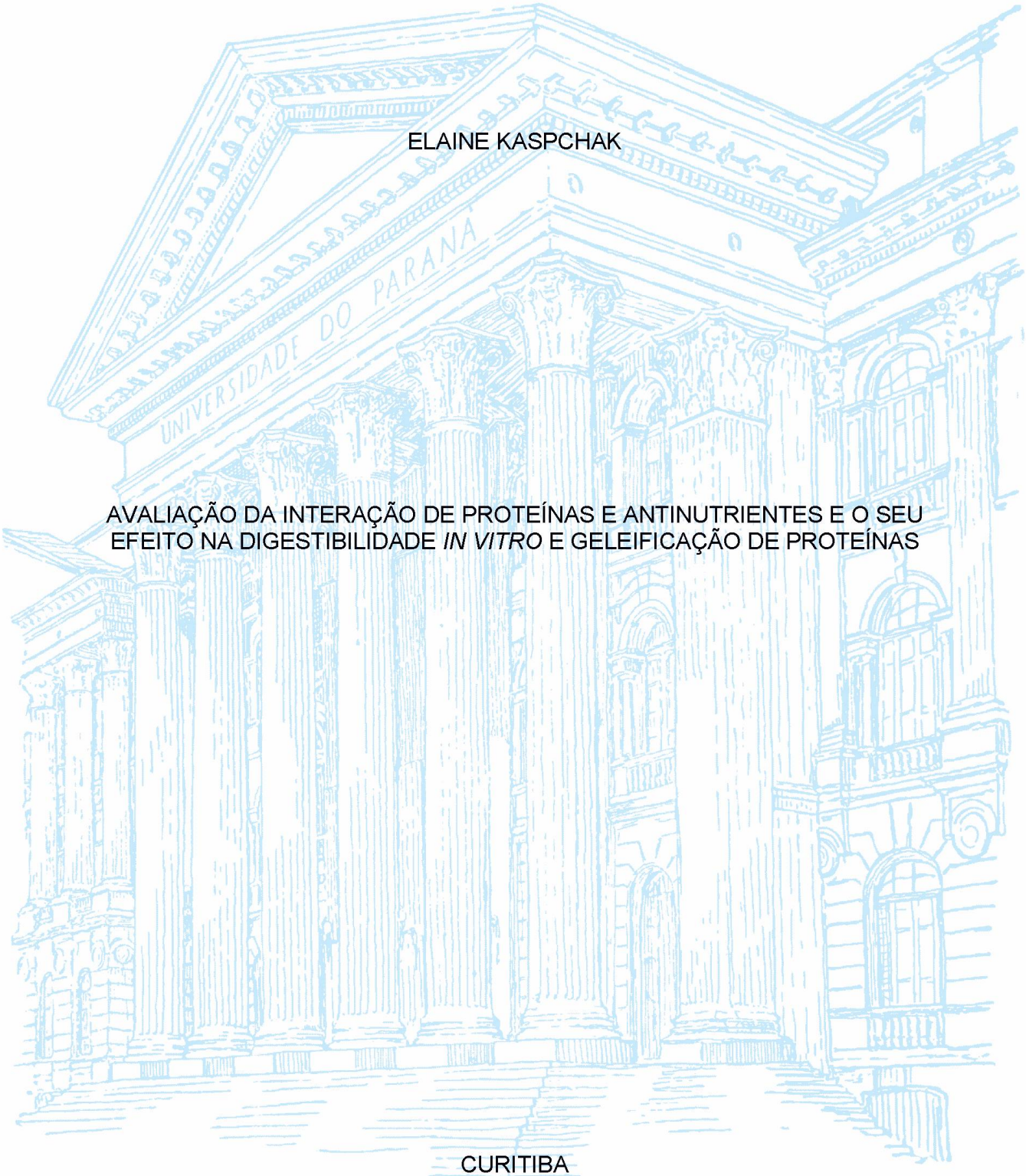
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE KASPCHAK



AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANTINUTRIENTES E O SEU EFEITO NA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

CURITIBA

2019

ELAINE KASPCHAK

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS E ANTINUTRIENTES E O SEU EFEITO NA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* E GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Drª. Luciana Igarashi Mafra
Coorientador: Dr. Marcos Rogério Mafra

CURITIBA
2019

Catalogação na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

K19a Kaspchak, Elaine
Avaliação da interação de proteínas e antinutrientes e o seu efeito na digestibilidade in vitro e geleificação de proteínas [recurso eletrônico] / Elaine Kaspchak. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientador: Luciana Igarashi Mafra – Coorientador: Marcos Rogério Mafra.

1. Ácido fítico. 2. Taninos. 3. Saponinas. 4. Calorimetria. 5. Biodisponibilidade. 6. Reologia. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Luciana Igarashi. III. Mafra, Marcos Rogério. IV. Título.

CDD: 660.28449

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ELAINE KASPCHAK** intitulada: **Avaliação da interação de proteínas e antinutrientes e o seu efeito na digestibilidade *in vitro* e geleificação de proteínas.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Fevereiro de 2019.

LUCIANA IGARASHI MAFRA
Presidente da Banca Examinadora

ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Avaliador Interno (UFPR)

FRANCINY CAMPOS SCHMIDT
Avaliador Interno (UFPR)

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UEM)

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Paulo e Inês, e ao meu marido, Felipe.

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre torcerem por mim e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao Felipe, por todo amor e compreensão dedicados a mim.

Aos meus orientadores Dra.ª Luciana Igarashi-Mafra e Dr. Marcos R. Mafra pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Às técnicas da Central Analítica Multiusuário das Usinas Piloto, Andrea e Patrícia, por toda ajuda e paciência durante a realização dos experimentos de ITC.

Às técnicas Danielle e Sheila por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Ana Caroline Goedert pela realização das análises de eletroforese e à Cíntia T. M. Kayukawa pela ajuda nas análises de dicroísmo circular.

Aos professores, membros pertencentes à banca avaliadora, pelo tempo dedicado na avaliação deste trabalho.

À Prof. Drª Joana Léa Meira Silveira por possibilitar a realização das análises reológicas e pela ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFPR pela oportunidade e a CAPES por conceder a bolsa de doutorado.

Aos amigos do LATOS e do PPGEAL pela troca de experiências, amizade e momentos de descontração.

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

RESUMO

Alguns alimentos, principalmente as sementes de leguminosas, possuem antinutrientes (AN) capazes de diminuir o seu valor nutritivo. Os ANs mais conhecidos por formarem complexos com proteínas são os taninos, as saponinas e os fitatos. Esses ANs podem influenciar a digestão proteica, atividade enzimática e propriedades funcionais das proteínas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as interações de proteínas e ANs e a sua relação com a digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) e geleificação de proteínas. Os estudos de interação molecular foram realizados por calorimetria de titulação isotérmica e a capacidade geleificante foi determinada utilizando reologia oscilatória. Foi observado que as interações do ácido fítico (AF) com a albumina do soro bovino (BSA) ocorrem principalmente por interações eletrostáticas e são favorecidas pelo aumento da temperatura e baixa força iônica. Na presença de cátions divalentes (Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+}), o AF forma um complexo ternário com a BSA, o qual interfere na solubilidade da proteína, mas não afeta a sua DPIV. As interações entre o ácido tânico (AT) e BSA ocorrem em diversos sítios da proteína por ligações hidrofílicas e hidrofóbicas. Estas interações tornam-se menos favoráveis com o aquecimento e mais favoráveis com o aumento da força iônica. O AT diminui a DPIV drasticamente (em até 100% dependendo da razão mássica de AT/BSA), sendo que os cátions divalentes agravam o efeito negativo do AT na DPIV. As interações entre a saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) e BSA não afetarem a DPIV em baixas razões mássicas de SCQ/BSA. Além disso, a SCQ melhorou a capacidade geleificante da BSA. As interações moleculares da proteína com misturas de ANs mostraram que o AF aumenta a afinidade entre o AT e BSA e que a SCQ aumenta a complexidade das ligações nos sistemas contendo AT, SCQ e BSA. As misturas de ANs influenciaram a DPIV sendo observado um efeito sinérgico quando mais de um AN estava presente, provavelmente devido a interações complexas envolvendo enzimas digestivas, interações AN-AN, competição, entre outros. Os ANs AF e AT promoveram alterações na estrutura secundária das proteínas, diminuindo a porcentagem de α-hélice, além de diminuírem a solubilidade proteica. Por outro lado, a SCQ não promoveu alterações na estrutura secundária e solubilidade da proteína. Os ANs alteraram a geleificação de isolados proteicos comerciais de maneira diferente para cada proteína (soja, ervilha ou arroz). Isso ocorre devido às interações destes com as cadeias polipeptídicas da proteína, o que afeta a sua solubilidade e estabilidade e, dessa forma, a sua organização durante a geleificação. Os ANs estão comumente presentes nos alimentos e podem impactar de maneira significativa no comportamento das proteínas, tanto no alimento quanto em organismos vivos, e este impacto pode ser minimizado ou maximizado dependendo das condições do meio (temperatura, força iônica, presença de cátions divalentes e razão mássica dos componentes). O entendimento das interações envolvendo os ANs se torna essencial para o processamento e melhor aproveitamento de alimentos que podem ser ricos nessas substâncias.

Palavras-chave: ácido fítico, tanino, saponina, calorimetria de titulação isotérmica, biodisponibilidade, interações moleculares, reologia.

ABSTRACT

Some foods, especially legume seeds, have antinutrient (AN) capable of decreasing their nutritional value. The ANs most known to form complexes with proteins are tannins, saponins and phytates. These ANs can influence protein digestion, enzymatic activity and functional properties of proteins. Thus, the aim of this work was to evaluate the interactions of proteins and ANs and their influence on *in vitro* protein digestibility (IVPD) and protein gelation. Molecular interaction studies were performed by isothermal titration calorimetry and the gelation capacity was determined using oscillatory rheology. Results showed that the interactions of phytic acid (PA) with bovine serum albumin (BSA) occur mainly by electrostatic forces and are favored by heating and low ionic strength. In the presence of divalent cations (Mg^{2+}, Ca^{2+} and Mn^{2+}), the PA forms a ternary complex with BSA, which interferes with the solubility of the protein but does not affect its IVPD. The interactions between tannic acid (TA) and BSA occur at several sites of the protein by hydrophilic and hydrophobic bonds. These interactions become less favorable with heating and more favorable with increasing ionic strength. TA decreases IVPD dramatically (up to 100% depending on the TA/BSA mass ratio), and the divalent salts aggravate the negative effect of TA on IVPD. The interactions between *Quillaja* bark saponin (QBS) and BSA did not affect IVPD at low QBS/BSA mass ratios. Besides, the QBS increased the gelation ability of the BSA. Molecular interactions of the protein with mixtures of ANs showed that PA increases the affinity between TA and BSA and that QBS increases the complexity of the binding in systems containing TA, QBS and BSA. Mixtures of ANs influenced IVPD and a synergistic effect was observed when more than one AN was present, probably due to complex interactions involving digestive enzymes, AN-AN interactions, competition, among others. The antinutrients PA and TA changed the protein secondary structure, decreasing the α-helix percentage, in addition to decreasing the protein solubility. On the other hand, QBS does not promote changes in protein secondary structure and solubility. The ANs altered the gelation of commercial protein isolates differently for each protein (soy, pea or rice). This is due to the interactions of ANs with the polypeptide chains of the proteins which affects protein solubility and stability and, thus, its organization during the gel formation. The ANs are commonly present in foods and can significantly impact the behavior of proteins both in food and in living organisms and this impact can be minimized or maximized depending on the conditions of the medium (temperature, ionic strength, presence of divalent cations and mass ratio components). Understanding the interactions involving ANs becomes essential for the processing and better utilization of foods that may be rich in these substances.

Key-words: phytic acid, tannin, saponin, isothermal titration calorimetry, bioavailability, molecular interactions, rheology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO FÍTICO 26
FIGURA 2 – INTERAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO COM PROTEÍNAS E MINERAIS 27
FIGURA 3 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO TÂNICO 29
FIGURA 4 - TIPOS DE INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE PROTEÍNAS E POLIFENÓIS 30
FIGURA 5 – EXEMPLOS DE ESTRUTURAS DA SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* 34
FIGURA 6 – TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO 37
FIGURA 7 – DIAGRAMA DESCRITIVO DE UM MÉTODO DE SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO *IN VITRO*. 38
FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DOS EXPERIMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO 41
FIGURA 9 - ESTRUTURA MOLECULAR CRISTALINA DA ALBUMINA DO SORO BOVINO 42
FIGURA 10 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS 57
FIGURA 11 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO (AF) OU ÁCIDO TÂNICO (AT) EM pH 3,0, E COM DIFERENTES FORÇAS IÔNICAS (FI) A 25 °C 59
FIGURA 12 - INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO EM pH 3,0, OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS 62
FIGURA 13 - INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO TÂNICO (AT) EM pH 3,0, OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS 63
FIGURA 14 - COMPENSAÇÃO ENTALPIA-ENTROPIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS PARA INTERAÇÕES AF-BSA E AT-BSA 65
FIGURA 15 - ANÁLISE MORFOLÓGICA UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) PARA OS COMPLEXOS PROTEÍNA-ANTINUTRIENTE 66

FIGURA 16 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPVI) DE BSA NA PRESENÇA DE ÁCIDO TÂNICO E ÁCIDO FÍTICO SUBMETIDA A TRATAMENTOS TÉRMICOS (a) E SOB DIFERENTES FORÇAS IÓNICAS (b) 68
FIGURA 17 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA A INTERAÇÃO ENTRE BSA, FITATO DE SÓDIO (NaP) E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 E 25 °C PARA SISTEMAS BINÁRIOS 74
FIGURA 18 - CURVAS OBTIDAS POR CALORIMETRIA DAS TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 E 25 °C PARA SISTEMAS TERNÁRIOS 76
FIGURA 19 – EFEITO DA BSA, DO FITATO DE SÓDIO E DOS CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ A 25 °C E pH 7,0 80
FIGURA 20 - CURVAS DE ITC PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 A 25 °C85
FIGURA 21 - EFEITO DA BSA, ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ 91
FIGURA 22 - ELETROFORESE EM GEL TRIS-TRICINA DE AMOSTRAS HIDROLISADAS E ANÁLISE DE DIGESTÃO PROTEICA IN VITRO DAS AMOSTRAS CONTENDO BSA, AT E M^{2+} 93
FIGURA 23 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E A SAPONINA EM PH 3,0 A 25 °C E 75 °C 97
FIGURA 24 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR EM 200-250 nm (A) 250-300 nm (B) DA ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE SAPONINA DE CASCA DE QUILLAJA (SCQ).99
FIGURA 25 - EFEITO DA SAPONINA (2,5%) NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA SOLUÇÃO DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA (5%) DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 3,0. 100

FIGURA 26 – DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DA BSA NA PRESENÇA DE SAPONINA DA CASCA DE *QUILLAJA* EM DIFERENTES RAZÕES MASSICAS 102
FIGURA 27 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TURBIDEZ DE MISTURAS DE ANTINUTRIENTES E BSA..... 105
FIGURA 28 - CURVAS DE ITC DA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO TÂNICO (AT) NA PRESENÇA DE ÁCIDO FÍTICO (AF) E SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) EM pH 3,0 E 25 °C 106
FIGURA 29 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV) DA ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE ANTINUTRIENTES 109
FIGURA 30 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E GRÁFICO DE PARETO COMPARANDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO TÂNICO (AT), ÁCIDO FÍTICO (AF) E SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV) 111
FIGURA 31 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA E ELETROFORESE DOS ISOLADOS PROTEICOS DE SOJA, ERVILHA E DE ARROZ..... 115
FIGURA 32 – SOLUBILIDADE DOS ISOLADOS PROTEICOS COMERCIAIS NA PRESENÇA DE ANTINUTRIENTES..... 118
FIGURA 33 – EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE PROTEÍNAS DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 3,0..... 120
FIGURA 34 - EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE PROTEÍNAS DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 7,0..... 121
FIGURA A1 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS RESULTADOS APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.1..... 153

FIGURA A2 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS RESULTADOS APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.2..... 154
FIGURA A3 - CURVA DE ITC PARA TITULAÇÃO DE $MgCl_2$ EM NaP.. 155
FIGURA A4 - ZOOM DO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO PICO OBTIDOS POR ITC PARA A TITULAÇÃO DE $MnCl_2$ EM BSA+NaP 155
FIGURA A5 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.3..... 156
FIGURA A6 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.4..... 157
FIGURA A7 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.5..... 158
FIGURA A8 – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ANTINUTRIENTES E PEPSINA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA 159
FIGURA A9 - ASPECTO VISUAL DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE BSA, TA E CÁTIONS DIVALENTES NO PRIMEIRO DIA, SEGUNDO DIA E QUINTO DE ARMAZENAMENTO. 163
FIGURA A10 - DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ELETROFORESE PARA AS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*..... 164
FIGURA A11 – ELETROFORESE EM GEL DE TRIS-TRICINA E DENSITOMETRIA DAS BANDAS PARA AMOSTRAS DE PEPSINA E PANCREATINA UTILIZADAS NA ANÁLISE DE DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*..... 165
FIGURA A12 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS EM pH 3,0 APÓS ANÁLISE REOLÓGICA..... 166
FIGURA A13 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS EM pH 7,0 APÓS ANÁLISE REOLÓGICA..... 167

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONTEÚDO DE PROTEÍNA E ANTINUTRIENTES E DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV) DE GRÃOS 24

TABELA 2 - PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA SISTEMAS TERNÁRIOS DE BSA, ÁCIDO TÂNICO (AT) OU FÍTICO (AF) E CÁTIONS DIVALENTES (M^{2+}) 49

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MISTURA DE ANTINUTRIENTES NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DA ALBUMINA DO SORO BOVINO 53

TABELA 4 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DVPI) DE ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE FITATO DE SÓDIO (NaP) E CÁTIONS DIVALENTES (M^{2+}) SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS. 82

TABELA 5 – RELAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA E CONSTANTE DE AFINIDADE PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O ÁCIDO TÂNICO E OS CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 A 25 °C.... 86

TABELA 6 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) E ÁCIDO TÂNICO (AT) NA PRESENÇA DE SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) E ÁCIDO FÍTICO (AF) EM pH 3,0 E 25 ° C 107

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DOS ISOLADOS PROTEICOS DE SOJA, ERVILHA E ARROZ 117

TABELA 8 - EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE SUSPENSÕES PROTEICAS (10%) NO INÍCIO DO EXPERIMENTO (20 °C), APÓS AQUECIMENTO (90 °C) E APÓS RESFRIAMENTO (20 °C) EM pH 3,0 E 7,0. 122

TABELA A1 - TESTE DE TUKEY APLICADO A RESULTADOS OBTIDOS PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO OU ÁCIDO TÂNICO EM pH 3,0 E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES 160

TABELA A2 - COEFICIENTES ESTIMADOS E VALORES DE p OBTIDOS PELO MODELO ESPECIAL CÚBICO DESCREVENDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA, FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ. 161
TABELA A3 - VALORES DE TURBIDEZ (%) PARA CADA PONTO DE PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA AS MISTURAS M^{2+}-NaP-BSA 161
TABELA A4 - COEFICIENTES ESTIMADOS COM O VALORES DE p OBTIDOS PELO MODELO ESPECIAL CÚBICO DESCREVENDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA, ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ. . 162
TABELA A5 - VALORES DE TURBIDEZ (%) PARA CADA PONTO DE PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA AS MISTURAS M2+-AT-BSA 162
TABELA A6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A DIGESTIBILIDADE PROTÉICA IN VITRO DE MISTURAS DE ÁCIDO TÂNICO (TA), ÁCIDO FÍTICO (PA) E SAPONINA DE CASCA DE QUILLAJA (SCQ) 162

LISTA DE SIGLAS

AN	–	Antinutriente
AF	–	Ácido fítico
AT	–	Ácido tânico
BSA	–	Albumina do soro bovino
DPIV	–	Digestibilidade proteica *in vitro*
DTG	–	Termogravimetria derivada
FI	–	Força iônica
IP6	–	Inositol hexafosfato
IPA	–	Isolado proteico de arroz
IPE	–	Isolado proteico de ervilha
IPS	–	Isolado proteico de soja
ITC	–	Calorimetria de titulação isotérmica
M^{2+}	–	Cátion divalente
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
MM	–	Massa molar
MOPS	–	Ácido-3-Morfolinopropanossulfonico
NaP	–	Fitato de sódio
pI	–	Ponto isoelétrico
SCQ	–	Saponina de casca de Quillaja
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
TG	–	Termogravimetria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1. OBJETIVO 22
1.1.1. Objetivo geral 22
1.1.2. Objetivos específicos 22
2. REVISÃO DA LITERATURA 23
2.1. ANTINUTRIENTES 23
2.2. ÁCIDO FÍTICO (FITATO) 25
2.3. TANINOS 28
2.4. SAPONINAS 33
2.5. DIGESTIBILIDADE DE PROTEÍNAS 36
2.6. CONSIDERAÇÃOES SOBRE A REVISÃO DE LITERATURA .. 40
3. MATERIAL E MÉTODOS 41
3.1. MATERIAL 42
3.2. MÉTODOS 43
3.2.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) 43
3.2.1.1. Interação entre a BSA e o ácido fítico (AF) em pH 3,0 43
3.2.1.2. Interação entre a BSA e o ácido tânico (AT) em pH 3,0 44
3.2.1.3. Interação do fitato de sódio (NaP) com a BSA na presença de cátions divalentes (M^{2+}) em pH 7,0 44
3.2.1.4. Interação de BSA com o ácido tânico (AT) na presença de cátions divalentes (M^{2+}) em pH 7,0 45
3.2.1.5. Interação de BSA com a saponina da casca de Quillaja (SCQ) 45
3.2.1.6. Interação de BSA com o ácido tânico (AT) na presença de saponina da casca de Quillaja (SCQ) e ácido fítico (AF) em pH 3,0 46
3.2.1.7. Obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação 46
3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 47
3.2.3. Análise de turbidez 48
3.2.3.1. Turbidez dos complexos ternários formados por cátions divalentes (M^{2+}), antinutrientes (AN) e BSA 48
3.2.3.2. Turbidez dos complexos formados por BSA e antinutrientes (AN) 49

3.2.4. Dicroísmo Circular (CD) 50
3.2.5. Digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) 51
3.2.5.1. Efeito de tratamentos térmicos na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT) e ácido fítico (AF) 51
3.2.5.2. Efeito da força iônica na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT) e ácido fítico (AF) 52
3.2.5.3. Efeito de cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido fítico (AF)..... 52
3.2.5.1. Efeito de cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT)..... 52
3.2.5.2. Efeito das saponinas na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA..... 53
3.2.5.3. Efeito das misturas de antinutrientes de ácido fítico (AF), ácido tânico (AT) e saponina da casca de Quillaja (SCQ) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA 53
3.2.6. Geleificação a quente da BSA na presença de saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) avaliada por reologia..... 54
3.2.7. Influência da temperatura e presença de antinutrientes na geleificação a quente de isolados proteicos comerciais..... 54
3.2.7.1. Composição dos isolados proteicos 55
3.2.7.2. Eletroforese 55
3.2.7.3. Solubilidade..... 55
3.2.7.4. Análises reológicas..... 56
3.2.8. Análise estatística..... 56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 57
4.1. EFEITO DO AQUECIMENTO E DA FORÇA IÔNICA NA INTERAÇÃO DA ALBUMINA DO SORO BOVINO COM OS ÁCIDOS TÂNICO E FÍTICO, E A SUA INFLUÊNCIA NA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA *IN VITRO* [1] 58
4.1.1. Efeito da força iônica na interação molecular..... 58
4.1.2. Efeito da temperatura na interação molecular..... 61

4.1.3. Efeito de tratamentos térmicos na microestrura dos complexos formados por BSA e os ácidos tânico (AT) e fítico (AF)..... 65
4.1.4. Avaliação do efeito dos antinutrientes e diferentes tratamentos na digestibilidade proteica *in vitro* (DPVI)..... 67
4.1.5. Avaliação do efeito dos antinutrientes e diferentes tratamentos na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) de BSA: Considerações finais..... 70
4.2. INFLUÊNCIA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO ENTRE ALBUMINA DE SORO BOVINO, FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA PROTEÍNA [2]..... 72
4.2.1. Interação entre BSA, fitato de sódio (NaP) e cátions divalentes (M^{2+}) determinada por ITC para sistemas binários..... 73
4.2.2. Interação da BSA, NaP e M^{2+} por ITC para sistemas ternários. 75
4.2.3. Turbidez dos complexos formados por BSA, fitato de sódio (NaP) e cátions divalentes (M^{2+})..... 79
4.2.4. Efeito do fitato de sódio (NaP) e dos cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) de BSA 81
4.2.5. Influência da formação do complexo ternário entre albumina de soro bovino, fitato de sódio e cátions divalentes na turbidez e digestibilidade *in vitro* da proteína: Considerações finais..... 83
4.3. EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA INTERAÇÃO DE ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) E ÁCIDO TÂNICO E SUA INFLUÊNCIA NA TURBIDEZ E NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*..... 84
4.3.1. Avaliação da interação de albumina de soro bovino com ácido tânico na presença de cátions divalentes por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) 84
4.3.2. Influência da formação do complexo ternário na turbidez dos complexos formados por BSA, ácido tânico (AT) e cátions divalentes (M^{2+})..... 90
4.3.3. Efeito do ácido tânico e cátions divalentes na digestibilidade proteica *in vitro* da BSA..... 92

4.3.4. Efeito de cátions divalentes na interação de albumina do soro bovino (BSA) e ácido tânico e sua influência na turbidez e na digestibilidade proteica *in vitro*: Considerações finais. 95
4.4. EFEITO DA INTERAÇÃO DE SAPONINA DA CASCA DE *QUILLAJA* E BSA NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA, GELEIFICAÇÃO E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA PROTEÍNA 96
4.4.1. Interação molecular obtida por ITC 96
4.4.2. Dicroísmo circular (CD) 98
4.4.3. Geleificação de BSA na presença de saponina 99
4.4.4. Digestibilidade proteica *in vitro* 102
4.4.5. Efeito da interação da saponina da casca de *Quillaja* e BSA na estrutura secundária e terciária, geleificação e digestibilidade *in vitro* da proteína: Considerações finais. 103
4.5. INTERAÇÕES ENVOLVIDAS EM MISTURAS DE ANTINUTRIENTES E ALBUMINA DO SORO BOVINO E O SEU EFEITO NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* 104
4.5.1. Efeito dos ANs na estrutura secundária de BSA e Turbidez ... 104
4.5.2. Interação do ácido tânico com BSA na presença de ácido fítico e saponina da casca de *Quillaja* 106
4.5.3. Efeito de misturas de antinutrientes na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) 109
4.5.4. Interações Envolvidas em Misturas de Antinutrientes e Proteínas e o seu Efeito na Digestibilidade Proteica *In Vitro*: Considerações finais 113
4.6. INFLUÊNCIA DOS ANTINUTRIENTES NA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS 114
4.6.1. Caracterização dos isolados proteicos 114
4.6.2. Solubilidade dos isolados proteicos na presença de antinutrientes 117
4.6.3. Geleificação de proteínas vegetais avaliada por reologia oscilatória 119

4.6.4. Influência dos antinutrientes na geleificação de proteínas vegetais: Considerações finais 128
5. CONCLUSÃO 129
REFERÊNCIAS 132
APÊNDICE I – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC 153
APÊNDICE II – TESTE DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE MÉDIAS 160
APÊNDICE III – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MODELOS OBTIDOS PARA A TURBIDEZ DOS SISTEMAS TERNÁRIOS E DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DAS MISTURAS DE ANTINUTRIENTES 161
APÊNDICE IV – ASPECTO VISUAL DOS COMPLEXOS TERNÁRIOS FORMADOS PELO ÁCIDO TÂNICO, CÁTIONS DIVALENTE E BSA E ELETROFORESE DOS COMPLEXOS HIDROLISADOS E ENZIMAS DIGESTIVAS 163
APÊNDICE V – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS APÓS ANÁLISE REOLÓGICA 166
ANEXO I – PERMISSÃO ACS PUBLICATIONS 168

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são indispensáveis para funções básicas dos organismos vivos (MOUGHAN, 2016; BIHUNIAK; INSOGNA, 2015). A absorção de aminoácidos pelo corpo humano depende da biodisponibilidade das proteínas que pode ser afetada pela presença de algumas substâncias, chamadas antinutrientes (ANs). Os ANs são substâncias naturais comumente encontradas nos alimentos que podem interagir com nutrientes ou enzimas digestivas inibindo a absorção de substâncias como proteínas, vitaminas e minerais (GEMEDE et al., 2014).

Os alimentos mais ricos em AN naturais são as sementes de leguminosas, castanhas e cereais, sendo os fitatos, as saponinas e os taninos os antinutrientes que mais atuam sobre as proteínas (GEMEDE et al., 2014). Como alternativas para minimizar os efeitos negativos dos ANs em alimentos, vários processamentos são utilizados como, por exemplo, o cozimento, a tostagem, a fermentação, a germinação, o descascamento, a maceração, etc. (HÍDVÉGI, MÁTÉ; LÁSZTITY, 2002; ONWUKA, 2006; KUMAR et al., 2009). Porém com esses tratamentos complexos ainda mais estáveis podem ser formados. Isso ocorre, por exemplo, com o cozimento do feijão (BRESSANI et al., 1988) e do sorgo (DUODU et al., 2002; SOETAN et al., 2006).

A diminuição da solubilidade de proteínas na presença de ANs em meios neutros e ácidos é um dos principais fatores que influenciam a digestibilidade proteica. Isso ocorre devido à cobertura hidrofóbica dos peptídeos a serem hidrolisados (MARTÍNEZ; MOYANO, 2003) e diminuição da acessibilidade das ligações peptídicas (MARIA et al., 2016). Além disso, a redução da solubilidade também afeta as propriedades funcionais das proteínas que são dependentes da sua hidratação e solubilidade como, por exemplo, a geleificação. Outro motivo da mudança na geleificação de proteínas é a interação do AN em regiões hidrofóbicas da proteína conforme observado para a geleificação de proteínas na presença de compostos fenólicos (ARNTFIELD, 1996; MALIK; SAINI, 2017).

Além das interações com proteínas, alguns ANs como, por exemplo, os taninos e fitatos, interagem com íons metálicos (RIMBACH; PALLAUF, 1999; MA et al., 2007; GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017) podendo formar complexos ternários. Estes complexos podem diminuir a biodisponibilidade tanto dos minerais

quanto dos aminoácidos. Devido à presença de minerais, proteínas e ANs ser comum nos alimentos de origem vegetal, esta interação também pode afetar o processamento de alimentos devido à diminuição na solubilidade e alteração na estabilidade proteica (BYE et al., 2013). Isso é observado, por exemplo, na formação de precipitados em bebidas (MILLET et al., 2017) e mudanças na textura do tofu (ZUO et al., 2016).

As interações moleculares entre proteínas e ANs podem ser estudadas por meio da calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Esta técnica permite, em um único experimento, determinar os parâmetros como relação estequiométrica, afinidade e entalpia. Por meio de ITC é possível estabelecer hipóteses da natureza das forças envolvidas nas interações moleculares e o efeito de inibidores, temperatura e pH nas ligações. Interações moleculares que formam complexos insolúveis, como é o caso dos complexos proteína-antinutriente, podem ser obtidas ao contrário de outras técnicas para avaliação de interações moleculares como, por exemplo, a fluorescência. Estudos de ITC envolvendo a formação de complexos insolúveis podem ser correlacionados com análises de turbidez conforme demostrado por Romanini et al. (2013), Watrelot et al. (2015), Goltz et al. (2016), entre outros.

A correlação das interações envolvidas na formação de complexos proteínas-antinutrientes em diferentes condições com a digestão proteica pode auxiliar no desenvolvimento de alimentos seguros para o consumo humano. Estudos de digestibilidade proteica *in vitro* utilizando enzimas digestivas em condições similares às observados *in vivo* permitem avaliar o efeito de diferentes tratamentos e presença de inibidores na digestão proteica. Além disso, o efeito das interações moleculares nas propriedades funcionais das proteínas, como a geleificação e solubilidade, são essenciais para o processamento e armazenamento de alimentos. Essas informações podem auxiliar no melhor aproveitamento dos alimentos e no desenvolvimento de novos produtos com qualidade tanto sensorial quanto nutricional e garantia da sua estabilidade durante armazenamento. Diante do exposto, o presente trabalho visou estudar as interações de proteínas e ANs e a sua relação com a digestibilidade proteica *in vitro* e turbidez em diferentes condições de pH, temperatura, força iônica e presença de cátions divalentes. Os estudos de interação foram realizados com a

albumina do soro bovino (BSA) devido a esta proteína ser amplamente estudada na literatura e ter as suas características bem definidas. Além disso, a capacidade geleificante de proteínas de origem vegetal (soja, ervilha e arroz) na presença de antinutrientes foi determinada por meio de análises reológicas.

1.1. OBJETIVO

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar as interações proteínas-antinutrientes e a sua relação com a digestibilidade *in vitro* e geleificação de proteínas.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar o perfil de interação e as constantes termodinâmicas de ligação envolvidas na formação dos complexos entre proteínas e antinutrientes (ácido fítico, ácido tânico e saponina) por meio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- Avaliar o efeito da força iônica, temperatura e presença de cátions divalentes nas interações entre proteínas e antinutrientes;
- Determinar a digestibilidade proteica *in vitro* de complexos proteínas-antinutrientes em diferentes condições;
- Avaliar o efeito das misturas dos antinutrientes na digestibilidade proteica *in vitro;*
- Determinar a turbidez dos complexos proteína-antinutrientes e proteína-antinutriente-cátion divalente;
- Avaliar o efeito dos antinutrientes na geleificação de proteínas comerciais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura apresentada neste tópico serão abordados os aspectos básicos acerca dos antinutrientes e as características específicas de interação, estrutura e efeito na geleificação dos antinutrientes ácido fítico, taninos e saponinas. Além disso, será feita uma breve descrição dos aspectos envolvidos na digestibilidade de proteínas.

2.1. ANTINUTRIENTES

Os antinutrientes são gerados naturalmente em alimentos pelo metabolismo de espécies, mas que exercem efeitos contrários à nutrição humana (KUMAR, 1992). Estas substâncias são produzidas nas plantas como um mecanismo de proteção contra fungos, insetos e predadores (SINHA; KHARE, 2017). O seu efeito antinutricional em animais monogástricos está relacionado à inibição da absorção de nutrientes e micronutrientes pelo organismo (MICHAELSEN et al., 2009; GEMEDE et al., 2014).

Os efeitos fisiológicos dos ANs estão relacionados com o seu nível de ingestão e as condições em que são ingeridos, como a presença de outros constituintes da dieta e saúde do indivíduo (THOMPSON, 1993). Por exemplo, crianças e jovens são mais sensíveis aos efeitos dos ANs devido a maior quantidade de energia e nutrientes demandada, visto que esses indivíduos estão em fase de crescimento. Além disso, o impacto de cada um dos fatores antinutricionais deve de ser considerado no contexto das dietas específicas e os problemas nutricionais de uma população (MICHAELSEN et al., 2009).

Os ANs naturais mais comumente encontrados nos alimentos são as saponinas, os taninos, os inibidores de protease, os oxalatos, os fitatos, as hemaglutininas (lectinas), os glicosídeos cianogênicos, as cumarinas e o gossipol (SOETAN; OYEWOLE, 2009; AKANDE et al., 2010). De maneira geral, os antinutrientes ácido fítico (AF), saponinas e taninos são os mais conhecidos e estudados levando em conta a interação com proteínas. A TABELA 1 mostra o teor desses ANs em alguns grãos e a digestibilidade proteica dos mesmos.

TABELA 1 - CONTEÚDO DE PROTEÍNA E ANTINUTRIENTES E DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV) DE GRÃOS

Alimento	Proteína (%)	Ácido fítico (%)	Taninos (%)	Saponina (%)	DPIV grão cru (%)	DPIV grão cozido (%)	Fonte
Amendoim (*Arachis hypogaea*)	26,6	2,63	8,9	1,6	73,4	79,7-84,9	Embaby (2010); Fenwick e Oakenfull (1983)
Ervilha (*Pisum sativum*)	25,93-26,50	0,90-1,15	0,01-0,33	0,14-0,18	74,47-82,3	78,6-85,8	Linsberger-Martin et al., (2013); El-Hady e Habiba (2003); Curl et al. (1985)
Feijão (*Phaseolus vulgaris*)	22,26-25,66	1,10-2.41	0,23-2,88	0,09-0.13	65,63-80,66	68,3-94,22	Barampama; Simard (1993); Linsberger-Martin et al., (2013); Shimelis e Rakshit (2007)
Feijão-arroz (*Vigna Umbellata*)	17,2-25,57	0,40-8,78	0,38-154	1,40-3,12	71,28	78,12-80,12	Katoch (2013); Kalpanadevi e Mohan (2013)
Grão de bico (*Cicer arietinum*)	22,1-26,0	0,48-0,82	0,08-0,56	5,6	64,2-78,8	69,58-98	Ghavidel; Prakash, (2007); Xu et al. (2016) El-Hady e Habiba (2003)
Lentilha (*Lens culinaris*)	23,1-26,5	0,19-1,25	0,75-0.915	5.8	37,6	68,0-76,0	Ghavidel; Prakash (2007); Zia-Ur-Rehman e Salariya (2005)
Milho (*Zea mays*)	7,3-8,9	0,45-0,698	0,033-0,635	s.i.	66,6-77,0	62	Hassan et al. (2009); Jood; Kapoor; Singh (1995); Duodu et al. (2002)
Sorgo (*Sorghum bicolor*)	14,1	0,07	0,70	2,7	37,33-51,5	25,93-33,41	Adeyemo; Onilude; Olugbogi (2016); Hassan et al. (2009); Soetan et al. (2006); Duodu et al. (2002)
Soja (*Glycine max*)	40-55,7	1,36-5,57	0,58-1,59	1,82-6,22	63,3-70,49	66,8	Fenwick e Oakenfull (1983); Sharma et al. (2013)
Trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*)	14,47	0,19-3,83	5,13	3,23	73,56	74,16-78,32	Deng et al. (2015); Steadman et al. (2001)

Nota: Os teores de proteína, ácido fítico, tanino e saponina estão em base seca. s.i: sem informação na literatura.

Conforme apresentado na TABELA 1 os antinutrientes ácido fítico, taninos e saponinas são encontrados em quantidades relativamente elevadas em grãos e exercem efeito negativo na DPIV. A interação desses ANs com proteínas isoladamente e o seu efeito na digestão proteica é conhecido e serão discutidos nos tópicos a seguir. No entanto, em geral, os ANs não existem isoladamente e, portanto, o efeito destes na DPIV final pode ser resultado de interações complexas entre os ANs e os demais constituintes dos alimentos. Por exemplo, o consumo simultâneo de tanino e saponina promove interações químicas que inibem a absorção de toxinas do trato intestinal em dietas herbívoras (FREELAND et al., 1985), porém, pode diminuir a digestibilidade proteica em ruminantes (MAKKAR et al., 1995). Outro exemplo é o aumento da absorção de compostos flavonoides na presença de ácido fítico (MATSUMOTO et al., 2007; XIE et al., 2014; FU et al., 2015) devido ao aumento da solubilidade e permeabilidade dos polifenóis nas células (XIE et al., 2014) e redução da mobilidade gastrintestinal (MATSUMOTO et al., 2007).

Os tópicos a seguir descrevem detalhadamente os antinutrientes ácido fítico, taninos e saponinas e as suas interações com proteínas e cátions divalentes.

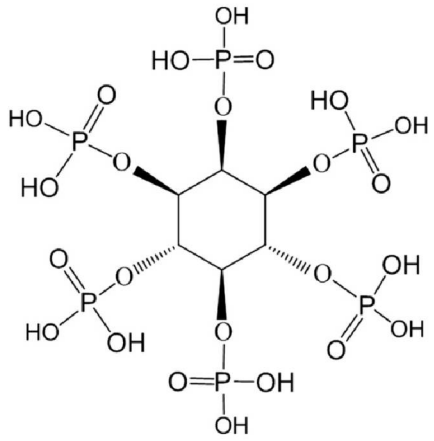
2.2. ÁCIDO FÍTICO (FITATO)

O ácido fítico (AF) é um dos antinutrientes mais comuns em dietas de países com baixa renda e consiste em aproximadamente 1% a 5% do peso de muitos cereais e legumes (CHERYAN; RACKIS, 1980). Esta molécula funciona como um composto de armazenamento de fósforo em sementes e é essencial para a liberação deste durante a germinação (MICHAELSEN et al., 2009). O AF acumula-se em nozes, grãos de cereais e sementes de leguminosas (MICHAELSEN et al., 2009), representando 40% a 99% da quantidade total de fósforo em sementes de legumes e 25% a 60% em castanhas (FERRANDO, 1983).

O ácido fítico ou ácido inositol hexafosfato (IP6) é um éster resultante da combinação dos grupos funcionais secundários do inositol (ciclohexanol) com seis moléculas de ácido ortofosfórico (FIGURA 1). Este éster é o único composto

natural que contém um átomo de fósforo para cada átomo de carbono. Ele pode formar um sal simples com um metal ou um sal complexo com vários metais em uma mesma molécula (FERRANDO, 1983).

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO FÍTICO



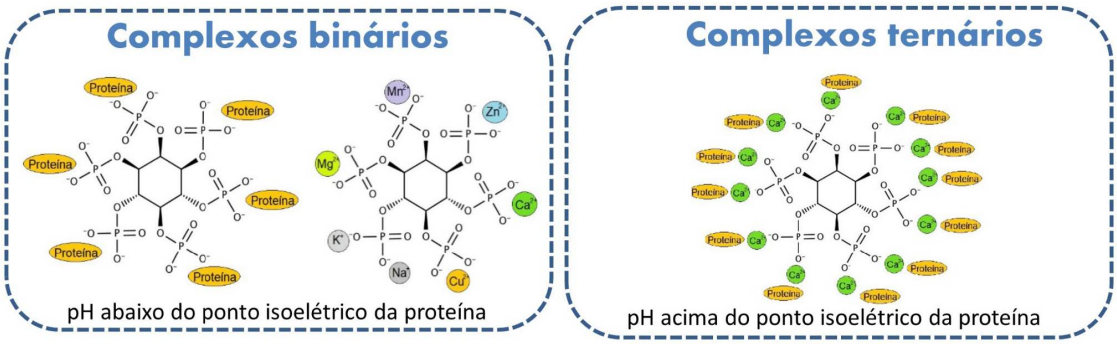
FONTE: FU et al. (2015)

Dos 12 átomos de hidrogênio substituíveis do AF, seis são prótons fortemente dissociáveis apresentando um pKa de aproximadamente 1,8. Dois apresentam valor de pKa de aproximadamente 6,3 e os quatro restantes são fracamente ácidos, com valor de pKa maior que 9.7 (CHICHESTER et al., 1983). Dessa forma, o AF é carregado negativamente em uma ampla faixa de pH o que lhe confere alta reatividade com outras moléculas positivamente carregadas como minerais e proteínas (CHERYAN; RACKIS, 1980). Em muitas plantas o ácido fítico é encontrado em globóides, que são vacúolos de armazenamento de proteína, principalmente no gérmen e camada de aleurona dos grãos. Dessa forma, as interações entre o ácido fítico e proteínas ocorrem naturalmente nas plantas. Porém, os complexos formados durante o processamento dos alimentos e no trato gastrointestinal são de maior importância na digestão proteica pelo organismo devido a sua menor solubilidade (KIES et al., 2006).

Nas proteínas, em pH abaixo do ponto isoelétrico, o ácido fítico pode interagir com os grupos carregados positivamente como os grupos amino terminais, aminoácidos básicos como, por exemplo, a lisina e arginina e por meio de ligações de hidrogênio com grupos carboxílicos. Acima do ponto isoelétrico há

a formação de um complexo ternário de proteína-mineral-ácido fítico (GRYNSPAN; CHERYAN, 1989). Os complexos ternários são formados devido a uma ponte iônica entre o cátion divalente (carregado positivamente) e a molécula de proteína e do AF (carregados negativamente) (SELLE et al., 2012). A FIGURA 2 ilustra, de maneira geral, como os complexos binários e ternários são formados.

FIGURA 2 – INTERAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO COM PROTEÍNAS E MINERAIS



FONTE: O autor (2019).

A interação do AF com as proteínas depende da estrutura, conformação e composição de aminoácido da proteína (SELLE et al., 2012). Outros fatores como a temperatura e a presença de sais afeta as interações entre proteínas e o AF. Os sais em pH ácido inibem a formação dos complexos devido à neutralização da molécula de AF (MURTHY; RAO, 1984). Em relação à temperatura, o aquecimento pode aumentar a relação estequiométrica da ligação e a liberação de água devido a formação de complexos insolúveis (DARBY et al., 2016). Este poderia ser um fator importante para caraterísticas funcionais de proteínas como a geleificação a quente. Arntfield (1996) observou um aumento da resistência dos géis de proteína de canola em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico devido à interação direta entre o AF e a proteína. Porém, segundo Wong (1995), esta interação pode proporcionar a agregação proteica alterando as características dos géis.

A interação do AF com enzimas digestivas e a sua capacidade de inibição enzimática vêm sendo discutida. Singh e Krikorian (1982) demonstraram que o ácido fítico inibe a atividade de tripsina pancreática em até 46%. Em outro estudo

realizado *in vivo* por Sajjadi e Carter (2004) não foram observadas diferenças na atividade da enzima tripsina quando ácido fítico foi adicionado a dietas de peixes. Já para a enzima α-amilase foi observada uma redução de 49% (DESHPANDE, 1984) até 99% (SHARMA et al., 1978) da sua atividade devido à presença de diferentes concentrações de AF.

O AF é um forte quelante de metais divalentes (RIMBACH; PALLAUF, 1999; MA et al., 2007) e pode formar um sal simples com um metal ou um sal complexo com vários metais (FERRANDO, 1983) (FIGURA 2). A interação ocorre devido a fortes cargas negativas nos seis grupos fosfato do AF podem interagir com os cátions divalentes e trivalentes (OH et al., 2001; KIM et al., 2010). O Ca^{2+} é o cátion divalente mais abundante sob condições fisiológicas e é tipicamente um dos minerais mais prevalentes para interagir com o fitato (KIM et al., 2010). Como os seres humanos são incapazes de hidrolisar fitatos, a quelação de minerais pode levar a diminuição da sua biodisponibilidade (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017). Devido aos íons metálicos, por exemplo o zinco, o cálcio e o magnésio, serem indispensáveis para a processos fisiológicos dos organismos vivos, a diminuição na sua absorção pode causar problemas à saúde (STEIN, 2010; GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

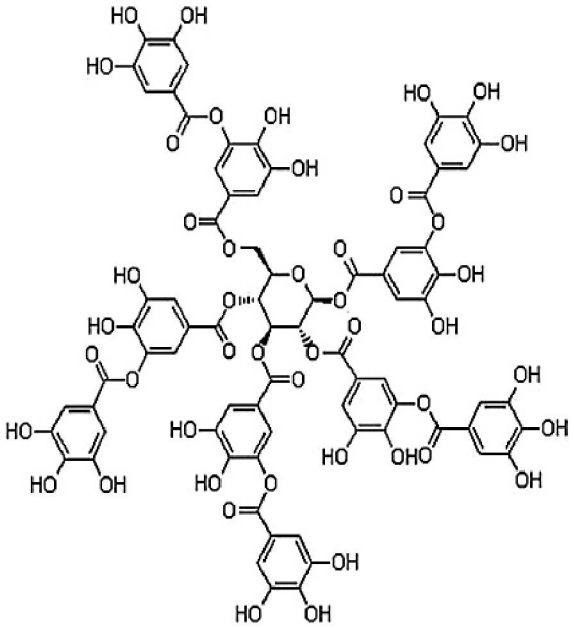
Além disso, a formação de um complexo ternários entre o AF, cátion divalente e proteína pode influenciar vários processos como a atividade catalítica e a degradação autocatalítica da tripsina (CALDWELL, 1992), textura e solubilidade dos alimentos, separação de proteínas (ALI et al., 2010), e estabilidade (BYE et al., 2013). Essas interações vêm sendo estudadas também no organismo humano devido a sua capacidade de prevenção de condições patológicas e câncer. Isso ocorre em virtude de sua capacidade antioxidante via quelação do ferro, supressão da formação de radicais livres, quelação com Ca^{2+} e modulação de funções do sistema imunológico (SILVA; BRACARENSE, 2016).

2.3. TANINOS

Os taninos são amplamente encontradas em alimentos como frutas, legumes e grãos (COMBS, 2016). Estas substâncias são compostos fenólicos solúveis em água com uma massa molar maior que 500 Daltons (AKANDE et al.,

2010). A sua estrutura é formada por pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, além de outros constituintes (JALDAPPAGARI et al., 2013). Um tanino comum encontrado nos alimentos é o ácido tânico (AT), o qual é composto por uma molécula de glicose central com um ou mais resíduos de galoil (GÜLÇIN et al., 2010) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO TÂNICO



FONTE: THONGKAEW et al. (2014).

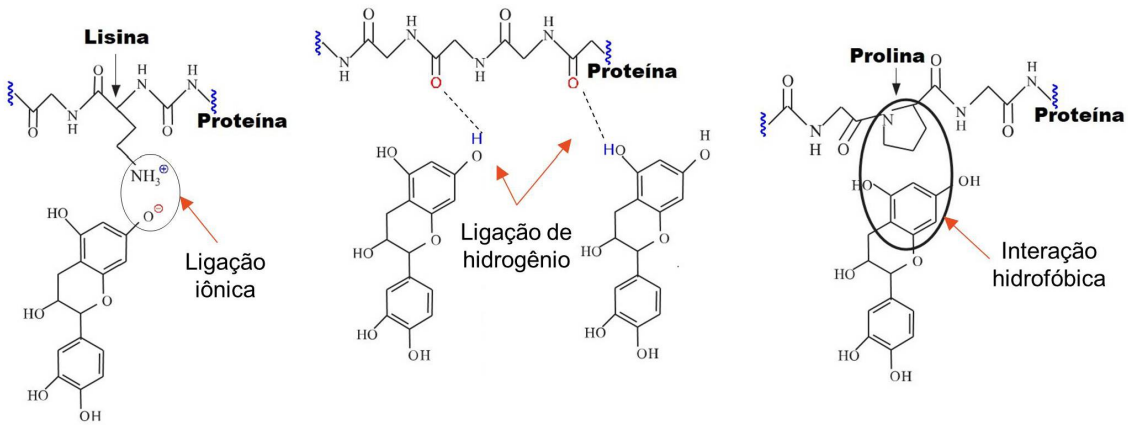
Os taninos são conhecidos por interagir com proteínas e diminuir a sua digestibilidade além de serem responsáveis pela adstringência dos alimentos. A interação entre proteínas e polifenóis vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Esta interação tem grande importância em alimentos e nutrição, pois além de contribuírem para a adstringência dos alimentos (CHARLTON et al., 2002; MCRAE et al., 2010) podem inibir a atividade enzimática (OLSEN et al., 2011; ISHTIKHAR et al., 2018) e a absorção de nutrientes (MARTÍNEZ; MOYANO, 2003) e mudar a ação antioxidante dos polifenóis (OZDAL et al., 2013; ISHTIKHAR et al., 2018), etc. Além disso, os polifenóis podem afetar as características funcionais das proteínas como a geleificação. Por exemplo, a formação de complexos proteína-polifenol acelera a geleificação de β-

lactoglobulina e caseinomacropeptídeo devido a capacidade do polifenol em auxiliar na desnaturação e agregação das proteínas (STASZEWSKI, VON et al., 2012). Porém, pode inibir a formação de rede de gel devido a precipitação (STASZEWSKI, VON et al., 2011) e interferência nas interações hidrofóbicas (ARNTFIELD, 1996).

As interações de proteínas com compostos fenólicos dependem da estrutura dos polifenóis, da estrutura das proteínas e dos parâmetros da solução (pH, força iônica, temperatura, etc.). Em relação às características das proteínas, altos teores de prolina favorecem a ligação com polifenóis por interações hidrofóbicas. O pH ou força iônica do meio altera a extensão das ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica. A temperatura pode causar a desnaturação proteica aumentando assim a probabilidade de ligação com polifenóis na sua superfície (BANDYOPADHYAY et al., 2012).

As interações de proteínas com polifenóis podem ser reversíveis ocorrendo por meio de ligações não covalentes como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e hidrofílicas ou irreversíveis devido à formação de ligações covalentes como as ligações cruzadas (BOURVELLEC, LE; RENARD, 2012; OZDAL et al., 2013; ROHN, 2014). Ligações covalentes do tipo C-N ou C-S podem ser formadas quando o polifenol é oxidado a quinonas ou semiquinonas as quais tem alta reatividade com os aminoácidos lisina, metionina, cisteína e triptofano (CHU et al., 2018). A FIGURA 4 apresenta um esquema das possíveis interações reversíveis que podem ocorrer entre proteínas e polifenóis.

FIGURA 4 - TIPOS DE INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE PROTEÍNAS E POLIFENÓIS



FONTE: Adaptado de LE BOURVELLEC e RENARD (2012).

Mudanças na conformação molecular das proteínas proporcionadas por polifenóis podem reduzir a atividade catalítica de muitas enzimas como, por exemplo, as enzimas digestivas. He, Lv e Yao (2007) observaram inibição de 61% da atividade de α-amilase, 32% de pepsina, 38% de tripsina e 54% de lipase na presença de 0,05 mg/mL de polifenóis de chá, o que pode proporcionar redução na absorção de nutrientes. Porém, segundo Bandyopadhyay, Ghosh e Ghosh (2012), a modulação na ação dos polifenóis em enzimas pode ser benéfica para a saúde devido à inibição das enzimas amilase e glucosidase em pacientes diabéticos ou inibição da lipase em pessoas obesas.

Estudos de interação entre proteínas e taninos utilizando ITC são frequentes e resultam, em sua maioria, em interação exotérmica. A afinidade dos taninos pelas proteínas e a relação estequiométrica da ligação varia de acordo com a composição da proteína e a composição dos taninos (PRIPP et al., 2005; DEAVILLE et al., 2007; PONCET-LEGRAND et al., 2007; FRAZIER et al., 2010; OLSEN et al., 2011; MCRAE et al., 2015; JAUREGI et al., 2016; KILMISTER et al., 2016). Por exemplo, o caseinato de sódio apresenta maior constante de afinidade com o ácido tânico quando comparado às proteínas BSA, gelatina e β-lactoglobulina, porém a quantidade de ácido que é ligada é menor do que a obtida para as outras proteínas, sendo que a gelatina consegue ligar até 48 moléculas de ácido tânico em sua estrutura (PRIPP et al., 2005). Além disso, a relação estequiométrica da ligação depende do número de grupos galoil (SUN, L. et al., 2017) e do tamanho do tanino (ROPIAK et al., 2017).

Segundo Kilmister et al. (2016) a ligação entre os taninos e as proteínas globulares envolvem vários sítios de ligação. Porém, segundo estudo realizado por Hagerman e Butler (1981) alguns tipos de taninos podem precipitar uma única proteína na presença de várias outras. A especificidade dessa interação é uma função do tamanho, conformação, carga e, principalmente, o conteúdo de prolina na molécula de proteína. O mesmo comportamento foi observado por Cala et al. (2012), onde os taninos apresentaram maior afinidade por peptídeos de menor massa molar presentes na saliva.

Além das interações dos polifenóis com as proteínas, estes compostos podem formar complexos com íons multivalentes como, por exemplo, zinco, ferro e cálcio e reduzir a sua absorção no trato gastrointestinal (GHARIBZAHEDI;

JAFARI, 2017). O metal pode fazer o polifenol agir como um pró-oxidante (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016) e promover a formação de precipitados em bebidas (MILLET et al., 2017). Entretanto, em algumas áreas do conhecimento, numerosos usos de taninos ou materiais contendo taninos dependem da complexação com íons metálicos (MCDONALD et al., 1996). Alguns exemplos são: tratamento da hipersensibilidade dentária (JU et al., 2017), mobilidade de metais e nutrientes em solos (SCHMIDT et al., 2017) e a formação de filmes tridimensionais para administração de medicamentos (GUO et al., 2014; LIANG et al., 2017).

A presença de proteínas, íons metálicos e taninos é frequentemente observada em alimentos e em organismos vivos e o conhecimento das interações entre estas substâncias é essencial para a compreensão de vários processos. Por exemplo, a interação β-lactoglobulina e epigalocatequina-3-galato (polifenol do chá) é afetada pelo cálcio presente no leite em misturas de leite e chá, que podem afetar a degradação de polifenóis e proteínas durante a digestão gastrointestinal (CARNOVALE et al., 2015). Outro exemplo é a interação de proteínas ricas em prolina com taninos em vez de ferro não-heme, tornando o mineral mais biodisponível (DELIMONT et al., 2017). Além disso, a presença de metais pode afetar as reações de drogas baseadas em compostos fenólicos com as albuminas séricas no plasma. Esse comportamento foi observado para a complexação de íons com proteínas plasmáticas encurtando o tempo de retenção do flavonoide no sangue e facilitando a sua liberação (WANG et al., 2007; HEGDE; SEETHARAMAPPA, 2011).

Os taninos podem apresentam inúmeros benefícios para a saúde sendo considerados cardioprotetores, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos e anti-mutagênicos (KUMARI, M., JAIN, 2012). Porém as suas propriedades biológicas são muito dependentes da sua biodisponibilidade (CARDONA et al., 2013). Dessa forma, a interação de proteínas e taninos influenciam o seu efeito benéfico no organismo e o conhecimento de como estas interações ocorrem pode auxiliar no melhor aproveitamento do potencial biológico dos taninos.

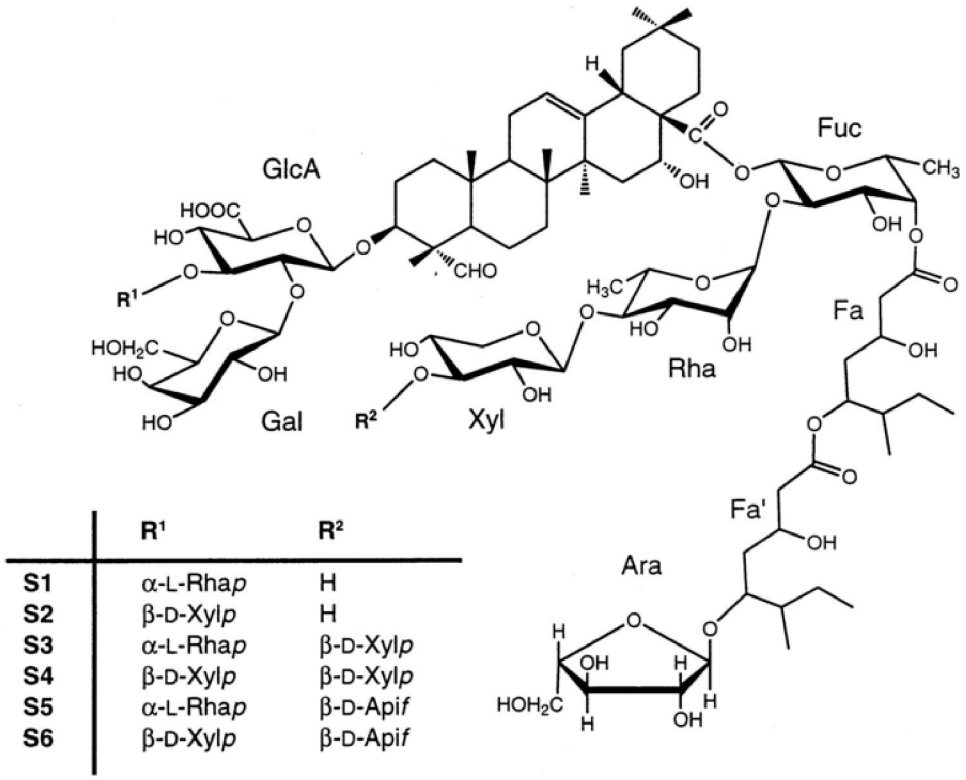
2.4. SAPONINAS

As saponinas estão amplamente distribuídas em animais marinhos e vegetais e incluem muitos compostos biologicamente ativos. Elas são conhecidas por formar soluções coloidais em água, pela capacidade espumante e de precipitar colesterol (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996). Em alimentos processados, as saponinas são usadas como emulsificantes ou agentes espumantes.

As saponinas constituem um vasto grupo de compostos estruturalmente relacionados consistindo de uma aglicona triterpenóide ou não polar esteróide (também conhecida como sapogenina) ligado a uma ou mais porções de oligossacarídeos hidrofílicos através de uma ligação glicosídica éter ou éster. Tal combinação de elementos estruturais polares e não polares lhes confere propriedades espumantes e emulsificantes (NAVARRO DEL HIERRO; HERRERA; GARCÍA-RISCO; et al., 2018).

Uma das saponinas mais estudadas e comercialmente disponível é derivada da árvore chilena *Quillaja saponaria* Molina (REICHERT et al., 2015). As saponinas extraídas dessa planta são utilizadas principalmente em xampus, detergentes líquidos, cremes dentais e bebidas como emulsificante e agente espumante de longa duração (WALLER; YAMASAKI, 1996). A FIGURA 5 apresenta a estrutura geral da saponina de casca de *Quillaja*. As saponinas extraídas dessa planta podem apresentar uma variedade de estruturas (BANKEFORS et al., 2008). A sua complexidade estrutural decorre da variabilidade na estrutura da sapogenina, da natureza das cadeias laterais e das posições de ligação das moléculas de açúcar à sapogenina (NAVARRO DEL HIERRO; HERRERA; FORNARI; et al., 2018).

FIGURA 5 – EXEMPLOS DE ESTRUTURAS DA SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA*



	R¹	R²
S1	α-L-Rha*p*	H
S2	β-D-Xyl*p*	H
S3	α-L-Rha*p*	β-D-Xyl*p*
S4	β-D-Xyl*p*	β-D-Xyl*p*
S5	α-L-Rha*p*	β-D-Api*f*
S6	β-D-Xyl*p*	β-D-Api*f*

Nota: S1 a S6 são alguns exemplos de estruturas, R^1 e R^2 representam grupos H ou diferentes grupos de açúcar, Ara é arabinose, Xyl é xilose, Rha é ramnose, Gal é galactose, GlcA é ácido glucurônico, Fuc é fucose e Fa ou Fa' é acil graxo.
FONTE: NYBERG et al. (1999).

Os diferentes grupos presentes na saponina podem interagir com proteínas (POTTER et al., 1993) por ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, forças eletrostáticas ou uma combinação dessas (REICHERT et al., 2018). O tipo de interação é influenciado principalmente pelo pH, força iônica e estrutura da proteína e da saponina (FARIA, DE et al., 2017a, 2017b). Se o pH das proteínas está abaixo do ponto isoelétrico a afinidade com saponinas pode ser maior e complexos com razão molar de saponina:proteína menor podem ser obtidos (PIOTROWSKI et al., 2012). Acima do ponto isoelétrico, interações hidrofóbicas também ocorrem (FARIA, 2015). Mudanças na força iônica do meio podem alterar a solubilidade dos complexos. Em baixas concentrações de sal, a repulsão eletrostática impede a agregação enquanto, em altas concentrações de sal, as interações atrativas (como van der Waals) superam as interações de repulsão (como eletrostática) (YANG et al., 2013).

Além disso, a proporção dos componentes muda o processo de interação. Baixas proporções de proteínas saponinas formam complexos devido a interações eletrostáticas entre as cargas iônicas da proteína e as cargas iônicas do surfactante. No entanto, se existe excesso do agente surfactante, a ligação com proteínas ocorre principalmente por ligações hidrofóbicas (WOJCIECHOWSKI et al., 2011, 2014).

O efeito da saponina é diferente em cada proteína devido à sua natureza e organização individual (SHIMOYAMADA et al., 2000). Por exemplo, as proteínas de soja interagem rapidamente de maneira forte com saponinas ao contrário da caseína que complexa lentamente (POTTER et al., 1993) ou da gelatina que pode não interagir (SARNTHEIN-GRAF; MESA, LA, 2004). As diferenças observadas nas interações estão relacionadas com a presença de locais de ligação específicos das proteínas, reconhecendo seletivamente porções de açúcar (por exemplo, lisozima) ou carboxílicas (por exemplo, β-lactoglobulina) das moléculas de saponina. Essas interações específicas modulam as interações eletrostáticas e hidrofóbicas simples disponíveis em misturas de proteínas com saponinas (KEZWON; WOJCIECHOWSKI, 2014).

Os complexos de proteína e saponinas podem diminuir a digestibilidade proteica (IKEDO et al., 1996; SHIMOYAMADA et al., 1998, 2000). A inibição da hidrólise proteica está relacionada a alterações conformacionais da proteína e a cobertura dos resíduos alvo das enzimas digestivas (IKEDO et al., 1996). No entanto, em determinadas condições, a hidrólise enzimática aumenta na presença de saponinas. Esse comportamento foi observado para a β-lactoglobulina e foi atribuído à perda da estrutura de beta barril da molécula melhorando o acesso das enzimas digestivas (SHIMOYAMADA et al., 2005).

A interação de saponinas e proteínas proporciona alterações na atividade de superfície de soluções resultando em alterações na capacidade espumante (PIOTROWSKI et al., 2012), emulsificante (WANGSAKAN et al., 2006; BÖTTCHER et al., 2016; FARIA, DE et al., 2017a, 2017b; REICHERT et al., 2018), e propriedades interfaciais da solução (WOJCIECHOWSKI et al., 2014). Além disso, pode ocorrer um aumento da temperatura de desnaturação das proteínas (IKEDO et al., 1996), formação de complexos insolúveis em bebidas (MORTON;

MURRAY, 2001) e mudança na atividade enzimática (ISHAAYA; BIRK, 1965; YU et al., 2017).

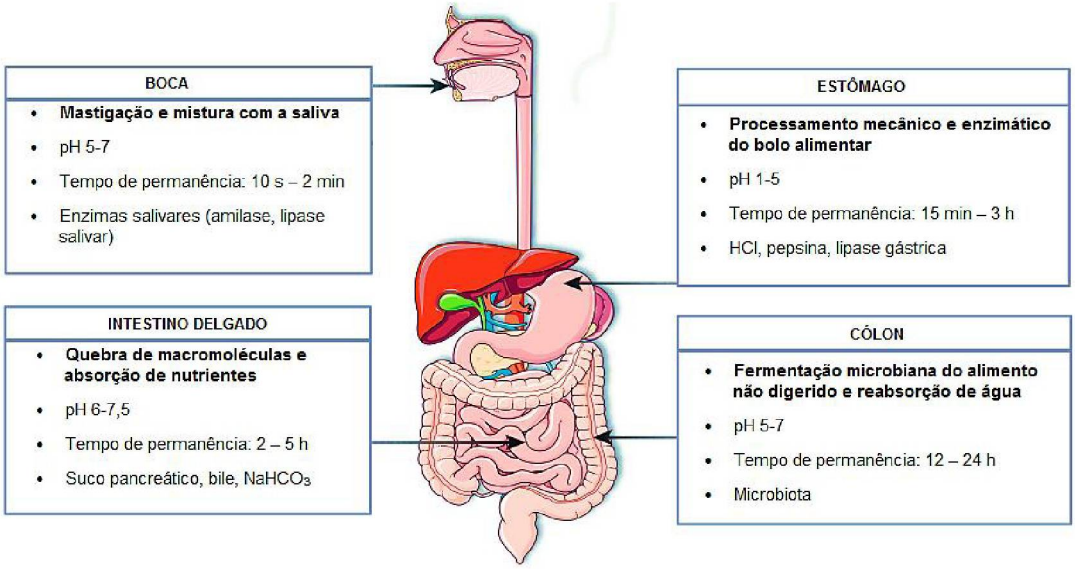
Como observado para os taninos e fitatos, as saponinas também apresentam diversos efeitos benéficos como interação com proteínas tóxicas de tumores (THAKUR et al., 2013), combate a diabete (BARKY, EL et al., 2016) redução nos níveis do colesterol LDL (POTTER et al., 1993; UEDA; YOKOYAMA, 2001) e apresentam efeito antioxidante, antifúngico e antiviral (FRANCIS et al., 2002). Além disso, interagem com membranas celulares e, dessa forma, podem modular o tráfego intracelular de toxinas (WENG et al., 2012).

2.5. DIGESTIBILIDADE DE PROTEÍNAS

As proteínas consumidas na alimentação humana são utilizadas como fonte de aminoácidos para a síntese de proteínas (KNIGHT et al., 2009). A qualidade proteica de um alimento depende da quantidade de aminoácidos essenciais ingeridos na dieta, digestibilidade das proteínas e a biodisponibilidade dos aminoácidos (GILANI et al., 2012).

Para compreender como ocorre a digestão proteica é necessário entender como funciona o sistema digestivo. A FIGURA 6 apresenta um esquema do trato gastrointestinal humano. A digestão se inicia pela boca por meio da mastigação e ação de enzimas. Em seguida, o bolo alimentar é enviado ao estômago para ser digerido pelo suco gástrico o qual contém pepsina e lipase gástrica em baixo pH (1-5) que promovem a digestão de proteínas e lipídeos. No intestino delgado ocorre a quebra de macromoléculas e absorção de água e nutrientes. Nesta etapa, as enzimas pancreáticas (uma mistura complexa de proteases, amilases e lipases) e outras enzimas digestivas atuam na quebra de componentes dos alimentos seguida da absorção dos nutrientes pelas células epiteliais do intestino. O material não absorvido viaja para o intestino grosso onde ocorre a absorção de água e eletrólitos, a fermentação de polissacarídeos e proteínas, a reabsorção de sais biliares além da formação, armazenagem e eliminação das fezes (GUERRA et al., 2012).

FIGURA 6 – TRATO GASTROINTESTINAL HUMANO

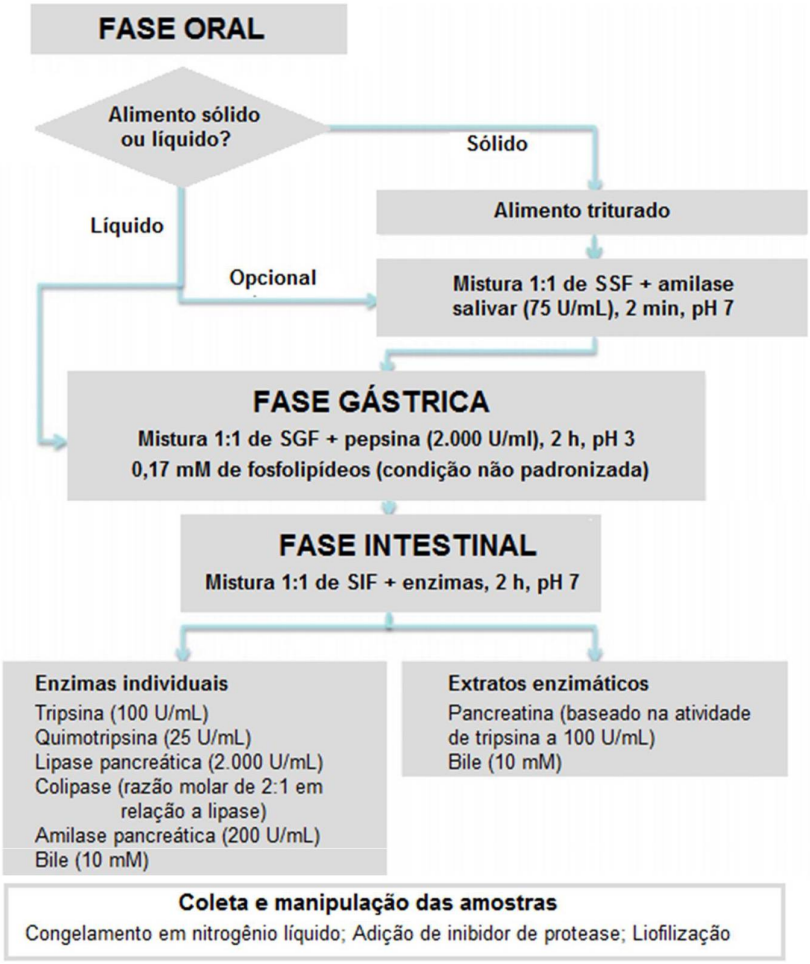


FONTE: GUERRA et al. (2012)

O procedimento para a determinação da digestibilidade proteica *in vivo* é realizado com ratos por um período de 9 dias. Por meio deste método, o índice de nitrogênio fecal é quantificado e o nitrogênio excretado nas fezes é subtraído da quantidade ingerida resultando no valor de digestibilidade aparente. Para a determinação da digestibilidade verdadeira, é preciso determinar a quantidade de nitrogênio endógeno excretado que é obtido quando o animal está consumindo tanto uma dieta livre de proteínas quanto uma dieta com apenas o suficiente de uma proteína de fácil digestão (FAO/WHO, 1991).

Pela maior praticidade, menor custo e tempo de análise, além de ser evitado o uso de animais, a digestibilidade proteica *in vitro* vem sendo amplamente utilizada em pesquisas científicas e, em geral, apresenta concordância com resultados obtidos *in vivo* (HSU et al., 1977; BUTTS et al., 2012). As metodologias propostas para a determinação da digestibilidade *in vitro* são variadas. Dessa forma, Minekus et al. (2014) propuseram um método padronizado por meio de uma colaboração entre pesquisadores de vários países. A metodologia proposta pelos autores está apresentada na FIGURA 7 e é baseada nos processos de digestão *in vivo* descritos anteriormente.

FIGURA 7 – DIAGRAMA DESCRITIVO DE UM MÉTODO DE SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO *IN VITRO*.



Nota: SSF, SGF e SIF são fluidos salivar, gástrico e intestinal simulado, respectivamente, e são compostos pelos eletrólitos K^+, Na^+, Cl^-, $H2PO_4^-$, $HCO3^-$, CO_3^-, Mg^{2+}, NH_4, Ca^{2+} em diferentes concentrações. As atividades enzimáticas estão em unidades por mL da mistura digestiva final de cada fase de digestão. A temperatura em todas as etapas é de 37 °C.
FONTE: MINEKUS et al. (2014).

Como pode ser observado nas FIGURAS 6 e 7, a digestão de proteínas ocorre basicamente por enzimas presentes no estômago e no intestino delgado, além da hidrólise ácida proporcionada pelo baixo pH do estômago. Dessa forma, para a avaliação da digestibilidade proteica, podem ser utilizadas somente as etapas da fase gástrica e intestinal descritos na FIGURA 7.

Segundo Damodaran, Parkin e Fennema, (2010) os principais fatores que afetam a digestibilidade proteica são:

- Conformação: proteínas desnaturadas apresentam digestibilidade maior do que proteínas no estado nativo;

- Processamento dos alimentos: devido a reações químicas que proporcionam mudanças na interação de proteínas e outros componentes ou na estrutura da proteína;
- Presença de fatores antinutricionais: complexos de proteína-antinutrientes que são resistentes à digestão ou inibidores de protease;
- Viscosidade (FLEDDERUS et al., 2007): um aumento moderado na viscosidade pode reduzir a taxa de esvaziamento gástrico aumentando a hidrólise da proteína.

Os processamentos mais utilizados em sementes de leguminosas afim de aumentar a digestibilidade proteica são o descascamento, a moagem, a maceração, a germinação, a fermentação e o cozimento (KUMAR; SUDHIR; 2010). O descascamento pode aumentar o valor nutritivo dos alimentos pois os ANs presentes em grãos encontram-se principalmente nas camadas externas (KUMAR et al., 2009; MICHAELSEN et al., 2009; OGHBAEI et al., 2016). A maceração auxilia na redução de ANs solúveis em água, como saponinas e fitatos, e devido a ativação de enzimas endógenas (KHOKHAR; CHAUHAN, 1986). O tratamento térmico proporciona a inativação principalmente dos antinutrientes de origem proteica como os inibidores de protease e lectinas (KHOKHAR; CHAUHAN, 1986; KUMAR et al., 2009) e pode auxiliar na degradação de algumas saponinas (KHOKHAR; CHAUHAN, 1986).

Processos que envolvem reações enzimáticas podem ser ainda mais eficientes na obtenção de alimentos com nutrientes biodisponíveis. A fermentação é efetiva na redução do conteúdo de muitos ANs devido à liberação da enzima fitase, polifenoloxidase, entre outras pelos microrganismos (AKPAPUNAM; ACHINEWHU, 1985; REDDY; PIERSON, 1994). Durante a germinação também ocorre a liberação de enzimas que podem auxiliar na redução do fitato (VIDALVALVERDE et al., 1994; NAJDI HEJAZI et al., 2016), taninos (KHOKHAR; CHAUHAN, 1986; YASMIN et al., 2008) e oxalatos (KAUR et al., 2012; NAJDI HEJAZI et al., 2016). Métodos mais precisos, porém, mais onerosos, que visam à eliminação de ANs são a utilização de enzimas isoladas. A aplicação de enzimas como a tanase (SCHONS, 2009) e fitase (SELLE et al., 2000; BARUAH et al., 2004; SCHONS, 2009; KUMAR et al., 2010) podem ser utilizadas em alimentos

com alto teor de taninos e ácido fítico e já vem sendo utilizadas para alimentação animal (WALSH et al., 1993; COWIESON et al., 2006).

2.6. CONSIDERAÇÃOES SOBRE A REVISÃO DE LITERATURA

Os antinutrientes estão comumente presentes nos alimentos de origem vegetal e o conhecimento de suas interações com componentes dos alimentos e enzimas são importantes para o entendimento da biodisponibilidade e propriedades tecnológicas dos alimentos durante o processamento. A ingestão de quantidade excessiva de antinutrientes pode ser preocupante, por exemplo, em dietas de crianças e adolescentes que estão em fase de crescimento ou em dietas não equilibradas como ocorre em países subdesenvolvidos com principal fonte de proteínas de origem vegetal e integrais sem o devido processamento. As interações envolvendo antinutrientes no organismo humano são complexas e ainda não foram completamente compreendidas sendo que em alguns casos os ANs podem apresentar e efeitos benéficos para a saúde, mas por outro lado tendem a diminuir a absorção de nutrientes.

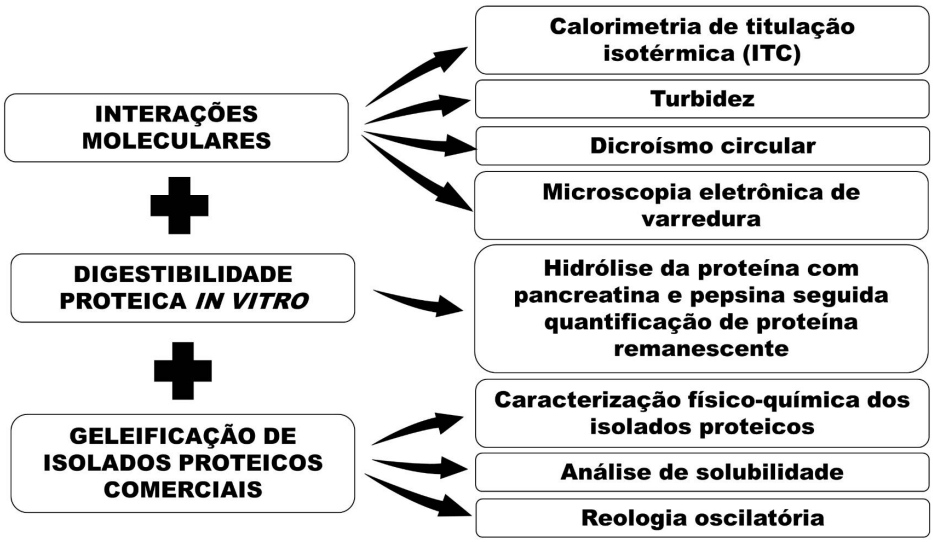
Os estudos existentes de interação molecular entre proteínas e taninos utilizando calorimetria de titulação isotérmica são focados principalmente nas interações de com proteínas devido ao seu efeito adstringente em alimentos. As interações do ácido fítico utilizando esta técnica não levam em consideração parâmetros que podem influenciar nas interações como a força iônica, presença de cátions divalentes e pH. Dessa forma, existe a necessidade de estudos que relacionam a natureza das ligações envolvidas entre os antinutrientes e as proteínas, utilizando calorimetria de titulação isotérmica, com a sua ação antinutricional.

Devido à capacidade dos antinutrientes em complexar com proteínas, as propriedades funcionais destas podem ser afetadas. A propriedade funcional mais afetada é a solubilidade a qual resulta na mudança de outras propriedades das proteínas como estabilidade, capacidade geleificante, entre outras. Dessa forma, o conhecimento das condições que afetam estas propriedades pode ser importante para a aplicação de alimentos ricos em antinutrientes e melhor aproveitamento de alimentos de origem vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A FIGURA 8 apresenta uma visão geral dos experimentos realizados neste trabalho. Cada etapa apresentada será descrita detalhadamente nas seções subsequentes.

FIGURA 8 – ESQUEMA GERAL DOS EXPERIMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO



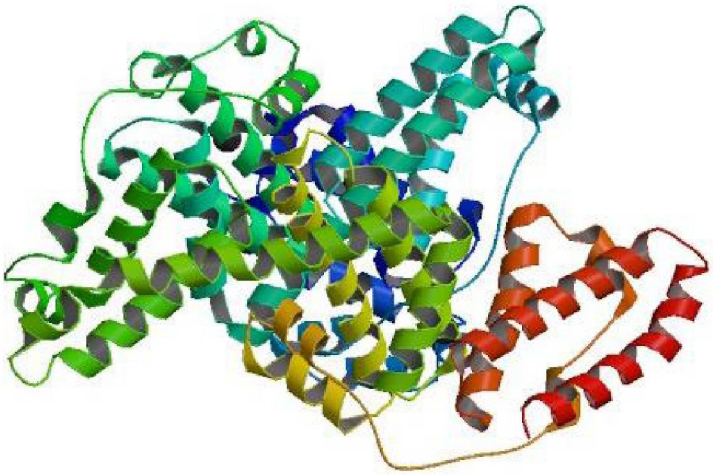
FONTE: O autor (2019).

Foram utilizadas análises de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para estudar diretamente as interações moleculares envolvidas entre proteínas e antinutrientes. As alterações nos resultados de turbidez, dicroísmo circular e microscopia eletrônica de varredura na presença de ANs são devidas as interações moleculares e, dessa forma, essas análises foram utilizadas de forma a complementar os resultados obtidos por ITC. A digestibilidade proteica foi determinada *in vitro* na presença dos antinutrientes utilizando enzimas digestivas em condições gastrointestinais simuladas. A capacidade geleificante foi estudada em isolados proteicos comerciais na presença de antinutrientes. Os isolados proteicos foram previamente caracterizados e a influência dos ANs na solubilidade proteica e formação de géis por meio de reologia foi determinada.

3.1. MATERIAL

A albumina de soro bovino (BSA) (massa molar de 66,43 kDa) da marca Sigma (Missouri, EUA) foi utilizada nas análises de ITC. A FIGURA 9 apresenta a estrutura cristalina da BSA.

FIGURA 9 - ESTRUTURA MOLECULAR CRISTALINA DA ALBUMINA DO SORO BOVINO



FONTE: https://www.rcsb.org/structure/3V03

Os antinutrientes utilizados foram o ácido fítico (AF) (solução a 50% (m/m) em água, massa molar de 660,04 g/mol) e o ácido tânico (AT) (massa molar de 1701,1 g/mol) adquiridos da Sigma (Missouri, EUA) e a saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) adquirida da empresa Vetec (São Paulo, Brasil). As enzimas digestivas utilizadas foram a pepsina suína (1:10000) adquirida da Neon (São Paulo, Brasil) e pancreatina suína (30 unidades de USP/mg de protease de acordo com o fabricante) adquirida da Inlab (São Paulo, Brasil). Para o prepara das soluções tampão, foram utilizados fosfato de sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil), ácido cítrico (Biotec, São Paulo, Brasil), Tris-base (Norgen Biotek Corp., Ontário, Canada) e MOPS (ácido-3-Morfolinopropanossulfonico) (Sigma, Missouri, USA). Os cátions divalentes utilizados foram provenientes do cloreto de magnésio da Neon (São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de manganês da Synth (São Paulo, Brasil). O sal utilizado para o ajuste da força iônica das soluções foi o cloreto de sódio da Neon (São Paulo, Brasil). Os isolados proteicos de soja, ervilha e arroz comerciais foram adquiridos da empresa

Zona Cerealista (São Paulo, Brasil). Todos os demais produtos químicos eram de grau analítico e foram utilizados sem purificação. Todas as soluções usadas nas análises de ITC e turbidez foram preparadas com água Milli-Q® (18,2 mΩcm a 25 °C, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA). As demais amostras foram preparadas em água obtida por um sistema de osmose reversa (condutividade ≤0.06 µS/cm, Vexer, Paraná, Brasil).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Para análise de ligação entre BSA e os ANs foi utilizado um calorímetro de titulação isotérmica (ITC 200, Microcal Inc., Massachusetts, USA) disponível na Central Analítica Multiusuários das Usinas Piloto (CAMUP-UFPR). Antes dos experimentos as amostras de proteína foram dialisadas *overnight* contra o tampão (específico de cada sistema) em membrana de 12 kDa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) sob agitação a 5 °C. As soluções em diferentes concentrações foram preparadas no mesmo tampão de diálise para minimizar o efeito das interações entre o solvente e o ligante. Antes da análise de ITC, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *g* por 5 minutos (Heraeus Fresco 21, Fisher Scientific, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha) para eliminação de bolhas. As concentrações das soluções proteicas foram determinadas de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976) previamente às análises. As titulações de tampão em tampão, tampão em BSA e ligante em tampão foram realizadas e os resultados estão apresentados no APÊNDICE I. A célula de referência foi preenchida com água ultrapura e a célula de amostra com uma solução proteica ou a solução proteica e aditivos. O sistema foi agitado a 700 rpm e a primeira injeção descartada para todas as análises.

3.2.1.1. Interação entre a BSA e o ácido fítico (AF) em pH 3,0

Foi utilizada uma injeção de 0,5 µL seguida de 18 injeções de 2 µL, com intervalos de 150 s entre cada injeção. A concentração de AF foi fixada em 5

mmol/L e a de BSA variou de 0,020 mmol/L a 0,075 mmol/L com o objetivo de atingir a saturação do sistema. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 10 °C, 25 °C, 37 °C, 60 °C e 80 °C em tampão de ácido cítrico e fosfato (pH 3,0; 0,5 mmol/L; força iônica de 1,6 mmol/L). As forças iônicas analisadas foram de 10 mmol/L e 100 mmol/L ajustadas com cloreto de sódio (NaCl), levando em conta a força iônica do tampão, e atingidas por meio de diálise. Para a obtenção da curva final, os resultados obtidos por meio da titulação do AF em tampão foram subtraídos dos resultados obtidos para a titulação do ácido fítico em BSA.

3.2.1.2. Interação entre a BSA e o ácido tânico (AT) em pH 3,0

Foi utilizada uma injeção de 0,5 µL seguida de 24 injeções de 1,5 µL, com intervalos de 300 s entre cada injeção. A concentração de AT foi fixada em 5 mmol/L e da BSA em 0,01 mmol/L. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 10 °C, 25 °C, 37 °C, 60 °C e 80 °C em tampão de ácido cítrico e fosfato (pH 3,0; 0,5 mmol/L; força iônica de 1,6 mmol/L). As forças iônicas analisadas foram de 10 mmol/L e 100 mmol/L ajustadas com cloreto de sódio (NaCl), levando em conta a força iônica do tampão, e atingidas por meio de diálise. Para a obtenção da curva final, os resultados obtidos por meio da titulação do AT em tampão foram subtraídos dos resultados obtidos para a titulação do AT em BSA.

3.2.1.3. Interação do fitato de sódio (NaP) com a BSA na presença de cátions divalentes (M^{2+}) em pH 7,0

Para esses estudos foi utilizado o tampão Tris-HCl (pH 7.0; 100 mmol/L, força iônica de 0,094 mol/L). Como o AF apresenta um pH muito baixo e o tamponamento de sua solução em pH neutro é difícil, utilizou-se fitato de sódio (NaP). Para a preparação do NaP, foi titulado NaOH (2 M) em uma solução de AF de acordo com a Equação 1.

$$C_6H_{18}0_{24}P_6 + 12NaOH \rightarrow C_6H_6Na_{12}0_{24}P_6 + 12H_2O \quad (1)$$

Os experimentos de ITC foram realizados utilizando uma injeção de 0,5 µL seguida de 18 injeções de 2 µL, com intervalos de 150 s entre cada injeção em temperatura de 25 °C. Para o estudo da formação do complexo ternário, titulou-se a solução de M^{2+} em NaP e BSA. Os cátions divalentes utilizados foram Mg^{2+}, Ca^{2+} e o Mn^{2+}. As razões molares de NaP para BSA utilizadas foram de 44:1, 88:1 e 200:1, que foi escolhida com base em testes preliminares. A interação dos sistemas binários BSA-NaP, NaP-M^{2+} e BSA-M^{2+} também foi realizada. Titulações controle foram realizadas para todos os sistemas para avaliar os efeitos de diluição (APÊNDICE I). A titulação M^{2+} em tampão foi subtraída das curvas obtidas para titulação de NaP em BSA e para titulações M^{2+} em NaP e NaP+BSA separadamente.

3.2.1.4. Interação de BSA com o ácido tânico (AT) na presença de cátions divalentes (M^{2+}) em pH 7,0

Os experimentos foram realizados em tampão MOPS (pH 7.0; 20 mmol/L, força iônica de 0,011 mol/L). Para a titulação do AT em M^{2+}, utilizou-se uma injeção de 0,5 µL seguida de 18 injeções de 2,0 µL com intervalos de 150 s entre cada injeção em temperatura de 25 °C. Para sistemas ternários, uma injeção de 0,5 µL seguida de 25 injeções de 1,5 µL foi realizada, com intervalos de 300 s entre cada injeção. Foi titulado o AT nas soluções de BSA contendo os M^{2+} em razões molares de BSA/M^{2+} de 1:250 e 1:625 que foram escolhidas com base em testes preliminares. Os resultados obtidos para a titulação do AT em tampão foram subtraídos das curvas obtidas para titulação de AT em M^{2+} e BSA.

3.2.1.5. Interação de BSA com a saponina da casca de Quillaja (SCQ)

Foi utilizada uma injeção de 0,5 µL seguida de 15 injeções de 2,5 µL, com intervalos de 150 s entre cada injeção. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 25 °C, 37 °C e 75 °C em tampão de ácido cítrico e fosfato (pH 3,0; 5 mmol/L, força iônica de 5,6 mmol/L). A concentração e SCQ utilizada foi de

15 mg/mL e de BSA foi de 1 mg/mL. Para a obtenção da curva final, os resultados obtidos por meio da titulação da SCQ em tampão foram subtraídos dos resultados obtidos para a titulação da saponina em BSA.

3.2.1.6. Interação de BSA com o ácido tânico (AT) na presença de saponina da casca de Quillaja (SCQ) e ácido fítico (AF) em pH 3,0

Uma injeção de 0,5 µL seguido por 19 injeções de 2 µL, com intervalos de 300 s entre cada injeção. Os experimentos foram realizados na temperatura de 25 °C em tampão de ácido cítrico e fosfato (pH 3,0; 0,5 mmol/L; força iônica de 1,6 mmol/L). A concentração de BSA utilizada variou de 0,01 mmol/L a 0,015 mmol/L e de AT foi de 5 mmol/L. O efeito de misturas de ANs foi avaliado pela adição de AF e SCQ na célula da amostra com BSA em razão mássica de 0,01:1 a 0,05:1 de AF/BSA e de 0,25:1 a 1:1 de SCQ/BSA. Para obter a curva final, os resultados da titulação AT em tampão foram subtraídos dos resultados obtidos para a titulação do AT em soluções de BSA ou BSA+AN.

3.2.1.7. Obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação

Os parâmetros termodinâmicos relação estequiométrica (n), constante de afinidade (K_a), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram determinados ajustando o modelo de um-sitio aos dados (Equações 2 e 3), usando o *software* Microcal Origin 7.0 de acordo com o manual (Microcal Tutorial Guide on ITC Data Analysis in Origin®, 2004).

$$Q = \frac{nM_t\Delta HV_0}{2}\left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_aM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{K_aM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}}\right] \quad (2)$$

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0}\left[\frac{Q(i)+Q(i-1)}{2}\right] - Q(i-1) \quad (3)$$

onde Q é o calor total liberado ou absorvido; n é a relação estequiométrica; M_t e [M] são a concentração total e livre da macromolécula no V_o, respectivamente; V_o e V_i são o volume da célula e o volume de injeção, respectivamente; ΔH é o calor

molar da ligação com o ligante; X_t e [X] são as concentrações de ligante total e livre, respectivamente; K_a é a constante de afinidade; e Q(i) é o calor liberado na enésima injeção.

Sendo que a constante de afinidade K_a é definida pela Equação 4.

$$K_a = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]} \quad (4)$$

onde Θ é a fração de sítios ocupados pelo ligante.

O ajuste envolve as estimativas iniciais de n, K_a e ΔH; o cálculo de ΔQ (i) para cada injeção e comparação destes valores com os valores experimentais de calor para a injeção; melhoria nos valores iniciais de n, K_a e ΔH pelo método padrão de Levenberg–Marquardt; e iteração do procedimento acima até que não haja nenhuma melhora significativa no ajuste (Microcal Tutorial Guide on ITC Data Analysis in Origin®, 2004).

A variação de entropia (ΔS) foi calculada pelo software Microcal Origin usando Equação 5.

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T} - Rl\, nK_a \quad (5)$$

onde T é a temperatura do sistema e R é a constante de gás ideal (8,31 J/K.mol).

A energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada usando Equação 6.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os parâmetros termodinâmicos apresentados são a média das medições.

3.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os complexos de BSA/AF (razão molar de 1:15) e BSA/AT (razão molar de 1:100) submetidos ou não a tratamento térmico foram liofilizadas (liofilizador L101, Liobras, São Paulo, Brasil). As amostras obtidas após a liofilização (sem nenhum

tratamento) foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura a 15 kV (VEGA3 LMU, Kohoutovice, República Checa) localizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CME-UFPR). Uma fina camada de cada amostra foi fixada em tiras usando fita adesiva de dupla face. As amostras foram revestidas com ouro (SCD 030, Balzers, Liechtenstein) previamente as análises e as micrografias foram obtidas com ampliação de 300× e 800×. Os tratamentos térmicos das amostras foram realizados sob pressão atmosférica e sob alta pressão (autoclave). Para o tratamento em pressão atmosférica, as amostras de proteína e AN (cerca de 5 mL em frascos de vidro de 10 mL) em água fervente (98 °C na cidade de Curitiba, Paraná) aquecida em uma chapa de aquecimento por 15 min (114, Nova Ética, São Paulo, Brasil). Para o tratamento em autoclave, as amostras foram autoclavadas a 121 °C e 1,1 kgf/cm^2 por 15 min (Autoclave AV-30, Phoenix, São Paulo, Brasil).

3.2.3. Análise de turbidez

Os complexos formados entre proteínas e ANs normalmente precipitam em solução. Dessa forma, a diminuição da solubilidade pode ser correlacionada com a interação molecular. Além disso, a diminuição da solubilidade é um dos principais fatores que afetam a biodisponibilidade das proteínas na presença dos ANs devido a cobertura dos peptídeos a serem hidrolisados pelas enzimas digestivas. Para os estudos de turbidez a porcentagem de transmitância (T) das amostras foi analisada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) localizado no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS-UFPR). O comprimento de onda utilizado foi de 420 nm conforme descrito por Kurukji et al. (2014) para a BSA. A porcentagem de turbidez foi definida como 100 menos a porcentagem de transmitância (RU et al., 2012).

3.2.3.1. Turbidez dos complexos ternários formados por cátions divalentes (M^{2+}), antinutrientes (AN) e BSA

Utilizou-se um planejamento de misturas do tipo simplex-lattice com adição de ponto central e pontos axiais de acordo com a TABELA 2, a fim de avaliar a

influência da BSA, AT ou NaP e M^{2+} na turbidez em pH 7,0. Tampão Tris-HCl (100 mmol/L) foi usado nos sistemas contendo o NaP e tampão MOPS (20 mmol/L) para os sistemas contendo AT. As amostras foram homogeneizadas em microtubos de 2 mL, sendo que o volume total utilizado para cada amostra foi de 1,2 mL. Após a estabilização em banho termostatizado a 25 °C por 4 horas (Lab Companion, Modelo RW-1025G) a transmitância foi determinada. O planejamento foi testado quanto à significância dos modelos por meio do *software* Statistica 10.0 (Statsoft, Brasil). O modelo especial cúbico foi o que mais se adequou aos dados experimentais e foi utilizado para a obtenção da superfície de resposta.

TABELA 2 - PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA SISTEMAS TERNÁRIOS DE BSA, ÁCIDO TÂNICO (AT) OU FÍTICO (AF) E CÁTIONS DIVALENTES (M^{2+})

	Nível codificado			Concentração real (mg/ml)		
n	**BSA**	**NaP/AT**	**M^{2+}**	**BSA**	**NaP/AT**	**M^{2+}**
1	1,00	0,00	0,00	1,82	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00	0,00	1,82	0,00
3	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,82
4	0,50	0,50	0,00	0,91	0,91	0,00
5	0,50	0,00	0,50	0,91	0,00	0,91
6	0,00	0,50	0,50	0,00	0,91	0,91
7	0,67	0,17	0,17	1,22	0,31	0,31
8	0,17	0,67	0,17	0,31	1,22	0,31
9	0,17	0,17	0,67	0,31	0,31	1,22
10	0,33	0,33	0,33	0,60	0,60	0,60

FONTE: O autor (2019).

3.2.3.2. Turbidez dos complexos formados por BSA e antinutrientes (AN)

As concentrações de cada substância utilizada na análise de turbidez foram baseadas em testes preliminares. Para estudar o efeito da razão mássica de AN/BSA na turbidez, soluções de AF (6,6 mg/mL) foram tituladas em solução de BSA (0,6643 mg/mL) até uma razão mássica de AF/BSA de 1,4:1,0. Para as misturas de AT e BSA uma solução de BSA (3,32 mg/mL) foi preparada e o AT adicionado (massa conhecida) até uma razão mássica de AT/BSA de 2,6:1,0. A SCQ foi pesada e adicionada a uma solução de BSA (0,6643 mg/mL) até uma razão mássica de SCQ/BSA de 2,6:1,0. Após a adição de AN, as amostras foram mantidas por cinco minutos sob agitação. Todas as soluções foram preparadas em tampão ácido cítrico-fosfato (0,5 mmol/L) em pH 3,0.

3.2.4. Dicroísmo Circular (CD)

A conformação de BSA solubilizada em pH 3,0 foi avaliada em um espectrômetro de CD (J-815, Jasco International CO., Japão) localizado no departamento de Bioquímica da UFPR. Os espectros foram obtidos utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,01 cm. O nitrogênio foi usado como gás de purga a uma vazão de 10 L/min e a temperatura de 25 °C. Para os estudos de estrutura secundária, as amostras foram analisadas nos comprimentos de onda de 200-260 nm. Para isso, a BSA foi preparada na concentração de 0,1 mg/mL em soluções tampão (ácido cítrico-fosfato dibásico; pH 3,0; 0,15 mmol/L). A razão mássica das amostras contendo AN foi 0,025:1 de AF/BSA, 0,06:1 de AT/BSA e 0,25:1 a 1:1 de SCQ/BSA, que foi escolhida com base em testes anteriores para não formar precipitados durante a análise. As curvas obtidas para as amostras foram descontadas daquelas obtidas para o tampão. A conformação de BSA na presença de saponina também foi avaliada nos comprimentos de onda de 250-350 nm para a determinação de mudanças na estrutura terciária da proteína. Nesses experimentos, 1 mg/mL de BSA foi utilizada e as razões molares de BSA/SCQ variaram de 0,25:1 a 1:1. As curvas obtidas para as amostras contendo SCQ e tampão foram descontadas das obtidas para as mostras contendo BSA, SCQ e tampão. Os dados estão expressos como elipticidade molar calculada de acordo com a Equação 7.

$$MRE = \frac{\theta \times 100 \times MM}{C \times l \times n} \quad (7)$$

onde θ é o grau de elipticidade (deg), L é o caminho óptico (cm), C é a concentração da proteína (mg/mL), MM é a massa molar (g/dmol) e n é o número de resíduos de proteína (CORRÊA et al., 2009).

Os experimentos foram realizados em duplicata e as composições das estruturas de α-hélice estimadas a partir dos dados espectrais utilizando o algoritmo CONTIN-LL pelo software CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000).

3.2.5. Digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV)

O pH gástrico varia de 1 a 5 e o intestinal varia de 6 a 7,5, (GUERRA et al., 2012). Portanto, no presente estudo, o pH 3,0 foi utilizado para simular condições gástricas e pH 7,0 para simular condições intestinais. A digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) foi determinada pelo método descrito por Vilela et al. (2006) com algumas modificações. Para simulação da digestão gástrica, utilizou-se pepsina (5 mg/mL) preparada em pH 3,0 (ajustado com HCl 1,0 M). A concentração de BSA foi de 3,0 mg/mL preparada em diferentes condições conforme apresentado nos subtópicos a seguir. As amostras foram mantidas sob agitação durante 1,5 h a 37 °C. Para a simulação da digestão intestinal, as amostras foram neutralizadas usando NaOH (1,0 M) e uma solução de pancreatina (tampão fosfato; 0,1 M; pH 7,0) foi adicionada até concentração final de 5 mg/mL. As amostras foram mantidas durante 3,5 h a 37 °C sob agitação. Adicionou-se carbonato de sódio a uma concentração final de 5,0 mg/mL para parar a reação. A proteína remanescente após digestão foi quantificada pelo método de Bradford (1976). A DPIV foi calculada de acordo com a Equação 8.

$$DPIV(\%) = \left(1 - \frac{\text{teor de proteína após a hidrólise}}{teor\ de\ proteína\ inicial}\right) \times 100 \qquad (8)$$

3.2.5.1. Efeito de tratamentos térmicos na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT) e ácido fítico (AF)

Os tratamentos térmicos foram aplicados nos complexos formados entre o AF e AT com BSA para avaliar o efeito do calor na DPIV conforme descrito no tópico 3.2.2. A razão molar de proteína para antinutriente utilizada neste experimento foi de 1:15 para ambos os ANs (AF e AT).

3.2.5.2. Efeito da força iônica na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT) e ácido fítico (AF)

O efeito da força iônica na digestão da BSA foi realizado adicionando-se NaCl nas concentrações de 0 a 100 mmol/L. A razão molar de proteína para AN utilizada foi mantida em 1:15.

3.2.5.3. Efeito de cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido fítico (AF)

Foram utilizadas diferentes razões molares de M^{2+}/BSA (25:1 a 200:1) e de NaP/BSA (9,5:1 a 28,4:1) com base nos resultados de ITC e turbidez. A simulação da digestão gástrica e intestinal foram realizadas em concentrações diferentes de enzimas das utilizadas nos demais experimentos. As razões de substrato/enzima foram de 1:4 (m/m) e 1:2 (m/m) para a pepsina e a pancreatina, respectivamente.

3.2.5.1. Efeito de cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA na presença de ácido tânico (AT)

Foram utilizadas as razões molares de M^{2+}:AT:BSA de 250:50:1 e 625:50:1 e de AT:BSA de 50:1 com base nos resultados de ITC e turbidez. As amostras resultantes deste experimento foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante Tris-Tricina-SDS de acordo com o protocolo de Schägger (2006) com um gel de separação composto por 16% de acrilamida. Os géis foram submetidos a corridas de aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 130-170 V. O kit de Calibração Amersham LMW para Eletroforese SDS, composto de fosforilase b (97kDa), albumina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e alfa-lactalbumina (14,4kDa) foram utilizados como padrão de massa molecular. O volume de cada amostra obtida após a DPIV aplicado no gel foi de 10 µL.

3.2.5.2. Efeito das saponinas na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA

Para estudar o efeito da saponina na DPIV da BSA foram utilizadas razões mássicas de saponina:BSA variando de 0 (controle) a 20:1.

3.2.5.3. Efeito das misturas de antinutrientes de ácido fítico (AF), ácido tânico (AT) e saponina da casca de Quillaja (SCQ) na digestibilidade proteica in vitro (DPIV) de BSA

Para o estudo do efeito de misturas binárias de ANs na DPIV da BSA foram preparadas diferentes proporções de AF, AT e SCQ. As misturas binárias de AF e SCQ foram preparadas com concentrações de 0,4 mg/mL de AF e SCQ variando de 0,10 mg/mL a 1,00 mg/mL. As misturas binárias AT e SCQ foram preparadas com concentrações de 0,4 mg/mL de AT e SCQ variando de 0,10 mg/mL a 1,00 mg/mL. Finalmente, para AT e AF foram utilizadas misturas binárias com concentrações de 0,4 mg/mL de AT e AF variando de 0,10 mg/mL a 1,00 mg/mL.

O efeito das misturas ternárias foi estudado por meio de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. As concentrações de cada componente estão apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO COM NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MISTURA DE ANTINUTRIENTES NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DA ALBUMINA DO SORO BOVINO

	Valores codificados			**Valores reais**		
n	**AT**	**AF**	**SCQ**	**AT (mg/mL)**	**AF (mg/mL)**	**SCQ (mg/mL)**
1	-1	-1	-1	0,2	0,2	0,2
2	-1	-1	1	0,2	0,2	0,6
3	-1	1	-1	0,2	0,6	0,2
4	-1	1	1	0,2	0,6	0,6
5	1	-1	-1	0,6	0,2	0,2
6	1	-1	1	0,6	0,2	0,6
7	1	1	-1	0,6	0,6	0,2
8	1	1	1	0,6	0,6	0,6
9	0	0	0	0,4	0,4	0,4
10	0	0	0	0,4	0,4	0,4
11	0	0	0	0,4	0,4	0,4

FONTE: O autor (2019).

A concentração da BSA foi fixada em 3,0 mg/mL conforme experimentos anteriores. Por meio do planejamento fatorial foi possível obter uma equação empírica na faixa avaliada e as proporções de antinutrientes que mais influenciaram a digestão proteica.

3.2.6. Geleificação a quente da BSA na presença de saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) avaliada por reologia

As análises reológicas foram realizadas no departamento de Bioquímica da UFPR. Foi utilizado um reômetro Haake Mars II (Thermo Electron GmbH, Alemanha) acoplado a um banho termostatizado Haake K15, termocirculador de água DC5B3 Haake e uma unidade de controle de temperatura Peltier (TC 81, Haake). As soluções de BSA (5%) foram preparadas em pH 3,0 (5 mmol/L de tampão fosfato/ácido cítrico) na presença e ausência de 2,5% de SCQ. Para a avaliação da formação dos géis durante os experimentos, os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram medidos em função da uma rampa de temperatura. A amostra foi aquecida de 20 °C a 90 °C a uma taxa de 2 °C/min, em seguida, resfriada até 20 °C na mesma taxa. O sensor utilizado foi do tipo cone-placa com diâmetro de 60 mm e ângulo do cone de 2° (C60 2°/TiL). A frequência foi de 1 Hz e deformação máxima de 1% durante os experimentos. Uma campânula (222-1903) foi usada para evitar a desidratação da amostra.

3.2.7. Influência da temperatura e presença de antinutrientes na geleificação a quente de isolados proteicos comerciais

Foram utilizados isolados proteicos comerciais de soja, ervilha e arroz. Para eliminar contaminantes de menor massa molar, como carboidratos de baixa massa molar ou alguns ANs, e sais presentes nos isolados proteicos foi realizada a diálise dos mesmos. Foram utilizadas membranas de diálise de 12-14 kDa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e a diálise foi realizada contra água a 5 °C sob agitação por um período de 48 horas (4 trocas de água). Após a diálise, os isolados proteicos foram liofilizados (liofilizados L101, Liobras, São Paulo, Brasil) e armazenados sob refrigeração até o momento da análise.

3.2.7.1. Composição dos isolados proteicos

O teor de proteína total dos isolados foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2008). O teor de carboidratos totais foi obtido pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O teor de umidade e cinza foi determinado por termogravimetria (TG) (TGA 4000, PerkinElmer, Rodgau, Alemanha). Na análise de TG, aproximadamente 15 mg dos isolados proteicos foram acondicionados em um cadinho de alumina e aquecidos de 30 °C a 700 °C (10 °C/min) em uma atmosfera de ar sintético com um fluxo de 50 mL/min. O teor de umidade da amostra foi determinado pela perda de massa na faixa de temperatura de 30 °C a 150 °C, e o teor de cinzas consistiu da massa residual ao final da análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.7.2. Eletroforese

Foi realizada eletroforese em gel desnaturante Tris-Glicina-SDS em gel de poliacrilamida desnaturante conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador foi de 12% (m/v) e do gel de empilhamento foi de 4%. Foi utilizado 10 µL de amostra na concentração de 2 mg/mL de isolado proteico. A voltagem da corrida variou de 100 V a 200 V e foi utilizado o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descorados em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

3.2.7.3. Solubilidade

A solubilidade dos isolados proteicos na presença e ausência dos antinutrientes foi determinada de acordo com Abugoch et al. (2008), com algumas modificações. Dispersões de proteína (1% m/v) em tampão (fosfato/ácido cítrico 25 mmol/L) foram agitados em Vortex (MX-S, Gomixer) a cada 15 minutos durante uma hora. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 *g* por 30

minutos. A proteína remanescente no sobrenadante foi quantificada (BRADFORD, 1976) e solubilidade da proteína foi calculada de acordo com a Equação 9.

$$\text{Solubilidade } (\%) = \frac{\text{Proteina no sobrenadante}}{\text{Teor de proteína total}} \times 100 \quad (9)$$

3.2.7.4. Análises reológicas

As análises reológicas foram realizadas conforme descrito no item 3.2.6. O efeito da temperatura na geleificação foi avaliado na concentração de isolado proteico de 10% (m/m) em pH de 3,0 e 7,0 (tampão fosfato/ácido cítrico a 25 mmol/L). Os antinutrientes foram adicionados às soluções proteicas na concentração de 1% (m/m). As suspensões dos isolados proteicos foram submetidas à agitação por 1,5 h a 20 °C para estabilização da temperatura e completa homogeneização antes da análise e em seguida submetidas a aquecimento e resfriamento no reômetro. Este procedimento foi realizado para a transformação da suspenção de proteína em um gel durante o experimento.

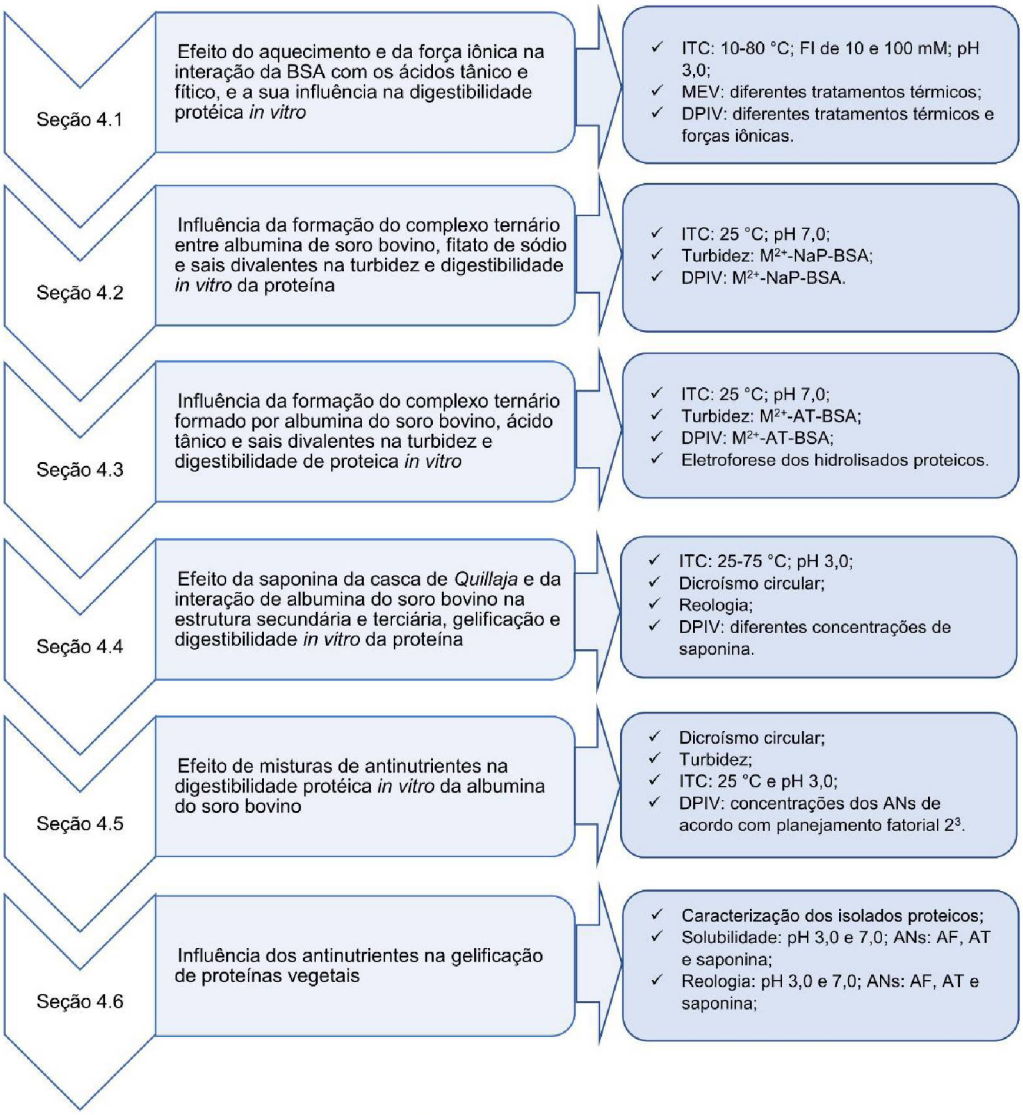
3.2.8. Análise estatística

A análise dos dados experimentais obtidos por meio dos planejamentos fatoriais, com nível de confiança de 95%, e as diferenças estatísticas obtidas por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram realizadas utilizando o *software* Statistica 10.0 (Statsoft™, Inc.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FIGURA 10 mostra como os resultados deste trabalho foram organizados. As primeiras quatro seções tratam dos estudos envolvendo a interação e influência dos ANs ácido tânico (AT), ácido fítico (AF) e saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV). A seção seguinte trata da influência da mistura desses ANs na DPIV e interações moleculares. A última seção mostra os resultados da influência dos ANs nas propriedades reológicas de proteínas comerciais durante aquecimento e resfriamento.

FIGURA 10 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS



FONTE: O autor (2019).

4.1. EFEITO DO AQUECIMENTO E DA FORÇA IÔNICA NA INTERAÇÃO DA ALBUMINA DO SORO BOVINO COM OS ÁCIDOS TÂNICO E FÍTICO, E A SUA INFLUÊNCIA NA DIGESTIBILIDADE PROTÉICA *IN VITRO* [1]

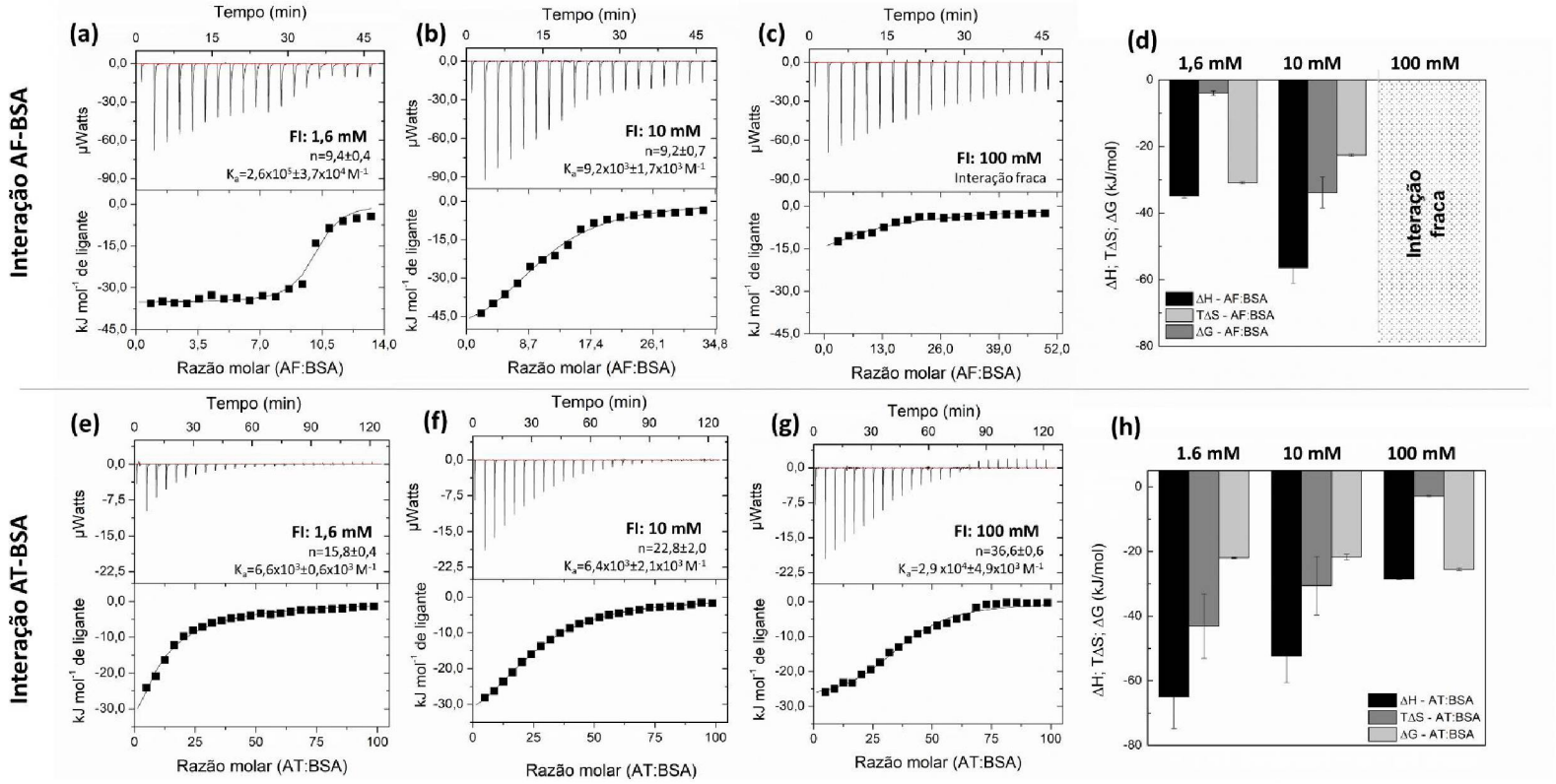
Durante o processamento de alimentos, fatores como temperatura, tempo de aquecimento, força iônica e conteúdo mineral influenciam as propriedades físico-químicas das proteínas (LIU et al., 2016). O aquecimento promove a desnaturação das proteínas, alterando suas interações, devido à exposição de grupos hidrofóbicos e tiol da molécula (STASZEWSKI, VON et al., 2012). A força iônica da solução influencia a solubilidade, estabilidade e agregação da proteína e sua interação com ligantes (STASZEWSKI, VON et al., 2012; JALDAPPAGARI et al., 2013). Dessa forma, essa seção tem como objetivo determinar os parâmetros termodinâmicos (n, Ka, ΔG, ΔH e ΔS) envolvidos na ligação entre albumina de soro bovino (BSA) e ácido fítico (AF) ou ácido tânico (AT) em pH 3,0 em diferentes temperaturas (10-80 °C) e forças iônicas (1,6-100 mmol/L), e a sua correlação com a digestibilidade *in vitro*. Mudanças na microestrutura dos complexos de proteínas e antinutrientes submetidos a tratamentos térmicos também foram avaliadas.

4.1.1. Efeito da força iônica na interação molecular

A influência da força iônica na ligação de AT e AF com a BSA foi obtida por meio de ITC e os resultados são apresentados na FIGURA 11. Os experimentos de ITC foram conduzidos a 25 °C, e as curvas ajustadas utilizando o modelo de ligação de um sítio para estimar os parâmetros termodinâmicos das interações (n, K_a, ΔG, ΔH e ΔS). Os valores de ΔH, ΔS e ΔG foram todos negativos, mostrando que a interação é espontânea e que a ligação ocorre predominantemente por interações hidrofílicas como ligações de hidrogênio e interações por forças eletrostáticas.

[1] KASPCHAK, E.; MAFRA, L. I.; MAFRA, M. R. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on *in vitro* protein digestibility. **Food Chemistry**, v. 252, p. 1–8, jun. 2018.

FIGURA 11 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO (AF) OU ÁCIDO TÂNICO (AT) EM pH 3,0, E COM DIFERENTES FORÇAS IÔNICAS (FI) A 25 °C.



Nota: (a) AF (5 mmol/L) em BSA (0,075 mmol/L) sem adição de sal (FI=1,6 mmol/L); (b) AF (5 mmol/L) em BSA (0,030 mmol/L) a 10 mmol/L de FI; (c) AF (5 mmol/L) em BSA (0,020 mmol/L) a 100 mmol/L de FI; (d) perfil termodinâmico interações AF-BSA; (e) AT (5 mmol/L) em BSA (0,01 mmol/L) sem adição de sal (FI=1,6 mmol/L); (f) AT (5 mmol/L) em BSA (0,01 mmol/L) a 10 mmol/L de FI; (g) AT (5 mmol/L) em BSA (0,01 mmol/L) a 100 mmol/L de FI; (h) perfil termodinâmico interações AT e BSA. A força iônica foi ajustada com NaCl. Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; os símbolos são dados experimentais, n é a relação estequiométrica, K_a é a constante de afinidade, ΔH é a mudança de entalpia, ΔS é a mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs. A análise de diferença estatísticas dos dados está apresentada no APÊNDICE II.

FONTE: O autor (2019).

A curva obtida para a interação entre BSA e AF sem adição de sal (força iônica do tampão de 1,6 mmol/L) foi sigmoidal, a qual é típica para interações de alta afinidade. Com um aumento na força iônica a forma da curva tornou-se menos sigmoidal e a afinidade de ligação tornou-se gradualmente mais fraca (FIGURA 11a-c). A constante de afinidade diminuiu de $2,6\times10^5\pm3,7\times10^4$ para $9,2\times10^3\pm1,7\times10^3$ M^{-1} com um aumento na força iônica de 1,6 mmol/L para 10 mmol/L. A 100 mmol/L de força iônica, as interações foram fracas resultado em um sinal baixo no gráfico de ITC. Este comportamento era esperado em razão da ligação entre o AF e as proteínas ser governada por interações eletrostáticas (MOW; SCHWFNKE, 1990; HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, 2002; ALI et al., 2010), sendo que nesse caso a presença do sal tende a neutralizar os grupos carregados da proteína e do AF, impedindo a ligação.

A curva de titulação de AT em BSA mostra um perfil hiperbólico, comum para interações de polifenóis com polipeptídios. A forma da curva pode ser atribuída a cooperatividade (DARBY et al., 2016) e interações de naturezas distintas ocorrendo simultaneamente, tais como interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e van der Waals, ou ligação a múltiplos sítios da proteína (PRIGENT et al., 2003; DEAVILLE et al., 2007; KILMISTER et al., 2016). No presente trabalho, a afinidade de ligação entre o AT e BSA tornou-se maior com o aumento da força iônica de 10 mmol/L para 100 mmol/L. A constante de afinidade aumentou de $6,4\times10^3\pm2,1\times10^3$ M^{-1} para $2,9\times10^4\pm4,9\times10^3$ M^{-1} para força iônica de 10 mmol/L e 100 mmol/L, respectivamente, mostrando que as interações também ocorrem por forças hidrofóbicas (PRIGENT et al., 2003; JALDAPPAGARI et al., 2013; KILMISTER et al., 2016). Segundo Rawel, Meidtner, and Kroll (2005), para altos valores de força iônica, a molécula de BSA tende a expor resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no interior da molécula que podem interagir com o AT. Observa-se também um aumento da relação estequiométrica nessas condições.

O perfil termodinâmico das interações entre a BSA e AF ou AT sob diferentes forças iônicas é mostrado nas FIGURAS 11d e 11h. O componente entálpico das interações é dominante para ambos os sistemas ($\Delta H>T\Delta S$), o qual é atribuído principalmente às ligações de hidrogênio e ligações iônicas (PONCET-LEGRAND et al., 2007). No entanto, no caso das interações entre BSA e AT,

ocorrem interações também devido à ligação hidrofóbica, observada pela redução de TΔS e aumento da afinidade com o aumento da força iônica.

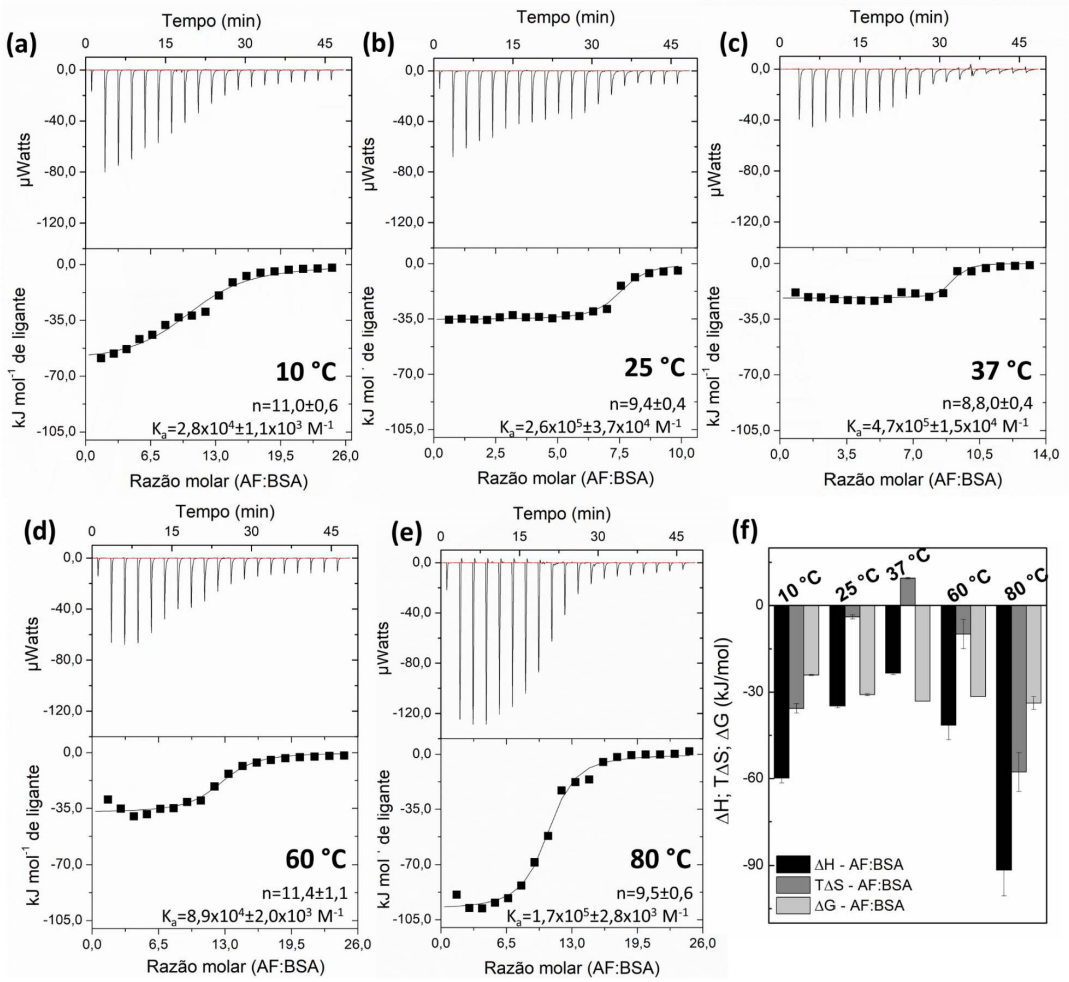
4.1.2. Efeito da temperatura na interação molecular

A interação entre o AT e o AF com a BSA em pH 3,0 sem adição de sal foi analisada em diferentes temperaturas. Nas FIGURAS 12 e 13 são apresentadas as curvas e os parâmetros termodinâmicos obtidos por ITC nas temperaturas de 10 °C, 25 °C, 37 °C, 60 °C e 80 °C para as interações AF:BSA e AT:BSA, respectivamente.

Interações entre o AT e o AF com BSA ocorreram em todas as temperaturas estudadas e apresentaram sinal exotérmico ($\Delta H<0$). Diferentes temperaturas promoveram perfis semelhantes de interação. No entanto, os parâmetros termodinâmicos foram diferentes entre si. A interação entre o AF e a BSA apresenta uma curva sigmoidal, exceto a 10 °C (FIGURA 12a), condição essa menos favorável, como pode ser observado em razão da diminuição do valor da constante de afinidade (K_a). A interação entre o AT e a BSA apresenta um perfil hiperbólico, como também foi observado para as interações em diferentes forças iônicas (seção 4.1.1).

A variação da entalpia para a interação da BSA com o AT foi maior que a observada para a interação do AF com BSA, exceto a 80 °C. O AT apresentou uma menor afinidade que o AF para a interação com BSA. A 37 °C, a maior afinidade e valores de ΔH menores foram observados para ambos os antinutrientes. Além disso, menor relação estequiométrica para a interação AF-BSA e maior relação estequiométrica para a interação AT-BSA foram observados a 37 °C. A BSA é a albumina sérica que serve como proteína de depósito e transporte para numerosos compostos endógenos e exógenos (KRAGH-HANSEN, 1981). Portanto, é razoável que as interações sejam mais favoráveis nesta temperatura, e as condições de interação sejam distintas daquelas observadas para as outras temperaturas estudadas.

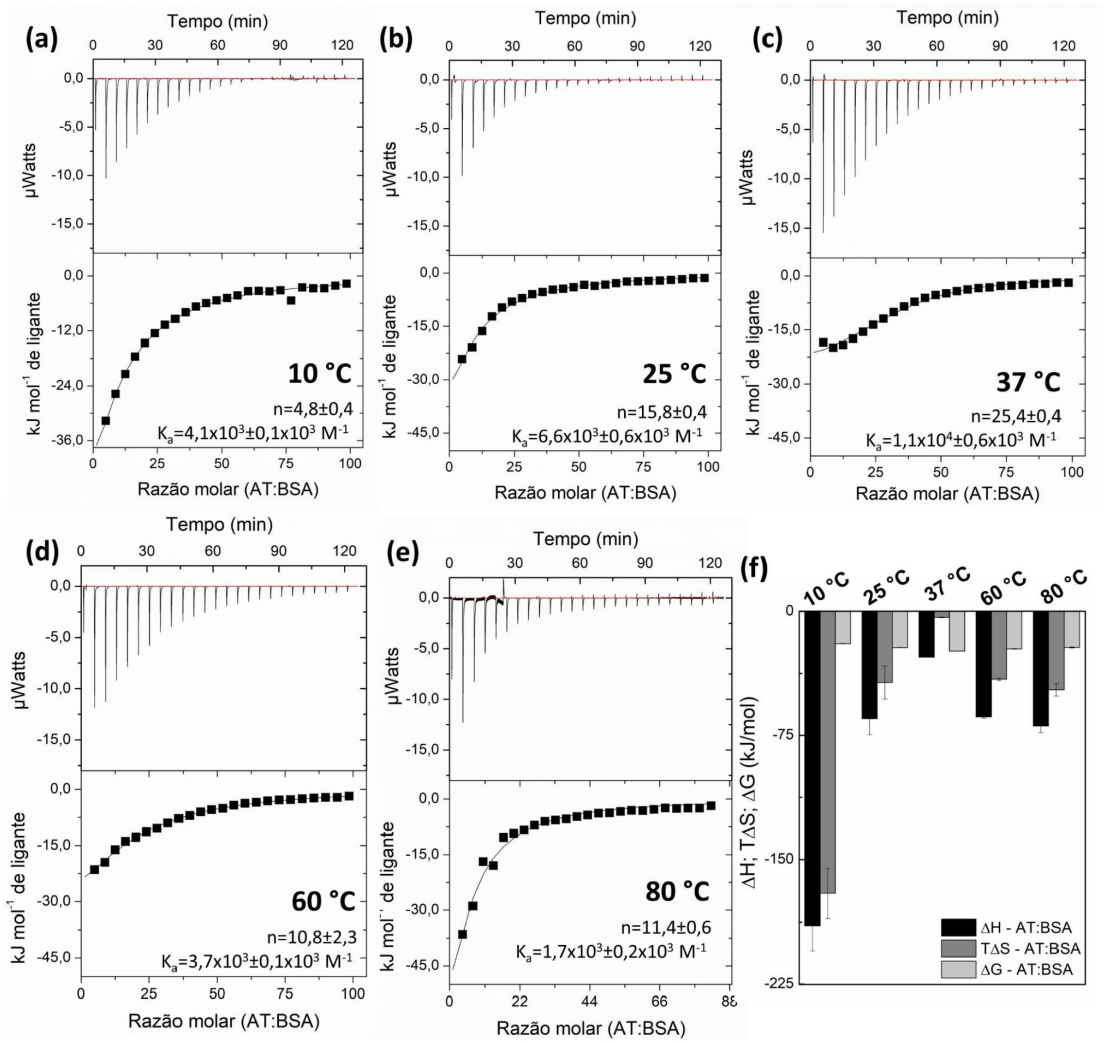
FIGURA 12 - INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO EM pH 3,0, OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS



Nota: 10 °C (a), 25 °C (b), 37 °C (c), 60 °C (d) e 80 °C (e). A concentração de BSA foi de 0,04 mmol/L para os experimentos a 10 °C, 60 °C e 80 °C e 0,075 mmol/L para os experimentos a 25 °C e 37 °C. Em todos os experimentos, a concentração de AF foi de 5 mmol/L. Perfis termodinâmicos interações AF e BSA são apresentados em (f). Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; os símbolos são dados experimentais, n é a relação estequiométrica, K_a é a constante de afinidade, ΔH é a mudança de entalpia, ΔS é a mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs. A análise de diferença estatísticas dos dados está apresentada no APÊNDICE II.

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 13 - INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO TÂNICO (AT) EM pH 3,0, OBTIDA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS



Nota: 10 °C (a), 25 °C (b), 37 °C (c), 60 °C (d) e 80 °C (e). A concentração de BSA foi de 0,01 mmol/L e a de AT foi de 5 mmol/L. Os perfis termodinâmicos das interações entre o AT e a BSA estão apresentados em (f). Linhas sólidas representam o melhor ajuste dos dados usando o modelo um sítio; símbolos representam dados experimentais, n é a relação estequiométrica, K_a é a constante de afinidade, ΔH é mudança de entalpia, ΔS é mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs. A análise de diferença estatísticas dos dados está apresentada no APÊNDICE II.
FONTE: O autor (2019).

Apesar de as interações entre BSA e AF serem mais favoráveis a 37 °C, a 80 °C uma maior entalpia de ligação foi observada. As interações de AF com BSA são governadas por ligações iônicas, como discutido na seção 4.1.1, e a desnaturação da BSA ocorre em temperaturas próximas a 65 °C (BORZOVA et al., 2016). Portanto, é possível que a desnaturação promova a exposição de

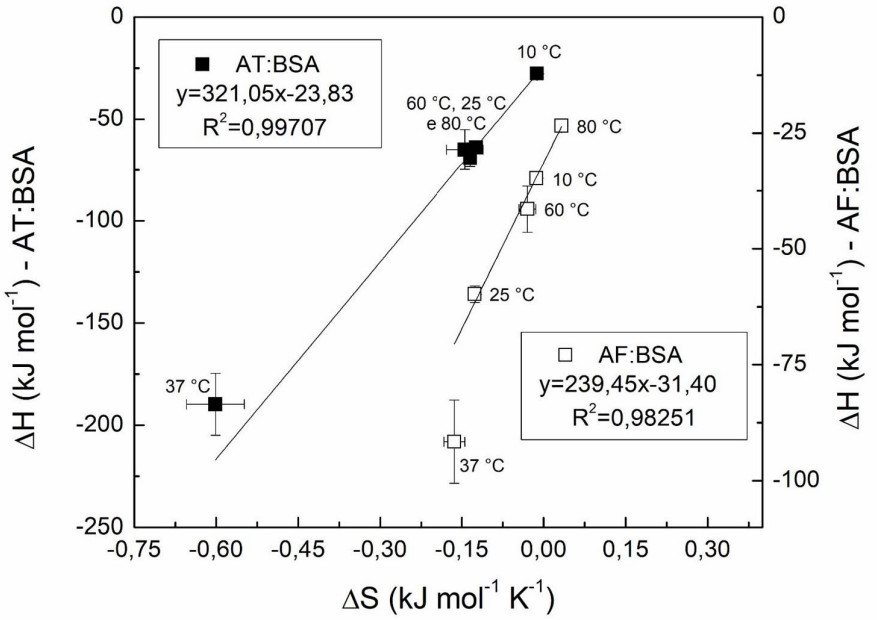
grupos carregados da proteína que se tornam disponíveis para interagir com as cargas negativas do AF.

As interações entre o AF e o AT com BSA foram dirigidas entalpicamente, com exceção das interações do AF com BSA a 37 °C, que apresentaram tanto caráter entálpico quanto entrópico. Apesar das contribuições entrópicas geralmente estarem correlacionadas com interações hidrofóbicas, este comportamento também é atribuído à perda de moléculas de água e íons e mudanças conformacionais (PONCET-LEGRAND et al., 2007). Dessa forma, a 37 °C as interações entre AF e BSA provavelmente promovem a formação de complexos maiores que liberam mais moléculas de água, provocando alterações conformacionais na estrutura de BSA.

Para as interações entre AT e BSA, as diferentes temperaturas avaliadas promoveram pequenas diferenças no formato das curvas. Apesar do perfil hiperbólico ser mantido, os parâmetros termodinâmicos foram diferentes. A 80 °C, por exemplo, as interações foram menos favoráveis, e a constante de afinidade (K_a) e o parâmetro estequiométrico (n) diminuíram. Além disso, uma maior quantidade de ruído foi observada na linha de base. A 80 °C a BSA, já desnaturada, tende a se autoassociar, formando grandes agregados (BORZOVA et al., 2016) que podem ocultar os grupos reativos da proteína, reduzindo as interações.

A linearidade da relação de ΔH e ΔS é um sinal de compensação entalpia-entropia e baixa dependência do ΔG em relação à temperatura. A compensação entalpia-entropia das interações entre a BSA e o AF ou o AT pode ser observada na FIGURA 14. Uma regressão linear dos dados experimentais resultou em um coeficiente de determinação de 0,99707 e 0,98251, para interação da BSA com o AT e com o AF, respectivamente.

FIGURA 14 - COMPENSAÇÃO ENTALPIA-ENTROPIA EM DIFERENTES TEMPERATURAS PARA INTERAÇÕES AF-BSA E AT-BSA.



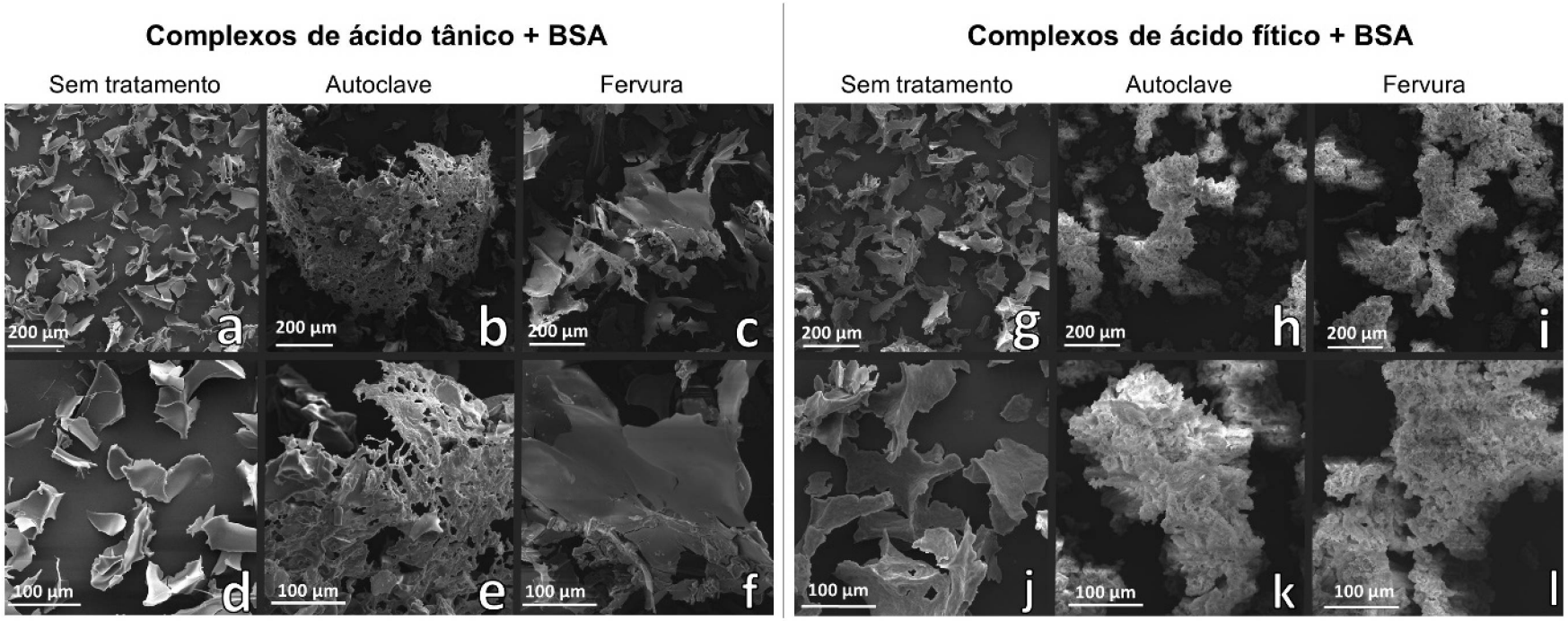
Nota: Linhas sólidas representam o melhor ajuste para os dados e os símbolos representam os dados experimentais. A equação do ajuste linear para os dados e o coeficiente de determinação (R^2) da equação são apresentados nas caixas.
FONTE: O autor (2019).

Esse comportamento pode ser devido a mudanças conformacionais no soluto e reorganização do solvente (AHMAD et al., 2015), ou mudanças na estrutura dos complexos formados (FREIRE, 2008). A interação entre compostos fenólicos e proteínas têm um caráter superficial (SEKOWSKI et al., 2014) e pode modificar a estrutura terciária das proteínas sem alterar a estrutura secundária (OJHA et al., 2012; CAO; XIONG, 2017). Um comportamento semelhante na estrutura secundária das proteínas na presença do AF também foi observado por Mow e Schwfnke (1990).

4.1.3. Efeito de tratamentos térmicos na microestrura dos complexos formados por BSA e os ácidos tânico (AT) e fítico (AF)

A fim de compreender o efeito dos tratamentos térmicos sobre a microestrutura dos complexos liofilizados de AF-BSA e AT-BSA foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias das diferentes amostras são apresentadas na FIGURA 15.

FIGURA 15 - ANÁLISE MORFOLÓGICA UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) PARA OS COMPLEXOS PROTEÍNA-ANTINUTRIENTE



Nota: amostras sem tratamento (a, d, g, j), autoclavadas (121 °C / 1,1 kgf/cm^2) por 15 min (b, e, h, k) e fervidas (98 °C em pressão atmosférica) por 15 min (c, f, i, l). As imagens a–f correspondem aos complexos de ácido tânico e BSA e as imagens g–l correspondem aos complexos de ácido fítico e BSA. As imagens estão com ampliação de 300 × (a, b, c, g, h e i) e 800 × (d, e, f, j, k e l).
FONTE: O autor (2019).

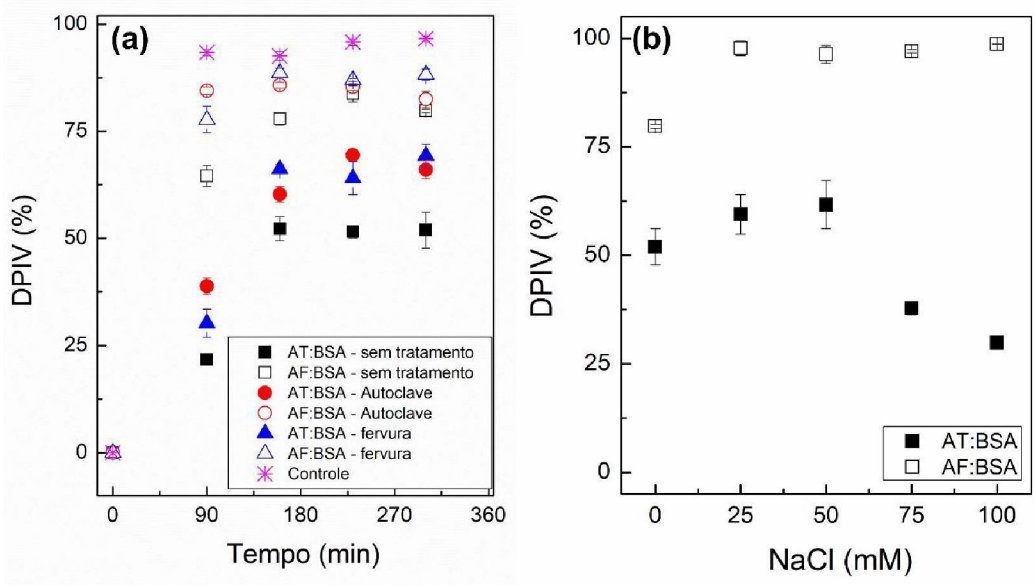
Os complexos AT-BSA (FIGURA 15a e 15d) apresentaram agregados menores com superfície regular, visualmente mais organizados e compactos do que os complexos AF-BSA (FIGURA 15g e 15j). Amostras de BSA na presença de AT formaram grandes agregados com uma estrutura bem organizada após serem autoclavadas (121 °C, 1,1 kgf/cm^2) ou passarem pela fervura (98 °C em pressão atmosférica) (FIGURA 15b, 15c, 15e e 15f). O tratamento térmico das amostras em pressão atmosférica resultou em complexos AT-BSA finos com superfície regular e sem porosidade ou perfurações, porém com aspecto frágil. Amostras submetidas à tratamento térmico em alta pressão mostraram um padrão diferente de polimerização, com perfurações na rede e alguns pequenos agregados ao longo da superfície. Como os polifenóis tendem a promover a geleificação proteica (STASZEWSKI, VON et al., 2012), essas substâncias também podem contribuir para uma melhor organização das redes de proteínas, como foi observado neste trabalho.

Complexos formados com AF após o aquecimento se apresentaram maiores do que as amostras sem tratamento térmico. Entretanto, os complexos foram menos organizados. Amostras submetidas aos tratamentos térmicos apresentaram aspectos semelhantes entre si, com microestrutura não homogênea e frágil. O maior tamanho dos agregados formados após tratamento térmico se deve a um aumento na exposição de alguns grupos na superfície das moléculas, que podem interagir uns com os outros e formar agregados maiores devido à desnaturação da proteína (HU et al., 2013).

4.1.4. Avaliação do efeito dos antinutrientes e diferentes tratamentos na digestibilidade proteica *in vitro* (DPVI)

A influência do tratamento térmico e de diferentes forças iônicas sobre a DPIV de BSA na presença e ausência de AF e AT é mostrada na FIGURA 16. Observou-se que tanto o AF quanto o AT apresentam um efeito negativo sobre a digestibilidade de BSA. A acessibilidade das ligações peptídicas coordena a hidrólise enzimática (MARIA et al., 2016). Portanto, se as ligações peptídicas estão protegidas na estrutura do complexo insolúvel, é de se esperar que a hidrólise se torne mais difícil, comprometendo a digestibilidade.

FIGURA 16 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPVI) DE BSA NA PRESENÇA DE ÁCIDO TÂNICO E ÁCIDO FÍTICO SUBMETIDA A TRATAMENTOS TÉRMICOS (a) E SOB DIFERENTES FORÇAS IÓNICAS (b)



Nota: amostras autoclavadas (121 °C / 1,1 kgf/cm^2) por 15 min e fervidas (98 °C em pressão atmosférica) por 15 min. A análise de diferença estatísticas dos dados está apresentada no APÊNDICE II.

FONTE: O autor (2019).

O AF diminuiu a digestão de BSA, mas não interrompeu completamente sua hidrólise. Como o AF interage com proteínas sob condições ácidas, nas condições simuladas do estômago (pH 3,0), a hidrólise de proteínas é menos favorável, e a DPIV foi menor em relação à amostra controle (FIGURA 16a). Sob condições intestinais, simuladas em pH 7,0, o complexo não é estável, e a BSA fica sujeita a hidrólise realizada por enzimas digestivas, aumentando a DPIV, como também foi relatado por Kies, De Jonge, Kemme e Jongbloed (2006).

O AT inibiu consideravelmente a digestão de BSA por enzimas. A interação de AT com BSA pode ocorrer em uma ampla faixa de pH e, dessa forma, seus complexos são estáveis a mudanças de pH durante a digestão dos alimentos. Uma diminuição na digestibilidade de BSA também pode ocorrer devido à cobertura hidrofóbica da superfície da proteína, que tende a interferir na hidrólise enzimática devido a uma diminuição na solubilidade (MARTÍNEZ; MOYANO, 2003). Como as interações entre BSA e AT também ocorrem devido a forças hidrofóbicas, outra causa de inibição da digestibilidade pode ser o impedimento

estérico ou químico da pepsina, uma vez a pepsina possui uma preferência pela clivagem de ligações peptídicas próximas a aminoácidos hidrofóbicos (CAO; XIONG, 2017).

Em relação ao tratamento térmico, pode-se observar que o calor aumenta a digestibilidade dos complexos formados entre os antinutrientes e BSA. Para o sistema AF-BSA o efeito foi menos evidente devido a digestibilidade das amostras sem tratamento também ser alta (DPIV acima de 80%). O aumento na digestibilidade proteica das amostras submetidas ao tratamento térmico é devido a desnaturação da proteína, que pode expor um maior número de sítios de ligação ao ataque enzimático (MARIA et al., 2016). Embora a interação entre o AF e a BSA seja favorável em temperaturas elevadas, os complexos não são estáveis no pH encontrado nas condições intestinais (pH 7,0). Esse comportamento se deve ao fato de as interações do AF com proteínas carregadas negativamente (acima do ponto isoelétrico) não ser favorável. Portanto, para proteínas com ponto isoelétrico maior, a inibição da digestão proteica poderia ser maior para amostras que passaram por tratamento térmico devido a sua estabilidade em meio ácido e básico observados ao longo do trato gastrointestinal.

Para o sistema AT-BSA o calor aumentou a DPIV de 51,4±4,2% para 66,0±2,1% e 69,3±2,8%, para amostras sem tratamento, autoclavadas (121 °C, 1,1 kgf/cm^2) e fervidas (98 °C em pressão atmosférica), respectivamente. A partir dos resultados de ITC, observou-se que a interação entre o AT e a BSA é inibida em altas temperaturas (menor constante de afinidade) e, portanto, seus complexos podem ser mais vulneráveis à hidrólise por enzimas digestivas. Independentemente do aumento da DPIV devido ao tratamento térmico, os complexos AT-BSA ainda apresentam um pequeno valor de DPIV (~70%). Segundo Liu, Wang, Ma e Gao (2016), em altas temperaturas, os polifenóis podem formar radicais reativos ou quinonas que se associam a sítios proteicos hidrofóbicos expostos devido ao desdobramento, dificultando a hidrólise da proteína.

Maria, Ferrari e Maresca (2016) observaram que a ação sinérgica da alta pressão hidrostática e reações enzimáticas aumenta a hidrólise proteica devido a desnaturação da proteína. No entanto, no presente trabalho, o tratamento em autoclave (alta pressão e temperatura) causou hidrólise similar para a digestão

com pepsina e pancreatina quando comparada ao tratamento em fervura (FIGURA 16a) para os dois sistemas estudados.

A FIGURA 16b mostra os resultados da DPIV dos complexos AT–BSA e AF–BSA em função da força iônica (NaCl). O NaCl aumentou a digestibilidade proteica da BSA na presença de AF. Isso era esperado, uma vez que a interação de AF com BSA ocorre devido a forças eletrostáticas, sendo que o NaCl pode proporcionar a neutralização das cargas, evitando a formação de complexos, como discutido na seção 4.1.1.

O NaCl em concentrações menores que 50 mmol/L proporcionou o aumento da DPIV para o sistema AT-BSA. Acima de 50 mmol/L de NaCl a DPIV diminuiu. Este comportamento é devido ao aumento da afinidade do AT com BSA, como observado por ITC e mudanças na solubilidade dos complexos. De acordo com Freitas, Carvalho e Mateus (2003), a solubilidade dos complexos formados por tanino e BSA aumenta com o aumento da força iônica devido à adsorção ou fixação dos íons da solução na superfície hidrofóbica do tanino ou à fixação dos íons na superfície dos complexos formados entre o tanino e BSA. O aumento na solubilidade pode levar a uma maior digestibilidade proteica. No entanto, em alta força iônica, a afinidade entre o AT e BSA aumenta, como observado nas análises de ITC, devido à exposição de grupos hidrofóbicos da proteína, o quais impendem a hidrólise enzimática.

4.1.5. Avaliação do efeito dos antinutrientes e diferentes tratamentos na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) de BSA: Considerações finais

A temperatura e a força iônica influenciam fortemente as interações entre proteínas e antinutrientes e, consequentemente, a DPIV. Uma alta força iônica pode aumentar a afinidade entre os taninos e BSA diminuindo a digestibilidade proteica. A ligação entre AF e BSA ocorre devido a interações eletrostáticas e, dessa forma, à medida que a força iônica aumenta, a interação diminui e a DPIV aumenta. A temperatura de 37 °C foi a mais favorável para a interação dos dois sistemas avaliados (AT-BSA e AF-BSA). Em temperaturas superiores à temperatura de desnaturação de BSA observou-se um aumento das interações AF-BSA e diminuição das interações AT-BSA. Para ambos os ANs estudados, os

tratamentos térmicos aumentaram a DPIV e o tamanho dos complexos, provavelmente devido à exposição de diferentes sítios da proteína, e melhor acessibilidade das enzimas digestivas.

Esta seção do trabalho pode contribuir para o conhecimento das condições em que ocorre a interação desses compostos com proteínas, e correlação de seus efeitos antinutritivos e algumas alterações na funcionalidade de proteínas durante o processamento de alimentos.

4.2. INFLUÊNCIA DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO TERNÁRIO ENTRE ALBUMINA DE SORO BOVINO, FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA PROTEÍNA [2]

Tendo que os seres humanos são incapazes de hidrolisar fitatos em seu sistema gastrointestinal, a formação de complexos entre fitatos e minerais ou proteínas pode causar desnutrição, uma vez que os íons metálicos (Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) e os aminoácidos são indispensáveis para a manutenção fisiológica normal dos organismos vivos (KNIGHT et al., 2009; BIHUNIAK; INSOGNA, 2015; LI; WANG, 2015; MOUGHAN, 2016; OKUR et al., 2017; SUN, N. et al., 2017). Além das interações do ácido fítico diretamente com sais ou proteínas formando complexos binários, há a formação de complexos ternários entre cátions divalentes e proteínas em pH neutro e básico (HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, 2002). Essa capacidade de formar complexos ternários pode influenciar vários processos que envolvem proteínas e minerais, como a atividade catalítica (CALDWELL, 1992), textura, solubilidade e estabilidade proteica (BYE et al., 2013).

A importância das interações envolvidas na formação dos complexos ternários entre fitato, proteína e minerais é difícil de estabelecer (ALI et al., 2010). Isso se deve ao fato de que em meio alcalino alguns sais de fitatos são insolúveis (HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, 2002) o que dificulta a determinação de interações moleculares por técnicas como titulação turbidimétrica e fluorescência. Dessa forma, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) pode ser útil para tal detecção pois permite a determinação de interações moleculares que formam complexos insolúveis.

Dessa forma, o objetivo desta seção foi avaliar as ligações envolvidas na formação dos complexos entre BSA, o fitato de sódio (NaP) e cátions divalentes (Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+}) por ITC. Além disso, a influência da formação dos complexos ternários na solubilidade e digestibilidade *in vitro* da proteína foi avaliada.

[2] KASPCHAK, E.; MAFRA, L. I.; MAFRA, M. R. Influence of Ternary Complexation between Bovine Serum Albumin, Sodium Phytate, and Divalent Salts on Turbidity and *In Vitro* Digestibility of Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 10543–10551, 2018.

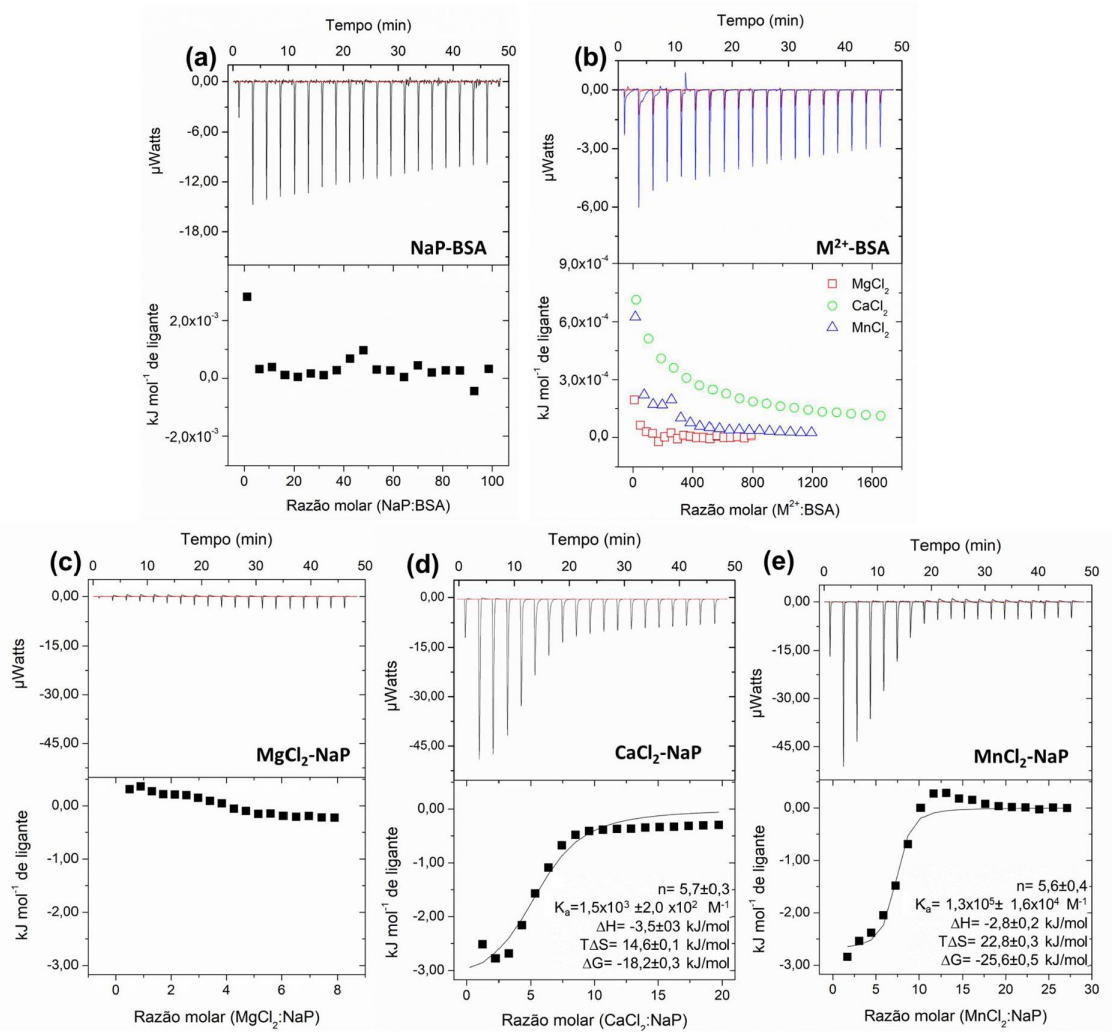
4.2.1. Interação entre BSA, fitato de sódio (NaP) e cátions divalentes (M^{2+}) determinada por ITC para sistemas binários

Os resultados das interações do NaP-BSA, M^{2+}-BSA e NaP-M^{2+} avaliadas em pH 7,0 e 25 °C são apresentados na FIGURA 17. Como esperado, não foi observada interações significativas entre o NaP e a BSA nessas condições (FIGURA 17a), uma vez que as interações são governadas por forças eletrostáticas e nesse pH ambas as moléculas estão carregadas negativamente (HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, 2002).

A titulação de M^{2+} em BSA resultou em baixos valores de entalpia (FIGURA 17b). Embora íons positivamente carregados possam se associar reversivelmente com a maioria das albuminas, íons metálicos, como Ca^{2+} e Mg^{2+}, apresentam baixa afinidade de ligação (KRAGH-HANSEN, 1981), o que pode resultar em um baixo calor de interação. As interações dos íons cálcio e magnésio com as proteínas são governadas por forças eletrostáticas que ocorrem em regiões não específicas da proteína carregadas negativamente (GUILLAUME et al., 2000) como o oxigênio carboxílico (SUN, N. et al., 2017). Além disso, a troca iônica H^+/Ca^{2+} também pode ocorrer em sistemas envolvendo proteína e M^{2+}. Enquanto o $MnCl_2$ se liga fortemente à BSA por quelação por grupos imidazólicos (MILDVAN; COHN, 1963). Essa explicação corrobora os resultados obtidos pelo ITC para a interação entre $MnCl_2$ e BSA que resultaram em picos alongados no início da titulação devido, provavelmente, a uma reação secundária e lenta como a quelação e subsequente oxidação do manganês.

As FIGURAS 17c, 17d e 17e mostram os resultados das interações do M^{2+} com o NaP obtido por ITC. A interação de $MgCl_2$ com NaP (FIGURA 17c) resultou em um sinal de baixa intensidade com ruído na linha de base não sendo possível ajustar o modelo de um sítio aos dados experimentais. A interação mostrou picos exotérmicos e endotérmicos (o zoom dos picos é apresentado na FIGURA A3 do APÊNDICE I). Observou-se que, com o aumento da razão molar de M^{2+}/NaP, o sinal exotérmico aumentou e o sinal endotérmico diminuiu. Como os picos exotérmicos podem ser atribuídos à perda de íons da estrutura (PONCET-LEGRAND et al., 2007), esse comportamento pode estar associado à troca iônica de sódio e magnésio na estrutura do fitato.

FIGURA 17 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA A INTERAÇÃO ENTRE BSA, FITATO DE SÓDIO (NaP) E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 E 25 °C PARA SISTEMAS BINÁRIOS



Nota: (a) titulação de NaP em BSA; (b) Titulação do $MgCl_2$, do $CaCl_2$ e do $MnCl_2$ em BSA (c) titulação do $MgCl_2$ em NaP; (d) titulação de $CaCl_2$ em NaP; (d) titulação de $MnCl_2$ em NaP. Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; símbolos representam os dados experimentais; n é a relação estequiométrica; K_a é a constante de afinidade; ΔH é mudança de entalpia; T é a temperatura; ΔS é a mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs.
FONTE: O autor (2019).

Para a interação entre NaP e $CaCl_2$, o sinal foi predominantemente exotérmico (FIGURA 17d) e com intensidade maior do que a observada para sistemas contendo $MgCl_2$. Os dados apresentaram um perfil sigmoidal e picos bem definidos. Parâmetros termodinâmicos (ΔH, TΔS e ΔG) obtidos a partir dos perfis de interação (curvas ITC) ilustram que o componente entrópico das interações é dominante (em módulo) para todos os sistemas; ou seja, $|\Delta H| < |T\Delta S|$.

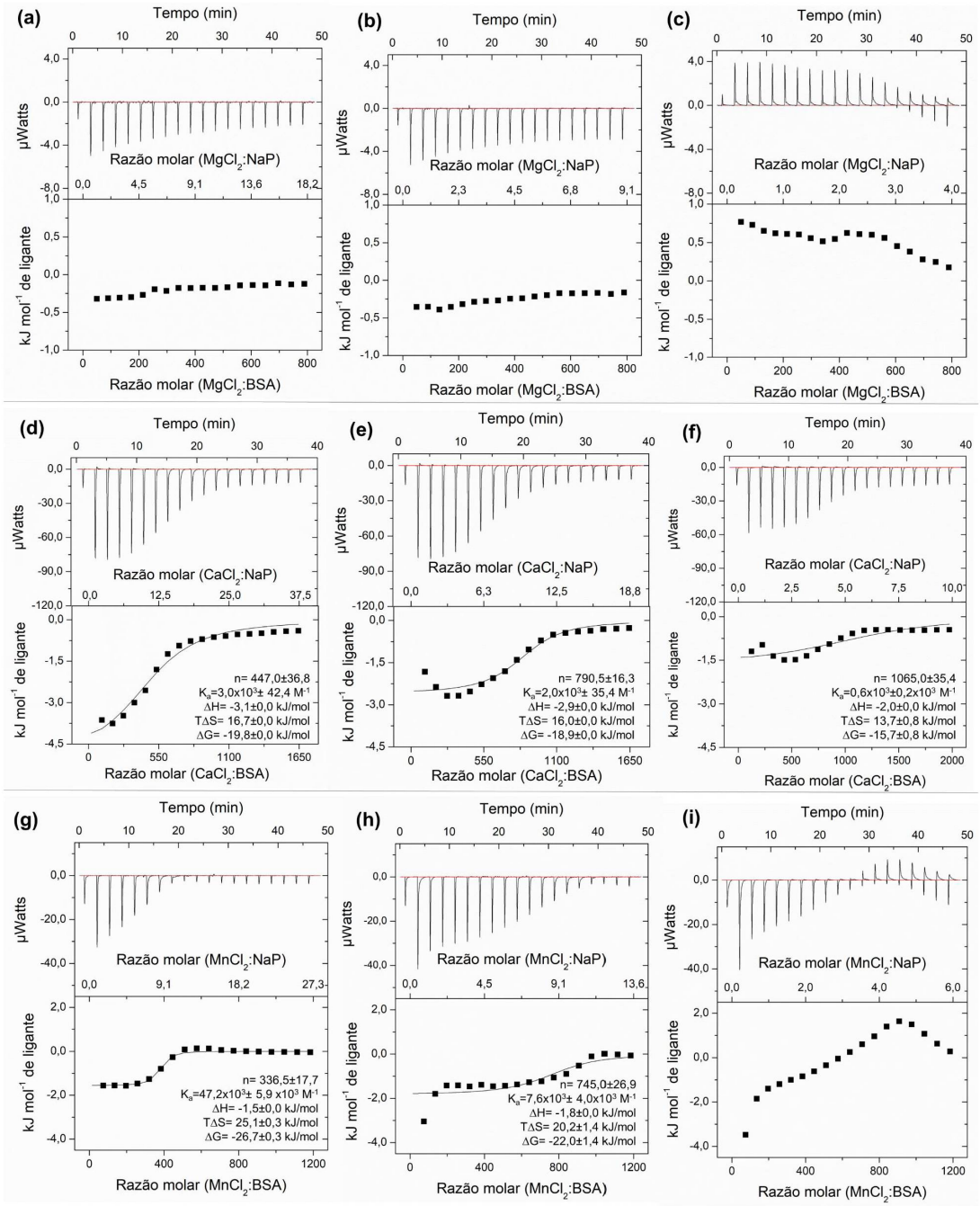
A interação de $MnCl_2$ com NaP apresentou alguns picos exotérmicos na razão molar Mn^{2+}/NaP em torno de 10, provavelmente devido a precipitação de fitato de manganês. Esse comportamento pode ser atribuído a competição entre o mineral e o hidrogênio pelas cargas negativas de NaP resultando na precipitação do complexo (GRYNSPAN; CHERYAN, 1983).

A relação estequiométrica do complexo $CaCl_2$-NaP e $MnCl_2$-NaP foi próxima a 6, o que está de acordo com Torres et al. (2005). Essa relação estequiométrica é favorecida quando o cátion divalente está em excesso, produzindo um ânion fitato totalmente dissociado (GRYNSPAN; CHERYAN, 1983). A relação estequiométrica e a entalpia observadas no presente estudo são diferentes das de Kim et al. (2010) e Oh et al. (2001) que registraram uma relação estequiométrica de Ca^{2+}/fitato de 3:1 e 4:1, respectivamente. Essa diferença é atribuída a condições experimentais distintas, pois Kim et al. (2010) realizaram os experimentos em pH 5,0 e 37 °C, Oh et al. (2001) utilizaram pH 7,0 a 30 °C, e o presente estudo foi realizado em pH 7,0 e 25 °C. Além disso, o tipo de fitato usado (fitato de sódio ou de potássio) pode promover um perfil de interação distinto já que a dissociação de cada tipo de ânion a partir da estrutura do ácido fítico pode ser diferente.

4.2.2. Interação da BSA, NaP e M^{2+} por ITC para sistemas ternários

Para avaliar a formação do complexo ternário, as soluções de $MgCl_2$, $CaCl_2$ e $MnCl_2$ foram tituladas em NaP e BSA, evitando assim a formação de complexos insolúveis na célula do equipamento antes das titulações. A FIGURA 18 apresenta os resultados da formação do complexo ternário entre BSA, NaP e M^{2+} obtidos por ITC para as razões molares de BSA:NaP de 1:44, 1:88 e 1:200.

FIGURA 18 - CURVAS OBTIDAS POR CALORIMETRIA DAS TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 E 25 °C PARA SISTEMAS TERNÁRIOS



Nota: (a) titulação de $MgCl_2$ em BSA:NaP (1:44); (b) titulação de $MgCl_2$ em BSA:NaP (1:88); (c) titulação de $MgCl_2$ em BSA:NaP (1:200); (d) titulação de $CaCl_2$ em BSA:NaP (1:44); (e) titulação de $CaCl_2$ em BSA:NaP (1:88); (f) titulação de $CaCl_2$ em BSA:NaP (1:200); (g) titulação de $MnCl_2$ em BSA:NaP (1:44); (h) titulação de $MnCl_2$ em BSA:NaP (1:88); (i) titulação de $MnCl_2$ em BSA:NaP (1:200). Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados; símbolos representam os dados experimentais; n é a relação estequiométrica; K_a é a constante de afinidade; ΔH é mudança de entalpia; T é a temperatura do sistema; ΔS é a mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs.

FONTE: O autor (2019).

Os sistemas BSA-NaP-M^{2+} apresentaram um comportamento distinto daquele observado para os sistemas binários, indicando a formação do complexo ternário. O sistema contendo magnésio apresentou um sinal de pequena intensidade e a predominância de picos exotérmicos durante todas as titulações para a razão molar de BSA:NaP de 1:44 e 1:88 (FIGURAS 18a e 18b, respectivamente). Para a titulação de $MgCl_2$ nas amostras contendo 1:200 de BSA:NaP (FIGURA 18c), a maioria dos picos foi endotérmica com baixa intensidade de sinal não sendo possível o ajuste do modelo aos dados experimentais. Ao final da titulação, ocorreram picos exotérmicos e endotérmicos simultaneamente, como também observado para o complexo binário de $MgCl_2$ e NaP (FIGURA 17c).

Para a interação de NaP e BSA com $CaCl_2$, a intensidade do sinal no início dos experimentos foi maior para as razões molares de BSA:NaP de 1:44 e 1:88 (FIGURAS 18d e 18e, respectivamente) quando comparado aos resultados obtidos para as interações NaP-$CaCl_2$ (FIGURA 17d). À medida que a concentração de NaP aumentou, alguns pequenos picos endotérmicos são observados, possivelmente relacionados à liberação de quantidades substanciais de sódio e água da molécula de fitato, devido a precipitação do complexo. Para a razão molar BSA:NaP de 1:200 (FIGURA 18f), uma menor quantidade de calor é liberada quando comparada ao sistema sem proteína (FIGURA 17d) e com as razões molares de BSA:NaP de 1:44 e 1:88 (FIGURAS 18d e 18e, respectivamente). As curvas de ITC dos sistemas contendo $CaCl_2$ apresentaram perfis semelhantes entre si.

Para sistemas contendo $MnCl_2$, quando a razão molar 1:44 foi utilizada (FIGURA 18g), a curva ITC teve um pico menor do que o observado na ausência de proteína (FIGURA 17e). Os sistemas com razão molar BSA:NaP de 1:88 (FIGURA 18h) e 1:200 (FIGURA 18i) apresentaram picos iniciais de alta intensidade, e o segundo pico foi mais amplo que o primeiro (o zoom do gráfico é apresentado na FIGURA A4 do APÊNDICE I). Esse sinal amplo poderia representar reações secundárias ocorrendo no sistema, como oxidação e quelação, como também foi observado para a interação de $MnCl_2$ com BSA (FIGURA 17b). A titulação de $MnCl_2$ em 1:200 de BSA:NaP (Figura 18i) resultou em picos exotérmicos que apareceram simultaneamente com picos endotérmicos

no final das titulações. Esse comportamento dificultou o ajuste do modelo de um sítio à curva e pode ser atribuído à maior complexidade desse sistema em relação aos outros. O aumento da complexidade pode ser devido a interações simultâneas como, por exemplo, a formação de complexos binários, competição entre BSA e NaP por íons, troca iônica e liberação de uma quantidade considerável de água da estrutura como resultado da formação de complexos insolúveis maiores.

A FIGURA 18d-18h apresentam os parâmetros termodinâmicos (n, K_a, ΔH, ΔS e ΔG) envolvidos nas interações dos sistemas contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$. Valores de ΔS positivos (apresentado como $T\Delta S$) e ΔH de baixa intensidade e negativo foram obtidos. A interação de proteínas e fitatos é governada por forças eletrostáticas, desta forma, a alta e positiva entropia observada neste trabalho está relacionada a mudanças nos resíduos hidrofóbicos da proteína (LI; NI, 2016), assim como à formação de complexos insolúveis e à perda de íons das estruturas do fitato e da proteína (PONCET-LEGRAND et al., 2007).

Os complexos ternários obtidos na presença de $CaCl_2$ e $MnCl_2$ para razões molares de BSA:NaP de 1:44 e 1:88 foram formados nas razões molares M^{2+}:NaP de cerca de 10:1 e 8:1, respectivamente. Na razão molar de BSA:NaP de 1:200, observou-se um comportamento distinto para ambos os sistemas, sendo que o complexo ternário formado na razão molar de $CaCl_2$:NaP foi em torno de 5:1 e o sistema contendo $MnCl_2$ apresentou uma curva complexa que não pode ser ajustada ao modelo de um sítio (FIGURA 18i).

Com o aumento da razão molar de BSA/NaP a constante estequiométrica (n) aumentou e os valores de K_a, ΔH, $T\Delta S$ e ΔG diminuíram para os complexos ternários contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$. Além disso, a constante de afinidade obtida na ausência de proteína (FIGURAS 18d e 18e) foi maior que a obtida para a titulação de $CaCl_2$ em BSA:NaP na razão molar de 1:200 (FIGURA 18f) e a titulação de $MnCl_2$ em na razão molar de BSA:NaP de 1:44 e 1:88 (FIGURA 18g e 18h). A diminuição da afinidade pode ser atribuída a interações complexas simultâneas que ocorrem quando a proteína é adicionada.

Embora a análise de ITC dos sistemas ternários e a identificação dos diferentes perfis de interação sejam alcançáveis, a formação de sistemas ternários ainda é difícil de ser determinada, pois interações binárias também estão

envolvidas. Desta forma, a influência da mistura de componentes na turbidez também foi avaliada.

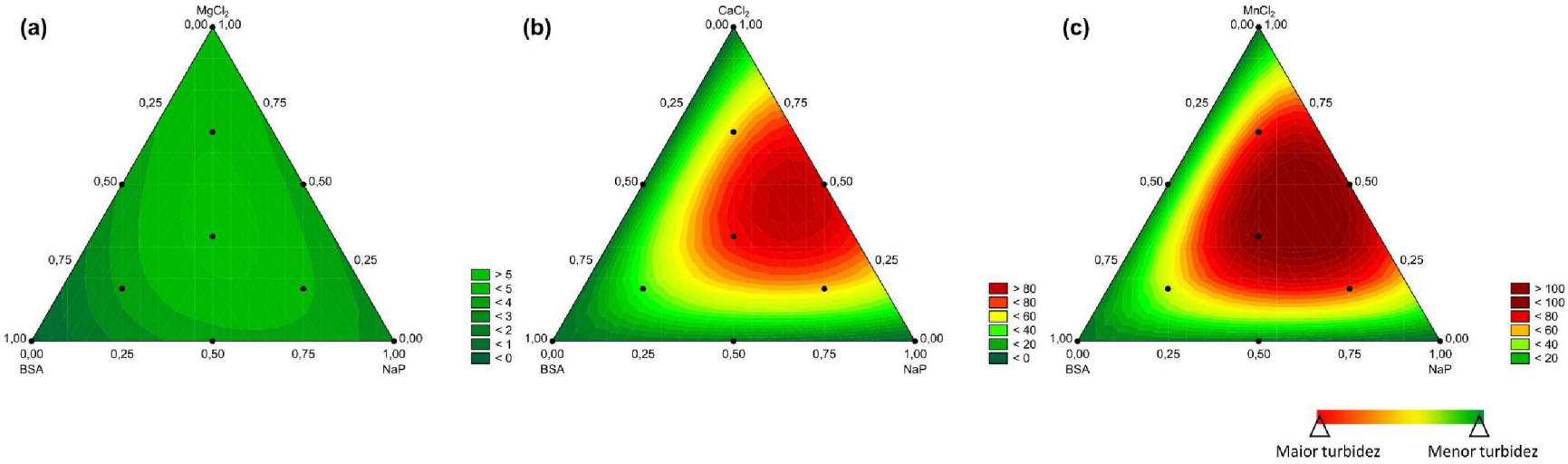
4.2.3. Turbidez dos complexos formados por BSA, fitato de sódio (NaP) e cátions divalentes (M^{2+})

Complexos formados com fitato podem alterar a solubilidade de algumas substâncias, como proteínas e minerais, e, consequentemente, as propriedades dos alimentos durante o processamento ou consumo (GRYNSPAN; CHERYAN, 1983). Além disso, a quelação de minerais pelo fitato reduz a biodisponibilidade de minerais em animais monogástricos devido a formação de complexos insolúveis (KIM et al., 2010). A turbidez, uma medida indireta da solubilidade, está relacionada à interação da proteína com os ligantes fitato e cátions divalentes. Neste trabalho, a influência da concentração de cada componente na turbidez foi avaliada utilizando o planejamento *Simplex Lattice*.

A FIGURA 19 mostra o gráfico de superfície de contorno para os sistemas contendo BSA, NaP e M^{2+} ($MgCl_2$, $CaCl_2$ e $MnCl_2$). Os coeficientes estimados dos parâmetros obtidos para o modelo especial cúbico descrevendo o efeito de diferentes concentrações de BSA, NaP e M^{2+} na turbidez estão apresentados na TABELA A2 do APÊNDICE III. A região de formação do complexo ternário provavelmente ocorre na cor vermelha escura no gráfico, que representa a maior turbidez observada na presença dos três componentes (FIGURAS 19b e 19c).

Para sistemas contendo $MgCl_2$, os valores de turbidez foram menores que 13%, o que está de acordo com os resultados obtidos por ITC onde um baixo calor de interação foi observado. Dessa forma, a baixa turbidez pode ser atribuída ao tamanho dos complexos que por serem pequenos não interferem na transmitância da amostra ou devido a formação de complexos solúveis. O fitato de magnésio apresenta alta solubilidade na ausência de proteínas (GRYNSPAN; CHERYAN, 1989), e as misturas binárias de NaP e $MgCl_2$ não interferem na turbidez da amostra. A turbidez mais alta foi observada na baixa concentração de proteína e alta concentração de $MgCl_2$ (amostra 9 da TABELA A3 do APÊNDICE III) provavelmente como resultado do efeito *salting-out* do $MgCl_2$ na BSA.

FIGURA 19 – EFEITO DA BSA, DO FITATO DE SÓDIO E DOS CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ A 25 °C E pH 7,0



Nota: (a) misturas de BSA, AF e $MgCl_2$; (b) misturas de BSA, AF e $CaCl_2$; (c) misturas de BSA, AF e $MnCl_2$. O modelo aplicado às superfícies foi o especial cúbico que informa a influência da mistura ternária no resultado. Os pontos experimentais estão apresentados dentro dos gráficos pelos círculos pequenos, e os valores dos eixos são os dados codificados.

FONTE: O autor (2019).

Em relação aos sistemas contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$, os fatores que mais influenciaram a turbidez foram as concentrações de NaP e M^{2+}. A turbidez mais elevada foi obtida na ausência de BSA, indicando a formação de fitato de cálcio e fitato de manganês insolúvel. Estudos demostraram que o fitato pode diminuir consideravelmente a biodisponibilidade de Ca^{2+} (FREDLUND et al., 2006). Os sistemas contendo $MnCl_2$ podem formar complexos em uma maior gama de concentrações dos três componentes quando comparado as amostras contendo $CaCl_2$ já que nenhuma diferença estatística (nível de confiança de 95%) foi observada nas amostras 6-10 (TABELA A3 do APÊNDICE III). Considerando o efeito do cátion divalente, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com Quiñone et al. (2017), que observaram que a solubilidade do fitato aumentou na seguinte ordem: Mn^{2+}, Ca^{2+} e Mg^{2+}. A mesma tendência é observada para o efeito de *salting out* dos cátions divalentes nas proteínas, em que o Mg^{2+} é mais propenso a precipitar a proteína, seguido pelo Ca^{2+} e depois pelo Mn^{2+} (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984).

4.2.4. Efeito do fitato de sódio (NaP) e dos cátions divalentes (M^{2+}) na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) de BSA

Os complexos ternários BSA-NaP-M^{2+} podem ser formados em diferentes proporções de cada componente. Desta forma, a DPIV foi realizada em diferentes razões molares de M^{2+}/NaP e M^{2+}/BSA. A TABELA 4 apresenta os dados da DPIV de BSA na presença de NaP e M^{2+}. Apesar do teste de Tukey mostrar uma diferença significativa entre as amostras, a variação da DPIV na presença dos três componentes foi baixa (86,3-91,1%) e, provavelmente, a formação do complexo ternário de proteína-NaP-M^{2+} não impactaria na digestão proteica *in vivo*. A menor DPIV foi observada na ausência de M^{2+} e na maior concentração de NaP. Isso é esperado porque os complexos binários proteína-fitato são formados em pH baixo, reduzindo a digestão da proteína pela pepsina (KIES et al., 2006). No entanto, nos sistemas que contêm os cátions divalentes, os íons destes sais podem se ligar a cargas negativas de fitato, inibindo a formação de complexos fitato-proteína em pH ácido, diminuindo o efeito na digestão proteica.

TABELA 4 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DVPI) DE ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE FITATO DE SÓDIO (NaP) E CÁTIONS DIVALENTES (M^{2+}) SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS.

Razão molar (M^{2+}/BSA)	Razão molar (NaP/BSA)	Razão molar (M^{2+}/NaP)	DPIV de BSA-NaP-$MgCl_2$ (%)	DPIV de BSA-NaP-$CaCl_2$ (%)	DPIV de BSA-NaP-$MnCl_2$ (%)
50	9,5	5,3	87,4±0,2 ^{aB}	86,5±0,9 ^{bB}	89,5±0,5 ^{bA}
50	18,9	2,6	89,2±0,3 ^{aA}	88,9±0,7 ^{aA}	87,7±0,8 ^{cB}
50	28,4	1,8	89,3±1,1 ^{aA}	88,8±0,8 ^{aA}	87,6±0,0 ^{cB}
25	14,2	1,8	87,9±0,6 ^{aAB}	89,3±0,7 ^{aA}	86,3±0,7 ^{dB}
100	14,2	7,0	88,8±0,7 ^{aA}	88,4±0,3 ^{aA}	88,5±0,5 ^{bcA}
200	14,2	14,1	89,4±2,4 ^{aA}	88,1±0,7 ^{aA}	91,1±0,5 ^{aA}
				DPIV de BSA-NaP (%)	
Sem M^{2+}	9,5	Sem M^{2+}		87,2±0,6 ^{a}	
Sem M^{2+}	14,2	Sem M^{2+}		88,4±0,3 ^{a}	
Sem M^{2+}	18,9	Sem M^{2+}		88,9±1,3 ^{a}	
Sem M^{2+}	28,4	Sem M^{2+}		82,4±0,3 ^{b}	
				DPIV de BSA (%)	
Controle (sem M^{2+} e NaP)				88,3±0,7	

Nota: A digestão no estômago foi simulada com pepsina (razão de enzima/substrato de 1:4 m/m) durante 1,5 h a 37 °C em pH 3,0. A digestão no intestino foi simulada com pancreatina (razão de enzima/substrato de 1:2 m/m) durante 3,5 h a 37 °C em pH 7,0. Médias seguidas pela mesma letra em colunas ou linhas não diferem estatisticamente (Coluna = letras minúsculas; Linhas = letras maiúsculas) em um nível de confiança de 95% de acordo com o teste de Tukey.
Fonte: O autor (2019).

As amostras contendo cloreto de magnésio ou de cálcio e NaP apresentaram a mesma DPIV ($p<0,05$), com exceção do sistema contendo $CaCl_2$ na menor razão molar de NaP/BSA. Para amostras contendo $MnCl_2$ e NaP, observou-se um discreto aumento da DPIV em razões molares de Mn^{2+}/NaP maiores. Valores de DPIV maiores que a amostra controle (sem sal e sem NaP) foram observados para amostras contendo ambos M^{2+} e NaP. A presença de cátions, como o sódio, pode anular o efeito de desestabilização do fitato na estrutura da proteína (BYE et al., 2013). Assim, o efeito positivo do NaP e M^{2+} na digestibilidade proteica pode ser devido à melhor estabilização das enzimas digestivas.

Sob as condições intestinais (pH~7,0), o complexo ternário BSA-NaP-M^{2+} pode ser formado. Apesar disso, a interação neste ambiente só ocorrerá com proteína previamente hidrolisada no estômago pela pepsina, não afetando de

maneira significativa a digestão proteica. De acordo com Selle et al. (2012), há uma atenção crescente sobre o impacto dos complexos ternários de cátions divalentes entre proteína e fitato na biodisponibilidade mineral. O fitato pode formar complexos em uma ampla faixa de pH com cátions trivalentes (BRETTI et al., 2012) e divalentes (STEFANO, DE et al., 2006; CREA et al., 2008), o que significa que eles podem ser estáveis ao longo de todo o trato gastrointestinal. Neste trabalho, após a digestão observou-se um complexo insolúvel, sugerindo a formação de fitatos de cátions divalentes insolúveis e indicando fortemente uma possível redução na absorção mineral dessas substâncias.

4.2.5. Influência da formação do complexo ternário entre albumina de soro bovino, fitato de sódio e cátions divalentes na turbidez e digestibilidade *in vitro* da proteína: Considerações finais

Por associação dos dados de ITC, turbidez e DPIV, foi possível confirmar a ligação de NaP, BSA e M^{2+} por forças eletrostáticas que promoveram a perda de água da estrutura da proteína como resultado da agregação. A formação do complexo ternário não teve grande impacto na DPIV. Apesar disso, o conhecimento da formação de complexos ternários envolvendo proteínas, NaP e M^{2+} é importante para a nutrição e tecnologia de alimentos. Na nutrição, a formação desse complexo pode afetar a biodisponibilidade mineral e a atividade catalítica de enzimas. Na tecnologia de alimentos, as propriedades sensoriais, processamento de alimentos e transformação bioquímica dos alimentos pode ser alterada devido a formação desses complexos ternários.

4.3. EFEITO DE CÁTIONS DIVALENTES NA INTERAÇÃO DE ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) E ÁCIDO TÂNICO E SUA INFLUÊNCIA NA TURBIDEZ E NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*

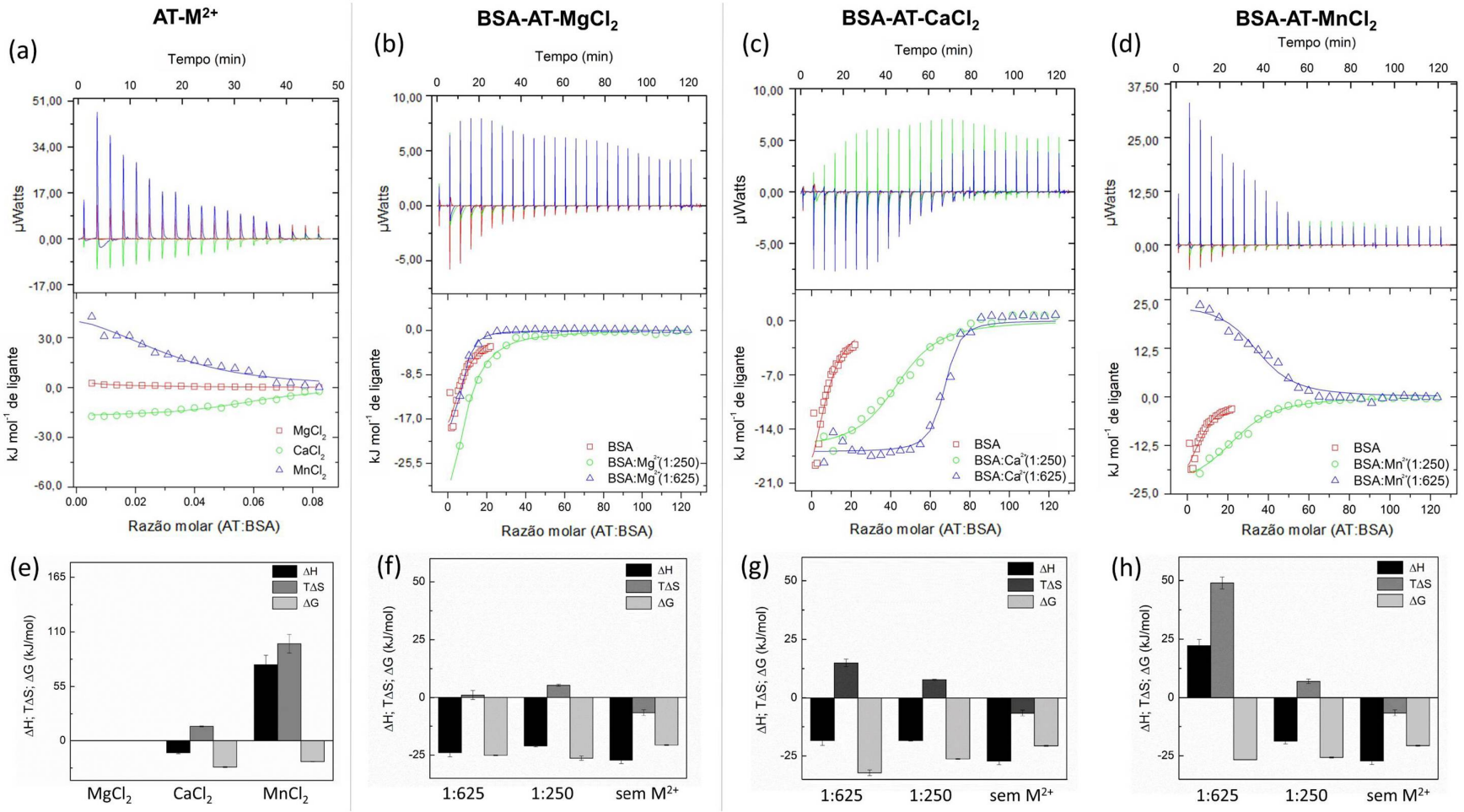
A interação de proteínas com taninos pode reduzir a biodisponibilidade das proteínas, inibir a atividade enzimática (MAKKAR et al., 2008; OLSEN et al., 2011; GEMEDE et al., 2014), causar a adstringência de alimentos (MCRAE et al., 2010), alterar a estrutura e a estabilidade de proteínas (MOSER et al., 2014). Os taninos também apresentam a propriedade de interagir com metais, podendo reduzir a sua absorção (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017). No entanto, numerosos usos de taninos ou materiais contendo taninos dependem da complexação com íons metálicos (JU et al., 2017; SCHMIDT et al., 2017; GUO et al., 2014; LIANG et al., 2017; MANDEL et al., 2006).

Até o presente momento, que sejam do nosso conhecimento, somente um trabalho foi encontrado na literatura explorando as interações entre taninos e minerais por ITC. No trabalho realizado por Yang et al. (2014) as interações de ácidos fenólicos com Fe (III) é avaliada na presença de citrato. A interação entre as proteínas e os taninos obtidos por ITC são mais frequentes conforme apresentado na revisão de literatura. Dessa forma, essa seção tem por objetivo avaliar as interações entre a albumina de soro bovino (BSA), o ácido tânico (AT) e os cátions divalentes Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+}. Além disso, esta seção avalia a influência da formação de complexos na digestibilidade proteica *in vitro* e na turbidez dos sistemas.

4.3.1. Avaliação da interação de albumina de soro bovino com ácido tânico na presença de cátions divalentes por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A interação de AT, BSA e M^{2+} foi avaliada por ITC e os resultados são apresentados na FIGURA 20 e na TABELA 5.

FIGURA 20 - CURVAS DE ITC PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 A 25 °C



Nota: (a) AT em M^{2+}; (b) AT em BSA-$MgCl_2$; (c) AT em BSA-$CaCl_2$; (d) AT em BSA-MgCl2; (e) perfil termodinâmico da interação dos cátions divalentes com o AT (f) perfil termodinâmico da interação AT-BSA-$MgCl_2$; (g) perfil termodinâmico da interação AT-BSA-$CaCl_2$; (h) perfil termodinâmico da interação AT-BSA-$MnCl_2$. Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; símbolos são os dados experimentais, ΔH é mudança de entalpia, ΔS é mudança de entropia e ΔG é a energia livre de Gibbs

FONTE: O autor (2019).

TABELA 5 – RELAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA E CONSTANTE DE AFINIDADE PARA A INTERAÇÃO ENTRE A BSA, O ÁCIDO TÂNICO E OS CÁTIONS DIVALENTES EM pH 7,0 A 25 °C

	n (AT:BSA)	n (M^{2+}:AT)	K_a x10^{-3} (M^{-1})
BSA – sem sal	$8,3\pm0,3^{bB\beta}$	-	$4,2\pm0,3^{aA\beta}$
BSA:$MgCl_2$ (1:250)	$24,0\pm2,3^{a}$	$10,5\pm1,0$	$42,6\pm14,6^{a}$
BSA:$MgCl_2$ (1:625)	$11,0\pm0,5^{b}$	$56,6\pm2,5$	$24,8\pm1,6^{a}$
BSA:$CaCl_2$ (1:250)	$41,2\pm0,5^{A}$	$6,1\pm0,1$	$39,6\pm3,1^{A}$
BSA:$CaCl_2$ (1:625)	$50,2\pm5,9^{A}$	$12,5\pm1,5$	$252,0\pm79,2^{A}$
BSA:$MnCl_2$ (1:250)	$42,8\pm2,1^{\alpha}$	$5,8\pm0,3$	$31,6\pm1,8^{\alpha\beta}$
BSA:$MnCl_2$ (1:625)	$35,2\pm0,6^{\alpha}$	$17,8\pm0,3$	$47,4\pm0,2^{\alpha}$
	n (M^{2+}:AT)		**K_a x10^{-3} (M^{-1})**
$MgCl_2$	Sem ajuste		Sem ajuste
$CaCl_2$	$18,2\pm0,5$		$45,4\pm9,4$
$MnCl_2$	$44,3\pm0,8$		$5,0\pm0,5$

n: relação estequiométrica; K_a: constante de afinidade; ΔH: mudança de entalpia; T: temperatura; ΔS: mudança de entropia; ΔG: energia livre de Gibbs. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem na coluna a um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.
FONTE: O autor (2019).

As FIGURAS 20a e 20e apresentam os resultados obtidos para a titulação da AT nas soluções de M^{2+}. O perfil termodinâmico de interação para cada metal foi diferente. A interação do $MgCl_2$ com o AT resultou em um sinal positivo e de baixa intensidade (ΔH~0). A interação do AT com o $CaCl_2$ resultou em ΔH negativo e TΔS positivo e a interação do AT com $MnCl_2$ resultou em valores de ΔH e TΔS positivos. O manganês pode sofrer oxirredução (SCHMIDT et al., 2017), assim, além da quelação Mn^{2+} pelo AT, mudanças no estado de oxidação (pode variar de +2 a +7) podem contribuir para um perfil termodinâmico distinto daqueles observados para a ligação de $CaCl_2$ e AT.

Relacionado à constante estequiométrica, o AT pode se ligar a cerca de 18 moléculas de $CaCl_2$ e 44 de $MnCl_2$ (TABELA 5). A constante de afinidade para a interação do $CaCl_2$ com o AT foi maior do que a observada para a interação com o $MnCl_2$. O AT é composto por uma molécula de glicose central ligada a um ou mais resíduos de galoil (GÜLÇIN et al., 2010). Os grupos de pirogaloil do AT podem capturar fortemente íons de cálcio (JU et al., 2017). Além disso, qualquer outro grupo de hidroxila e carboxila do AT pode quelar íons (GÜLÇIN et al., 2010). A maior relação estequiométrica observada para a interação $MnCl_2$ com a AT pode ser atribuída à oxidação do manganês que poderia aumentar as possibilidades de interação entre o metal e o tanino.

A complexação do AT com o M^{2+} resultou em um aspecto visual diferente dependendo do tipo de metal utilizado (FIGURA A9 do APÊNDICE IV). Todas as amostras mudaram de cor após cinco dias de armazenamento, no entanto, as mudanças ocorreram em velocidade diferente. Sistemas contendo $MnCl_2$ tornaram-se marrons no primeiro dia de armazenamento, provavelmente devido à rápida oxidação do íon metálico. Os sistemas de $CaCl_2$ tornaram-se azuis no segundo dia de armazenamento e o $MgCl_2$ tornou-se amarelo apenas no quinto dia de armazenamento. O aspecto visual está de acordo com os resultados observados pelo ITC, onde os complexos AT-$CaCl_2$ e AT-$MnCl_2$ apresentaram precipitados, enquanto o complexo AT-$MgCl_2$ permaneceu solúvel.

Para avaliar a influência do M^{2+} na interação do AT com BSA, foram utilizadas duas razões molares de BSA para cátion divalente, 1:625 e 1:250, baseadas em testes preliminares. A interação de BSA com íons como Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+} resulta em baixo calor de interação e não precipita na solução em uma pequena concentração de sal, como foi observado nos resultados apresentados na seção 4.2. Assim, a célula do ITC foi preenchida com BSA e M^{2+} e a seringa com a solução AT.

A interação do AT com a BSA em pH 7.0 na ausência de M^{2+} resultou em uma curva hiperbólica similar à obtida em pH 3,0 (seção 4.1) que é característica das interações entre taninos e proteínas (KILMISTER et al., 2016) e pode ser um resultado de fenômenos combinados, como agregação, mudança conformacional, auto associação/dissociação (PONCET-LEGRAND et al., 2007), cooperatividade e interações de natureza diferente (PRIGENT et al., 2003; DEAVILLE et al., 2007; KILMISTER et al., 2016). Além disso, em altas concentrações de AT, pode ocorrer a ligação inicial de AT em sítios específicos da proteína causando alterações conformacionais, as quais aumentam a afinidade do AT com a proteína observada pela $T\Delta S$ e ΔH negativa (ISHTIKHAR et al., 2018).

Na presença de $MgCl_2$, a interação de BSA com AT manteve o perfil hiperbólico e apresentou valores similares de ΔH quando comparado aos sistemas sem adição de sal. No entanto, o gráfico de fluxo de calor apresentou picos endotérmicos seguidos de picos exotérmicos. A soma da ΔH positiva e negativa resultou em um ΔH próximo a zero na sexta e décima terceira injeção para razões molares de BSA:$MgCl_2$ de 1:625 e 1:250, respectivamente. A interação de $MgCl_2$

com AT apresenta picos endotérmicos e de BSA com AT picos exotérmicos, assim, neste sistema, ambas as interações estão ocorrendo. Provavelmente, primeiro o AT se liga ao $MgCl_2$ e o complexo AT-$MgCl_2$ se liga à BSA formando um complexo ternário em ambas as concentrações de sal utilizadas resultando em um aumento na constante de afinidade.

A interação BSA e AT apresentou um aumento na constante de afinidade e ΔG com o aumento na concentração de $CaCl_2$. Consequentemente, a $T\Delta S$ diminuiu e mudou de positivo, em sistemas contendo M^{2+}, para negativo, em sistemas sem M^{2+}. O $T\Delta S$ positivo e o ΔH negativo indicam que interações eletrostáticas e hidrofóbicas estão ocorrendo simultaneamente (LI; NI, 2016; ISHTIKHAR et al., 2018). Tanto a formação de complexos AT-BSA como AT-$CaCl_2$ é exotérmica, no entanto, o gráfico de fluxo de calor de sistemas contendo BSA, AT e $CaCl_2$ também apresentaram picos endotérmicos seguidos de picos exotérmicos. Picos exotérmicos com maior intensidade foram observados na titulação do AT na razão molar de BSA:$CaCl_2$ de 1:250. Com base nisso, pode-se supor que o $CaCl_2$ em concentração aumente a afinidade de ligação entre o AT com BSA e, em menor concentração, provavelmente ocorrerá uma competição pelo AT, já que ambos BSA (TAKAHASHI et al., 2018) e Ca^{2+} (JU et al., 2017) preferem se ligar a grupos de galoil do AT. Ishtikhar et al. (2018) estudaram a ligação de AT com BSA a 37 °C e observaram que a interação ocorreu em dois locais na proteína, no sítio I um sinal exotérmico foi obtido e no sítio II a reação foi endotérmica. Assim, outra explicação para o perfil diferente de interação obtido na presença de $CaCl_2$ poderia ser a ligação da AT em local diferente da proteína promovida pelo cátion divalente.

Com o aumento da concentração de $MnCl_2$, tanto ΔH e $T\Delta S$ aumentaram, e na maior concentração do sal (BSA:$MnCl_2$ de 1:625), o ΔH tornou-se positivo. A ΔG foi semelhante em ambas as concentrações de $MnCl_2$ mostrando que a natureza da ligação mudou e provavelmente houve alterações conformacionais da proteína devido à complexação (ISHTIKHAR et al., 2018). Os maiores valores de $T\Delta S$ quando comparados ao ΔH mostram que a interação entre BSA e AT na presença de alta concentração de $MnCl_2$ é dirigida entropicamente, provavelmente devido a uma maior expulsão de moléculas de água dos

microambientes hidrofóbicos para a solução (LI; NI, 2016) como resultado da formação de um complexo maior.

Na presença de M^{2+}, foi observado um aumento na constante de afinidade. A interação da proteína com os taninos depende da flexibilidade de suas estruturas (DEAVILLE et al., 2007). Assim, o M^{2+} provavelmente promoveu mudanças na estrutura dos taninos e proteínas. Além disso, com o aumento da força iônica, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos da proteína podem ser expostos, aumentando a afinidade da proteína e do tanino (RAWEL et al., 2005). Os diferentes parâmetros termodinâmicos da ligação ΔH, $T\Delta S$ e ΔG observados na presença dos diferentes M^{2+} também podem ser devido à interação do sal em regiões distintas da proteína que poderiam alterar a natureza da ligação.

O Mg^{2+} liga-se em regiões inespecíficas da proteína por forças eletrostáticas (GUILLAUME et al., 2000) e, provavelmente, não afetam a natureza das interações entre BSA e AT. As ligações serem dirigidas entalpicamente em todas as concentrações de $MgCl_2$ nos sistemas ternários é uma indicação desse comportamento. O cálcio pode liga-se à albumina sérica em regiões inespecíficas (GUILLAUME et al., 2000) e também em sítios de ligação específicos localizados próximos à região que ligam ácido graxo (MAJOREK et al., 2012) resultando em mudanças nas interações hidrofóbicas da proteína com o AT. Finalmente, Mn^{2+} liga-se fortemente à BSA através da quelação por grupos imidazol (MILDVAN; COHN, 1963) e pode alterar a estrutura secundária da proteína, como foi observado por Zhang, Sahu, Xu, Wang, & Hu (2017) para a ligação de (-)-epigalocatequina-3-galato com a β-lactoglobulina.

Os resultados obtidos mostram que os cátions divalentes influenciam todos os aspectos da ligação entre BSA e AT e a influência é diferente para cada cátion divalente.

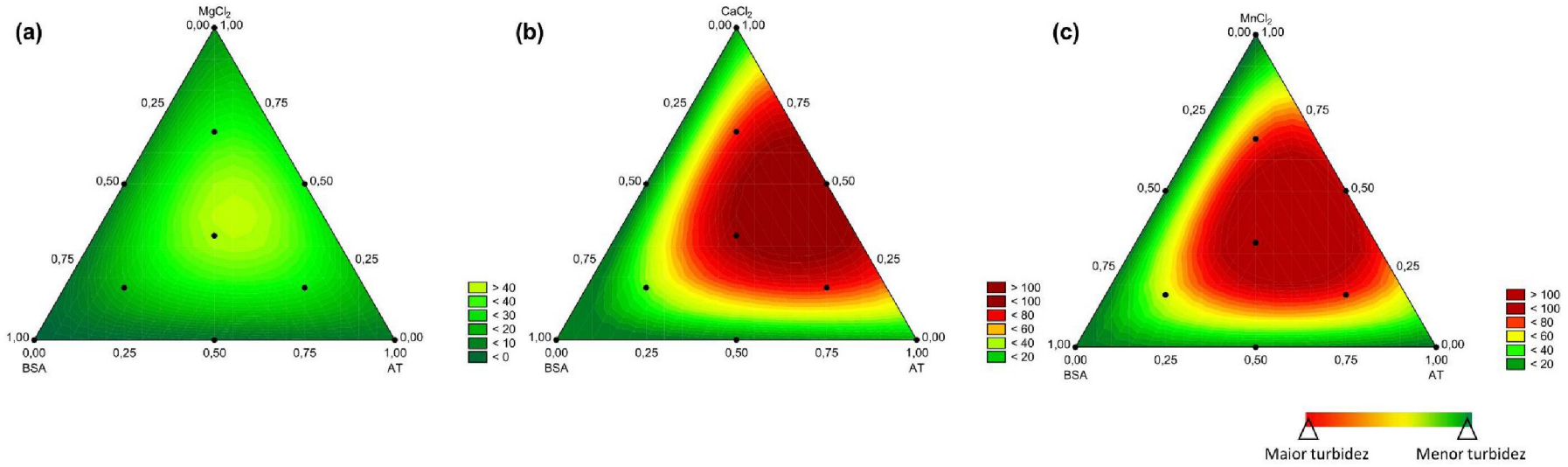
4.3.2. Influência da formação do complexo ternário na turbidez dos complexos formados por BSA, ácido tânico (AT) e cátions divalentes (M^{2+})

A Figura 21 mostra o gráfico superfície de contorno obtido por um modelo cúbico especial para o efeito das diferentes concentrações de AT, BSA e M^{2+} na turbidez. Os parâmetros obtidos para a influência de cada componente na turbidez são apresentados no APÊNDICE III (TABELAS A4 e A5). Um bom ajuste do modelo para os dados foi observado para amostras contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$ (R^2 de 0,937 e 0,892) e um menor coeficiente de determinação (0,632) para amostras contendo $MgCl_2$.

Os sistemas contendo $MgCl_2$ apresentaram menores valores de turbidez (máximo de 64%) quando comparados com amostras contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$ (valores próximos a 100%). Este resultado está de acordo com aqueles obtidos pelo ITC que mostraram baixos valores de ΔH para a ligação de AT com $MgCl_2$ e não promoveram mudanças na natureza da ligação entre AT e BSA. Os baixos valores de $T\Delta S$ para os complexos BSA-AT-$MgCl_2$ indicam que a interação libera menos água devido à precipitação.

Para amostras contendo $CaCl_2$ e $MnCl_2$, o fator que mais influenciou a turbidez foi a interação binária de AT e M^{2+}. Desta forma, os sistemas contendo $CaCl_2$ ou $MnCl_2$ e AT provavelmente irão precipitar. Segundo Carnovale et al. (2015), complexos grandes podem ser formados na presença de cálcio como resultado da formação de uma grande rede de cálcio-polifenol interagindo por ligações eletrostáticas. A interação do metal com grupos funcionais o-dihidroxifenil do tanino pode ser responsável pela formação do complexo insolúvel (MCDONALD et al., 1996). Além disso, a solubilidade do manganês pode ser reduzida dependendo de seu estado de oxidação (SCHMIDT et al., 2017). Consequentemente, além das interações do manganês diretamente com o tanino, sua oxidação pode aumentar a formação de precipitado. De fato, o $MnCl_2$ promoveu maior variação de turbidez no diagrama ternário, indicando que o sal pode formar precipitados em menores concentrações.

FIGURA 21 - EFEITO DA BSA, ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ



Nota: (a) misturas de BSA, AT e $MgCl_2$; (b) misturas de BSA, AT e $CaCl_2$; (c) misturas de BSA, AT e $MnCl_2$. O modelo aplicado às superfícies foi o especial cúbico que informa a influência da mistura ternária no resultado. Os pontos experimentais estão apresentados dentro dos gráficos pelos círculos pequenos, e os valores dos eixos são os dados codificados.

FONTE: O autor (2019).

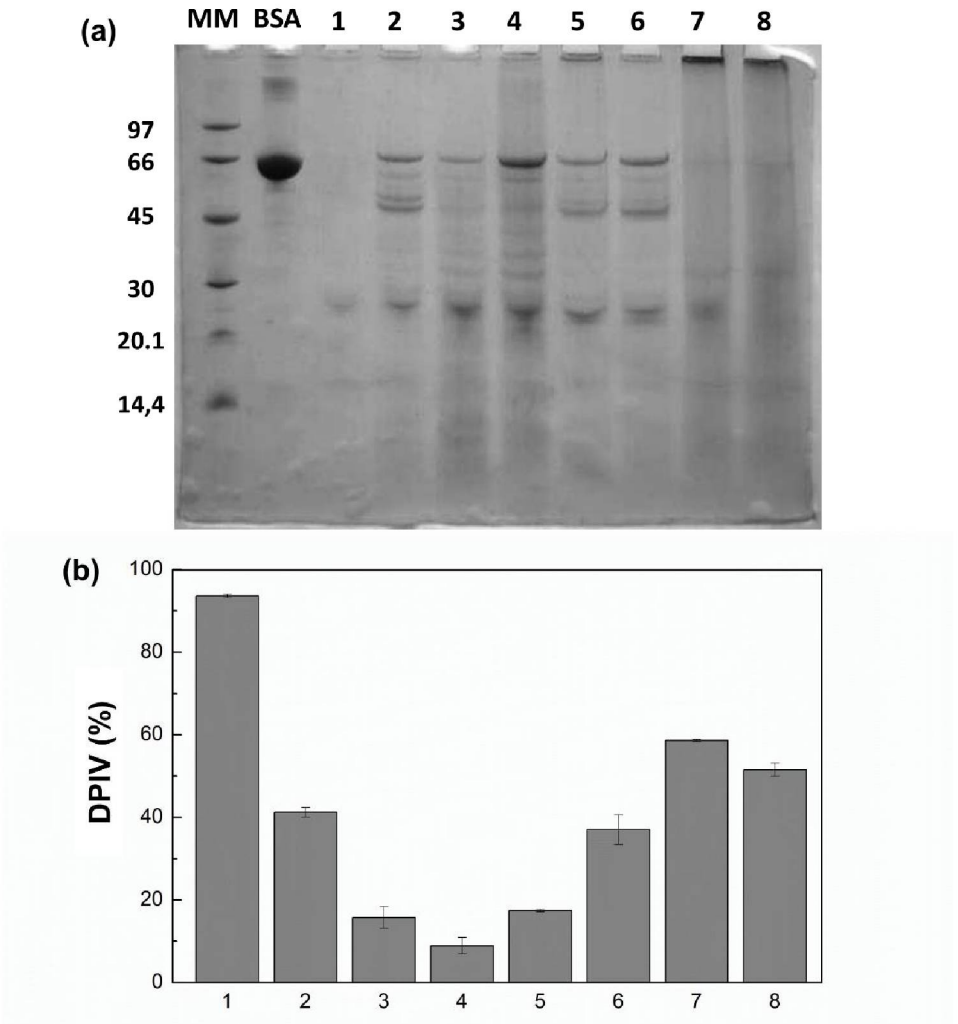
O mecanismo de precipitação do polifenol pela proteína pode envolver três fases distintas, a formação do complexo proteína-polifenol solúvel, a formação de complexos insolúveis que ocorre por interações fracas e cooperativas e a agregação dos complexos insolúveis (CHARLTON et al., 2002). Dessa forma, os complexos insolúveis formados por AT e M^{2+} podem ocorrer primeiro nas misturas contendo proteína devido à sua maior velocidade de reação. O complexo insolúvel polifenol-metal está relacionado a formação de um complexo não carregado, a redução da polaridade da molécula de tanino e a formação de complexos de alta massa molar (MCDONALD et al., 1996). A polimerização dos polifenóis reduzem a partição destes em membranas celulares (HIDER et al., 2001), afetando sua biodisponibilidade. Além disso, a formação de um complexo insolúvel com proteínas pode afetar sua digestibilidade, como pode ser visto na próxima seção.

4.3.3. Efeito do ácido tânico e cátions divalentes na digestibilidade proteica *in vitro* da BSA

Os resultados de DPIV de BSA na presença de AT e M^{2+} estão apresentados na FIGURA 22. A análise de eletroforese em condições redutoras de amostras obtidas após o procedimento de DPIV está ilustrada na Figura 22a e o cálculo da massa molar das bandas é apresentada no APÊNDICE IV (FIGURA A10). Como a mesma quantidade de amostra hidrolisada foi colocada no gel, as bandas de maior intensidade indicaram a diminuição da DPIV. A presença de uma banda de BSA nativa sob condições redutoras após a hidrólise sugere que a proteína permaneceu intacta mesmo após digestão por tempo prolongado pela pepsina e pancreatina. Observou-se uma multiplicidade de bandas que variavam em tamanho para todas as amostras contendo AT, $MgCl_2$ e $CaCl_2$ com bandas de maior intensidade em 68-70 kDa, 45-48 kDa e ~24 kDa e grandes agregados que não entraram no gel. A faixa com 68-70 kDa é provavelmente BSA em seu estado nativo, mostrando que o AT e o M^{2+} protegem a proteína contra a hidrólise. As outras bandas observadas entre 66 kDa e 30 kDa são um resultado de proteínas parcialmente hidrolisadas. A banda a 24 kDa é provavelmente a enzima digestiva (a eletroforese de pepsina e pancreatina é apresentada na FIGURA A11 do APÊNDICE IV). As amostras contendo $MnCl_2$ apresentaram agregados que não

puderam entrar no gel (amostras 7 e 8) mostrando que o complexo AT-BSA-Mn^{2+} é mais resistente à digestão com pepsina e pancreatina devido à formação de complexos de alta massa molar.

FIGURA 22 - ELETROFORESE EM GEL TRIS-TRICINA DE AMOSTRAS HIDROLISADAS E ANÁLISE DE DIGESTÃO PROTEICA IN VITRO DAS AMOSTRAS CONTENDO BSA, AT E M^{2+}



Nota: eletroforese (a) e digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) (b) de BSA na presença de ácido tânico e cátions divalentes em condições gastrointestinais simuladas por pepsina (pH 3,0) e pancreatina (pH 7,0) a 37 ° C. (1) controle; (2) AT:BSA (50:1); (3) $MgCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (4) $MgCl_2$:AT:BSA (625:50:1); (5) $CaCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (6) $CaCl_2$:AT:BSA (625:50:1); (7) $MnCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (8) $MnCl_2$:AT:BSA (625:50:1). A faixa denominada MM contém padrões de massa molar, com massas respectivas em kDa e a faixa denominada BSA contém a proteína sem qualquer tratamento. A quantidade de amostra hidrolisada (1 a 8) aplicada no gel foi de 10 µL.
FONTE: O autor (2019).

A diminuição na digestibilidade da BSA devido à presença de AT foi observada em todas as amostras. A redução de DPIV na presença de AT ocorre como resultado da cobertura hidrofóbica da superfície da proteína (MARTÍNEZ; MOYANO, 2003) e de um impedimento estérico da pepsina, uma vez que as ligações peptídicas próximas a aminoácidos hidrofóbicos estão envolvidos nos complexos AT-BSA e ficam indisponível para a hidrólise (CAO; XIONG, 2017). As amostras contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ diminuíram a DPIV da BSA na presença de AT. Com o aumento da força iônica, a afinidade entre AT e BSA aumenta devido à exposição de grupos hidrofóbicos da proteína impedindo a hidrólise enzimática. Além disso, um complexo ternário entre AT, BSA e $MgCl_2$ ou $CaCl_2$ pode ser formado dificultando o acesso das enzimas à proteína.

O $MnCl_2$ aumentou a DPIV dos complexos AT-BSA. Isto pode ser devido à diminuição da liberdade de rotação por impedimento estérico da superfície da proteína à qual o manganês está ligado (MILDVAN; COHN, 1963), aumentando assim a ligação do AT com o $MnCl_2$ em vez da BSA. Apesar disso, a DPIV ainda é pequena. Os resultados obtidos na análise de eletroforese indicam que, embora a diminuição na DPIV das amostras contendo o $MnCl_2$ tenha sido baixa em relação àquelas observadas para $MgCl_2$ e $CaCl_2$, o complexo formado é resistente a condições desnaturante utilizadas na análise de eletroforese. Cálcio e magnésio podem ser mais facilmente extraídos por polifenóis em condições ácidas (SCHMIDT et al., 2017), ou seja, sua interação é favorável em condições que são observadas durante a digestão pela pepsina (pH 3,0). Esta pode ser a razão de seu maior impacto na DPIV global quando comparado às amostras contendo $MnCl_2$. Curiosamente, o impacto de cada M^{2+} na DPIV segue a tendência observada para o efeito *salting out* dos cátions divalentes nas proteínas, onde o Mg^{2+} é mais propenso a precipitar a proteína, seguido pelo Ca^{2+} e depois pelo Mn^{2+} (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984).

Além da diminuição da DPIV, a interação polifenol e proteína pode diminuir a absorção do polifenol. Isto é observado para a diminuição da bioacessibilidade dos flavan-3-ol na presença de proteínas e minerais do leite (MOSER et al., 2014). Apesar da diminuição na digestibilidade da proteína e bioacessibilidade do polifenol e do mineral (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017), em alguns casos, a interação de polifenóis com metais pode ser benéfica no transporte de minerais,

como foi relatado por Li et al. (2012) para o transporte de ferro pela ferritina da semente de soja.

4.3.4. Efeito de cátions divalentes na interação de albumina do soro bovino (BSA) e ácido tânico e sua influência na turbidez e na digestibilidade proteica *in vitro*: Considerações finais.

Os cátions divalentes aumentam a afinidade e influenciam os valores de entalpia e entropia da ligação entre BSA e AT. A influência na ligação é diferente dependendo do metal provavelmente devido à interação do sal em regiões distintas da proteína e mudanças em sua estrutura. Além disso, cada sal interage de forma diferente com o AT. Na presença de $MgCl_2$, o perfil de interação AT-BSA manteve-se o mesmo. Na presença de $CaCl_2$ e $MnCl_2$, o mecanismo das interações mudou como foi observado pela entropia que passou de negativa para positiva. O fator que mais influenciou a turbidez foi a interação binária de AT e cátions divalentes. As amostras contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ diminuíram a DPIV dos complexos BSA e AT e, após a hidrólise, observou-se a permanência de complexos de alta massa molar, BSA sem hidrólise e peptídeos com tamanho de 45-48 kDa. Amostras contendo $MnCl_2$ apresentaram maior DPIV que amostras contendo somente BSA e AT, porém os complexos obtidos após hidrólise foram maiores do que os observados na presença de $MgCl_2$ e $CaCl_2$.

Os resultados apresentados nessa seção avançaram a compreensão das interações entre diferentes componentes em um sistema alimentar complexo e em condições fisiológicas. As condições de formação dos complexos envolvendo taninos e íons metálicos pode ser importante em diversas áreas do conhecimento (agronomia, meio ambiente e engenharia de materiais e alimentos) e a sua interação na presença de proteínas é importante em reações enzimáticas e transporte de substâncias no sangue. Além disso, essas interações podem afetar o processamento de alimentos devido a mudança de cor, precipitação, etc.

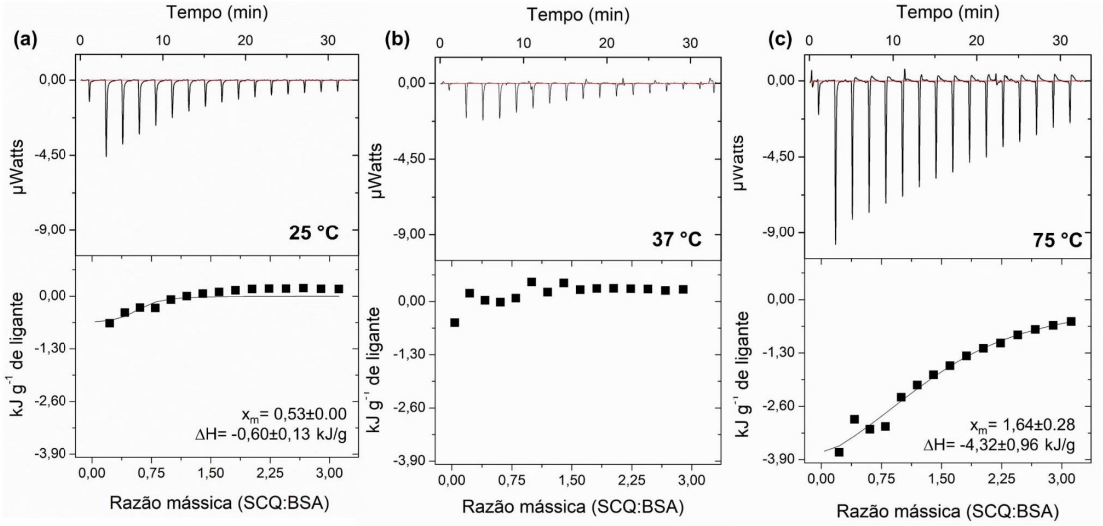
4.4. EFEITO DA INTERAÇÃO DE SAPONINA DA CASCA DE *QUILLAJA* E BSA NA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA, GELEIFICAÇÃO E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA PROTEÍNA

As saponinas são comumente consumidas nas dietas humanas na forma de aditivos para conferir capacidade emulsificante ou espumante, ou em razão da sua presença em alimentos como soja, ervilha, chás, etc. Dessa forma, o estudo das suas interações moleculares com proteínas é importante para o entendimento das alterações nas características estruturais dos alimentos, bem como nas suas propriedades nutricionais. Estudos indicam que a presença da saponina pode tanto auxiliar (SHIMOYAMADA et al., 2005) quanto dificultar (IKEDO et al., 1996; SHIMOYAMADA et al., 1998, 2000) a digestão de proteínas. Os fatores que mais influenciam a interação entre as proteínas e saponinas são o pH e a estrutura da proteína e da saponina (FARIA, DE et al., 2017a, 2017b). Dessa forma, essa seção tem como objetivo estudar a interação da saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) com BSA e a sua influência na conformação, geleificação e digestibilidade *in vitro* da proteína.

4.4.1. Interação molecular obtida por ITC

A interação molecular entre SCQ e BSA em pH 3,0 foi analisada nas temperaturas de 25 °C, 37 °C e 75 °C. Os valores de razão mássica onde ocorreu a complexação e da variação de entalpia de ligação foram obtidos utilizando o modelo de um sítio (FIGURA 23). Como a distribuição de massa molar da saponina utilizada nesse trabalho não foi determinada, os resultados referentes às interações são apresentados em termos mássicos. Na parte superior da figura encontra-se a curva referente à mudança de calor (μWatts) após a injeção da saponina na célula contendo a BSA. A parte inferior refere-se à variação de entalpia (ΔH) por grama de saponina envolvida na formação dos complexos SCQ-BSA.

FIGURA 23 - CURVAS DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E A SAPONINA EM PH 3,0 A 25 °C E 75 °C



Nota: Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; os símbolos são dados experimentais: x_m é a razão mássica de SCQ:BSA onde ocorre a ligação, ΔH é a mudança de entalpia.
FONTE: O autor (2019).

É possível observar na FIGURA 23 que as interações moleculares entre a BSA e a SCQ foram exotérmicas e de baixa intensidade. Uma vez que as amostras comerciais de SCQ apresentam misturas de estruturas de saponina (KEZWON; WOJCIECHOWSKI, 2014), a interação com proteínas estudada por ITC não é específica para um tipo de molécula e, dessa forma, tem-se apenas uma visão geral das interações. Esse resultado está de acordo com o trabalho de Liu et al. (2003) que observaram que a interação de extratos de saponina obtidos de *Panax notoginseng* com a albumina do soro humano ocorre em múltiplos sítios de ligação da proteína.

Pode-se observar que em 37 °C o calor de interação ficou próximo a zero indicando que não houve interação molecular nas condições do experimento. Comparando os resultados obtidos para as interações a 25 °C e a 75 °C, é observado que o aumento da temperatura acima da desnaturação proteica favorece a formação dos complexos. De acordo com Böttcher, Scampicchio e Drusch (2016), as proteínas em seu estado nativo apresentam menor flexibilidade e por isso não podem interagir facilmente com as saponinas de *Quillaja*. Quando ocorre a desnaturação proteica, a flexibilidade da proteína aumenta e interações

da saponina com grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos ocorrem. Por outro lado, se o aquecimento da proteína ocorrer na presença da saponina, a estabilidade proteica ao calor aumenta (IKEDO et al., 1996) o que pode resultar em características distintas de formação dos complexos. Este comportamento tende a impactar em propriedades funcionais das proteínas como a geleificação.

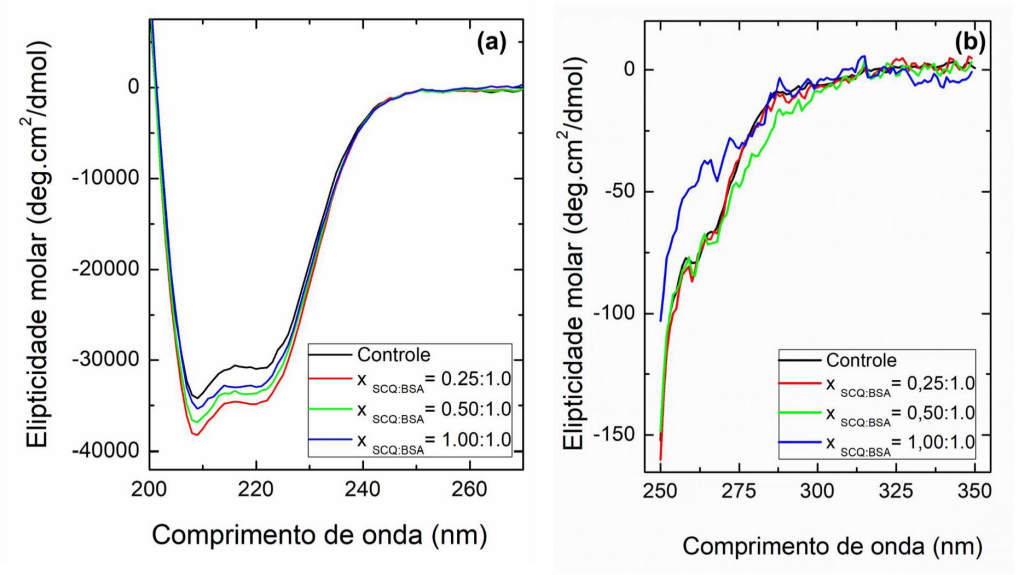
A interação da saponina com a BSA em pH 7,0 também foi realizada, porém neste pH não foi observado interação molecular significativa (dados não mostrados). Isso ocorre devido às saponinas de *Quillaja* apresentam carga líquida negativa na faixa de pH de 2 a 9 (REICHERT et al., 2015). Dessa forma, ocorre a repulsão entre a BSA e a saponina em pH 7,0, pois ambas as moléculas estão carregadas negativamente.

4.4.2. Dicroísmo circular (CD)

A alteração conformacional na estrutura secundária da proteína foi monitorada usando espectros de CD nos comprimentos de onda de 200-250 nm (*far*-CD) e 250-300 nm (*near*-CD) e os resultados são apresentados na Figura 24. Na região espectral de 190-250 nm, o cromóforo é a ligação peptídica e as alterações na estrutura secundária da proteína podem ser monitoradas. Na faixa de 250-300 nm, informações sobre a estrutura terciária podem ser obtidas. Nesses comprimentos de onda, os cromóforos são os aminoácidos aromáticos e ligações dissulfeto (RANJBAR; GILL, 2009).

A estrutura α-hélice de BSA é identificada por um sinal positivo a 195 nm e um amplo pico negativo na região de 200-240 nm, com um mínimo a 208 nm. Os espectros de *far*-CD de BSA (FIGURA 24a) foram registrados na ausência e presença de diferentes razões mássicas de saponina:proteína (0,25:1 a 1:1). A posição dos picos observados não se alterou na presença de SCQ mostrando que a estrutura secundária permaneceu a mesma (FIGURA 24a). O mesmo comportamento foi observado para a estrutura terciária estudada por *near*-CD (FIGURA 24b) onde não foram observadas mudanças na elipticidade das soluções de BSA nas razões mássicas de BSA:SCQ de 1:0,25 e 1:0,5. Dessa forma, pode-se observar que as interações envolvidas entre a SCQ e BSA tem um caráter superficial.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR EM 200-250 nm (A) 250-300 nm (B) DA ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE SAPONINA DE CASCA DE QUILLAJA (SCQ).



Nota: a concentração de proteína utilizada foi de 0,1 mg/mL (200-250 nm) e 1,0 mg/mL (250-300 nm).
FONTE: O autor (2019).

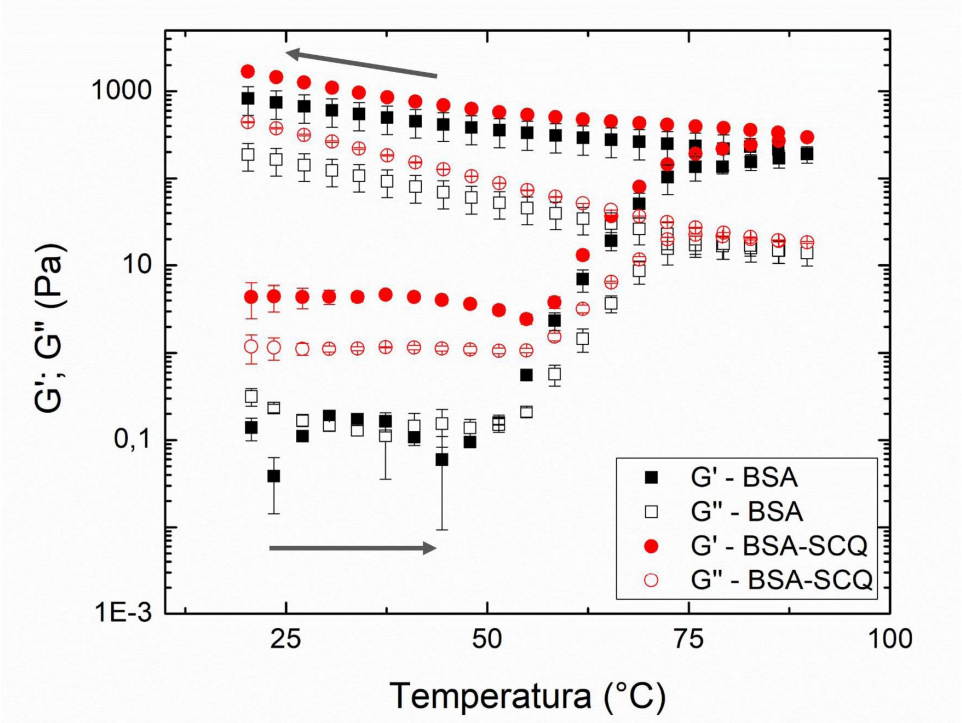
A BSA possui vários resíduos aromáticos (27 fenilalaninas, 20 tirosinas e 2 triptofanos) e 35 cisteínas que constituem 17 pontes dissulfeto e um tiol livre de cisteína (SU et al., 2008). A contribuição de cada resíduo aromático na elipticidade tem um comprimento de onda característico: triptofano (290-305nm), tirosina (275-282nm) e fenilalanina (255-270nm) (SU et al., 2008). Assim, o leve aumento da elipticidade na faixa de 250 a 275 na maior concentração da SCQ, indica que a saponina pode auxiliar na exposição de resíduos aromáticos fenilalanina da proteína ao ambiente mais polar do solvente. Resultados semelhantes foram obtidos por Shimoyamada et al. (2005) para misturas de saponina de soja e de α-lactalbumina.

4.4.3. Geleificação de BSA na presença de saponina

A geleificação induzida pelo calor é obtida por aquecimento da solução proteica que expõe os grupos funcionais, tais como CO e NH de ligações

peptídicas, grupos amida de cadeia lateral e grupos hidrofóbicos, que interagem entre si para formar um gel tridimensional rede (WANG; DAMODARAN, 1991). No presente trabalho, a geleificação da BSA foi obtida por reologia oscilatória. A amostra foi aquecida e resfriada para criar uma estrutura de gel durante a análise conforme apresentado na Figura 25.

FIGURA 25 - EFEITO DA SAPONINA (2,5%) NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA SOLUÇÃO DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA (5%) DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 3,0.



Nota: A concentração de BSA foi de 5% e de saponina foi de 2,5%. As condições durante o experimento foram: frequência foi de 1Hz, deformação máxima de 1% e taxa de aquecimento e resfriamento de 2 °C/min.
FONTE: O autor (2019).

A amostra de BSA apresentou um aumento nos valores de G' e G" durante o aquecimento e resfriamento. O valor G' foi menor que G" no início do experimento para a amostra sem SCQ mostrando um comportamento semelhante a líquido. O ponto em que o valor de G' aumentou e se tornou maior que G" devido à formação da rede de gel foi em torno de 50 °C. A BSA desnatura em torno de 65 °C (BORZOVA et al., 2016), portanto, a 50 °C, provavelmente o desdobramento da proteína começa e a exposição dos grupos funcionais ocorre

aumentando a interação proteína-proteína. Durante o resfriamento, os valores de G' e G" também aumentaram. A BSA pode agregar durante o resfriamento, como foi observado por Su et al. (2008), e assim a formação do gel mais forte pode ser devido à maior aproximação das cadeias de proteínas que interagem entre si.

A SCQ foi adicionada na solução de BSA para uma razão mássica de BSA:SCQ de 1,0:0,5, que foi a razão mássica de formação dos complexos obtida nas análises de ITC. Na presença de SCQ, o G' foi maior que G" no início do experimento, mostrando um comportamento de gel fraco. Durante o aquecimento, os valores G' e G" da amostra contendo SCQ permaneceram constantes até cerca de 60 °C. Acima dessa temperatura, foi observado um aumento significativo nos valores de G' e G". A temperatura onde ocorreu um aumento significativo nos valores de G' e G" foi maior para a amostra contendo SCQ do que a amostra sem SCQ (em torno de 50 °C), mostrando que a estabilidade térmica da proteína aumentou. Isto está de acordo com o trabalho de Ikedo, Shimoyamada e Watanabe (1996) que observaram um aumento na estabilidade da BSA na presença de saponina de soja (desnaturação proteica acima de 80 °C).

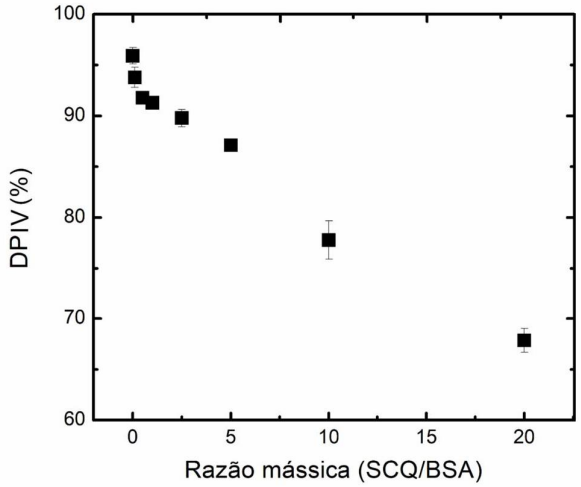
Os valores de G' e G" da BSA na presença de SCQ foram maiores durante o aquecimento e o resfriamento, indicando que a saponina auxiliou na formação e estabilização da rede de gel. A geleificação proteica a quente é controlada pelo equilíbrio entre interações hidrofóbicas e forças repulsivas eletrostáticas (MURATA et al., 1993) e a extensão da desnaturação afeta a formação do gel (WANG; DAMODARAN, 1991). As interações proteína e saponina podem ocorrer por ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e eletrostáticas (REICHERT et al., 2018). Assim, a SCQ pode interferir na interação proteína-proteína durante a geleificação e auxiliar na formação de ligações cruzadas entre as cadeias laterais da proteína.

Além disso, a conformação de proteína pode ter uma influência as características físicas dos géis de proteína (WANG; DAMODARAN, 1991). Alterações na estrutura terciária das soluções de BSA são induzidas acima de 60 °C em pH 7,0 (SU et al., 2008). Além disso, a SCQ interage com BSA em altas temperaturas. Assim, o aumento na força do gel pode ser atribuído tanto a uma maior interação proteína-proteína por grupos hidrofóbicos quanto à reticulação entre moléculas de proteína pela saponina.

4.4.4. Digestibilidade proteica *in vitro*

O efeito da razão mássica de SCQ/BSA na DPIV das misturas de BSA e SCQ é apresentado na FIGURA 26. Observou-se que em razões mássicas de SCQ:BSA menores que 2,5:1,0, as saponinas não influenciaram de maneira drástica a DPIV (cerca de 90% da proteína foi digerida). No entanto, quando a razão mássica de SCQ/BSA aumenta, a digestão de proteínas torna-se menos eficiente. Em baixas razões mássicas de saponina/proteína a formação dos complexos ocorre devido a interações eletrostáticas e em altas razões mássicas ocorrem principalmente por ligações hidrofóbicas (WOJCIECHOWSKI et al., 2011, 2014). Assim, a inibição da digestibilidade da proteína em altas concentrações de saponina pode ter ocorrido devido à formação de ligações hidrofóbicas entre saponinas e BSA.

FIGURA 26 – DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DA BSA NA PRESENÇA DE SAPONINA DA CASCA DE *QUILLAJA* EM DIFERENTES RAZÕES MASSICAS



FONTE: O autor (2019).

Segundo Ikedo, Shimoyamada e Watanabe (1996), a interação da porção aglicona da saponina com a região hidrofóbica superficial da BSA diminui a hidrólise proteica pela quimotripsina, devido à repulsão da enzima pelas cadeias hidrofóbicas de saponina. Em baixas concentrações de saponina, as interações são mais fracas e, portanto, desestabilizadas no pH gastrointestinal fazendo com que a proteína seja facilmente degradada pelas enzimas digestivas. As interações entre saponinas e proteínas são mais favoráveis em um ambiente ácido (WENG

et al., 2012) e, assim, a digestibilidade é menos afetada no pH do intestino (pH 7,0).

A inibição da hidrólise proteica está relacionada às alterações conformacionais da proteína e à cobertura dos resíduos alvo das enzimas digestivas na proteína (IKEDO et al., 1996). Além disso, como mostrado por Ishaaya e Birk (1965), as saponinas podem inibir a atividade catalítica de algumas enzimas. No entanto, altas concentrações de saponinas são necessárias para promover esse efeito. Nos alimentos, concentrações elevadas não são encontradas conforme apresentado na TABELA 1 (0,09% a 3,23% em grãos) e como aditivo, sendo que a quantidade máxima do extrato de *Quillaja* permitida de acordo com a legislação brasileira é de 0,2 mg/100mL em bebidas (BRASIL, 2005; BRASIL, 2007). Apesar disso, sob certas condições, a hidrólise enzimática pode aumentar na presença de saponinas. Este comportamento foi observado para a β-lactoglobulina e foi atribuído à perda da estrutura do β-barril da molécula, melhorando o acesso das enzimas digestivas (SHIMOYAMADA et al., 2005). Assim, as saponinas obtidas da casca da *Quillaja* podem não influenciar drasticamente a digestibilidade da albumina do soro bovino quando consumidas em pequenas quantidades.

4.4.5. Efeito da interação da saponina da casca de *Quillaja* e BSA na estrutura secundária e terciária, geleificação e digestibilidade *in vitro* da proteína: Considerações finais.

A interação entre BSA e SCQ ocorre em baixas razões mássicas de SCQ/BSA, resultando em um baixo calor de interação e uma curva não sigmoidal. A formação dos complexos SCQ e BSA foi favorecida na temperatura mais alta (75 °C), provavelmente devido à exposição de diferentes grupos da proteína. O gel de BSA formado na presença de SCQ foi mais forte o que pode ser atribuído a exposição de regiões hidrofóbicas da proteína e devido à reticulação entre moléculas de proteína. A digestibilidade proteica *in vitro* não foi muito afetada em baixas razões mássicas de SCQ/BSA. Assim, a SCQ pode ser usado para aumentar a força de géis proteicos sem um impacto significativo na digestibilidade da proteína, mantendo as suas propriedades medicinais já comprovadas.

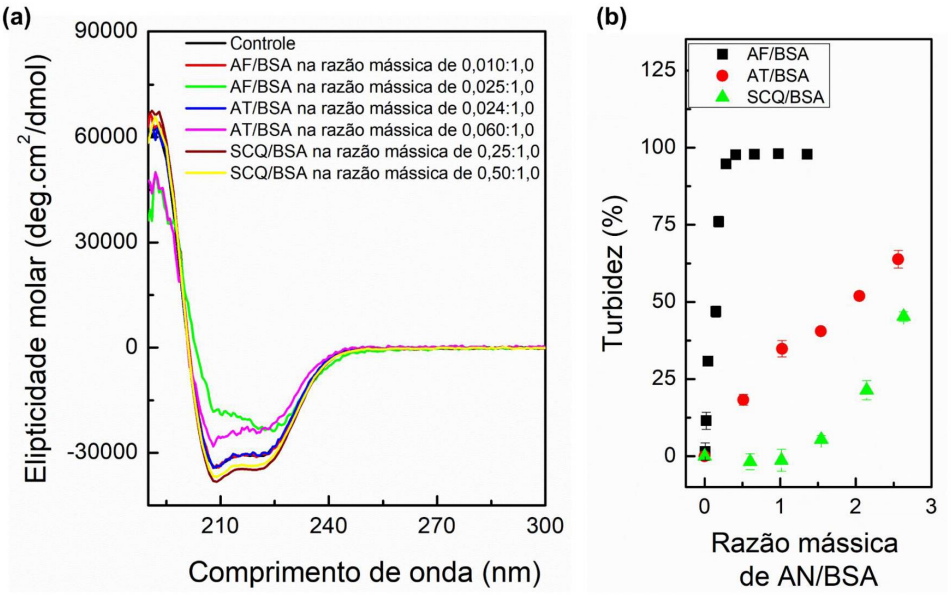
4.5. INTERAÇÕES ENVOLVIDAS EM MISTURAS DE ANTINUTRIENTES E ALBUMINA DO SORO BOVINO E O SEU EFEITO NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*

Foi mostrado ao longo desse trabalho que os antinutrientes fitato, taninos e saponinas afetam a digestão proteica. No entanto, em grãos, essas substâncias normalmente não existem de forma isolada nos alimentos conforme apresentado na TABELA 1 da revisão de literatura. Dessa forma, estudos do efeito das misturas de ANs podem ampliar a compreensão do papel nutricional de misturas complexas (MAKKAR, 2003). Ainda existem poucos estudos sobre interações envolvendo misturas de antinutrientes e as proteínas. Dessa forma, o objetivo desta seção foi estudar a interação da mistura de antinutrientes com a albumina do soro bovino (BSA) e seu efeito na digestibilidade proteica *in vitro*.

4.5.1. Efeito dos ANs na estrutura secundária de BSA e Turbidez

A estrutura secundária da proteína está relacionada à sua capacidade de interagir com outras moléculas, propriedades funcionais e digestibilidade (CARBONARO et al., 2012). A estrutura secundária da BSA foi determinada na presença de ANs por meio da análise de dicroísmo circular (CD). A FIGURA 27a mostra a curva obtida para a estrutura secundária da BSA em pH 3,0, com e sem AN. A BSA apresenta em sua maioria estruturas do tipo α-hélice. A estrutura da α-hélice é evidente por sinal positivo em torno de 190 nm e duas bandas negativas de magnitude similar em 222 e 208 nm (CORRÊA et al., 2009). A composição da estrutura secundária da BSA calculada pelo *software* Contin-LL resultou em 85,1±0,6% de α-hélice, 14,2±0,4% de estrutura desordenada, 0,7±0,2% de β-volta e 0,2±0,1% de β-folha para amostra sem AN (controle). As amostras com razão mássica de AF:BSA de 0,01:1,0, de AT:BSA de 0,024:1,0 e de SCQ:BSA de 0,25:1,0 e 0,5:1,0 não diferiram na composição da estrutura secundária quando comparadas com a amostra de controle (sem AN). No entanto, na razão mássica de AF:BSA (0,025:1,0) e AT:BSA (0,06:1,0) foram observadas diferenças nos espectros de CD, e o conteúdo de α-hélice diminuiu para 66,8±1,5% e 73,4±0,8%, respectivamente.

FIGURA 27 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TURBIDEZ DE MISTURAS DE ANTINUTRIENTES E BSA



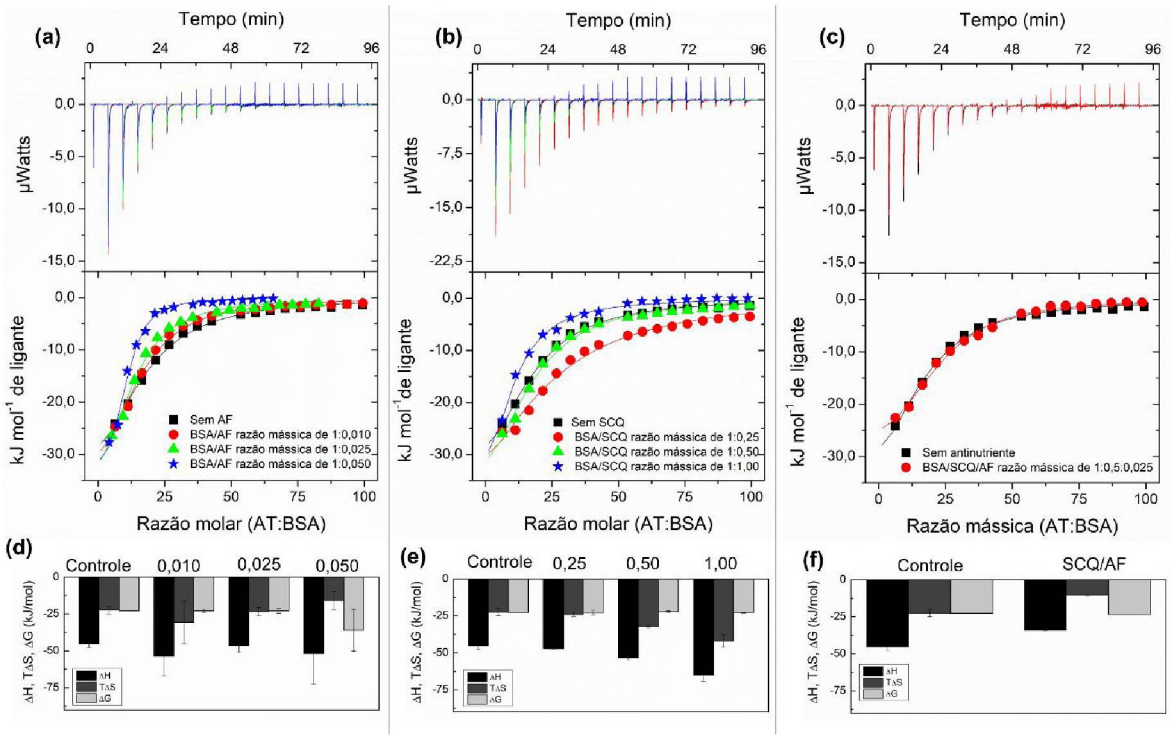
Nota: (a) Dicroísmo circular de BSA na presença de ácido fítico (AF), ácido tânico (AT) e saponina de casca de Quillaja (SCQ); (b) turbidez das misturas de antinutrientes e BSA.
FONTE: O autor (2019).

A turbidez em função da razão mássica de AN/BSA é apresentada na FIGURA 27b. A turbidez dos complexos AF/BSA em razões mássicas acima de 0,3 aumentou para cerca de 100%. A formação de complexos insolúveis de AF e proteína ocorrem devido a reticulação do AF com cadeias laterais básicas de aminoácidos para formar uma rede ou complexo insolúvel (BYE et al., 2013). Para os complexos BSA e AT, observou-se aumento na turbidez com o aumento da razão mássica AT/BSA, no entanto, a turbidez máxima obtida foi de 63,8%. Isto pode ser devido ao fato de o complexo não ser grande o suficiente para desviar a luz. Além disso, o mecanismo de interação entre tanino e proteínas pode ser lento, conforme descrito nas seguintes etapas: associação de taninos com proteínas para formar pequenas partículas, seguido pela associação dessas pequenas partículas para formar agregados solúveis, que podem se tornar insolúveis devido à agregação (FREITAS; MATEUS, 2012). Os complexos SCQ/BSA também apresentaram pequenos valores de turbidez (máximo de 45,2%). Isto deve-se provavelmente aos complexos de proteína e saponina serem solúveis nas razões mássicas de SCQ/BSA analisadas.

4.5.2. Interação do ácido tânico com BSA na presença de ácido fítico e saponina da casca de *Quillaja*

A interação de AT com BSA na presença de diferentes razões mássicas de SCQ/BSA e AT/BSA foi avaliada por ITC e os resultados estão apresentados na FIGURA 28 e na TABELA 6. Todas as curvas obtidas foram hiperbólicas o que é comum para a interação tanino e proteína, conforme discutido anteriormente.

FIGURA 28 - CURVAS DE ITC DA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO TÂNICO (AT) NA PRESENÇA DE ÁCIDO FÍTICO (AF) E SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) EM pH 3,0 E 25 °C



Nota: (a) AT em BSA/AF; (b) AT em BSA/SCQ; (c) AT em BSA/SCQ/AF (1:0,5:0,025); (d) perfil termodinâmico da interação AT-(BSA/AF) (f) perfil termodinâmico da interação AT-(BSA/SCQ); (g) perfil termodinâmico das interação AT-(BSA/SCQ/AF). O número observado acima do perfil termodinâmico, figuras d, e e f, é a razão mássica de AN/BSA. Linhas sólidas são o melhor ajuste dos dados usando o modelo de um sítio; símbolos são dados experimentais, ΔH é mudança de entalpia, ΔS é mudança de entropia, ΔG é a energia livre de Gibbs.
FONTE: O autor (2019).

TABELA 6 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA) E ÁCIDO TÂNICO (AT) NA PRESENÇA DE SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) E ÁCIDO FÍTICO (AF) EM pH 3,0 E 25 ° C

	n (AT/BSA)	K_a x10^{-3} (M^{-1})	ΔH (kJ/mol)	TΔS (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
AT-BSA	19,7±5,1 ^{aA*}	9,8±0,1 ^{bAB*}	-45,2±2,6 ^{aA*}	-22,5±2,5 ^{aA*}	-22,8±0,0 ^{aAB*}
AT-[BSA:AF (1:0,010)]	13,2±2,5 ^{a}	11,3±4,2 ^{b}	-53,7±13,3 ^{a}	-30,7±14,3 ^{a}	-23,0±1,0 ^{a}
AT-[BSA:AF (1:0,025)]	9,5±4,4 ^{a}	16,1±1,7 ^{b}	-46,5±4,4 ^{a}	-24,4±2,7 ^{a}	-23,0±1,7 ^{a}
AT-[BSA:AF (1:0,050)]	8,5±1,6 ^{a}	36,0±0,7 ^{a}	-52,0±20,4 ^{a}	-16,0±6,3 ^{a}	-36,0±14,1 ^{a}
AT-[BSA:SCQ (1:0,25)]	24,6±3,5 ^{A}	11,3±6,9 ^{A}	-47,0±0,5 ^{A}	-24,1±1,2 ^{A}	-22,9±1,6 ^{B}
AT-[BSA:SCQ (1:0,50)]	16,0±2,2 ^{A}	7,6±1,5 ^{B}	-53,3±1,3 ^{AB}	-32,2±0,8 ^{AB}	-22,1±0,5 ^{A}
AT-[BSA:SCQ (1:1,00)]	9,9±3,7 ^{A}	10,1±1,6 ^{AB}	-64,9±4,5 ^{B}	-42,0±4,2 ^{B}	-22,8±0,3 ^{AB}
AT-[BSA:SCQ:AF (1:0,5:0,025)]	20,2±1,3*	13,4±0,6*	-34,0±0,2*	-10,5±0,3*	-23,5±0,1*

Nota: n: relação estequiométrica; K_a: constante de afinidade; ΔH: mudança de entalpia; T: temperatura; ΔS: mudança de entropia; ΔG: energia livre de Gibbs. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem na coluna a um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey. A minúscula foi usada para comparação entre a interação da BSA e AT na presença de AF e maiúsculas para comparação entre interação da BSA e AT na presença de SCQ. As amostras com asterisco na coluna não diferiram estatisticamente de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

O perfil termodinâmico da ligação nas diferentes condições estudadas resultou em valores negativos de ΔH, TΔS e ΔG e interações dirigidas entalpicamente. O AT altera a estrutura secundária de BSA como foi observado por CD (FIGURA 27a) o que pode iniciar a "ligação sequencial", isto é, a ligação inicial de AT em locais particulares de proteína induz a afinidade de ligação de AT em relação à proteína como foi proposto por Ishtikhar et al. (2018).

A FIGURA 28a apresenta a influência do AF na interação entre o AT e BSA. Com o aumento da concentração de AF, a saturação da curva de ITC ocorreu em uma razão molar menor que a observada para amostra sem AF. Isso se deve à precipitação da BSA com o aumento da concentração de AF, como observado pelas medidas de turbidez (FIGURA 27b), inibindo o acesso do AT aos sítios de ligação da BSA. Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas na relação estequiométrica. A maior constante de afinidade foi observada na maior razão mássica de AF/BSA (1:0,05). O tanino pode ligar-se às proteínas por forças hidrofílicas e hidrofóbicas (PRIGENT et al., 2003; JALDAPPAGARI et al., 2013; KILMISTER et al., 2016), enquanto o AF interage principalmente por forças eletrostáticas (HÍDVÉGI, MÁTÉ; LÁSZTITY, 2002; BYE et al., 2013). Desta forma,

a ligação prévia do AF com BSA provavelmente aumenta a ligação do AT com BSA por forças hidrofóbicas.

Segundo Xie et al. (2014) a interação do AF com compostos fenólicos pode ocorrer através de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila do composto fenólico e os grupos fosfato do AF. No entanto, a interação não foi detectada pelo ITC no presente trabalho como pode ser observado na FIGURA A7g do APÊNDICE I (titulação de AT em AF), provavelmente devido ao baixo calor de interação envolvido na ligação.

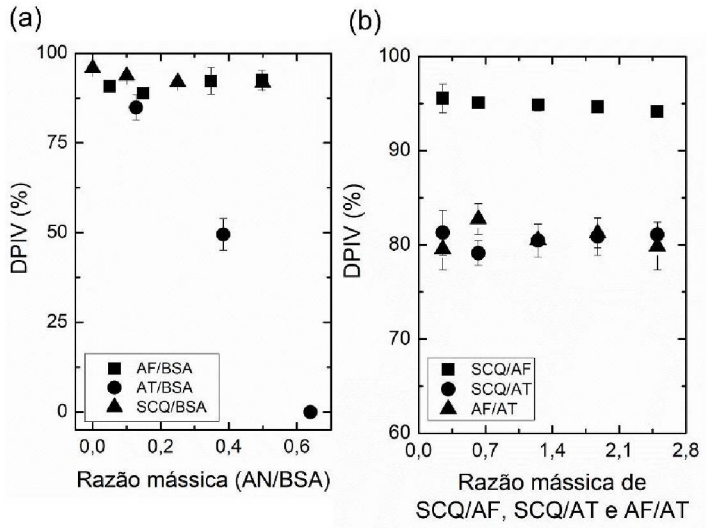
O perfil termodinâmico foi diferente na presença da SCQ e os valores de ΔH e $T\Delta S$ aumentaram com o aumento na razão mássica de SCQ/BSA mostrando que a natureza das interações entre o AT e BSA mudou. O resultado de CD (FIGURA 27a) mostrou que a interação entre a SCQ e BSA tem uma característica superficial. Assim, quando o AT é titulado no complexo SCQ-BSA, a ligação entre BSA e o AT é provavelmente intermediada pela SCQ. A influência da SCQ na interação AT e BSA pode ser complexa devido à grande possibilidade de ligações pelos diferentes grupos da saponina podendo interagir por ligações hidrogênio e hidrofóbicas, forças eletrostáticas ou uma combinação destas (REICHERT et al., 2018). Além disso, a SCQ também interage com o AT (FIGURA A7h do APÊNDICE I) podendo diminuir sua solubilidade (NAVARRO DEL HIERRO; HERRERA; GARCÍA-RISCO; et al., 2018). Como ambos AN podem interagir simultaneamente com proteínas e entre si, supõe-se que um complexo ternário por forças hidrofílicas e hidrofóbicas também pode ser formado.

A presença simultânea de BSA, SCQ e AF na célula de amostra do ITC não alterou os parâmetros termodinâmicos das ligações entre BSA e AT. Apesar da titulação de AF em SCQ resultar em sinais de baixa intensidade (FIGURA A7f do APÊNDICE I), o mesmo perfil obtido para o complexo AF-SCQ-BSA e BSA sem AN é possivelmente devido à interação SCQ e AF. Assim, apesar da presença do AF e SCQ isoladamente afetar a ligação de AT e BSA, a presença simultânea de ambos os ANs não afeta as interações AT e BSA.

4.5.3. Efeito de misturas de antinutrientes na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV)

O efeito da razão de massa de cada AN isolado e de misturas binárias e ternárias de AN sobre o IVPD foi analisado. Na FIGURA 29a, o efeito da razão mássica AN/BSA na DPIV foi avaliado isoladamente. O AF promoveu uma ligeira diminuição do em DPIV nas diferentes razões mássicas utilizadas de BSA/AF. Conforme descrito anteriormente, os complexos BSA/AF não são estáveis nas condições intestinais simuladas (pH 7,0) e dessa forma não impactam drasticamente a digestão proteica.

FIGURA 29 - DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV) DA ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA) NA PRESENÇA DE ANTINUTRIENTES



Nota: (a) BSA na presença de AF, TA e SCQ; (b) BSA na presença de misturas binárias SCQ/AF, SCQ/AT e AF/AT. A DPIV da amostra controle (sem AN) foi de 96,9±0,6%. A razão mássica de AN/BSA na figura b variou de 0,03 a 0,33.
FONTE: O autor (2019).

O AT diminuiu a DPIV de maneira significativa, sendo que a hidrólise proteica foi totalmente inibida na razão mássica de AT/BSA superior a 0,6. Na presença de AT, ocorre uma cobertura hidrofóbica da superfície da proteína dificultando o acesso das enzimas digestivas aos resíduos proteicos alvo (MARTÍNEZ e MOYANO, 2003). Além disso, uma vez que as forças hidrofóbicas envolvidas na ligação de AT e BSA são menos dependentes do pH, os complexos

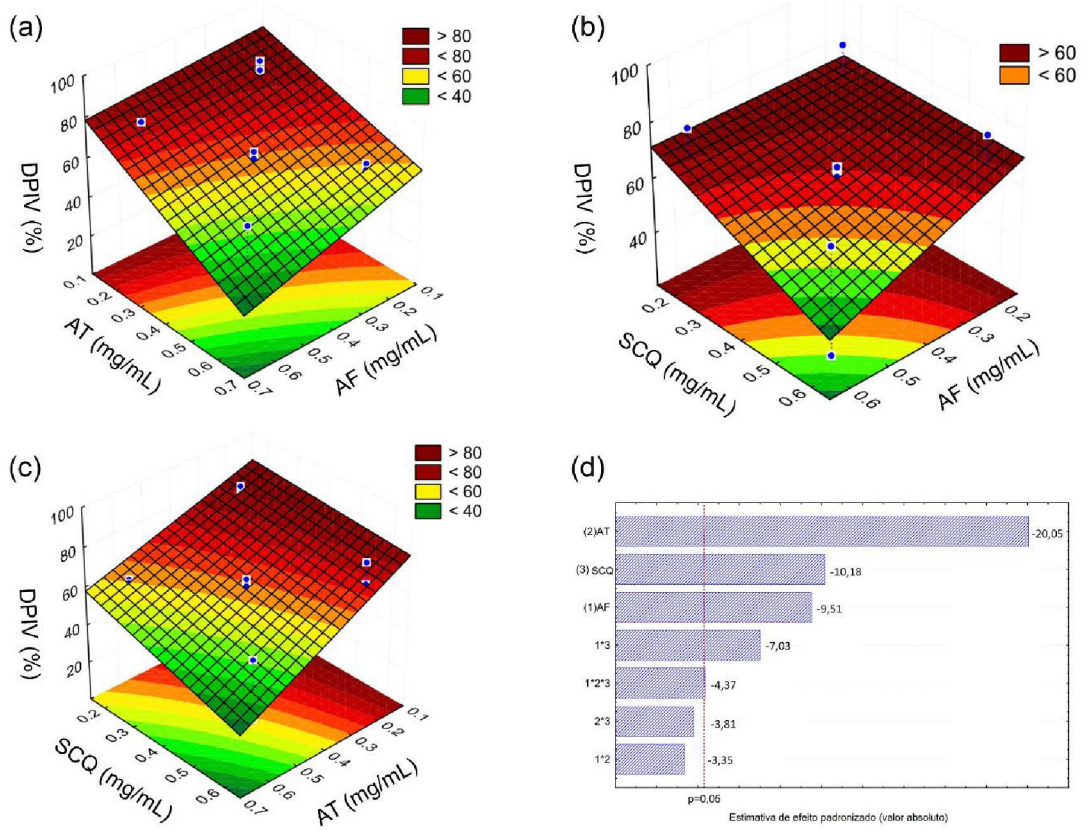
são estáveis ao longo do trato gastrointestinal. Outra razão da diminuição drástica da DPIV é a interação do AT com a pepsina (FIGURA A8 do APÊNDICE I).

A SCQ não influenciou a DPIV na razão mássica utilizada no presente estudo devido à interação entre saponina e proteína ser governada por forças eletrostáticas nas razões mássicas de saponina/proteína utilizadas. Além disso, nenhuma alteração na estrutura secundária e solubilidade da proteína ocorreu nessas condições, mostrando que os resíduos de proteína alvo estavam livres para serem hidrolisados por enzimas digestivas.

Na FIGURA 29b é demonstrado o efeito de misturas binárias de AN sobre a DPIV. Como esperado, as misturas binárias SCQ e AF não afetaram a DPIV devido a ambos os AN não interagem com a proteína em pH básico (condições intestinais simuladas) como foi discutido acima. Para misturas binárias contendo AT, a razão mássica de AT:BSA utilizada foi de 0,13:1 e a razão mássica de AF:BSA e SCQ:BSA variou de 0,03:1 a 0,33:1, respectivamente. Os resultados mostraram que o AF e a SCQ não alteram significativamente a digestibilidade da BSA e que a concentração de AT é o fator determinante na DPIV de misturas binárias de ANs. Isto está de acordo com Makkar, Blümmel, & Becker (1995) que mostraram que uma diminuição na taxa de digestão de proteínas era aditiva quando taninos e saponinas estavam presentes.

Com o objetivo de avaliar a influência da composição de cada AN em misturas ternárias na DPIV, utilizou-se um planejamento fatorial do tipo 2^3 com três pontos centrais. As FIGURAS 30a, 30b e 30c mostram as superfícies de resposta obtidas usando um modelo matemático de ordem 3 para o efeito de misturas de ANs na DPIV. Como esperado, em geral, com o aumento da concentração de AN, a DPIV diminuiu para misturas ternárias. O gráfico de Pareto mostrando a influência dos efeitos sobre a DPIV é apresentado na FIGURA 30d. Os efeitos devidos às variáveis escolhidas e suas interações na resposta são representados por barras cujo comprimento é proporcional à magnitude do efeito. Uma linha correspondente ao valor p de 0,05 é dada como referência.

FIGURA 30 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E GRÁFICO DE PARETO COMPARANDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO TÂNICO (AT), ÁCIDO FÍTICO (AF) E SAPONINA DE CASCA DE *QUILLAJA* (SCQ) NA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* (DPIV)



Nota: (a) AT e AF; (b) SCQ e AF; (c) AT e SCQ; (d) gráfico de Pareto. R^2 de 0,9999 e R ajustado de 0,98996. Os pontos experimentais estão apresentados dentro dos gráficos de superfície de resposta pelos pequenos círculos. A DPIV da amostra controle (sem AN) foi de 96,9±0,6%.
FONTE: O autor (2019).

Por meio de resultados de planejamento fatorial, um modelo que descreve a dependência de concentração de ANs em DPIV foi obtido com o auxílio do software Statistica (Equação 10). Os termos AF, AT e SCQ da equação são a concentração de cada AN (valores reais) em mg/mL.

$$\begin{aligned} DPIV = {} & 99{,}91 - (19{,}42 \times \mathrm{AF}) - (72{,}42 \times \mathrm{AT}) - (18{,}63 \times \mathrm{SCQ}) \\ & + (84{,}69 \times \mathrm{AF} \times \mathrm{AT}) + (26{,}61 \times \mathrm{AF} \times \mathrm{SCQ}) \\ & + (76{,}86 \times \mathrm{AT} \times \mathrm{SCQ}) - (340{,}75 \times \mathrm{AF} \times \mathrm{AT} \times \mathrm{SCQ}) \end{aligned} \quad (10)$$

O modelo obtido foi satisfatório, uma vez que não houve falta de ajuste aos dados experimentais, como pode ser observado pelos resultados da ANOVA apresentados no APÊNDICE III (TABELA A6). O coeficiente de determinação do modelo foi de 0,9969 mostrando um bom ajuste aos dados.

O gráfico de Pareto e o modelo matemático mostram que o AT é a principal causa da diminuição da DPIV de uma mistura ternária, seguida da SCQ e do AF. Efeitos sinérgico foram observados para os parâmetros de misturas binárias de AF e SCQ (1*3) e para a mistura dos três ANs (1*2*3). De acordo com o modelo obtido pelo planejamento fatorial, a concentração das misturas binárias AF-AT, AF-SCQ e AT-SCQ tem efeito positivo sobre a DPIV, ou seja, pode proporcionar um aumento na hidrólise proteica. No entanto, como o aumento da concentração dos três ANs a DPIV é reduzida. Isto é confirmado pelos resultados obtidos por ITC, onde a ligação de AT com BSA não foi afetada pelas misturas de AF e SCQ.

Além das interações AN-AN e AN-BSA, em condições gastrointestinais simuladas, os ANs podem interagir com enzimas digestivas alterando sua atividade catalítica (MAKKAR et al., 2008; SINGH e KRIKORIAN, 1982). As titulações controle de AN em pepsina usada para simulação de digestão gástrica também foram estudadas por ITC no presente trabalho (FIGURA A8 do APÊNDICE I). Apesar da massa molar da pepsina e do teor de proteína na amostra comercial utilizada não ser conhecido, pode-se observar claramente que o AT interage com a enzima. Além disso, o AF também pode se ligar à pepsina, porém a interação libera menor quantidade de calor. A SCQ apresentou mudanças de calor próximas de zero, provavelmente devido à pequena afinidade de ligação.

Como proposto por Martínez e Moyano (2003), o efeito dos taninos sobre as proteínas da dieta no trato digestivo depende de um grande número de fatores, incluindo a composição química desses polifenóis, as interações com outros nutrientes e a fisiologia digestiva do animal. Dessa forma, as interações envolvendo misturas de ANs são complexas e dependem da concentração e da estrutura da proteína e do AN. Essas misturas podem afetar o processamento de alimentos, principalmente aqueles de origem vegetal. Assim, o equilíbrio entre as proporções de cada componente pode ditar sua influência na biodisponibilidade de proteínas e ANs.

4.5.4. Interações Envolvidas em Misturas de Antinutrientes e Proteínas e o seu Efeito na Digestibilidade Proteica *In Vitro*: Considerações finais

O AF e o AT diminuíram a conformação α-hélice da BSA e a sua turbidez. A SCQ não influenciou a estrutura secundária da proteína e não diminuiu a solubilidade proteica em pequenas concentrações. O AF provavelmente aumenta as forças hidrofóbicas entre o tanino e a proteína, como foi observado por um aumento na constante de afinidade. A SCQ alterou o perfil termodinâmico das interações tanino-proteína devido a fenômenos complexos. Houve redução na hidrólise proteica com o aumento das concentrações de AN e o AT foi a principal causa da diminuição da DPIV. A concentração de cada AN em misturas ternárias resultou em diferentes valores de DVPI devido a mudanças na estrutura da proteína, natureza das ligações e interações com enzimas digestivas.

Os resultados obtidos nesta seção mostram que as interações envolvendo uma mistura de antinutrientes e proteínas são complexas. O efeito de cada antinutriente nas propriedades da proteína depende da concentração e da estrutura da proteína e do antinutriente. O equilíbrio entre as proporções de cada componente pode determinar sua influência na biodisponibilidade de proteínas e antinutrientes. Além disso, essas interações podem afetar o processamento de alimentos principalmente os de origem vegetal.

4.6. INFLUÊNCIA DOS ANTINUTRIENTES NA GELEIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS VEGETAIS

A capacidade de uma proteína de se desdobrar e agregar ou geleificar quando aquecida contribui para a viscosidade e estruturação de muitos alimentos (EUSTON, 2004). As propriedades dos géis são resultantes, principalmente, das interações moleculares complexas entre o solvente e a rede molecular. A água, como solvente, influencia a natureza e a magnitude das forças intramoleculares e intermoleculares responsáveis por manterem a integridade da rede polimérica (DAMODARAN e PARAF, 1997). Dessa forma, os ANs podem influenciar a geleificação, pela redução na solubilidade da proteína e, consequentemente, dificultando a interação desta com o solvente, ou facilitando a formação da rede devido a estabilização das estruturas tridimensionais.

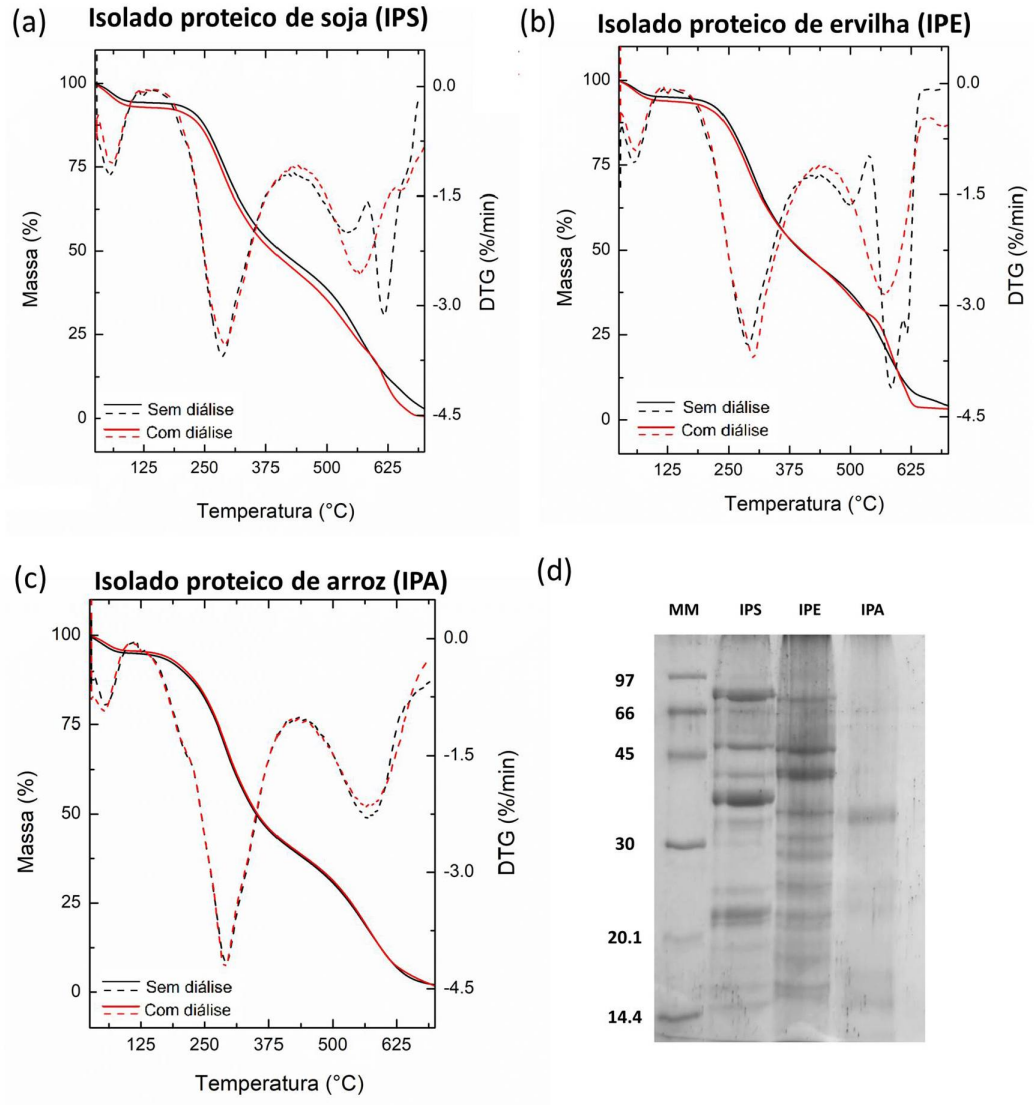
Os ANs podem estar presentes nos isolados proteicos, uma vez que os estes interagem com as proteínas presentes nos isolados e devido ao fato de que alguns processos de isolamento não focam na eliminação destas substâncias. Dessa forma, o objetivo dessa seção foi avaliar o efeito dos ANs ácido fítico (AF), ácido tânico (AT) e saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) na capacidade geleificante de proteínas vegetais por meio de reologia oscilatória. Foram utilizados isolados proteicos comerciais de soja (IPS), ervilha (IPE) e arroz (IPA) caracterizados quanto a sua composição físico química e solubilidade na presença de ANs. Os estudos de geleificação foram realizados nos valores de pH 3,0 e 7,0 devido a estes serem, de maneira geral, facilmente encontrados em alimentos e estarem abaixo e acima do ponto isoelétrico dos isolados proteicos, respectivamente.

4.6.1. Caracterização dos isolados proteicos

A diálise dos isolados proteicos comerciais foi realizada para eliminar as impurezas de baixa massa molar, como os minerais, pois estes poderiam interferir na estabilidade, solubilidade e geleificação das proteínas. As amostras com as quais realizou-se o processo de diálise ou não, foram analisadas por

termogravimetria para estimar se houve diferenças em sua composição devido a esse tratamento (Figura 31).

FIGURA 31 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE TERMOGRAVIMETRIA E ELETROFORESE DOS ISOLADOS PROTEICOS DE SOJA, ERVILHA E DE ARROZ



Nota: (a) TGA do isolado proteico de soja (IPS); (b) TGA do isolado proteico de ervilha (IPE); (c) TGA do isolado proteico de arroz (IPA); (d) eletroforese em gel de Tris-Glicina onde MM contém os padrões de massa molar, com as respectivas massas em kDa. A quantidade de amostra aplicada no gel foi de 10 µL (2 mg/mL do isolado proteico dialisado). Nos gráficos a, b e c, linhas sólidas correspondem à curva de TG e linhas pontilhadas à derivada da curva de TG chamada DTG.
FONTE: O autor (2019).

A FIGURA 31a-c mostra a curva termogravimétrica (perda de massa) e sua derivada (DTG; perda de massa em função do tempo de análise) para o IPS

(FIGURA 31a), IPE (FIGURA 31b) e IPA (FIGURA 31c). O teor de umidade (primeiro pico), a perda de massa no segundo pico e o teor de cinzas dos três isolados de proteína foram similares e independentes do processo de diálise. A temperatura do segundo pico foi em torno de 290 °C, o que é típico da decomposição de proteínas (NAYAK et al., 2011). Portanto, é razoável obter uma composição semelhante para ambos os isolados proteicos, uma vez que no processo de diálise, componentes de alta massa molar, como proteínas, não são eliminados. A decomposição de proteínas ocorre provavelmente devido à degradação de ligações de hidrogênio não covalentes, ligações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Subsequentemente, as ligações covalentes [C–N, C(O)-NH e C(O)–NH_2] que unem o NH_2 dos resíduos de aminoácidos são quebradas. Consequentemente, à medida que a temperatura aumenta, ocorre a liberação de gases, como CO_2, CO e NH_3 (SCHMIDT et al., 2005; LIU et al., 2015).

O IPS e o IPE não dialisado apresentaram dois picos em temperaturas acima de 450 °C, porém apenas um pico apareceu na curva DTG acima de 450 °C para as amostras dialisadas. Altas temperaturas de degradação (>500 °C) de isolados proteicos estão relacionadas às reações secundárias de proteínas parcialmente decompostas, como a oxidação (NAYAK et al., 2011) ou a degradação de outros compostos presentes no isolado proteico. Assim, o quarto pico observado nas amostras não dialisadas deve-se provavelmente à degradação de substâncias de baixa massa molar (<12 kDa) que são eliminadas na diálise. No entanto, a natureza dessas substâncias não foi estudada neste trabalho.

A análise do gel de eletroforese dos três isolados proteicos (FIGURA 31d) evidenciou vários polipeptídeos nas amostras de IPS e IPE. No IPS, as subunidades α (67–72 kDa), α' (63 kDa) e β (47 kDa) da conglicinina, bem como as subunidades ácidas (29–33 kDa) e básicas (~22 kDa) de glicinina foram identificados (MEINLSCHMIDT et al., 2016). O IPE apresentou bandas com massas molares de aproximadamente 73, 55 e 40 kDa de intensidade alta. As bandas em torno de 70 kDa correspondem à convicilina, e as subunidades em torno de 50 kDa são atribuídas à vicilina, descrita como uma proteína oligomérica que consiste de três subunidades (α, β e γ), com massas molares entre 43 kDa e 53 kDa. As subunidades de legumina (uma proteína hexamérica) foram vistas em

~37 kDa (ácida) e ~25 kDa (básica) (FIGURA 31d) (LADJAL-ETTOUMI et al., 2016). O IPA apresentou bandas fracas no gel, provavelmente devido à presença de glicoproteínas as quais são menos coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R-250 na análise de eletroforese (OSSET et al., 1989). Os polipeptídeos observados no gel provavelmente correspondem à glutenina, que tem duas subunidades de 22-23 kDa e 37-39 kDa (bandas de maior intensidade) e prolamina de 13 kDa (banda de menor intensidade) (WANG et al., 2016).

A TABELA 7 mostra os dados físico-químicos dos isolados proteicos comerciais dialisados. O teor de proteína foi de cerca de 90,0% para o IPS e o IPE, e 82,7% para o IPA, que, por sua vez, apresentou um teor de carboidratos relativamente maior, possivelmente devido à presença de amido. O alto teor de carboidratos foi confirmado na análise termogravimétrica, na qual as amostras dialisadas revelaram o mesmo perfil térmico da amostra não dialisada. Isso ocorre porque o amido possui uma massa molecular elevada e, portanto, não pode ser eliminado durante o processo de diálise.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DOS ISOLADOS PROTEICOS DE SOJA, ERVILHA E ARROZ

	Isolado proteico de soja (IPS)	**Isolado proteico de ervilha (IPE)**	**Isolado proteico de arroz (IPA)**
Umidade (%)[1]	3,04±0,30	2,28±0,14	1,43±0,16
Proteína (%)[2]	89,99±0,30	88,00±0,30	82,67±0,01
Cinzas (%)[3]	2,96±0,08	3,97±0,25	2,76±1,03
Carboidratos (%)[4]	2,19±0,26	2,92±0,11	9,74±0,04

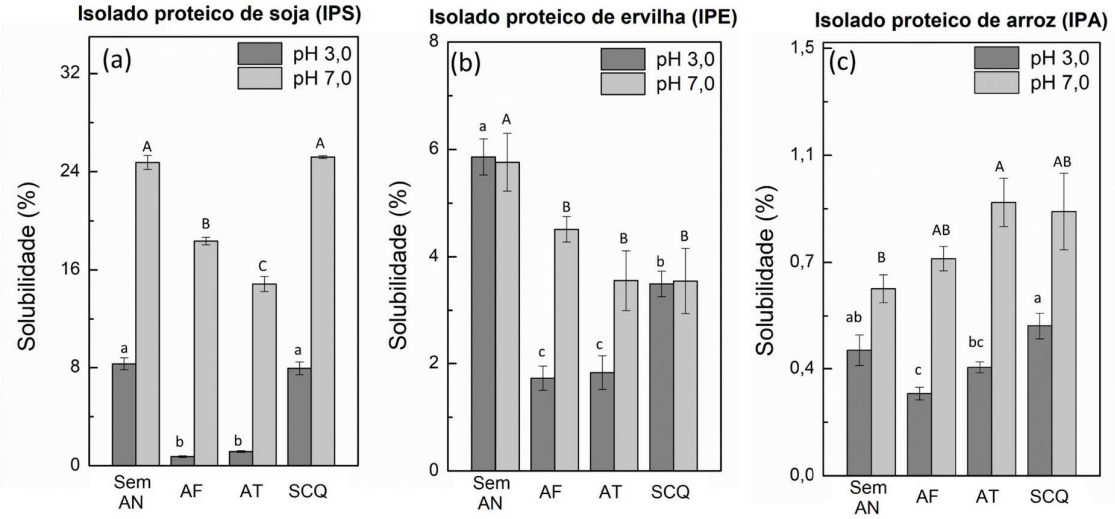
[1] Termogravimetria (30 °C a 150 °C); [2] AOAC (2005); [3] massa residual obtida após a análise termogravimétrica; [4] Dubois *et al.*, (1956). Os resultados estão expressos em base úmida. Todos os resultados correspondem as amostras de isolados proteicos dialisados em membrana de 12-14 kDa.
FONTE: O autor (2019).

4.6.2. Solubilidade dos isolados proteicos na presença de antinutrientes

Todos os três isolados proteicos testados apresentaram baixa solubilidade na presença de ANs em pH 3,0 e 7,0 (FIGURA 32). A solubilidade máxima da proteína foi de 25%, o que foi observado para o IPS sem AN, assim como para o IPS com SCQ, em pH 7,0. A ordem de aumento de solubilidade foi IPA<IPE<IPS.

O AT e o AF diminuíram a solubilidade da proteína em 91% e 86%, respectivamente, em pH 3,0. Proteínas isoladas de ervilha, arroz e soja apresentam pontos isoelétricos (pI) de 4,0 (LAGUNA et al., 2017), 4,5 (CAO et al., 2009; ESMAEILI et al., 2016) e 5,5 (RHAM; JOST, 1979), respectivamente. Assim, em pH 3,0, as proteínas possuem uma carga global positiva, o que favorece sua interação com o AF e o AT, contribuindo para a formação de complexos insolúveis. Em ambos os valores de pH estudados, a SCQ não alterou a solubilidade do IPA, no entanto, a solubilidade da proteína de ervilha diminuiu 40%. Em pH 7,0, a solubilidade do IPS e do IPA aumentou 66% e 33%, respectivamente, pois as proteínas possuíam carga global negativa, resultando em repulsão eletrostática entre as moléculas, o que promove maior solubilidade. Para o IPE, a solubilidade não foi alterada pelo aumento do pH, mas o AF e o AT forneceram diferentes solubilidades em cada pH.

FIGURA 32 – SOLUBILIDADE DOS ISOLADOS PROTEICOS COMERCIAIS NA PRESENÇA DE ANTINUTRIENTES



Nota: dispersões de proteína a 1% em pH de 3,0 e 7,0 (tampão fosfato/ácido cítrico 25 mmol/L). A concentração dos antinutrientes utilizada foi de 0,1%. A mesma letra em cada gráfico corresponde a comparação entre as amostras no pH 3,0 (letra minúscula) e no pH 7,0 (letra maiúscula) realizada pelo teste de Tukey (95% de significância).
FONTE: O autor (2019).

A natureza aniônica das proteínas em pH 7,0, dificulta sua interação com o AF. Apesar disso, a solubilidade dos isolados proteicos ainda foi menor (26% e 22% para o IPS e o IPE, respectivamente) ou igual (para IPA) que a amostra

controle (sem AN). Como os isolados proteicos contêm uma mistura de proteínas, como refletido nos dados de eletroforese (FIGURA 31d), é provável que algumas subunidades proteicas permaneçam com cargas positivas, mesmo acima do pI global e, portanto, interagem com o AF. Além disso, se houver cátions divalentes ligados às proteínas que poderiam não ser eliminadas por diálise, poderia ocorrer a formação de complexos ternários com AF. O AT reduziu a solubilidade do IPS e do IPE em pH 7,0 conforme esperado, uma vez que as associações de proteínas com taninos também são favorecidas por interações que não dependem das cargas de proteínas, tais como ligações hidrofóbicas. As alterações na solubilidade proteica indicam interações entre proteínas e ANs.

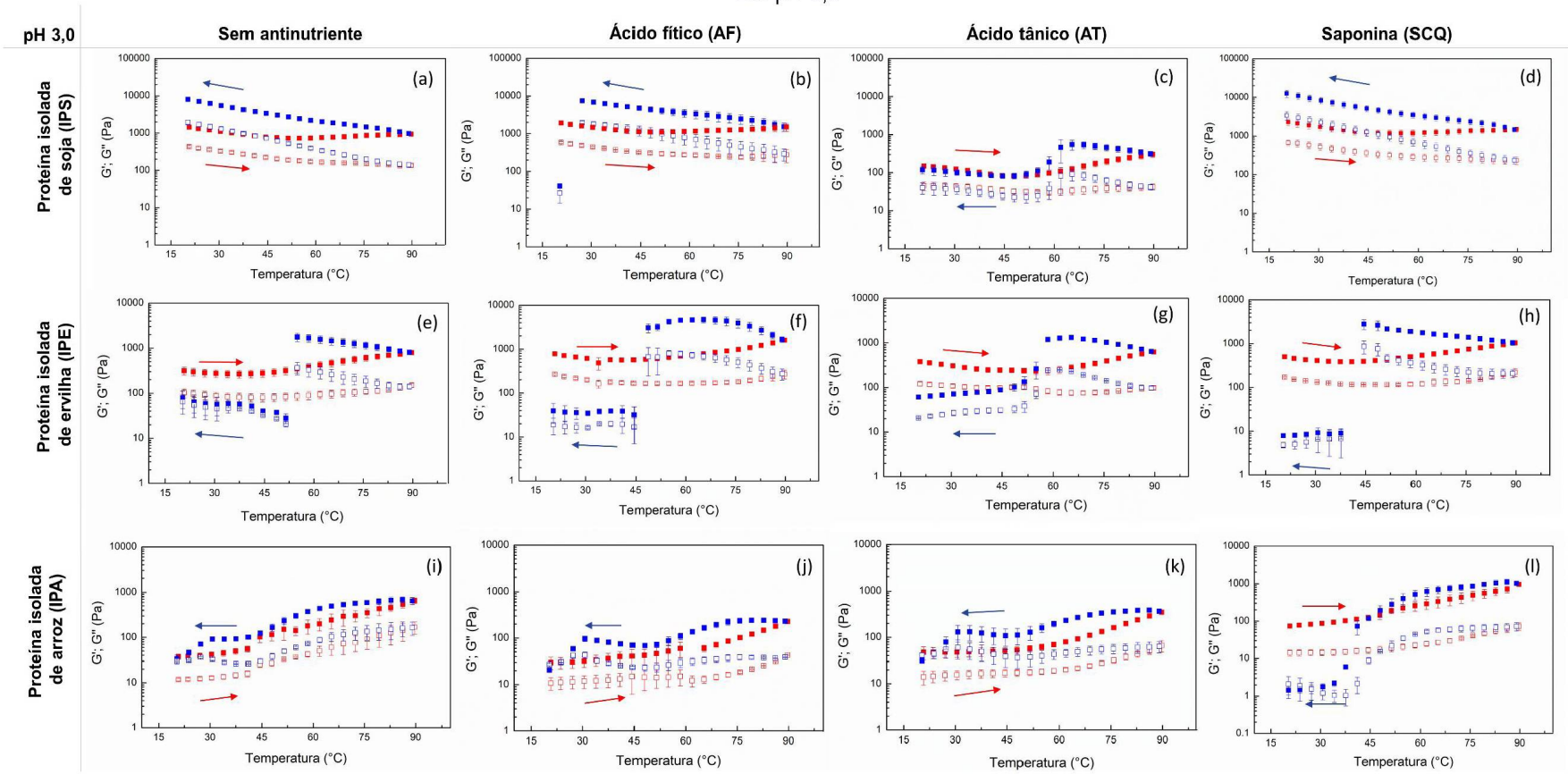
Alterações na solubilidade das proteínas vegetais podem afetar suas aplicações tecnológicas. Consequentemente, a capacidade de geleificação (seção 4.6.3) foi determinada na mesma concentração de proteína que utilizada na análise de solubilidade.

4.6.3. Geleificação de proteínas vegetais avaliada por reologia oscilatória

A reologia oscilatória é uma técnica analítica usada para fornecer informações sobre a capacidade geleificante e características de géis durante aquecimento e o resfriamento por meio da determinação dos dados G' (módulo elástico ou de armazenamento) e G" (módulo viscoso ou de perda).

Nas FIGURAS 33 e 34, os valores G' e G″ são apresentados em função da temperatura para as suspensões de isolado proteico (10% m/m) em pH 3,0 e 7,0, respectivamente. A TABELA 8 apresenta os valores de G' e G″ no início do experimento (20 °C), após aquecimento (90 °C) e após resfriamento da amostra (20 °C). Verificou-se que os isolados proteicos avaliados neste trabalho apresentaram G'>G″ no início do experimento. Este comportamento é atribuído a géis ou soluções proteicas altamente concentradas (GOSAL; ROSS-MURPHY, 2000). A aparência das amostras após os experimentos é exibida no APÊNDICE V (FIGURAS A12 e A13).

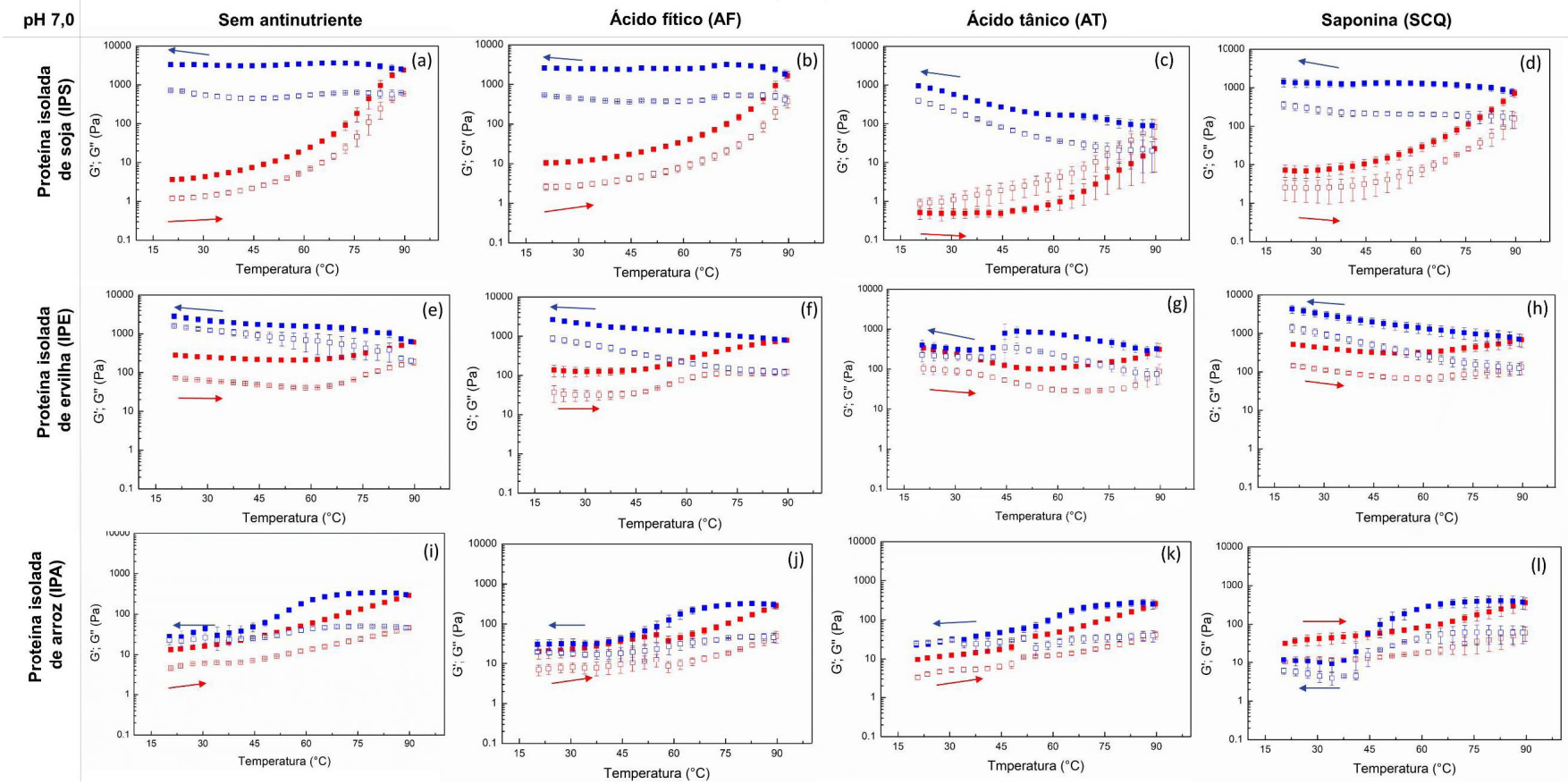
FIGURA 33 – EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE PROTEÍNAS DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 3,0



Nota: (a) IPS; (b) IPS-AF; (c) IPS-AT; (d) IPS-SCQ; (e) IPE; (f) IPE-AF; (g) IPE-AT; (h) IPE-SCQ; (i) IPA; (j) IPA-AF; (k) IPA-AT; (l) IPA-SCQ. A concentração dos isolados proteicos foi de 10% e dos ANs foi de 1%. Símbolos em vermelho e azul correspondem a pontos obtidos durante o aquecimento e resfriamento, respectivamente. Símbolos abertos representam valores de G'' e símbolos fechados valores de G'.

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 34 - EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE PROTEÍNAS DURANTE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO EM pH 7,0



Nota: (a) IPS; (b) IPS-AF; (c) IPS-AT; (d) IPS-SCQ; (e) IPE; (f) IPE-AF; (g) IPE-AT; (h) IPE-SCQ; (i) IPA; (j) IPA-AF; (k) IPA-AT; (l) IPA-SCQ. A concentração dos isolados proteicos foi de 10% e dos ANs foi de 1%. Símbolos em vermelho e azul correspondem a pontos obtidos durante o aquecimento e resfriamento, respectivamente. Símbolos abertos representam valores de G'' e símbolos fechados valores de G'.

Fonte: O autor (2019).

TABELA 8 - EFEITO DOS ANTINUTRIENTES NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE SUSPENSÕES PROTEICAS (10%) NO INÍCIO DO EXPERIMENTO (20 °C), APÓS AQUECIMENTO (90 °C) E APÓS RESFRIAMENTO (20 °C) EM pH 3,0 E 7,0.

Isolado proteico	AN	20 °C (início)		90 °C		20 °C (fim)	
		G'	G''	G'	G''	G'	G''
				pH 3.0			
Soja	Sem AN	1439,5±44,5 ^{b}	431,1±32,4 ^{C}	933,7±19,8^{ab}	136,6±14,4 ^{A}	8023,0±623,7^{b}	1955,0±287,1 ^{B}
	AF	1919,0±185,3 ^{b}	583,8±39,5 ^{B}	1512,0±362,0^{a}	275,8±104,4 ^{A}	40,8±4,8^{c}	26,8±12,4 ^{C}
	AT	148,6±18,7 ^{c}	45,3±11,4 ^{D}	301,4±47,2^{b}	42,6±7,5 ^{A}	118,6±26,4^{c}	40,3±12,1 ^{C}
	SCQ	2296,3±445,3 ^{a}	677,0±104,2 ^{A}	1483,0±204,6^{a}	234,5±51,9 ^{A}	12505,3±2575,0^{a}	3397±824,6 ^{A}
Arroz	Sem AN	37,5±4,8 ^{ab}	11,8±0,7 ^{A}	654,9±95,6 ^{b}	168,3±51,2 ^{A}	33,32±7,3 ^{a}	29,8±1,0 ^{AB}
	AF	29,7±8,8 ^{b}	10,8±3,3 ^{A}	227,2±5,3 ^{c}	42,8±0,1 ^{A}	20,6±0,1 ^{ab}	27,1±1,6 ^{B}
	AT	47,2±14,6 ^{ab}	14,1±4,7 ^{A}	348,5±8,3 ^{c}	66,0±18,5 ^{A}	31,2±2,4 ^{a}	41,1±5,1 ^{A}
	SCQ	73,4±1,0^{a}	14,1±2,5 ^{A}	959,8±51,3 ^{a}	73,1±16,7 ^{A}	1,4±0,4 ^{b}	2,1±1,2 ^{C}
Ervilha	Sem AN	314,7±61,9 ^{c}	102,0±22,6 ^{C}	792,0±68,5 ^{bc}	151,2±15,8 ^{A}	79,11±33,8 ^{a}	64,6±30,3 ^{A}
	AF	785,7±45,2 ^{a}	267,4±13,4 ^{A}	1604,7±165,0 ^{a}	269,9±61,1 ^{A}	39,2±18,7 ^{a}	19,0±7,7 ^{A}
	AT	379,0±35,6 ^{bc}	121,0±12,9 ^{C}	623,6±3,7 ^{c}	98,24±9,3 ^{A}	60,8±2,4 ^{a}	20,6±0,6 ^{A}
	SCQ	499,5±15,8 ^{b}	170,0±7,8 ^{B}	1035,1±108,8 ^{b}	220,2±44,9 ^{A}	7,8±0,2 ^{a}	4,8±0,7 ^{A}
				pH 7,0			
Soja	Sem AN	3,6±0,4 ^{a}	1,2±0,2 ^{A}	2383,5±164,8 ^{a}	587,6±8,3 ^{A}	3331,0±343,6 ^{a}	718,6±31,8 ^{A}
	AF	10,6±1,5 ^{a}	2,6±0,5 ^{A}	1660,5±458,9 ^{ab}	375,2±120,6 ^{AB}	2602,5±118,1 ^{a}	536,6±19,8 ^{AB}
	AT	0,9±0,3 ^{a}	0,5±0,2 ^{A}	83,5±42,7 ^{c}	22,6±16,9 ^{B}	952,6±35,4 ^{b}	396,8±59,6 ^{B}
	SCQ	7,2±2,6 ^{a}	2,6±1,4 ^{A}	719,2±158,6 ^{bc}	158,6±72,2 ^{B}	1413,5±357,8 ^{b}	357,8±80,8 ^{B}
Arroz	Sem AN	13,4±0,1 ^{ab}	4,4±0,1 ^{B}	293,2±17,5 ^{a}	46,2±3,1 ^{A}	28,1±1,6 ^{a}	22,6±5,0 ^{A}
	AF	20,7±7,4 ^{ab}	7,0±2,0 ^{AB}	283,8±49,8 ^{a}	50,1±16,5 ^{A}	31,1±9,3 ^{a}	20,2±2,0 ^{A}
	AT	9,6±0,4 ^{b}	3,3±0,4 ^{B}	255,2±52,2 ^{a}	41,2±9,5 ^{A}	22,9±2,2 ^{a}	25,1±3,1 ^{A}
	SCQ	32,0±1,8 ^{a}	10,4±0,0 ^{A}	360,6±120,4 ^{a}	60,5±24,4 ^{A}	11,8±2,2 ^{a}	6,1±1,1 ^{B}
Ervilha	Sem AN	280,2±8,4 ^{b}	71,8±4,0 ^{BC}	605,2±2,1 ^{a}	188,6±32,4 ^{A}	2840,0±424,3 ^{a}	1596,5±79,9 ^{A}
	AF	137,8±46,0 ^{c}	37,3±16,7 ^{C}	785,8±74,4 ^{a}	122,2±19,3 ^{A}	2628,0±131,5 ^{ab}	870,8±146,9 ^{AB}
	AT	339,3±75,9 ^{b}	104,1±29,2 ^{AB}	315,0±116,0 ^{a}	87,8±44,8 ^{A}	400,2±127,5 ^{b}	225,6±72,3 ^{B}
	SCQ	517,2±45,2 ^{a}	145,0±12,5 ^{A}	687,6±254,5 ^{a}	132,3±48,6 ^{A}	4306,0±1026,7 ^{a}	1413,5±351,4 ^{A}

Médias seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente com um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem a comparações entre os valores de G' e maiúscula entre os valores de G''. Os dados foram comparados somente entre os grupos pertencente a mesma proteína. Dados correspondentes aos apresentados na seção 4.6.

FONTE: O autor (2019).

Em pH 3,0, tanto G' quanto G″ foram maiores no início do experimento quando comparados com os valores obtidos em pH 7,0, para todos os isolados proteicos analisados, pois uma maior quantidade de proteína é dissolvida em pH mais alto que não pode ser incorporado na rede de gel (RENKEMA, GRUPPEN e VAN VLIET, 2002). Além disso, em pH 7,0, há repulsão eletrostática entre as moléculas, o que dificulta sua agregação (CHODANKAR et al., 2009) para amostras sem AN.

Para o IPS sem AN, maiores valores de G' iniciais foram obtidos em pH 3,0 (FIGURA 33a) do que em pH 7,0 (FIGURA 34a) (1439,5±44,5 vs 3,6±0,4 Pa). Apesar disso, no final do aquecimento, a tendência oposta foi observada, de modo que valores de G' foram maiores para amostras em pH 7,0 quando comparado com as amostras em pH 3,0 (2383,5±164,8 vs. 933,7±19,8 Pa). Este fenômeno é explicado pelas diferenças de solubilidade e temperatura de desnaturação (Td) em cada pH. Em pH 3,0, a desnaturação proteica ocorre em temperaturas mais baixas quando comparadas com pH 7,0 para a β-conglicinina (Td = 61 vs. 68 °C) e as frações de glicinina (Td = 55 e 63 vs. 88 °C) (RENKEMA et al., 2002). Estes aspectos conferem características diferentes aos géis formados em cada pH; um comportamento também observado visualmente (FIGURAS A12a e A13a do APÊNDICE V).

Durante o resfriamento, G' aumentou para o IPS em ambos os valores de pH estudados, o que se justifica, considerando a maior interação entre as proteínas e a água na menor temperatura e por causa do rearranjo da estrutura da rede. Além disso, a formação de ligações mais fortes entre cadeias polipeptídicas pode ocorrer devido à diminuição da mobilidade das moléculas durante o resfriamento (RAMOS et al., 2012).

Para o IPE, G' e G″ aumentaram durante o aquecimento em ambos os valores de pH, enquanto, durante o resfriamento em pH 3,0, este aumento cessou em aproximadamente 50 °C, seguido por uma queda acentuada em ambos os módulos (FIGURAS 33e e 34e). É provável que o resfriamento abaixo de 50 °C desencadeie uma quebra na estrutura do gel formada durante o aquecimento e forme precipitados insolúveis. Na ausência de sal, a proteína de ervilha exibe uma capacidade de geleificação diminuída devido à instabilidade da suspensão e à agregação de proteínas (SUN; ARNTFIELD, 2011). No

presente trabalho, o IPE foi dialisado, o que pode ter resultado na diminuição da estabilidade do gel durante o resfriamento em pH 3,0 do que em pH 7,0.

Em pH 7,0, a força do gel aumenta no final da fase de resfriamento. Esse aumento é devido à formação de ligações de hidrogênio, enquanto as interações eletrostáticas e hidrofóbicas do IPE são responsáveis pelo desenvolvimento da estrutura durante o aquecimento (SUN; ARNTFIELD, 2012). As diferenças na geleificação do IPE em pH 3,0 e 7,0 são um reflexo das diferentes Td sob estas condições. Meios ácidos e básicos causam desnaturação parcial e completa das proteínas de ervilha, respectivamente. Sun e Arntfield (2011) encontraram rigidez máxima de gel de IPE (14,5% m/v a 0,3 mol/L de NaCl) em pH 4,0, e uma rigidez de gel reduzida em pH mais elevado ou mais baixo. Valores de pH maiores que 4,0 levaram a maiores valores de Td e entalpia de desnaturação, e a proteína de ervilha pareceu estar completamente desnaturada em pH 3,0 (SUN; ARNTFIELD, 2011). Deste modo, a maior estabilidade do gel durante o resfriamento em pH 7,0 vs. 3,0 pode ser devida a uma desnaturação parcial da proteína enquanto em pH 3,0 ocorre a desnaturação completa resultando na agregação da proteína.

Em comparação com o IPS e o IPE, os valores de G' e G'' do IPA sem AN foram menores depois do aquecimento e resfriamento (FIGURAS 33i e 34i), o que resulta da baixa extensão das interações entre as cadeias de proteína do IPA (FELIX et al., 2016). Os resultados obtidos para o IPA durante aquecimento e resfriamento foram semelhantes em ambos os valores de pH. Tanto G' quanto G″ aumentaram durante o aquecimento e diminuíram durante o resfriamento. Este comportamento é devido a um rearranjo das cadeias polipeptídicas e do aumento da afinidade proteína-proteína em temperaturas baixas, formando provavelmente precipitados proteicos de uma forma desordenada. Além disso, a agregação da globulina de arroz induzida pelo calor é governada por ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (ELLEPOLA et al., 2006) que tem estabilidade reduzida durante o resfriamento. Apesar do mesmo comportamento durante o aquecimento e resfriamento em pH 3,0 e 7,0, o valor de G' foi maior no pH mais baixo (37,5±4,8 vs. 13,4±0,1 Pa), mostrando a formação de um gel mais forte. Em pH neutro, a globulina de arroz mostra uma predominância de estruturas α-hélice, enquanto que, em pH 3.0, predominam β-folha antiparalelas

e estruturas desordenadas (ELLEPOLA et al., 2006). Assim, a organização proteica em pH 3,0 é mais propensa a formação da rede de gel.

Os ANs testados (AF, AT e SCQ) influenciaram o comportamento reológico de todos os três isolados proteicos (IPS, IPE e IPA) durante o aquecimento e o resfriamento. O AF alterou o comportamento reológico do IPS, IPE e IPA em pH 3,0. Os valores de G' das amostras de IPS sem AN e na presença de AF não diferiram significativamente durante o aquecimento (TABELA 8). Porém, quando o resfriamento atingiu 30 °C, houve uma queda abrupta nos valores de G' e G", provavelmente devido à precipitação de proteína induzida pela AF (FIGURA 33b).

As amostras de IPE contendo AF apresentaram valores maiores de G' quando comparadas com a amostra sem AN durante o aquecimento (104,7±165,0 vs. 792,0±68,5 Pa) (FIGURA 33f). O aumento da viscoelasticidade durante o aquecimento pode ter sido causado pelo aumento das interações proteína-AF após a desnaturação proteica. Após o resfriamento (até 20 °C), não houve diferença significativa nos valores finais de G' e G" quando comparados com a amostra sem AN (FIGURA 33a). A mistura IPA-AF apresentou menor G' após aquecimento a 90 °C quando comparada com a amostra sem AN (227,2±5,3 vs. 654,9±95,6 Pa). No entanto, os perfis durante o resfriamento foram comparáveis, e os valores de G' e G" finais não foram significativamente diferentes, independentemente da presença ou ausência de AF (FIGURAS 33i e 33j).

Em pH 7,0, o AF não alterou significativamente os valores de G' e G" do IPS e IPA durante o aquecimento e o resfriamento (FIGURAS 33b e 34j, respectivamente, e TABELA 8). Quando IPE foi misturado com AF, houve uma diminuição na viscoelasticidade inicial (FIGURA 34f) (G' 137,8±46,0 vs. 280,2±8,4 Pa), mas os resultados foram comparáveis durante o aquecimento e resfriamento.

O AT modificou o comportamento reológico do IPS ao longo do experimento, em ambos os valores de pH (FIGURAS 33c e 34c), o que provavelmente está associado à diminuição da solubilidade e interação do AT com cadeias hidrofóbicas da proteína, responsáveis pela estruturação do gel após a desnaturação da proteína. Além disso, compostos fenólicos podem

modificar a estrutura terciária da proteína (CAO e XIONG, 2017; OJHA, MISHRA, HASSAN, e CHAUDHURY, 2012), alterando sua organização espacial e, consequentemente, a configuração da rede de gel. Von Staszewski et al. (2011) propuseram que a adição de polifenóis em níveis elevados (até 0,5%) revestiria toda a proteína, dificultando as interações proteína-proteína e, consequentemente, a formação de gel.

O AT não teve influência nas propriedades viscoelásticas do IPE em pH 3,0, no entanto em pH 7,0, na presença de AT, o perfil durante o resfriamento foi diferente, e G' e G″ foram menores quando comparados com o IPE sem AN (FIGURAS 33g e 34g). Existe um potencial para interações hidrofóbicas de AT com IPE em pH 7,0, o que pode ter facilitado a precipitação de proteínas durante o resfriamento. Para o IPA contendo AT, não houve grandes diferenças no perfil das curvas nos dois valores de pH estudados (FIGURAS 33k e 34k), e isto foi consistente com os resultados de solubilidade onde não foram encontradas diferença significativas entre a amostra com e sem AT, em ambos pH analisados (FIGURA 32c). A proteína do arroz é predominantemente hidrofóbica (WANG et al., 2018) e, assim, sua interação com o AT dependerá de forças hidrofóbicas, sendo menos influenciada pelo pH que outros mecanismos de interação.

Tanto G' quanto G″ (FIGURA 33d) foram maiores durante aquecimento e resfriamento de IPS em pH 3,0 na presença do que ausência de SCQ, como pode ser visto na TABELA 8. De acordo com Potter et al. (1993), as saponinas podem formar ligações muito fortes com proteínas de soja. Além disso, abaixo do pI da proteína, que é de cerca de 5,5 (RHAM; JOST, 1979), a sua afinidade com as saponinas pode ser aumentada pela dominância de cargas positivas em sua superfície (PIOTROWSKI et al., 2012). Assim, o aumento da viscoelasticidade está provavelmente relacionado à formação de ligações cruzadas entre saponinas e proteínas de soja. Em pH 7,0, os valores de G' finais (a 20 °C) foram menores quando comparados com a amostra sem AN (1413,5±357,8 vs. 3331,0±343,6 Pa) (FIGURAS 33d e 34d). As saponinas podem interagir por ligações hidrofóbicas em pH>pI (FARIA et al., 2017a), dificultando a geleificação, uma vez que os grupos hidrofóbicos são os principais responsáveis pela formação desses géis.

Quando combinado com SCQ, o IPE apresentou os valores de G' e G″ maiores no início do experimento (20 °C) quando comparados com o IPE sem AN, em ambos os pH avaliados (FIGURAS 33h e 34h). No entanto, os valores finais após aquecimento e resfriamento (20 °C) não mostraram diferença significativa entre essas duas amostras ($p<0,05$). Para o IPA, os valores de G' e G″ durante o aquecimento em pH 3,0 e 7,0 (FIGURAS 33l e 34l) foram semelhantes, independentemente da presença de SCQ. Durante o resfriamento, a amostra em pH 3,0 apresentou valores menores de G' e G″ e comportamento de líquido (G″>G') (GOSAL; ROSS-MURPHY, 2000) que não foram observados em pH 7,0. Isso sugere que houve um aumento nas interações proteína-proteína e proteína-SCQ facilitado pelo aumento da flexibilidade proteica, promovida pela desnaturação (IKEDO et al., 1996), formando complexos insolúveis.

A partir desses resultados, foi possível observar que as forças moleculares envolvidas nas interações entre proteínas e ANs podem ditar sua influência na geleificação. Um aumento na temperatura favorece a formação de interações hidrofóbicas enquanto enfraquece as interações dipolares e uma diminuição na temperatura leva ao efeito oposto em proteínas, como demonstrado por Sun and Arntfield (2012) para a geleificação de proteína de ervilha. Assim, interações proteína-AN que envolvem ligações de hidrogênio ou forças eletrostáticas, como AF, afetam a geleificação, especialmente, durante o resfriamento. Por outro lado, os ANs que se associam às proteínas por meio de ligações hidrofóbicas e hidrofílicas, como saponinas e taninos, podem influenciar a geleificação durante o aquecimento e o resfriamento.

Além disso, o efeito do pH na geleificação de proteínas e na solubilidade proteica na presença de ANs é governado pelas forças moleculares envolvidas na interação proteína-AN. O AT e a SCQ podem interagir com proteínas por forças hidrofóbicas e, assim, complexos proteína-AN podem ser formados em uma ampla faixa de pH. A complexação do AF com a proteína depende de forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio e, dessa forma, a ligação ocorre apenas em pH<pI da proteína ou um complexo ternário pode ser formado na presença de cátions divalentes em pH>pI. Apesar disso, o processo de geleificação é complexo e é diferente para cada proteína. A influência dos ANs deve ser avaliada para cada tipo de sistema, uma vez que a composição dos isolados

proteicos e a estrutura dos ANs podem oferecer diversas possibilidades de interação.

4.6.4. Influência dos antinutrientes na geleificação de proteínas vegetais: Considerações finais

Os isolados proteicos apresentaram capacidade de geleificação, influenciada pelo pH e pela presença de ANs. A diminuição na solubilidade e interferência com ligações hidrofóbicas e hidrofílicas da proteína pelos ANs é, provavelmente, o principal fator responsável pelas mudanças na formação do gel. O AN que mais afetou a solubilidade e as características reológicas das proteínas foi o AT, o que pode ter ocorrido devido a sua interação ser governada por ligações hidrofóbicas e hidrofílicas. O efeito dos ANs na geleificação foi mais pronunciado em pH 3,0 do que 7,0, o que é devido às interações dos ANs com as proteínas serem favorecidas em pH ácido.

Essa seção do trabalho mostrou que o processo de geleificação é complexo e é diferente para cada proteína. A influência dos antinutrientes deve ser avaliada para cada tipo de sistema, uma vez que a composição dos isolados proteicos e a estrutura dos antinutrientes podem oferecer diversas possibilidades de interação. Os dados apresentados nessa seção podem contribuir para o entendimento do comportamento de algumas proteínas vegetais e, consequentemente, para o melhor aproveitamento desses alimentos.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho visou estudar o efeito da interação entre proteínas e ANs na digestibilidade proteica *in vitro* (DPIV) e geleificação de proteínas em diferentes condições. Observou-se que os ANs ácido fítico (AF), ácido tânico (AT) e saponina da casca de Quillaja (SCQ) interagem com proteínas e afetam suas propriedades como solubilidade, estrutura secundária, geleificação e digestibilidade. Os resultados mostram que o efeito de cada AN depende das condições do meio como a temperatura, pH, razão molar de AN/proteína, presença de cátions divalentes (M^{2+}) e força iônica. Além disso, o efeito de cada AN nas propriedades das proteínas depende das forças moleculares envolvidas na interação.

Os principais resultados obtidos neste trabalho são:

- ✓ Altos valores de força iônica aumentam a afinidade entre AT e BSA, diminuindo a digestibilidade proteica. O efeito oposto é observado para o AF devido à formação dos complexos BSA-AF ocorrerem por forças eletrostáticas;
- ✓ A desnaturação térmica da BSA aumenta a sua interação com o AF e diminuiu a sua interação com o AT. Para ambos os ANs, o tratamento térmico aumenta a DPIV provavelmente devido à melhor acessibilidade das enzimas digestivas;
- ✓ A formação dos complexos M^{2+}-AF-BSA ocorrem devido às forças eletrostáticas, as quais promovem a precipitação do complexo não causando grande impacto na DPIV;
- ✓ Os cátions divalentes aumentam a afinidade e influenciam os valores de entalpia e entropia da ligação entre BSA e AT devido a alterações na natureza das ligações. O efeito de cada M^{2+} foi diferente provavelmente devido à interação do sal em regiões distintas da proteína e mudanças em sua estrutura. A DPIV das amostras contendo $MgCl_2$ e $CaCl_2$ e AT foram menores quando comparadas as amostras AT-BSA. Amostras contendo $MnCl_2$ apresentaram maior DPIV que amostras AT-BSA,

porém os complexos obtidos após hidrólise não entraram no gel de eletroforese por serem maiores e mais estáveis;

- ✓ O fator que mais influencia a turbidez de sistemas contendo AT ou AF, M^{2+} e BSA é a interação binária de AN-M^{2+};
- ✓ A interação BSA e SCQ ocorre em razões mássicas de SCQ/BSA baixas resultando em um baixo calor de interação devido, provavelmente, a não especificidade das ligações e aos diferentes tipos de saponina presentes na casca de *Quillaja* (fonte da saponina avaliada). As interações foram favorecidas em pH 3,0 e na maior temperatura avaliada (75 °C).
- ✓ A SCQ aumentou a força de géis de BSA sem afetar a DPIV e a conformação proteica em baixas razões mássicas SCQ/BSA;
- ✓ O AF e o AT diminuem a porcentagem de α-hélice da BSA e a sua turbidez. A SCQ não influencia a estrutura secundária da proteína e não diminuiu a solubilidade proteica em pequenas concentrações;
- ✓ Em misturas AF-AT-BSA, o AF provavelmente aumenta as forças hidrofóbicas entre o AT e BSA observado por um aumento na constante de afinidade de ligação. A SCQ altera o perfil termodinâmico de interação AT-BSA devido a fenômenos complexos, como a formação de complexos binários e ternários e interações SCQ-AT;
- ✓ A DPIV diminui com o aumento da concentração de AN, sendo que o AT é o AN que causa maior diminuição da digestibilidade proteica (inibição de até 100% da IVPD);
- ✓ A concentração de cada AN em misturas ternárias resultou em diferentes valores de hidrólise proteica devido a mudanças na estrutura da proteína, na natureza da ligação e na interação com enzimas digestivas;
- ✓ A geleificação dos isolados proteicos de soja, ervilha e arroz foram afetadas pelo pH e pela presença de ANs. Isso ocorre devido às mudanças na solubilidade dessas proteínas e interferência destes nas ligações responsáveis pela formação do gel. O AN que mais afetou a solubilidade e as características reológicas das proteínas foi o AT. O

efeito dos ANs na geleificação foi mais pronunciado em pH 3,0, onde as interações dos ANs com as proteínas são mais favorecidas.

Dessa forma, é possível observar que os ANs afetam as aplicações tecnológicas e as propriedades nutricionais das proteínas e minerais. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para o conhecimento das condições em que ocorre as interações dos antinutrientes com proteínas, e correlacionar estes com o seu efeito antinutricional e alterações nas propriedades funcionais das proteínas durante o processamento de alimentos.

REFERÊNCIAS

ABUGOCH, L. E.; ROMERO, N.; TAPIA, C.; SILVA, J., & RIVERA, M. Study of Some Physicochemical and Functional Properties of Quinoa (Chenopodium Quinoa Willd) Protein Isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4745–4750, 2008.

ADEYEMO, S. M.; ONILUDE, A. A.; OLUGBOGI, D. O. Reduction of Anti-nutritional Factors of Sorghum by Lactic Acid Bacteria Isolated from A bacha - an African Fermented Staple. **Frontiers in Science**, v. 6, n. 1, p. 25–30, 2016.

AHMAD, M.; HELMS, V.; LENGAUER, T.; KALININA, O. V. Enthalpy-entropy compensation upon molecular conformational changes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 4, p. 1410–1418, 2015.

AKANDE, K. E.; DOMA, U. D.; AGU, H. O.; ADAMU, H. M. Major antinutrients found in plant protein sources: Their effect on nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 827–832, 2010.

AKPAPUNAM, M. A.; ACHINEWHU, S. C. Effects of cooking, germination and fermentation on the chemical composition of Nigerian Cowpea (Vigna unguiculata). **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 353–358, 1985.

ALI, F.; IPPERSIEL, D.; LAMARCHE, F.; MONDOR, M. Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 162–168, 2010. Elsevier B.V.

AOAC. **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international.** 2008.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5912–5923, 1984.

ARNTFIELD, S. D. Effects of divalent cations, phytic acid, and phenolic compounds on the gelation of ovalbumin and canola proteins. **Macromolecular Interactions in Food Technology**, v. 650, p. 82–92, 1996.

BANDYOPADHYAY, P.; GHOSH, A. K.; GHOSH, C. Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. **Food & Function**, v. 3, p. 592–605, 2012.

BANKEFORS, J.; NORD, L. I.; KENNE, L. Structural classification of acyl-substituted Quillaja saponins by electrospray ionisation ion trap multiple-stage mass spectrometry in combination with multivariate analysis. , p. 3851–3860, 2008.

BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Nutrient composition, protein quality and

antinutritional factors of some varieties of dry beans (Phaseolus vulgaris) grown in Burundi. **Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 159–167, 1993.

BARKY, A. R. EL; HUSSEIN, S. A.; ALM-ELDEEN, A. A.; HAFEZ, Y. A.; MOHAMED, T. M. Anti-diabetic activity of Holothuria thomasi saponin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1472–1487, 2016. Elsevier Masson SAS.

BARUAH, K.; SAHU, N. P.; PAL, A K.; DEBNATH, D. Dietary Phytase: An ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3, p. 15–19, 2004.

BIHUNIAK, J. D.; INSOGNA, K. L. The effects of dietary protein and amino acids on skeletal metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 410, p. 78–86, 2015.

BORZOVA, V. A; MARKOSSIAN, K. A; CHEBOTAREVA, N. A; et al. Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153495, 2016.

BÖTTCHER, S.; SCAMPICCHIO, M.; DRUSCH, S. Mixtures of saponins and beta-lactoglobulin differ from classical protein/surfactant-systems at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 765–773, 2016. Elsevier B.V.

BOURVELLEC, C. LE; RENARD, C. M. G. C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 213–248, 2012.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 25, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o "regulamento técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e limites máximos para a categoria de alimentos: produtos protéicos - subcategoria: bebidas não alcoólicas a base de soja". **Diário Oficial da União**. Brasília, D.F., 16 de fevereiro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos". **Diário Oficial da União**. Brasília, D.F., 17 de janeiro de 2007.

BRESSANI, R.; HERNANDEZ, E.; BRAHAM, J. E. Relationship between content and intake of bean polyphenolics and protein digestibility in humans. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 38, n. 1, p. 5–21, 1988.

BRETTI, C.; CIGALA, R. M.; LANDO, G.; MILEA, D.; SAMMARTANO, S. Sequestering ability of phytate toward biologically and environmentally relevant

trivalent metal cations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 33, p. 8075–8082, 2012.

BUTTS, C. A; MONRO, J. A; MOUGHAN, P. J. In vitro determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S282–S287, 2012.

BYE, J. W.; COWIESON, N. P.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H.; FALCONER, R. J. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 290–295, 2013.

CALA, O.; DUFOURC, E. J.; FOUQUET, E.; et al. The colloidal state of tannins impacts the nature of their interaction with proteins: The case of salivary proline-rich protein/procyanidins binding. **Langmuir**, v. 28, n. 50, p. 17410–17418, 2012.

CALDWELL, R. A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 43–46, 1992.

CALLIES, O.; HERNÁNDEZ DARANAS, A. Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions. **Nat. Prod. Rep.**, v. 33, n. 7, p. 881–904, 2016.

CAO, X.; WEN, H.; LI, C.; GU, Z. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 184–189, 2009. Elsevier Ltd.

CAO, Y.; XIONG, Y. L. Interaction of Whey Proteins with Phenolic Derivatives Under Neutral and Acidic pH Conditions. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 2, p. 409–419, 2017.

CARBONARO, M.; MASELLI, P.; NUCARA, A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. **Amino Acids**, v. 43, n. 2, p. 911–921, 2012.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013. Elsevier Inc.

CARNOVALE, V.; BRITTEN, M.; COUILLARD, C.; BAZINET, L. Impact of calcium on the interactions between epigallocatechin-3-gallate and β-lactoglobulin. **Food Research International**, v. 77, p. 565–571, 2015.

CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J.; KHAN, M. L.; et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1593–1601, 2002.

CHERYAN, M.; RACKIS, J. J. Phytic acid interactions in food systems. **C R C**

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 13, n. 4, p. 297–335, 1980.

CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M.; STEWART, G. F. **Phytates in legumes and cereals**. 1983.

CHODANKAR, S.; ASWAL, V.; KOHLBRECHER, J.; VAVRIN, R.; WAGH, A. Small-angle neutron scattering study of structure and kinetics of temperature-induced protein gelation. **Physical Review E**, v. 79, n. 2, p. 21912, 2009.

CHU, Q.; BAO, B.; WU, W. Minireview Mechanism of Interaction between Phenolic Compounds and Proteins Based on Non-Covalent and Covalent Interactions Minireview. **Med. Res.**, v. 2, p. 1–6, 2018.

COMBS, C. A. **Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties**. New York: Nova Science, 2016.

CORRÊA, D. H. A D.; RAMOS, C. C. H. I.; CORREA, D. H. A.; RAMOS, C. C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African J Biochem Res**, v. 3, n. 5, p. 164–173, 2009.

COWIESON, A J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition research reviews**, v. 19, n. 1, p. 90–103, 2006.

CREA, F.; STEFANO, C. DE; MILEA, D.; SAMMARTANO, S. Formation and stability of phytate complexes in solution. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 10–11, p. 1108–1120, 2008.

CURL, C. L.; PRICE, K. R.; LANE, C.; BRITAIN, G. The Quantitative Estimation of Saponin in Pea (Pisum sativum L .) and Soya (Glycine max). , v. 18, p. 241–250, 1985.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4th ed. Porto Alegre, 2010.

DARBY, S. J.; PLATTS, L.; DANIEL, M. S.; COWIESON, A. J.; FALCONER, R. J. An isothermal titration calorimetry study of phytate binding to lysozyme. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1–8, 2016. Springer Netherlands.

DEAVILLE, E. R.; GREEN, R. J.; MUELLER-HARVEY, I.; WILLOUGHBY, I.; FRAZIER, R. A. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4554–4561, 2007.

DELIMONT, N. M.; ROSENKRANZ, S. K.; HAUB, M. D.; LINDSHIELD, B. L. Salivary proline-rich protein may reduce tannin-iron chelation: a systematic narrative review. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 47, 2017. Nutrition & Metabolism.

DENG, Y.; PADILLA-ZAKOUR, O.; ZHAO, Y.; TAO, S. Influences of High

Hydrostatic Pressure, Microwave Heating, and Boiling on Chemical Compositions, Antinutritional Factors, Fatty Acids, In Vitro Protein Digestibility, and Microstructure of Buckwheat. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 11, p. 2235–2245, 2015.

DESHPANDE, S. S. Effects of Phytic Acid , Divalent Cations , and Their Interactions on α-Amylase Activity. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 516–519, 1984.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUODU, K. G.; NUNES, A.; DELGADILLO, I.; et al. Effect of Grain Structure and Cooking on Sorghum and Maize in vitro Protein Digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 161–174, 2002.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, v. 1391, n. March, p. 1379–1391, 2016.

EL-HADY, E. A. A.; HABIBA, R. A. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 285–293, 2003.

ELLEPOLA, S. W.; CHOI, S. M.; PHILLIPS, D. L.; MA, C. Y. Raman spectroscopic study of rice globulin. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 85–93, 2006.

EMBABY, H. E.-S. Effect of Heat Treatments on Certain Antinutrients and in vitro Protein Digestibility of Peanut and Sesame Seeds. **Food Science and Technology Research**, v. 17, n. 1, p. 31–38, 2010.

ENGELS, C.; KNÖDLER, M.; ZHAO, Y. Y.; et al. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (Mangifera indica L.) kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7712–7718, 2009.

ESMAEILI, M.; RAFE, A.; SHAHIDI, S.-A.; HASAN-SARAEI, A. G. Functional properties of rice bran protein isolate at different pH levels. **Cereal Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 1–29, 2016.

EUSTON, S. R. Computer simulation of proteins: Adsorption, gelation and self-association. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 321–327, 2004.

FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. **Food and Nutrition**, v. 51. 1991.

FARIA, J. T. **Propriedades emulsificantes de saponina de Quillaja e β-lactoglobulina : efeitos do pH, da força iônica e das condições de**

homogeneização, 2015. Universidade Federal de Viçosa.

FARIA, J. T. DE; OLIVEIRA, E. B. DE; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Performance of Quillaja bark saponin and β-lactoglobulin mixtures on emulsion formation and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 67, p. 178–188, 2017a.

FARIA, J. T. DE; OLIVEIRA, E. B. DE; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Emulsifying properties of β-lactoglobulin and Quillaja bark saponin mixtures: Effects of number of homogenization passes, pH, and NaCl concentration. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 7, p. 1643–1654, 2017b. Taylor & Francis.

FELIX, M.; ROMERO, A.; GUERRERO, A. Development and evaluation of rheological and bioactive properties of rice protein-based gels. **Journal of Cereal Science**, v. 72, p. 91–100, 2016. Elsevier Ltd.

FENWICK, D. E.; OAKENFULL, D. Saponin Content of Food Plants and Some Prepared Foods. , , n. May 1982, p. 186–191, 1983.

FERRANDO, R. Natural antinutritional factors present in European plant proteins. **Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition**, v. 32, n. 3–4, p. 455–467, 1983.

FLEDDERUS, J.; BIKKER, P.; KLUESS, J. W. Increasing diet viscosity using carboxymethylcellulose in weaned piglets stimulates protein digestibility. **Livestock Science**, v. 109, n. 1–3, p. 89–92, 2007.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, 2002. Universidade Federal do Parana.

FRAZIER, R. A.; DEAVILLE, E. R.; GREEN, R. J.; et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 490–495, 2010.

FREDLUND, K.; ISAKSSON, M.; ROSSANDER-HULTHÉN, L.; ALMGREN, A.; SANDBERG, A. S. Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, n. 1, p. 49–57, 2006.

FREELAND, W. J.; CALCOTT, P. H.; ANDERSON, L. R. Tannins and saponin: Interaction in herbivore diets. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 13, n. 2, p. 189–193, 1985.

FREIRE, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 869–874, 2008.

FREITAS, V. DE; CARVALHO, E.; MATEUS, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 503–509, 2003.

FREITAS, V. DE; MATEUS, N. Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present

Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 351, p. 724–746, 2012.

FU, Q.; WANG, H.; XIA, M.; et al. The effect of phytic acid on tight junctions in the human intestinal Caco-2 cell line and its mechanism. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 1–8, 2015. Elsevier B.V.

GEMEDE, H. F.; RATTA, N.; GEMEDE, H. F.; et al. Antinutritional Factors in Plant Foods: Potential Health Benefits and Adverse Effects. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 4, p. 284–289, 2014.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 119–132, 2017. Elsevier Ltd.

GHAVIDEL, R. A.; PRAKASH, J. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1292–1299, 2007.

GOLTZ, C.; OLIVEIRA, M. A. S.; MISUGI, C. T.; et al. Heat Treatment and β-Carotene Incorporation Effect in the Interaction of β-Lactoglobulin and Carboxymethylcellulose System. **Food Biophysics**, v. 11, n. 4, p. 15–17, 2016. Food Biophysics.

GOSAL, W. S.; ROSS-MURPHY, S. B. Globular protein gelation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, n. 3–4, p. 188–194, 2000.

GRYNSPAN, F.; CHERYAN, M. Calcium phytate: Effect of ph and molar ratio on in vitro solubility. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 10, p. 1761–1764, 1983.

GRYNSPAN, F. F.; CHERYAN, M. Phytate-calcium interactions with soy protein. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 66, n. 1, p. 93–97, 1989.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

GUILLAUME, Y. C.; GUINCHARD, C.; BERTHELOT, A. Affinity chromatography study of magnesium and calcium binding to human serum albumin: pH and temperature variations. **Talanta**, v. 53, n. 3, p. 561–569, 2000.

GÜLÇIN, I.; HUYUT, Z.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 43–53, 2010.

GUO, J.; PING, Y.; EJIMA, H.; et al. Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal- phenolic networks. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 201, p. 5868–5871, 2014.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 9, p. 4494–4497, 1981.

HASSAN, A B.; OSMAN, G. A M.; RUSHDI, M. A H.; ELTAYEB, M. M.; DIAB, E. E. Effect of γ irradiation on the nutritional quality of maize cultivars (Zea mays) and sorghum (Sorghum bicolor) grains. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 167–171, 2009.

HEGDE, A. H.; SEETHARAMAPPA, B. S. J. Evaluation of binding and thermodynamic characteristics of interactions between a citrus flavonoid hesperitin with protein and effects of metal ions on binding. **Mol Biol Rep**, v. 38, p. 4921–4929, 2011.

HIDER, R. C.; LIU, Z. D.; KHODR, H. H. Metal chelation of polyphenols. **Methods in Enzymology**, v. 335, n. 1993, p. 190–203, 2001.

HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, R. Phytic Acid Content of Cereals and Legumes and Interaction with Protein. **Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.**, v. 46, n. 1, p. 59–64, 2002.

HÍDVÉGI, M.; LÁSZTITY, R. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. **Periodica Polytechnica: Chemical Engineering**, v. 46, n. 1–2, p. 59–64, 2002.

HSU, H. W.; VAVAK, D. L.; SATTERLEE, L. D.; MILLER, G. A. A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 5, p. 1269–1273, 1977.

HU, H.; LI-CHAN, E. C. Y.; WAN, L.; TIAN, M.; PAN, S. The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 303–311, 2013. Elsevier.

IKEDO, S.; SHIMOYAMADA, M.; WATANABE, K. Interaction between bovine serum albumin and saponin as studied by heat stability and protease digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 792–795, 1996.

ISHAAYA, I.; BIRK, Y. Soybean Saponins. IV. The Effect of Proteins on the Inhibitory Activity of Soybean Saponins on Certain Enzymes. **Journal of Food Science**, v. 30, n. 1, p. 118–120, 1965.

ISHTIKHAR, M.; AHMAD, E.; SIDDIQUI, Z.; et al. Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2450–2464, 2018. Elsevier B.V.

JALDAPPAGARI, S.; BALAKRISHNAN, S.; HEGDE, A. H.; TERADAL, N. L.; NARAYAN, P. S. Interactions of Polyphenols with Plasma Proteins: Insights from Analytical Techniques. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 456–473, 2013.

JAUREGI, P.; OLATUJOYE, J. B.; CABEZUDO, I.; FRAZIER, R. A.; GORDON, M. H. Astringency reduction in red wine by whey proteins. **Food Chemistry**, v.

199, p. 547–555, 2016. Elsevier Ltd.

JOOD, S.; KAPOOR, A C.; SINGH, R. Polyphenol and Phytic Acid Contents of Cereal-Grains As Affected By Insect Infestation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1983, p. 435–438, 1995.

JU, S.-W.; PRAJATELISTIA, E.; JUN, S. H.; et al. Aesthetically improved and efficient tannin–metal chelates for the treatment of dentinal hypersensitivity. **RSC Adv.**, v. 7, n. 1, p. 87–94, 2017. Royal Society of Chemistry.

KALPANADEVI, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, Vigna unguiculata (L.) Walp subsp. unguiculata. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 455–461, 2013. Elsevier Ltd.

KATOCH, R. Nutritional Potential of Rice Bean (Vigna Umbellata): An Underutilized Legume. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. 8–16, 2013.

KAUR, S.; SHARMA, S.; DAR, B. N.; SINGH, B. Optimization of process for reduction of antinutritional factors in edible cereal brans. **Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional**, v. 18, n. 5, p. 445–54, 2012.

KEZWON, A.; WOJCIECHOWSKI, K. Interaction of Quillaja bark saponins with food-relevant proteins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 185–195, 2014. Elsevier B.V.

KHOKHAR, S.; CHAUHAN, B. M. Antinutritional factors in moth bean (vigna aconitifolia): Varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 3, p. 591–594, 1986.

KIES, A. K.; JONGE, L. H. DE; KEMME, P. A.; JONGBLOED, A. W. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1753–1758, 2006.

KILMISTER, R. L.; FAULKNER, P.; DOWNEY, M. O.; DARBY, S. J.; FALCONER, R. J. The complexity of condensed tannin binding to bovine serum albumin – An isothermal titration calorimetry study. **Food Chemistry**, v. 190, p. 173–178, 2016.

KIM, O. H. J.; KIM, Y. O.; SHIM, J. H.; et al. β-propeller phytase hydrolyzes insoluble Ca2+-phytate salts and completely abrogates the ability of phytate to chelate metal ions. **Biochemistry**, v. 49, n. 47, p. 10216–10227, 2010.

KNIGHT, J.; EASTER, L. H.; NEIBERG, R.; ASSIMOS, D. G.; HOLMES, R. P. Increased protein intake on controlled oxalate diets does not increase urinary oxalate excretion. **Urological Research**, v. 37, n. 2, p. 63–68, 2009.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular Aspects of Ligand to Serum Albumin. **Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 16–53, 1981.

KUMAR, J. A.; SUDHIR, K.; PANWAR, J. D. S. Antinutritional factors and their detoxification in pulses – a review. **Agric. Rev.**, v. 30, n. 1, p. 64–70, 2009.

KUMAR, R. Antinutritional factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. Proceedings of the FAO Expert Consultation held at the Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI). **Anais...** . p.14–18, 1992. Malaysia: Andrew Speedy and Pierre-Luc Puglise.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945–959, 2010.

KUMARI, M., JAIN, S. Tannins: an antinutrient with positive effect to manage diabetes. **Res J Recent Sci**, v. 1, n. 12, p. 70–73, 2012.

KURUKJI, D.; NORTON, I.; SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 249–260, 2014. Elsevier Ltd.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 363–386, 1996. Gustav Fischer Verlag · Struttgart · Jena · New York.

LADJAL-ETTOUMI, Y.; BOUDRIES, H.; CHIBANE, M.; ROMERO, A. Pea , Chickpea and Lentil Protein Isolates : Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. **Food Biophysics**, v. 11, p. 43–51, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAGUNA, L.; PICOUET, P.; GUÀRDIA, M. D.; RENARD, C. M. G. C.; SARKAR, A. In vitro gastrointestinal digestion of pea protein isolate as a function of pH, food matrices, autoclaving, high-pressure and re-heat treatments. **LWT**, v. 84, p. 511–519, 2017.

LI, X.; NI, T. Probing the binding mechanisms of α-tocopherol to trypsin and pepsin using isothermal titration calorimetry, spectroscopic, and molecular modeling methods. **Journal of Biological Physics**, v. 42, n. 3, p. 415–434, 2016. Journal of Biological Physics.

LI, X.; WANG, S. Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. **New J. Chem.**, v. 39, n. 1, p. 386–395, 2015.

LIANG, H.; ZHOU, B.; HE, Y.; et al. Tailoring stimuli-responsive delivery system driven by metal-ligand coordination bonding. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3315–3330, 2017.

LINSBERGER-MARTIN, G.; WEIGLHOFER, K.; THI PHUONG, T. P.; BERGHOFER, E. High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and

in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 331–336, 2013.

LIU, F.; WANG, D.; MA, C.; GAO, Y. Conjugation of polyphenols prevents lactoferrin from thermal aggregation at neutral pH. **Food Hydrocolloids**, v. 58, n. February, p. 49–59, 2016.

LIU, H.; LI, C.; SUN, X. S. Improved water resistance in undecylenic acid (UA)-modified soy protein isolate (SPI)-based adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 577–584, 2015.

LIU, Y.; XIE, M.-X.; KANG, J.; ZHENG, D. Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 12, p. 2747–2758, 2003.

MA, G.; LI, Y.; JIN, Y.; et al. Phytate intake and molar ratios of phytate to zinc , iron and calcium in the diets of people in China. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 368–374, 2007.

MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A.; et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3–4, p. 174–182, 2012.

MAKKAR, H. P.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Protein concentrate from Jatropha curcas screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 9, p. 1542–1548, 2008.

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 3, p. 241–256, 2003.

MAKKAR, H. P. S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 4, p. 481–493, 1995.

MALIK, M. A.; SAINI, C. S. Polyphenol removal from sunflower seed and kernel: Effect on functional and rheological properties of protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 705–715, 2017.

MANDEL, S.; WEINREB, O.; REZNICHENKO, L.; KALFON, L.; AMIT, T. Green tea catechins as brain-permeable, non toxic iron chelators to “iron out iron” from the brain. **Journal of neural transmission. Supplementum**, , n. 71, p. 249–257, 2006.

MARIA, S. DE; FERRARI, G.; MARESCA, P. Effects of high hydrostatic pressure on the conformational structure and the functional properties of bovine serum albumin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, n. November 2016, p. 67–75, 2016.

MARTÍNEZ, T. F.; MOYANO, F. J. Effect of tannic acid on in vitro enzymatic hydrolysis of some protein sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p. 456–464, 2003.

MATSUMOTO, H.; ITO, K.; YONEKURA, K.; et al. Enhanced absorption of anthocyanins after oral administration of phytic acid in rats and humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2489–2496, 2007.

MCDONALD, M.; MILA, I.; SCALBERT, A. Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 599–606, 1996.

MCRAE, J. M.; FALCONER, R. J.; KENNEDY, J. A. Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: Implications for red wine astringency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12510–12518, 2010.

MCRAE, J. M.; ZIORA, Z. M.; KASSARA, S.; COOPER, M. A.; SMITH, P. A. Ethanol concentration influences the mechanisms of wine tannin interactions with poly(l -proline) in model wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 4345–4352, 2015.

MEINLSCHMIDT, P.; SUSSMANN, D.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; EISNER, P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. **Food Science and Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 11–23, 2016.

MICHAELSEN, K. F.; HOPPE, C.; ROOS, N.; et al. Choice of foods and ingredients for moderately malnourished children 6 months to 5 years of age. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, 2009.

MICROCAL TUTORIAL GUIDE ON ITC DATA ANALYSIS IN ORIGIN®. Using Origin® Scientific Plotting Software to Analyze Calorimetric Data from All MicroCal Isothermal Titration Calorimeters. **MicroCal, LLC**, 2004. MicroCal.

MILDVAN, A. S.; COHN, M. Magnetic Resonance Studies of the Interaction of the Manganous Ion with Bovine Serum Albumin. **Biochemistry**, v. 2, n. 5, p. 910–919, 1963.

MILLET, M.; POUPARD, P.; QUÉRÉ, J. M. LE; BAUDUIN, R.; GUYOT, S. Haze in Apple-Based Beverages: Detailed Polyphenol, Polysaccharide, Protein, and Mineral Compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6404–6414, 2017.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct. Food Funct**, v. 5, n. 5, p. 1113–1124, 2014.

MORTON, P. A JA.; MURRAY, B. S. Acid beverage floc: Protein-saponin interactions and an unstable emulsion model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 21, n. 1–3, p. 101–106, 2001.

MOSER, S.; CHEGENI, M.; JONES, O. G.; LICEAGA, A.; FERRUZZI, M. G. The effect of milk proteins on the bioaccessibility of green tea flavan-3-ols. **Food Research International**, v. 66, p. 297–305, 2014.

MOUGHAN, P. J. Protein: Digestion, Absorption and Metabolism. **Encyclopedia of Food and Health**. p.524–529, 2016. Elsevier.

MOW, R.; SCHWFNKE, K. D. Rapeseed protein - polyanion interactions. Soluble complexes between the 2 S protein fraction (napin) and phytic acid. **Die Nahrung**, v. 34, n. 4, p. 375–385, 1990.

MURATA, M.; TANI, F.; HIGASA, T.; KITABATAKE, N.; DOI, E. Heat-Induced Transparent Gel Formation of Bovine Serum-Albumin. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 43–46, 1993.

MURTHY, N. V. K. K.; RAO, M. S. N. Interaction of phytate with mustard 12S protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 493–498, 1984. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00123a019>. .

NAJDI HEJAZI, S.; ORSAT, V.; AZADI, B.; KUBOW, S. Improvement of the in vitro protein digestibility of amaranth grain through optimization of the malting process. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 59–65, 2016.

NAVARRO DEL HIERRO, J.; HERRERA, T.; FORNARI, T.; REGLERO, G.; MARTIN, D. The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities. **Journal of Functional Foods**, v. 40, n. November 2017, p. 484–497, 2018.

NAVARRO DEL HIERRO, J.; HERRERA, T.; GARCÍA-RISCO, M. R.; et al. Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. **Food Research International**, v. 109, n. April, p. 440–447, 2018.

NAYAK, P.; SAHOO, S. K.; BEHERA, A.; et al. Synthesis and Characterization of Soy Protein Isolate/MMT Nanocomposite Film for the Control Release of the Drug Ofloxacin. **World Journal of Nano Science and Engineering**, v. 1, n. 2, p. 27–36, 2011.

NYBERG, N. T.; KENNE, L.; RÖNNBERG, B.; SUNDQUIST, B. G. Separation and structural analysis of some saponins from Quillaja saponaria Molina. **Carbohydrate Research**, v. 323, n. 1–4, p. 87–97, 1999.

OGHBAEI, M.; PRAKASH, J.; YILDIZ, F. Effect of primary processing of cereals and legumes on its nutritional quality: A comprehensive review. (F. Yildiz, Ed.)**Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1136015, 2016.

OH, B.; CHANG, B. S.; PARK, K.; et al. Calcium-Dependent Catalytic Activity of a Novel Phytase from Bacillus amyloliquefaciens DS11. **Biochemistry**, v. 40, p. 9669–9676, 2001.

OJHA, H.; MISHRA, K.; HASSAN, M. I.; CHAUDHURY, N. K. Spectroscopic and

isothermal titration calorimetry studies of binding interaction of ferulic acid with bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 56–64, 2012.

OKUR, H. I.; HLADÍLKOVÁ, J.; REMBERT, K. B.; et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 9, p. 1997–2014, 2017.

OLSEN, S. N.; BOHLIN, C.; MURPHY, L.; et al. Effects of non-ionic surfactants on the interactions between cellulases and tannic acid: A model system for cellulase-poly-phenol interactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 353–359, 2011.

ONWUKA, G. I. Soaking, boiling and antinutritional factors in Pigeon peas (Cajanus cajan) and cowpeas (Vigna unguiculata). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 30, n. 5, p. 616–630, 2006.

OSSET, M.; PIÑOL, M.; FALLON, M. J. M.; LLORENS, R. DE; CUCHILLO, C. M. Interference of the carbohydrate moiety in Coomassie Brilliant Blue R-250 protein staining. **Electrophoresis**, v. 10, n. 4, p. 271–273, 1989.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein – phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, p. 954–970, 2013.

PIOTROWSKI, M.; LEWANDOWSKA, J.; WOJCIECHOWSKI, K. Biosurfactant-protein mixtures: Quillaja Bark Saponin at water/air and water/oil interfaces in presence of β-lactoglobulin. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 16, p. 4843–4850, 2012.

PONCET-LEGRAND, C.; GAUTIER, C.; CHEYNIER, V.; IMBERTY, A. Interactions between Flavan-3-ols and Poly(L-proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9235–9240, 2007.

POTTER, S. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; POLLACK, J.; LONE, T. A.; BERBER-JIMENEZ, M. D. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1287–1291, 1993.

PRIGENT, S. V. E.; GRUPPEN, H.; VISSER, A. J. W. G.; et al. Effects of Non-covalent Interactions with 5- O -Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5088–5095, 2003.

PRIPP, A. H.; VREEKER, R.; DUYNHOVEN, J. VAN. Binding of olive oil phenolics to food proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 3, p. 354–362, 2005.

QUIÑONE, D.; VEIGA, N.; TORRES, J.; et al. Self-Assembly of Manganese(II)–Phytate Coordination Polymers: Synthesis, Crystal Structure, and Physicochemical Properties. **ChemPlusChem**, v. 82, n. 5, p. 721–731, 2017.

RAMOS, Ó. L.; PEREIRA, J. O.; SILVA, S. I.; et al. Effect of composition of commercial whey protein preparations upon gelation at various pH values. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 681–689, 2012.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.

RAWEL, H. M.; MEIDTNER, K.; KROLL, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4228–4235, 2005.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. **Food Research International**, v. 27, n. 3, p. 281–290, 1994.

REICHERT, C. L.; SALMINEN, H.; BADOLATO BÖNISCH, G.; SCHÄFER, C.; WEISS, J. Concentration effect of Quillaja saponin – Co-surfactant mixtures on emulsifying properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 519, p. 71–80, 2018.

REICHERT, C. L.; SALMINEN, H.; LEUENBERGER, B. H.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Miscibility of Quillaja Saponins with other Co-surfactants under Different pH Values. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. E2495–E2503, 2015.

RENKEMA, J. M. S.; RUPPEN, H. G.; RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. VAN. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6064–6071, 2002.

RHAM, O. D.; JOST, T. Phytate-Protein Interactions in Soybean Extracts and Low-Phytate Soy Protein Products. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 2, p. 596–600, 1979.

RIMBACH, G.; PALLAUF, J. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 37–45, 1999.

ROHN, S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins. **Food Research International**, v. 65, n. PA, p. 13–19, 2014. Elsevier Ltd.

ROMANINI, D.; BRAIA, M. J.; PORFIRI, M. C.; et al. Applications of Calorimetric Techniques in the Formation of Protein-Polyelectrolytes Complexes. **Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry**. p.105–128, 2013.

ROPIAK, H. M.; LACHMANN, P.; RAMSAY, A.; GREEN, R. J.; MUELLER-

HARVEY, I. Identification of Structural Features of Condensed Tannins That Affect Protein Aggregation. (J. Chamani, Ed.)**PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170768, 2017.

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, n. 3, p. 838–846, 2012.

SAJJADI, M.; CARTER, C. G. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (Salmo salar, L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 135–142, 2004.

SARNTHEIN-GRAF, C.; MESA, C. LA. Association of saponins in water and water-gelatine mixtures. **Thermochimica Acta**, v. 418, n. 1–2, p. 79–84, 2004.

SARWAR GILANI, G.; WU XIAO, C.; COCKELL, K. A. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S2, p. S315–S332, 2012.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SCHMIDT, M. A.; HALVORSON, J. J.; HAGERMAN, A. E.; GONZALEZ, J. M. Macronutrients and metals released from soils by solutions of naturally occurring phenols. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 5, p. 544–553, 2017.

SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 25–31, 2005.

SCHONS, P. F. **Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (Sorghum bicolor) por tanase e fitase e estudo biológico**, 2009. Universidade Estadual de Campinas.

SEKOWSKI, S.; IONOV, M.; KASZUBA, M.; et al. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from Oenothera gigas and Geranium sanguineum with human serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 623–628, 2014.

SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; COWIESON, N. P.; RAVINDRAN, V. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 1–17, 2012.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, A.; BRYDEN, W. L. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. **Nutrition research reviews**, v. 13, n. 2, p. 255–278, 2000.

SHARMA, C. B.; GOEL, M.; IRSHAD, M. MYOINOSITOL HEXAPHOSPHATE

AS A POTENTIAL INHIBITOR OF α-AMYLASES. **Phytochemistryemistry**, v. 17, p. 201–204, 1978.

SHARMA, S.; GOYAL, R.; BARWAL, S. Domestic processing effects on physicochemical , nutritional and anti-nutritional attributes in soybean (Glycine max L . Merill). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 6, p. 3203–3209, 2013.

SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 161–172, 2007.

SHIMOYAMADA, M.; IKEDO, S.; OOTSUBO, R.; WATANABE, K. Effects of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 4793–4797, 1998.

SHIMOYAMADA, M.; OKADA, Y.; WATANABE, K.; YAMAUCHI, R. Characterization of tryptic hydrolysis of α-lactalbumin/saponin mixture and structural change of α-lactalbumin interacting with soybean saponin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 2, p. 273–279, 2005.

SHIMOYAMADA, M.; OOTSUBO, R.; NARUSE, T.; WATANABE, K. Effects of soybean saponin on protease hydrolyses of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 64, n. 4, p. 891–893, 2000.

SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. **Journal of Food Science**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2016.

SINGH, M.; KRIKORIAN, A. D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 30, n. 4, p. 799–800, 1982.

SINHA, K.; KHARE, V. Review on : Antinutritional factors in vegetable crops. **The Pharma Innovation Journal**, v. 6, n. 12, p. 353–358, 2017.

SOETAN, K. O.; OYEWOLE, O. E. The need for adequate processing to reduce the anti- nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. **African Journal of Food Science**, v. 3, n. 9, p. 223–232, 2009.

SOETAN, O.; OYEKUNLE, M. A.; AIYELAAGBE, O. O.; FAFUNSO, M. A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of Sorghum Bicolor L . Moench. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. December, p. 2405–2407, 2006.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

STASZEWSKI, M. VON; JAGUS, R. J.; PILOSOF, A. M. R. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. **Food**

Hydrocolloids, v. 25, n. 5, p. 1077–1084, 2011.

STASZEWSKI, M. VON; JARA, F. L.; RUIZ, A. L. T. G.; et al. Nanocomplex formation between β-lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 800–809, 2012.

STEADMAN, K. J.; BURGOON, M. S.; LEWIS, B. A.; EDWARDSON, S. E.; OBENDORF, R. L. Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 11, p. 1094–1100, 2001.

STEFANO, C. DE; MILEA, D.; PORCINO, N.; SAMMARTANO, S. Speciation of phytate ion in aqueous solution. Sequestering ability toward mercury(II) cation in NaClaq at different ionic strengths. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1459–1466, 2006.

STEIN, A. J. Global impacts of human mineral malnutrition. **Plant and Soil**, v. 335, n. 1, p. 133–154, 2010.

SU, R.; QI, W.; HE, Z.; ZHANG, Y.; JIN, F. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 6, p. 995–1005, 2008.

SUN, L.; GIDLEY, M. J.; WARREN, F. J. F. J. The mechanism of interactions between tea polyphenols and porcine pancreatic alpha-amylase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence quenching, differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 10, p. 1700324, 2017.

SUN, N.; JIN, Z.; LI, D.; YIN, H.; LIN, S. An Exploration of the Calcium-Binding Mode of Egg White Peptide, Asp-His-Thr-Lys-Glu, and In Vitro Calcium Absorption Studies of Peptide–Calcium Complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 44, p. 9782–9789, 2017.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Dynamic oscillatory rheological measurement and thermal properties of pea protein extracted by salt method: Effect of pH and NaCl. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 3, p. 577–582, 2011.

SUN, X. D.; ARNTFIELD, S. D. Molecular forces involved in heat-induced pea protein gelation: Effects of various reagents on the rheological properties of salt-extracted pea protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 325–332, 2012.

TAKAHASHI, T.; NAGATOISHI, S.; KURODA, D.; TSUMOTO, K. Thermodynamic and computational analyses reveal the functional roles of the galloyl group of tea catechins in molecular recognition. (R. Subramanyam, Ed.)**PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–14, 2018. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0204856>. .

THAKUR, M.; WENG, A.; PIEPER, A.; et al. Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: Role of saponins charge. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 61, p. 285–294, 2013.

THOMPSON, L. U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Research International**, v. 26, n. 2, p. 131–149, 1993.

THONGKAEW, C.; GIBIS, M.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate e pectin coacervates. **Food hydrocolloids**, v. 41, p. 103–112, 2014.

TORRES, J.; DOMÍNGUEZ, S.; CERDÁ, M. F.; et al. Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 828–840, 2005.

UEDA, H.; YOKOYAMA, A. Dietary Protein Sources Modify the Cholesterol-Lowering in Chicks. **Journal of Poultry Scienc**, v. 38, p. 225–233, 2001.

VIDALVALVERDE, C.; FRIAS, J.; ESTRELLA, I.; et al. Effect of Processing on Some Antinutritional Factors of Lentils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 2291–2295, 1994.

VILELA, R. M.; LANDS, L. C.; CHAN, H. M.; AZADI, B.; KUBOW, S. High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1013–1029, 2006.

WALLER, G. E.; YAMASAKI, K. **Saponins Used in Food and Agriculture**. Boston, MA: Springer US, 1996.

WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEADON, D. R. Enzymes in the animal-feed industry. , , n. 1984, p. 173–176, 1993.

WANG, C.; DAMODARAN, S. Thermal Gelation of Globular Proteins: Influence of Protein Conformation on Gel Strength. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, n. 3, p. 433–438, 1991.

WANG, T.; XU, P.; CHEN, Z.; WANG, R. Mechanism of structural interplay between rice proteins and soy protein isolates to design novel protein hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 84, n. June, p. 361–367, 2018.

WANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; TAO, W.; TANG, S. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin : A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, v. 126, p. 211–218, 2007.

WANG, Z.; LI, H.; LIANG, M.; YANG, L. Glutelin and prolamin, different components of rice protein, exert differently in vitro antioxidant activities. **Journal of Cereal Science**, v. 72, p. 108–116, 2016.

WANGSAKAN, A.; CHINACHOTI, P.; MCCLEMENTS, D. J. Isothermal titration calorimetry study of the influence of temperature, pH and salt on maltodextrin–

anionic surfactant interactions. (G. R. Waller & K. Yamasaki, Eds.)**Food Hydrocolloids**, Advances in Experimental Medicine and Biology., v. 20, n. 4, p. 461–467, 2006. Boston, MA: Elsevier Ltd.

WATRELOT, A. A.; RENARD, C. M. G. C.; BOURVELLEC, C. LE. Comparison of microcalorimetry and haze formation to quantify the association of B-type procyanidins to poly-l-proline and bovine serum albumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 376–382, 2015.

WENG, A.; THAKUR, M.; MALLINCKRODT, B. VON; et al. Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 74–86, 2012.

WOJCIECHOWSKI, K.; KEZWON, A.; LEWANDOWSKA, J.; MARCINKOWSKI, K. Effect of β-casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 208–216, 2014.

WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T. R. Short- and mid-term adsorption behaviour of Quillaja Bark Saponin and its mixtures with lysozyme. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 687–693, 2011.

XIE, Y.; LUO, H.; DUAN, J.; et al. Phytic acid enhances the oral absorption of isorhamnetin, quercetin, and kaempferol in total flavones of Hippophae rhamnoides L. **Fitoterapia**, v. 93, p. 216–225, 2014.

XU, Y.; CARTIER, A.; OBIELODAN, M.; et al. Nutritional and anti-nutritional composition, and in vitro protein digestibility of Kabuli chickpea (Cicer arietinum L.) as affected by differential processing methods. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 3, p. 625–633, 2016.

YANG, S.; BAI, G.; CHEN, L.; et al. The interaction of phenolic acids with Fe(III) in the presence of citrate as studied by isothermal titration calorimetry. **Food Chemistry**, v. 157, p. 302–309, 2014.

YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; JULIAN, D. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale). **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 589–596, 2013.

YASMIN, A.; ZEB, A.; KHALIL, A. W.; PARACHA, G. M.-D.; KHATTAK, A. B. Effect of Processing on Anti-nutritional Factors of Red Kidney Bean (Phaseolus vulgaris) Grains. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 4, p. 415–419, 2008.

YU, H.; DONG, S.; WANG, L.; LIU, Y. The effect of triterpenoid saponins on pancreatic lipase in vitro : Activity, conformation, kinetics, thermodynamics and morphology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 1–9, 2017.

ZHANG, G.; WANG, A.; JIANG, T.; GUO, J. Interaction of the irisflorentin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Molecular Structure**, v. 891, n. 1–3, p. 93–97, 2008.

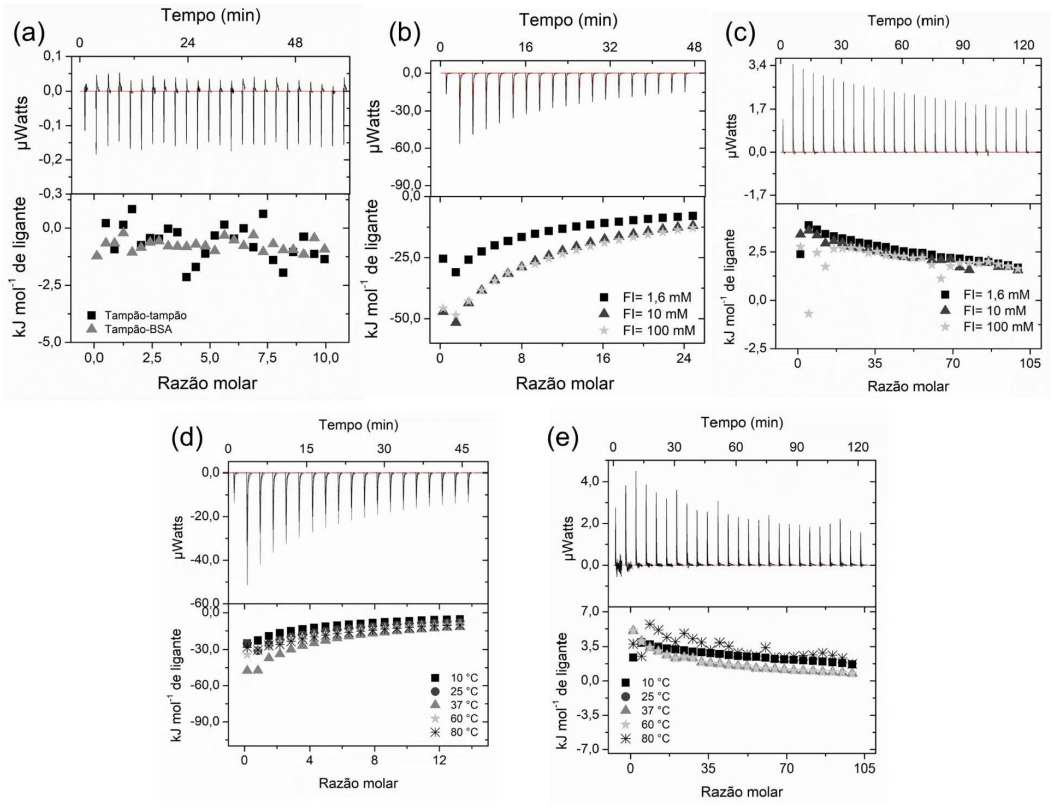
ZHANG, L.; SAHU, I. D.; XU, M.; WANG, Y.; HU, X. Effect of metal ions on the binding reaction of (-)-epigallocatechin gallate to b-lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1923–1929, 2017.

ZIA-UR-REHMAN; SALARIYA, A. M. The effects of hydrothermal processing on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 695–700, 2005.

ZUO, F.; CHEN, Z.; SHI, X.; WANG, R.; GUO, S. Yield and textural properties of tofu as affected by soymilk coagulation prepared by a high-temperature pressure cooking process. **Food Chemistry**, v. 213, p. 561–566, 2016.

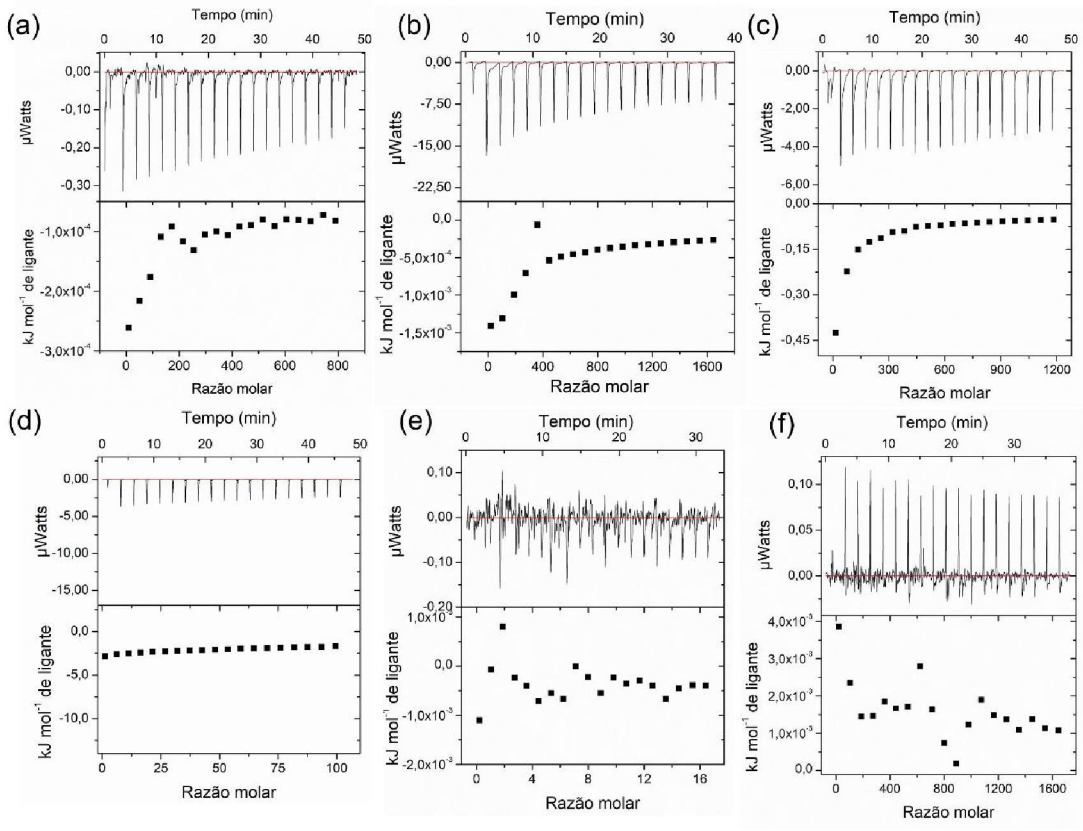
APÊNDICE I – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC

FIGURA A1 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS RESULTADOS APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.1



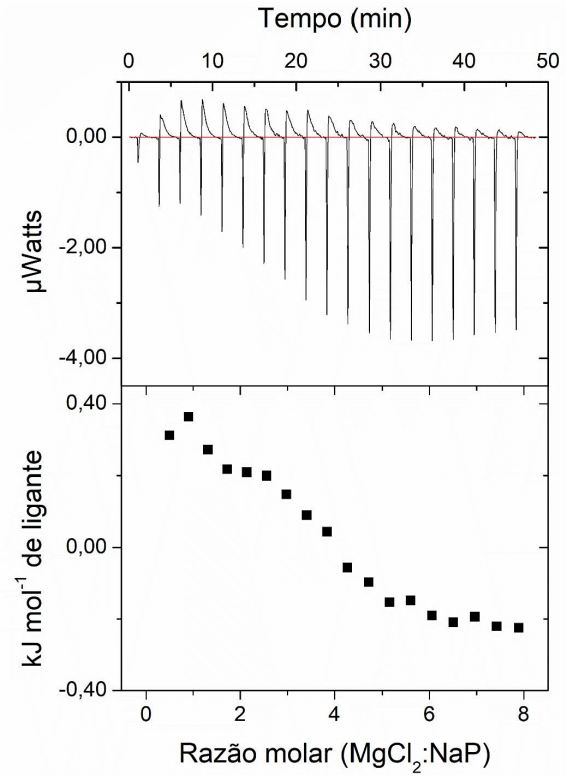
Nota: (a) titulação do tampão em tampão e tampão em BSA; (b) titulação de AF em tampão com diferentes forças iônicas; (c) titulação de AT em tampão com diferentes forças iônicas; (d) titulação de AF em tampão em diferentes temperaturas; (e) titulação de AT em tampão em diferentes temperaturas.
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A2 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS RESULTADOS APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.2



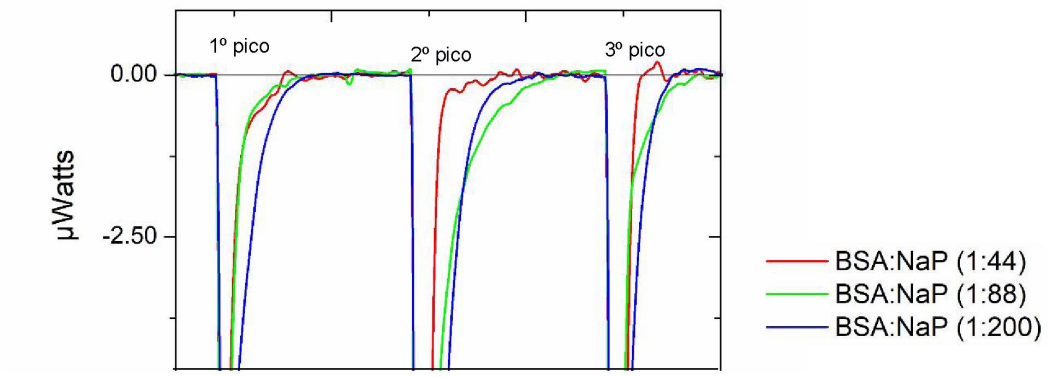
Nota: (a) titulação de $MgCl_2$ em tampão; (b) titulação de $CaCl_2$ em tampão; (c) titulação de $MnCl_2$ em tampão; (d) titulação de fitato de sódio em tampão; (e) titulação de tampão em tampão; (f) titulação de tampão em albumina de soro bovino e fitato de sódio.
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A3 - CURVA DE ITC PARA TITULAÇÃO DE $MgCl_2$ EM NaP.



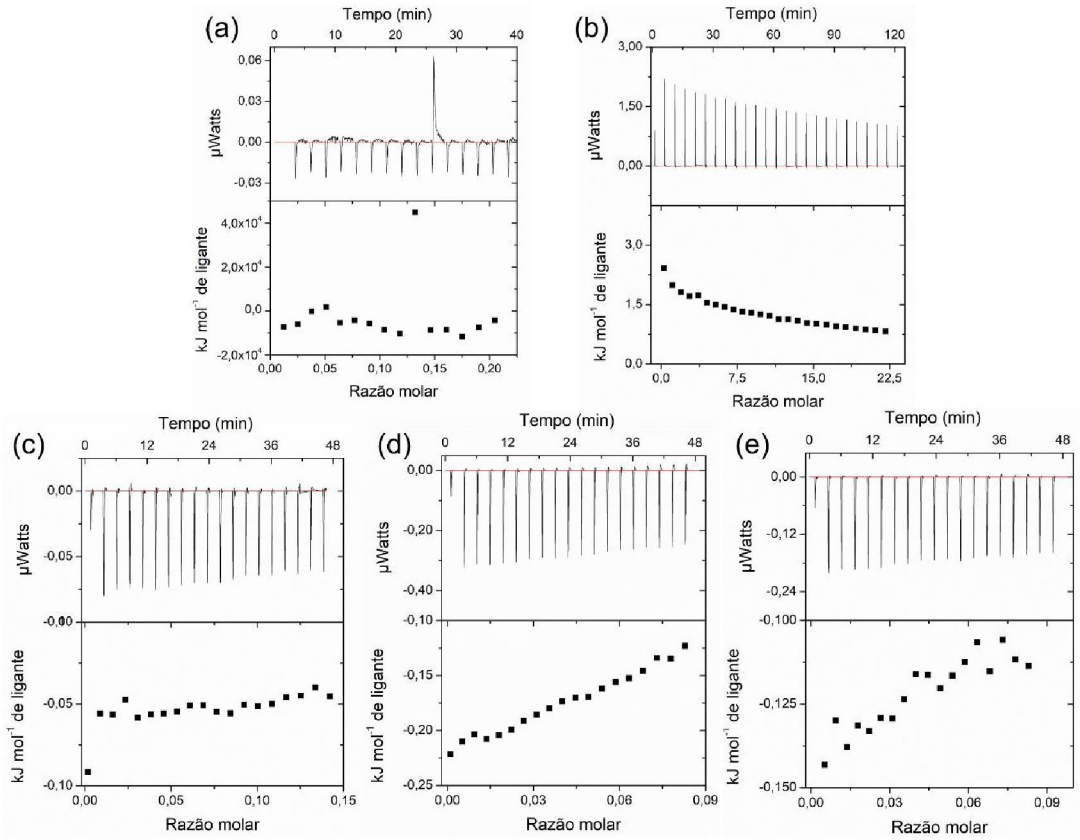
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A4 - ZOOM DO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO PICO OBTIDOS POR ITC PARA A TITULAÇÃO DE $MnCl_2$ EM BSA+NaP



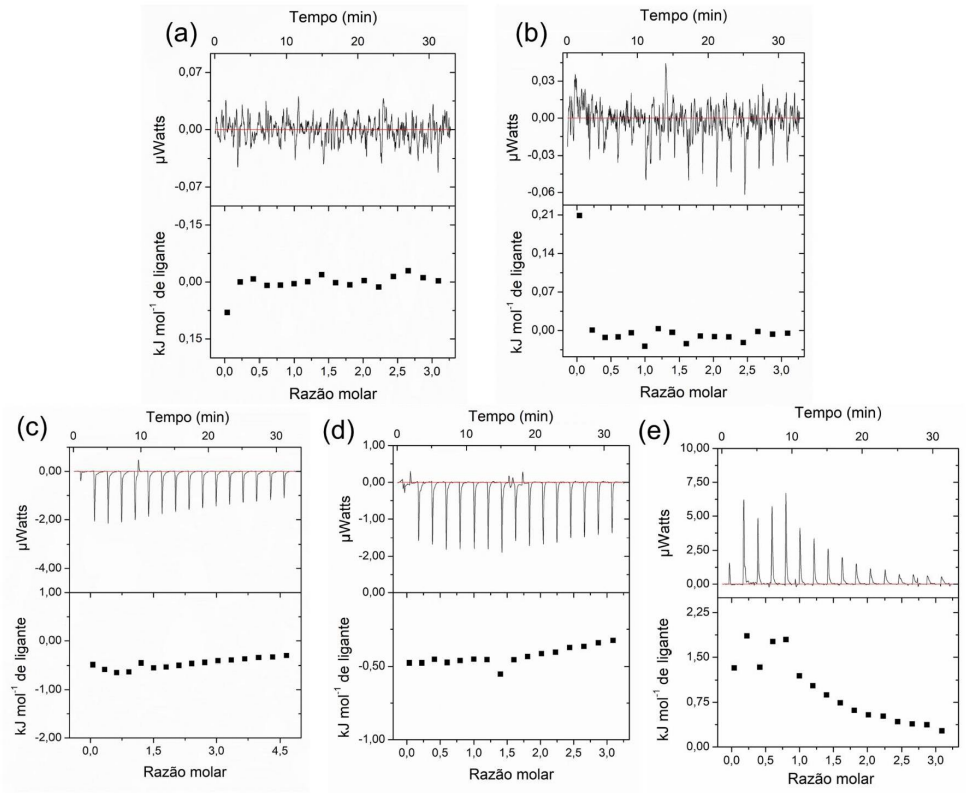
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A5 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.3



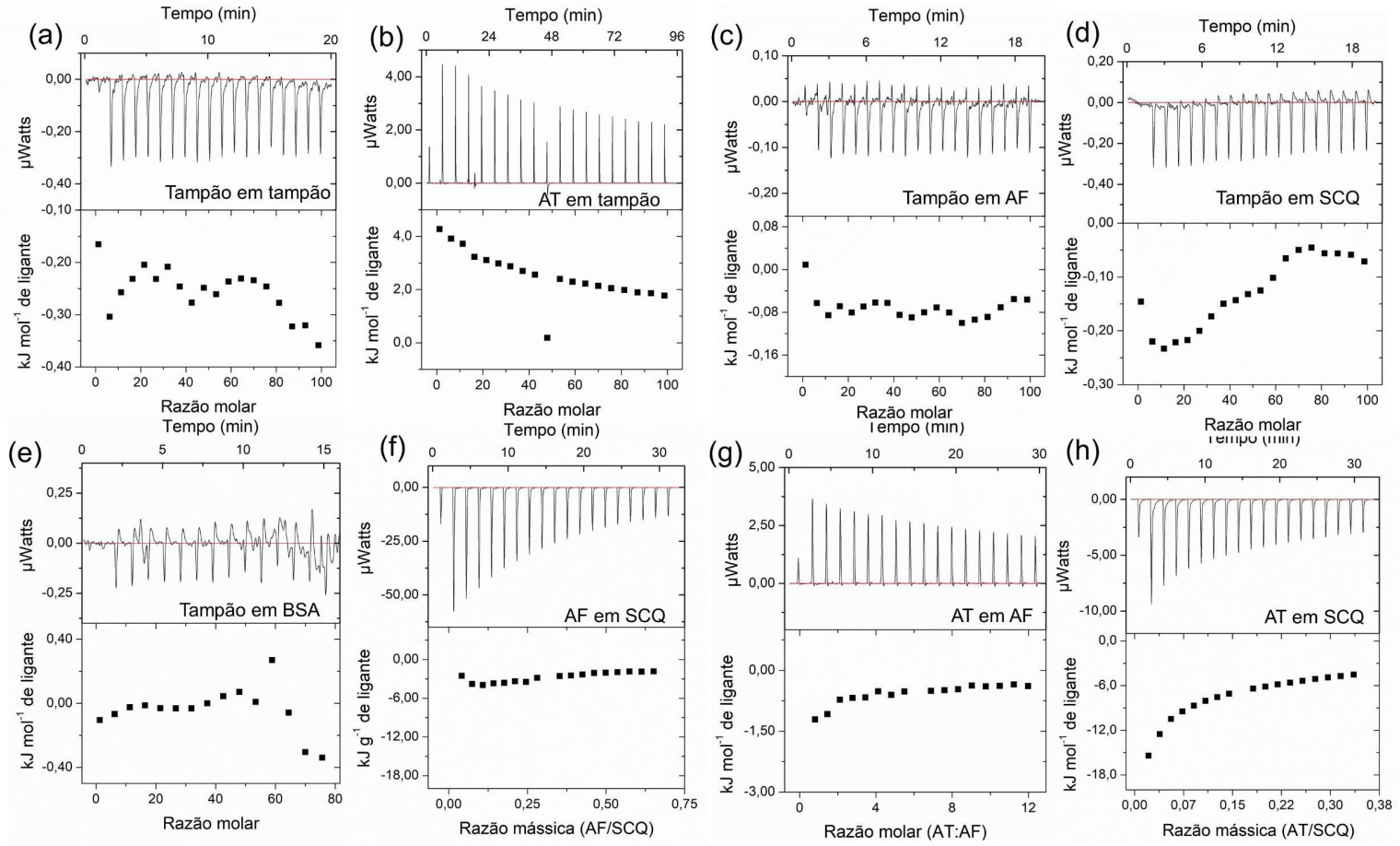
Nota: (a) tampão em tampão; (b) ácido tânico em tampão; (c) tampão em de $MgCl_2$; (d) tampão em $CaCl_2$ (e) tampão em $MnCl_2$.
FONTE: O autor (2019)

FIGURA A6 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.4



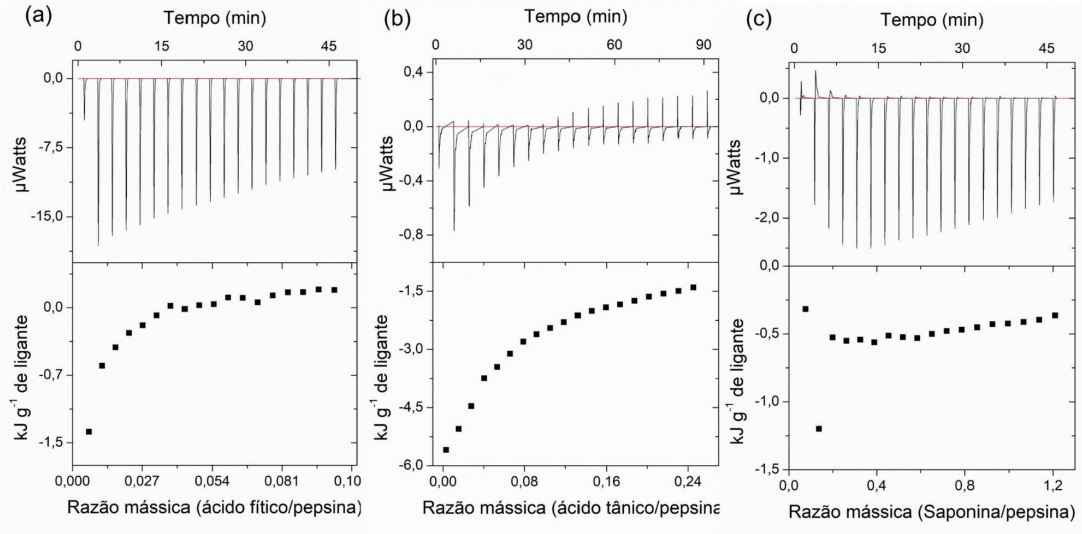
Nota: (a) tampão em tampão; (b) tampão em BSA; (c) saponina em tampão a 25 °C; (d) saponina em tampão a 37 °C (e) saponina em tampão a 75 °C.
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A7 – CURVAS CONTROLE OBTIDAS POR ITC CORRESPONDENTES AOS EXPERIMENTO APRESENTADOS NA SEÇÃO 4.5



Nota: (a) titulação de tampão em tampão; (b) titulação do AT em tampão; (c) titulação de tampão em AF; (d) titulação de tampão em SCQ; (e) titulação de tampão em BSA; (f) titulação do AF em SCQ; (g) titulação do AT em AF; (h) titulação do AF em SCQ.
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A8 – ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ANTINUTRIENTES E PEPSINA POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA



Nota: (a) titulação do ácido fítico (AF) (3,3 mg/mL) em pepsina (6,5 mg/mL); (b) titulação do ácido tânico (AT) (8,5 mg/mL) em pepsina (6,9 mg/mL); (c) titulação da saponina da casca de *Quillaja* (SCQ) (15,2 mg/mL) em pepsina (2,5 mg/mL). Os experimentos foram realizados em pH 3,0 e a pepsina não foi dialisada para evitar a autólise. As condições experimentais foram temperatura de 37 °C e agitação de 700 rpm. Utilizou-se uma injeção de 0,5 µL seguida de 18 injeção de 2 µL com intervalo de 150 s para titulação de AF e SCQ em pepsina e de 300 s para titulação do AT em pepsina.

FONTE: O autor (2019).

APÊNDICE II – TESTE DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE MÉDIAS

TABELA A1 - TESTE DE TUKEY APLICADO A RESULTADOS OBTIDOS PARA INTERAÇÃO ENTRE BSA E ÁCIDO FÍTICO OU ÁCIDO TÂNICO EM pH 3,0 E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES

		Calorimetria de titulação isotérmica						
		10 °C	**25 °C**	**37 °C**	**60 °C**	**80 °C**	**FI 10 mM**	**FI 100 mmol/L**
Ácido fítico	n	$11,0 \pm 0,6^{a}$	$9,4 \pm 0,4^{abA}$	$8,8 \pm 0,4^{b}$	$11,35 \pm 1,1^{a}$	$9,5 \pm 0,6^{ab}$	$9,2 \pm 0,7^{A}$	Interação fraca
	$K_a \times 10^{-3}$ (M^{-1})	$28,0 \pm 1,1^{e}$	$258,7 \pm 37,2^{bA}$	$472,5 \pm 14,8^{a}$	$89,0 \pm 2,0^{d}$	$171,0 \pm 2,8^{c}$	$9,2 \pm 1,7^{B}$	
	ΔH (kJ/mol)	$-59,8 \pm 1,8^{b}$	$-34,8 \pm 0,6^{cA}$	$-23,4 \pm 0,5^{c}$	$-41,5 \pm 5,0^{bc}$	$-91,6 \pm 9,0^{a}$	$-56,4 \pm 4,7^{A}$	
	TΔS (kJ/mol)	$-25,7 \pm 1,6^{ab}$	$-3,9 \pm 0,7^{cB}$	$9,8 \pm 0,6^{c}$	$-9,9 \pm 5,1^{bc}$	$-57,7 \pm 6,7^{a}$	$-33,9 \pm 4,6^{A}$	
	ΔG (kJ/mol)	$-24,1 \pm 0,2^{b}$	$-30,9 \pm 0,4^{aA}$	$-33,2 \pm 0,1^{a}$	$-31,6 \pm 0,1^{a}$	$-33,8 \pm 2,2^{a}$	$-22,4 \pm 0,2^{A}$	
Ácido tânico	n	$4,8 \pm 0,4^{c}$	$15,8 \pm 0,4^{bC}$	$25,4 \pm 0,4^{a}$	$10,8 \pm 2,3^{b}$	$11,4 \pm 0,6^{b}$	$22,8 \pm 2,0^{B}$	$36,6 \pm 0,6^{A}$
	$K_a \times 10^{-3}$ (M^{-1})	$4,1 \pm 0,1^{c}$	$6,6 \pm 0,6^{bB}$	$10,8 \pm 0,6^{a}$	$3,7 \pm 0,1^{c}$	$1,7 \pm 0,2^{d}$	$6,4 \pm 2,1^{B}$	$29,4 \pm 4,9^{A}$
	ΔH (kJ/mol)	$-189,8 \pm 15,1^{a}$	$-65,0 \pm 9,8^{bB}$	$-27,7 \pm 0,1^{c}$	$-63,9 \pm 0,9^{b}$	$-69,4 \pm 4,0^{b}$	$-52,3 \pm 8,2^{AB}$	$-28,4 \pm 0,2^{A}$
	TΔS (kJ/mol)	$-170,3 \pm 15^{a}$	$-43,0 \pm 9,9^{bB}$	$-3,6 \pm 0,2^{c}$	$-41,1 \pm 0,7^{b}$	$-47,5 \pm 3,7^{b}$	$-30,6 \pm 9,1^{AB}$	$-2,9 \pm 0,3^{A}$
	ΔG (kJ/mol)	$-19,5 \pm 0,1^{d}$	$-21,9 \pm 0,2^{cB}$	$-24,1 \pm 0,1^{a}$	$-22,8 \pm 0,2^{b}$	$-21,9 \pm 0,3^{a}$	$-21,7 \pm 0,8^{A}$	$-25,5 \pm 0,4^{AB}$

	Digestibilidade proteica *in vitro* (%)							
	Sem tratamento	**Autoclave**	**Fervura**	**NaCl 25 mmol/L**	**NaCl 50 mmol/L**	**NaCl 75 mmol/L**	**NaCl 100 mmol/L**	**Controle**
Ácido fítico	$79,7 \pm 0,4^{cC}$	$82,5 \pm 1,9^{bc}$	$88,2 \pm 1,4^{b}$	$97,7 \pm 1,7$	$96,3 \pm 2,0^{B}$	$97,0 \pm 0,4^{AB}$	$98,7 \pm 0,1^{A}$	$96,6 \pm 0,7^{aAB}$
Ácido tânico	$51,9 \pm 4,2^{bC}$	$66,0 \pm 2,1^{b}$	$69,3 \pm 2,8^{b}$	$59,4 \pm 4,6^{B}$	$61,6 \pm 5,6^{B}$	$37,7 \pm 1,5^{D}$	$29,8 \pm 1,2^{E}$	$96,6 \pm 0,7^{aA}$

n: relação estequiométrica; K_a: constante de afinidade; ΔH: mudança de entalpia; T: temperatura; ΔS: mudança de entropia; ΔG: energia livre de Gibbs; FI: força iônica. Médias seguidos pelas mesmas letras não diferem na linha com um nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey. Para comparação entre interação de AF e BSA a 10 mmol/L de força iônica e sem adição de sal, foi utilizado o teste t de Student. Dados correspondentes aos apresentados na seção 4.1.

FONTE: O autor (2019).

APÊNDICE III – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MODELOS OBTIDOS PARA A TURBIDEZ DOS SISTEMAS TERNÁRIOS E DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* DAS MISTURAS DE ANTINUTRIENTES

TABELA A2 - COEFICIENTES ESTIMADOS E VALORES DE p OBTIDOS PELO MODELO ESPECIAL CÚBICO DESCREVENDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA, FITATO DE SÓDIO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ.

	Turbidez (%)					
	BSA-NaP-$MgCl_2$	**p**	**BSA-NaP-$CaCl_2$**	**p**	**BSA-NaP-$MnCl_2$**	**p**
β_1	-0,38	0,95	5,26	0,71	6,97	0,76
β_2	2,37	0,69	-0,87	0,95	-0,82	0,97
β_3	4,81	0,44	1,90	0,90	2,80	0,90
$\beta_{1,2}$	10,12	0,73	24,23	0,73	16,15	0,88
$\beta_{1,3}$	3,67	0,90	9,90	0,89	18,30	0,87
$\beta_{2,3}$	-1,14	0,97	**372,03**	**0,01**	**358,59**	**0,04**
$\beta_{1,2,3}$	43,44	0,82	**1035,32**	**0,09**	1453,16	0,12
R^2	0,204		0,959		0,914	

Nota: os sobrescritos 1, 2 e 3 são BSA, fitato de sódio e cátion divalente, respectivamente. β é o parâmetro estimado para um único componente (1; 2; 3), interação binária (1,2; 1,3; 2,3) e termos ternários (1, 2, 3). Foi considerado como significativo os dados com valor de p≤0,10 (em negrito). Dados correspondentes aos apresentados na seção 4.2.
FONTE: O autor (2019).

TABELA A3 - VALORES DE TURBIDEZ (%) PARA CADA PONTO DE PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA AS MISTURAS M^{2+}-NaP-BSA

	Dados codificados de concentração			Turbidez (%)		
n	**BSA**	**NaP**	**M^{2+}**	**BSA-NaP-$MgCl_2$**	**BSA-NaP-$CaCl_2$**	**BSA-NaP-$MnCl_2$**
1	1,00	0,00	0,00	0,4±0,2 ^{c}	0,4±0,2 ^{f}	0,4±0,2 ^{b}
2	0,00	1,00	0,00	2,8±1,4 ^{bc}	2,8±1,4 ^{f}	2,8±1,4 ^{b}
3	0,00	0,00	1,00	2,5±1,4 ^{bc}	0,7±1,3 ^{f}	0,0±0,0 ^{b}
4	0,50	0,50	0,00	4,7±1,2 ^{b}	7,1±0,8 ^{e}	4,5±0,8 ^{b}
5	0,50	0,00	0,50	1,5±1,5 ^{bc}	0,0±0,0 ^{f}	0,1±0,1 ^{b}
6	0,00	0,50	0,50	1,4±0,9 ^{bc}	96,1±0,0 ^{a}	91,5±6,7 ^{a}
7	0,67	0,17	0,17	2,1±0,3 ^{bc}	54,0±2,5 ^{d}	71,2±23,0 ^{a}
8	0,17	0,67	0,17	4,0±2,3 ^{b}	55,3±0,6 ^{d}	64,9±27,9 ^{a}
9	0,17	0,17	0,67	13,1±0,9 ^{a}	70,1±2,4 ^{c}	86,3±11,5 ^{a}
10	0,33	0,33	0,33	1,9±2,4 ^{bc}	78,5±1,2 ^{b}	83,2±13,9 ^{a}

Nota: Médias seguidas pela mesma letra em colunas não diferem estatisticamente com nível de confiança de 95% de acordo com o teste de Tukey.
FONTE: O autor (2019).

TABELA A4 - COEFICIENTES ESTIMADOS COM O VALORES DE p OBTIDOS PELO MODELO ESPECIAL CÚBICO DESCREVENDO O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA, ÁCIDO TÂNICO E CÁTIONS DIVALENTES NA TURBIDEZ.

	$MgCl_2$-AT-BSA	p	$CaCl_2$-AT-BSA	p	$MnCl_2$-AT-BSA	p
β_1	-4,286	0,8573	-7,204	0,7320	8,509	0,7550
β_2	4,070	0,8644	11,389	0,5942	6,385	0,8141
β_3	10,547	0,6630	6,566	0,7545	2,362	0,9304
$\beta_{1,2}$	7,334	0,9511	0,839	0,9936	36,162	0,7916
$\beta_{1,3}$	21,103	0,8604	-2,746	0,9791	20,274	0,8817
$\beta_{2,3}$	95,387	0,4504	**389,289**	**0,0274**	**363,189**	**0,0625**
$\beta_{1,2,3}$	826,264	0,3381	1392,034	0,1164	1656,257	0,1386
R^2	0,632		0,937		0,892	

Nota: os sobrescritos 1, 2 e 3 são BSA, fitato de sódio e cátion divalente, respectivamente. β é o parâmetro estimado para um único componente (1; 2; 3), interação binária (1,2; 1,3; 2,3) e termos ternários (1, 2, 3). Foi considerado como significativo os dados com valor de p≤0,10 (em negrito). Dados correspondentes aos apresentados na seção 4.3.
FONTE: O autor (2019)

TABELA A5 - VALORES DE TURBIDEZ (%) PARA CADA PONTO DE PLANEJAMENTO SIMPLEX LATTICE PARA AS MISTURAS M2+-AT-BSA

	Dados codificados de concentração			Turbidez (%)		
n	**BSA**	**AT**	**M^{2+}**	**BSA-AT-$MgCl_2$**	**BSA-AT-$CaCl_2$**	**BSA-AT-$MnCl_2$**
1	1,00	0,00	0,00	0,4±0,2 ^{h}	0,4±0,2 ^{e}	0,4±0,2 ^{b}
2	0,00	1,00	0,00	9,3±1,7 ^{ef}	9,3±1,7 ^{cd}	9,3±1,7 ^{b}
3	0,00	0,00	1,00	1,0±0,3 ^{h}	0,0±0,0 ^{e}	0,0±0,0 ^{b}
4	0,50	0,50	0,00	11,6±2,1 ^{e}	7,7±4,1 ^{d}	11,2±10,2 ^{b}
5	0,50	0,00	0,50	3,5±1,1 ^{gh}	0,0±0,0 ^{e}	0,0±0,0 ^{b}
6	0,00	0,50	0,50	26,8±0,3 ^{c}	97,6±1,2 ^{a}	95,7±5,8 ^{a}
7	0,67	0,17	0,17	6,4±1,1 ^{fg}	13,0±2,8 ^{c}	86,2±19,5 ^{a}
8	0,17	0,67	0,17	15,2±0,9 ^{d}	84,1±1,4 ^{b}	80,7±31,4 ^{a}
9	0,17	0,17	0,67	63,8±2,1 ^{a}	94,7±0,1 ^{a}	93,1±10,2 ^{a}
10	0,33	0,33	0,33	48,7±1,5 ^{b}	94,8±0,2 ^{a}	90,8±13,7 ^{a}

Nota: Médias seguidas pela mesma letra em colunas não diferem estatisticamente com nível de confiança de 95% de acordo com o teste de Tukey.
FONTE: O autor (2019).

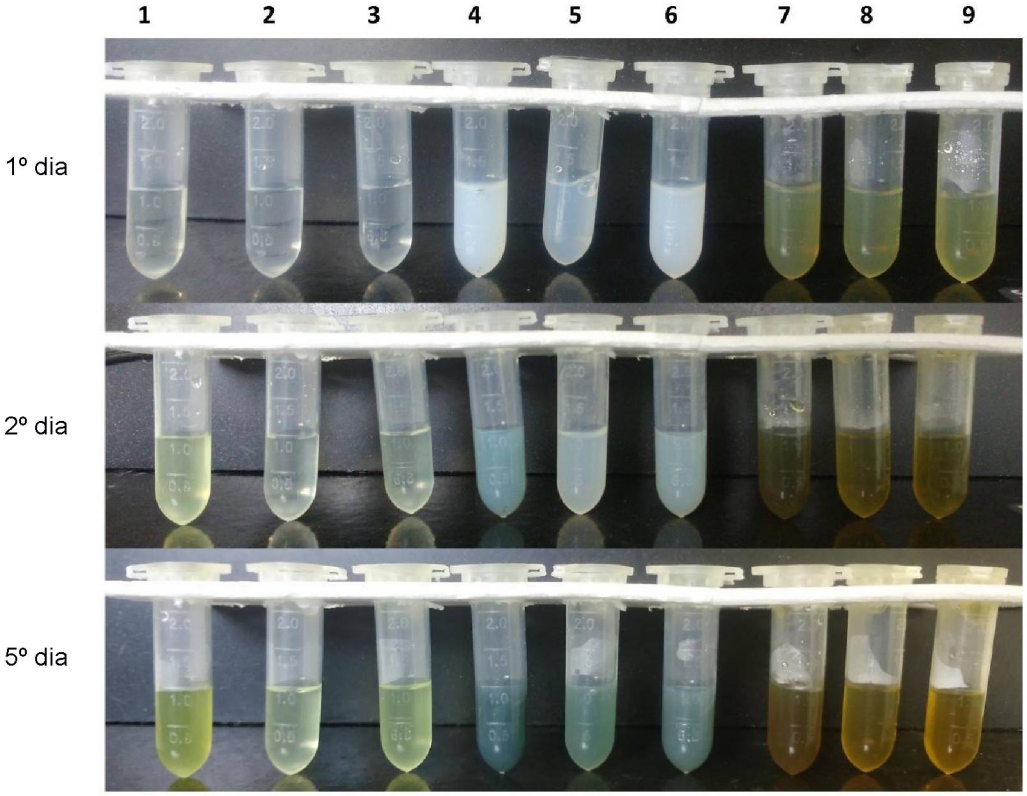
TABELA A6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A DIGESTIBILIDADE PROTÉICA IN VITRO DE MISTURAS DE ÁCIDO TÂNICO (TA), ÁCIDO FÍTICO (PA) E SAPONINA DE CASCA DE QUILLAJA (SCQ)

Parâmetro	SS	Grau de liberdade	MS	F	p
AF (1)	281,733	1	281,733	90,3929	0,010883
AT (2)	1253,021	1	1253,021	402,0261	0,002478
SCQ (3)	322,826	1	322,826	103,5774	0,009517
1*2	34,932	1	34,932	11,2076	0,078820
1*3	154,004	1	154,004	49,4115	0,019644
2*3	45,224	1	45,224	14,5099	0,062524
1*2*3	59,448	1	59,448	19,0736	0,048635
Falta de ajuste	0,264	1	0,264	0,085	0,798
Erro puro	6,234	2	3,117		
Total SS	2157,686	10			

FONTE: O autor (2019).

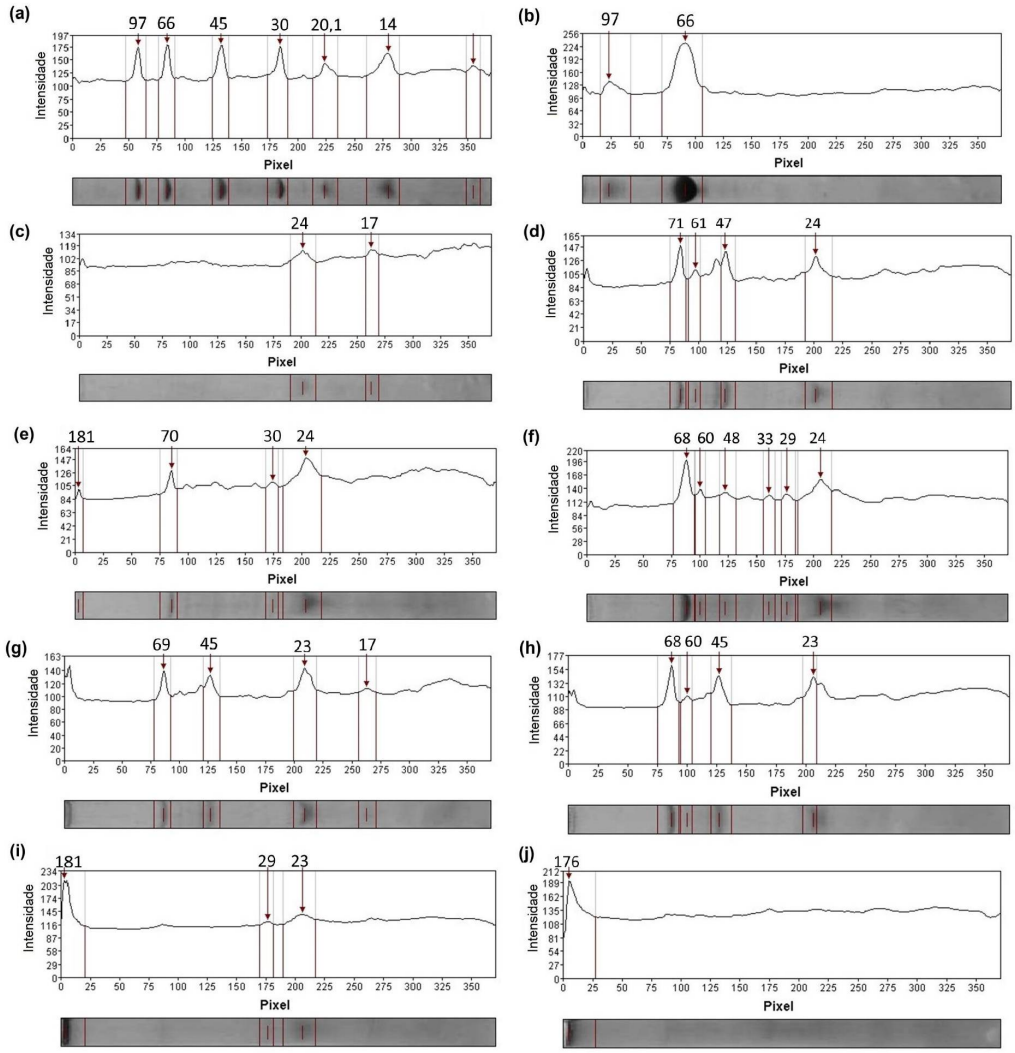
APÊNDICE IV – ASPECTO VISUAL DOS COMPLEXOS TERNÁRIOS FORMADOS PELO ÁCIDO TÂNICO, CÁTIONS DIVALENTE E BSA E ELETROFORESE DOS COMPLEXOS HIDROLISADOS E ENZIMAS DIGESTIVAS

FIGURA A9 - ASPECTO VISUAL DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE BSA, TA E CÁTIONS DIVALENTES NO PRIMEIRO DIA, SEGUNDO DIA E QUINTO DE ARMAZENAMENTO.



Nota: (1) $MgCl_2$:TA; (2) $MgCl_2$:TA:BSA (250:50:1); (3) $MgCl_2$:TA:BSA (625:50:1); (4) $CaCl_2$:TA;(5) $CaCl_2$:TA:BSA (250:50:1); (6) $CaCl_2$:TA:BSA (625:50:1); (7) $MnCl_2$:TA; (8) $MnCl_2$:TA:BSA (250:50:1); (9) $MnCl_2$:TA:BSA (625:50:1).
FONTE: O autor (2019).

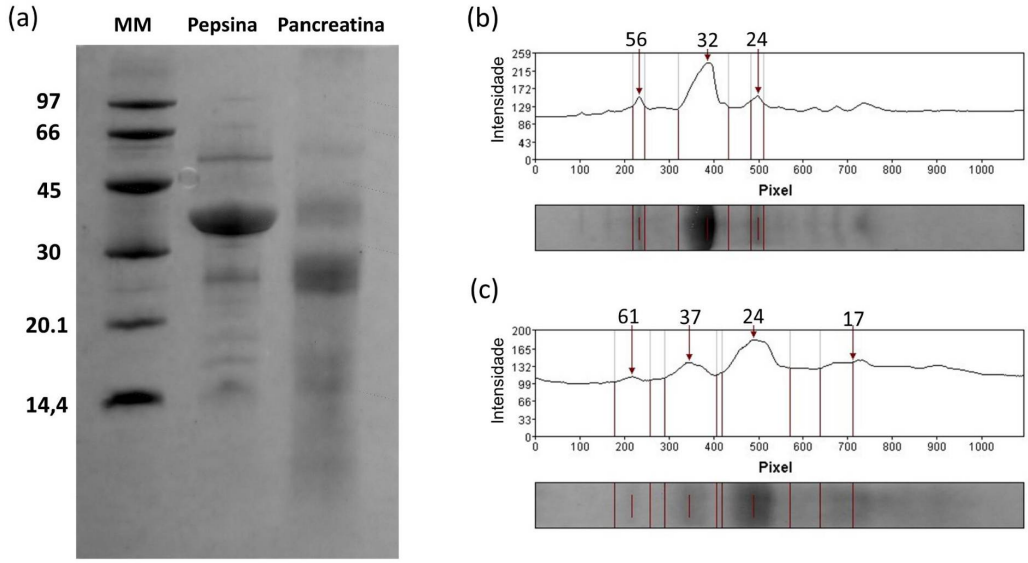
FIGURA A10 - DENSITOMETRIA DAS BANDAS DE ELETROFORESE PARA AS AMOSTRAS OBTIDAS APÓS ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*



Nota: (a) padrões de massa molar; (b) albumina de soro bovino; (c) controle; (d) AT:BSA (50:1); (e) $MgCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (f) $MgCl_2$:AT:BSA (625:50:1); (g) $CaCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (h) $CaCl_2$:AT:BSA (625:50:1); (i) $MnCl_2$:AT:BSA (250:50:1); (j) $MnCl_2$:AT:BSA (625:50:1). O número acima das setas indica a massa molar das bandas calculada com o auxílio do *software* Gel Analyzer (http://www.gelanalyzer.com/).

FONTE: O autor (2019).

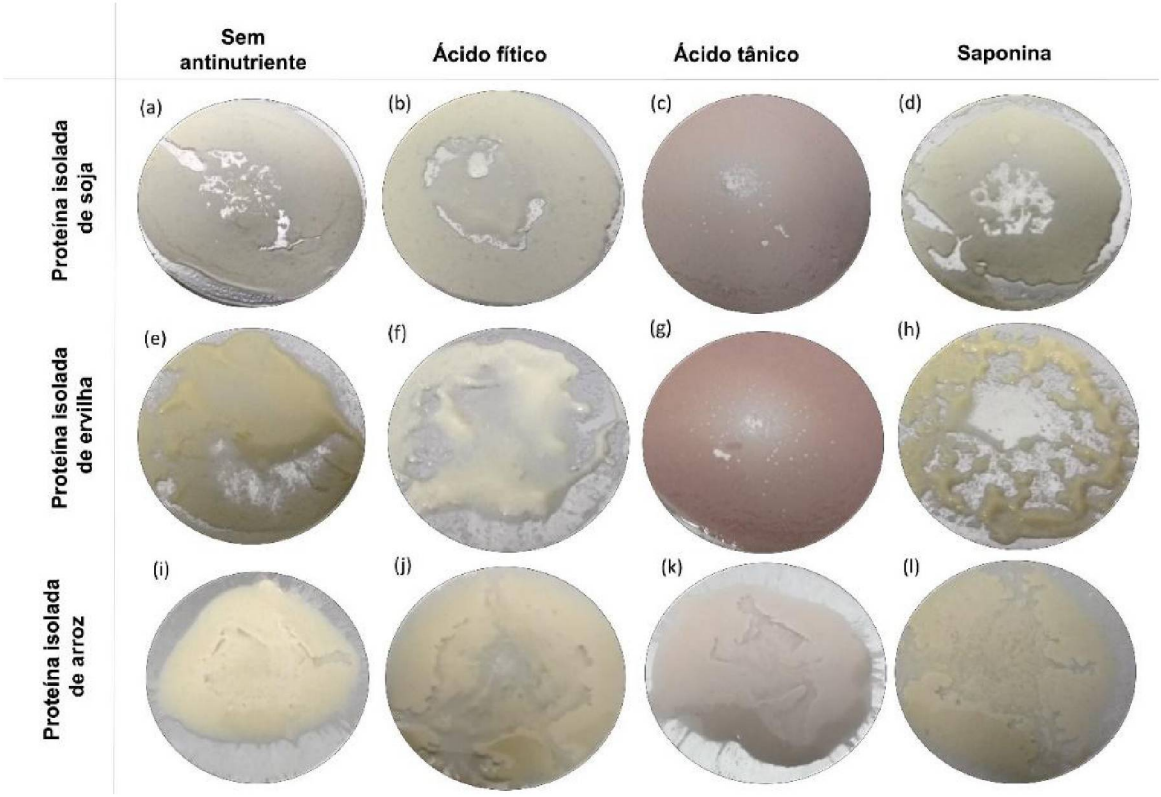
FIGURA A11 – ELETROFORESE EM GEL DE TRIS-TRICINA E DENSITOMETRIA DAS BANDAS PARA AMOSTRAS DE PEPSINA E PANCREATINA UTILIZADAS NA ANÁLISE DE DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO*



Nota: (a) eletroforese; (b) densitometria das bandas de eletroforese para a amostra de pepsina; (c) densitometria das bandas de eletroforese para a amostra de pancreatina. A faixa denominada MM contém padrões de massa molar, com suas respectivas massas em kDa. Foram aplicados 10 µL de pepsina e 20 µL de pancreatina de soluções na concentração de 10 mg/mL. O número acima das setas indica a massa molar das bandas calculada com o auxílio do *software* Gel Analyzer (http://www.gelanalyzer.com/).
FONTE: O autor (2019).

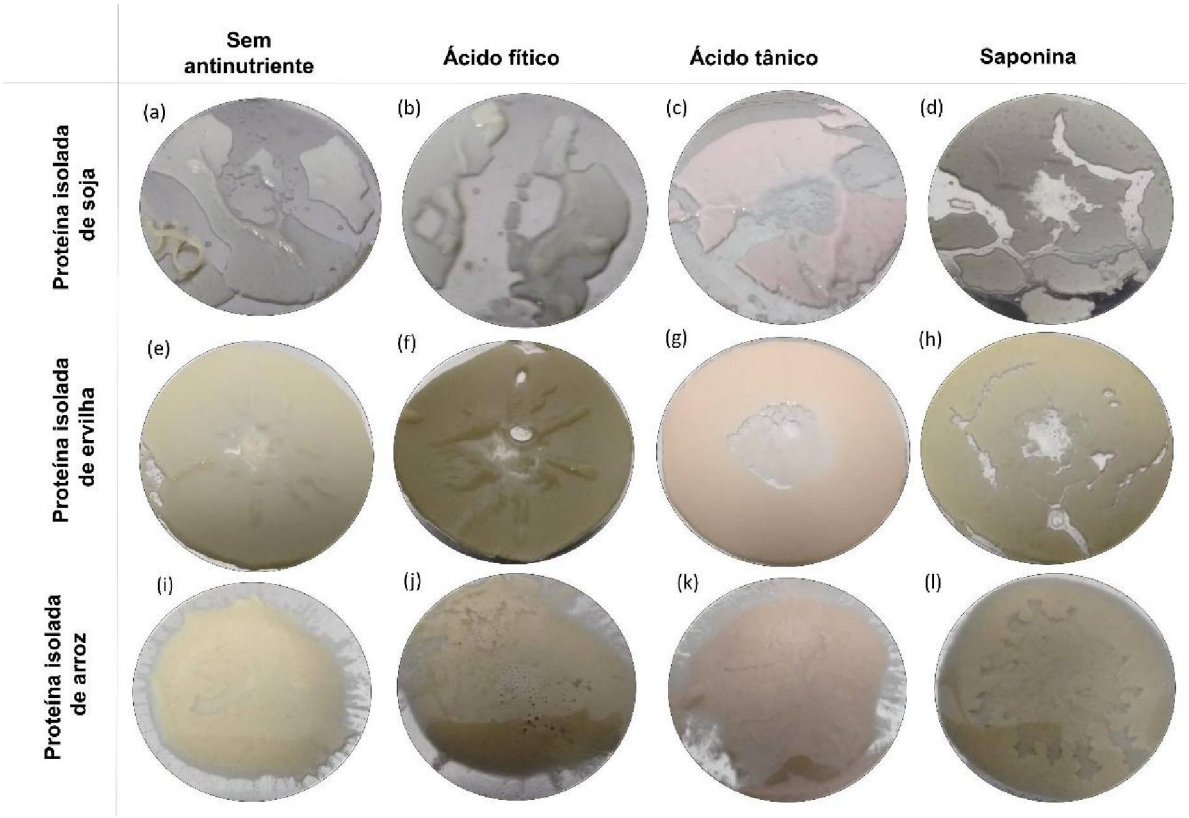
APÊNDICE V – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS APÓS ANÁLISE REOLÓGICA

FIGURA A12 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS EM pH 3,0 APÓS ANÁLISE REOLÓGICA



Nota: (a) IPS; (b) IPS-AF; (c) IPS-AT; (d) IPS-SCQ; (e) IPE; (f) IPE-AF; (g) IPE-AT; (h) IPE-SCQ; (i) IPA; (j) IPA-AF; (k) IPA-AT; (l) IPA-SCQ. A concentração dos isolados proteicos foi de 10% e dos ANs foi de 1%. As imagens das amostras foram adquiridas logo após as análises e estão sob o sensor do reômetro no qual as análises foram realizadas.
FONTE: O autor (2019).

FIGURA A13 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS EM pH 7,0 APÓS ANÁLISE REOLÓGICA



Nota: (a) IPS; (b) IPS-AF; (c) IPS-AT; (d) IPS-SCQ; (e) IPE; (f) IPE-AF; (g) IPE-AT; (h) IPE-SCQ; (i) IPA; (j) IPA-AF; (k) IPA-AT; (l) IPA-SCQ. A concentração dos isolados proteicos foi de 10% e dos ANs foi de 1%. As imagens das amostras foram adquiridas logo após as análises e estão sob o sensor do reômetro no qual as análises foram realizadas.
FONTE: O autor (2019).

ANEXO I – PERMISSÃO ACS PUBLICATIONS

Copyright Clearance Center RightsLink®

Home | Create Account | Help

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title: Influence of Ternary Complexation between Bovine Serum Albumin, Sodium Phytate, and Divalent Salts on Turbidity and In Vitro Digestibility of Protein

Author: Elaine Kaspchak, Luciana Igarashi-Mafra, Marcos R. Mafra

Publication: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Oct 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

LOGIN

If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials.

Already **a RightsLink user** or want to learn more?

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

BACK | CLOSE WINDOW

Copyright © 2018 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. Privacy statement. Terms and Conditions.
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com