



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS



**ALFA-LACTOALBUMINA E BETA-LACTOGLOBULINA:
PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS, SÍNTESE E
CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS**

JAMILLY RIBEIRO LOPES

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL**

2011

JAMILLY RIBEIRO LOPES

**ALFA-LACTOALBUMINA E BETA-LACTOGLOBULINA: PROPRIEDADES
TÉCNICO-FUNCIONAIS, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOESTRUTURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “*Strictu Senso*”, em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora:

Prof.^a D.Sc. Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-orientador:

Prof.^o D.Sc. Álvaro Vianna Novais de Carvalho Teixeira

ITAPETINGA

BAHIA – BRASIL

2011

620.5 L853p	<p>Lopes, Jamilly Ribeiro. Alfa-Lactoalbumina e Beta-Lactoglobulina: Propriedades técnico-funcionais, síntese e caracterização de nanoestruturas./ Jamilly Ribeiro Lopes. – Itapetinga-Ba: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), 2011. 88p. Il.</p> <p>Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Sensu</i>” do Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Sob a orientação da Prof^a. <i>D.Sc.</i> Jane Sélia dos Reis Coimbra e Co-orientação do Prof^o. <i>D.Sc.</i> Álvaro Vianna Novais de Carvalho Teixeira.</p> <p>Dissertação normalizada e revisada por Rogério Pinto de Paula – CRB 1654-5^a Reg.</p> <p>1. Engenharia de Processos de Alimentos – Nanoestruturas – α-Lactoalbumina e β-Lactoglobulina. 2. Nanoestruturas – Propriedades – Nanotecnologia – Síntese – Características. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos de Alimentos. II. Coimbra, Jane Sélia dos Reis (Orientadora). III. Teixeira, Álvaro Vianna Novais de Carvalho (Co-orientador). IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD(21): 620.5</p>
----------------	--

Catálogo na Fonte:

Rogério Pinto de Paula – CRB 1654-5^a Reg..
Diretor da Biblioteca Regina Célia Ferreira Silva – BIRCEFS
Presidente do Conselho de Bibliotecas da UESB
UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático Para Desdobramentos Por Assunto:

- 1 Engenharia de Processos de Alimentos: Nanoestruturas – α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina;
- 2 Nanoestruturas – Propriedades – Nanotecnologia – Síntese – Características.



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "ALFA-LACTOALBUMINA E BETA-LACTOGLOBULINA: PROPRIEDADES TÉCNICO-FUNCIONAIS, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS".

Autor: JAMILLY RIBEIRO LOPES

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra

Co-orientador: Prof^º. Dr^º. Álvaro Viana Novais de Carvalho

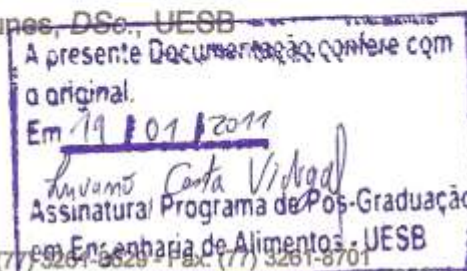
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.


Prof^ª. Dr^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra, DSc., UFV


Prof^ª. Dr^ª. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB


Prof^º. Dr^º. Genebaldo Sales Nunes, DSc., UESB

Data da Realização: 19 de janeiro de 2011.



Tenho muito a agradecer e a muitas pessoas, pois o meu mestrado foi fruto da ajuda de muitos indivíduos bons que Deus colocou em meu caminho.

Primeiramente meu louvor de agradecimento é dedicado ao Senhor, que como diz o salmista, me criou de uma forma tão maravilhosa. A ele dedico a minha existência...

Aos meus pais (João e Núbia) pela força e por acreditar em mim a cada passo da minha vida, a minha irmã Bruna e a minha sobrinha Belinha pela graça de suas companhias.

Ao meu esposo, Rodrigo, pelo apoio e amor incondicional.

A minha orientadora Jane por acreditar em mim e por me orientar durante o mestrado.

Ao meu co-orientador Álvaro, este merece um prêmio por me tolerar com tanta paciência, você é uma pessoa muito valiosa.

As minhas colegas de república, Dani, Carlinha, Angélica, Kelly, Marcinha, Juliane e Patrícia, foi uma experiência única morar com todas vocês, foi muito bom...

Aos meus colegas de laboratório, em especial Toninho, Fabíola, Rosana, Rita e Lizzy, não dá para esquecer o quanto fui ajudada por vocês, que Deus os abençoe.

A minha estagiária Raphaela, por ser tão calminha e boazinha.

Ao pessoal do laboratório do professor Rubén Sinisterra e em especial a Juliana, Fred e Joel pela orientação e suporte em Belo Horizonte.

Ao grupo de Microscopia e Microanálises da UFV e ao laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV.

A Renata Bonomo pela ajuda no estágio final.

A minha grande amiga Galzita por sua amizade e ajuda.

Desejo a todos, familiares, mestres e amigos que Deus os abençoe hoje e por toda vida!

Agradeço!

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso estamos alegres” (Sl 126.3)

RESUMO

LOPES, Jamilly Ribeiro, **Nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina**. Itapetinga-Ba: UESB, 2011, 88p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos) *.

Nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina foram sintetizadas pelo processo de gelificação e caracterizadas usando Solubilidade, Potencial Zeta, Espalhamento Dinâmico de Luz, Distribuição de Tamanho das Partículas, Microscopia de Transmissão Eletrônica e a Microscopia de Força Atômica. Avaliou-se também para as proteínas puras α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina a Solubilidade, Índice da Atividade Emulsificante (EAI), Estabilidade da Emulsão (ES), Potencial Zeta, Tamanho das Partículas, Espalhamento Dinâmico de Luz, Calorimetria Titulação Isotérmica. A solubilidade para as duas proteínas foi cerca de 90%, ocorreu somente uma alteração nos valores de solubilidade no pH de 4,6 para a α -Lactoalbumina, em torno do seu pI, apresentando os menores valores (36,4 – 48,2%). A solubilidade das nanoestruturas varia de 70,7 a 99,4 e é predominantemente influenciada pela β -Lactoglobulina. O Índice da Atividade Emulsificante aumentou à medida que aumentou a concentração de sal e proteína e a Estabilidade da Emulsão obteve valor máximo de 93,3% na concentração de 0,05% de proteína. Na calorimetria o sistema β -Lactoglobulina em α -Lactoalbumina foi espontâneo e exotérmico com estequiometria de associação de 2:1. O Espalhamento Dinâmico de Luz forneceu raios das nanoestruturas na faixa de (22 a 265,3) nm para o tempo de aquecimento de 30 minutos a 80°C, binômio tempo e temperatura ideal para a formação das nanoestruturas. O Potencial Zeta em função do pH para as proteínas isoladas, misturadas e como nanoestruturas foi positivos para condições acima do pI e negativos para pH abaixo do pI. A formação de nanoestruturas estáveis ocorreu a partir da concentração de 2 mg/mL de proteínas. A análise da distribuição do tamanho das partículas indicou aglomeração das proteínas em condição de pH próximas aos seus pIs. Nos demais valores de pH apresentaram raios mínimos indicando formas mais simples como monômeros e dímeros. A Microscopia de Transmissão Eletrônica indicou que o raio das nanopartículas variou entre (2,5 a 6) nm e para a Microscopia de Força Atômica o raio foi de 12,4 nm. As nanoestruturas obtidas foram uniformes e predominantemente esféricas.

Palavras-chave: Nanoestruturas, β -Lactoglobulina, α -Lactoalbumina.

*Orientadora: Prof^a. Jane Sélia dos Reis Coimbra, *D.Sc.*, UFV e Co-orientador: Prof^o. Álvaro Vianna Novais de Carvalho Teixeira, *D.Sc.*, UFV.

ABSTRAT

LOPES, Jamilly Ribeiro, **Nanostructures of α -Lactoalbumin and β -Lactoglobulin**. Itapetinga-Ba: UESB, 2011, 88p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos) *.

In this work we studied the production of nanostructures of α -Lactalbumin and β -lactoglobulin at gelation process and characterized using Solubility, Zeta Potential, Dynamic Light Scattering, Particle Size Distribution, Transmission Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy. Was also evaluated for the pure protein α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin the Solubility, Emulsification activity index (EAI), emulsion stability (ES), Zeta Potential, Particle Size, Dynamic Light Scattering, Isothermal Titration Calorimetry. The solubility for both proteins was about 90%, occurred only a change in the solubility values at pH 4.6 for α -Lactalbumin, around your IP, showing the lowest values (36.4 to 48.2 %). The solubility of the nanostructures varies from 70.7 to 99.4 and is predominantly influenced by β -lactoglobulin. The Emulsification activity index increased as increased the concentration of salt and protein and emulsion stability obtained maximum value of 93.3% at a concentration of 0.05% protein. Calorimetry system in β -lactoglobulin in α -Lactalbumin was spontaneous and exothermic with stoichiometry of 2:1. The Dynamic Light Scattering provided rays of the nanostructures in the range (22 to 265.3) nm for the heating time of 30 minutes at 80 ° C, a binomial ideal time and temperature for the formation of nanostructures. The data of Zeta Potential as a function of pH for the proteins isolated, not mixed and varied as nanostructures, and values were positive for conditions above the pI, and negative for pH below the pI. The formation of stable nanostructures occurred at concentrations of 2 mg / mL protein. Analysis of the distribution of particle size indicated clustering of proteins on pH condition near their Ips. In the other pH values showed minimum radii indicating simpler forms as monomers and dimmers. The Transmission Electron Microscopy showed that the radius of nanoparticles ranged between (2.5 to 6) nm and the Atomic Force Microscopy radius was 12.4 nm. The nanostructures obtained were predominantly spherical and uniform.

Key words: Nanostructures, β -Lactoglobulin, α -Lactoalbumin.

*Adviser: Prof^ª. Jane Sélia dos Reis Coimbra, D.Sc., UFV e Co-Adviser: Prof^º. Álvaro Vianna Novais de Carvalho Teixeira, D.Sc., UFV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação de uma titulação calorimétrica de variação de entalpia (Δh°) por razão molar (N).....	27
Figura 2 -	Representação esquemática do Potencial Zeta.....	28
Figura 3 -	Componentes básicos de um espalhador de luz.....	30
Figura 4 -	Variável $A(t)$ cujo valor flutua no tempo em torno de seu valor médio $\langle A \rangle$ que independe do tempo. O eixo do tempo é dividido em intervalos discretos Δt	31
Figura 5 -	Configuração típica de um TEM (Tosin, 2000).....	34
Figura 6 -	Gráfico da Solubilidade da α -Lactoalbumina em diferentes pHs e em função da concentração de proteína.....	51
Figura 7 -	Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da α -Lactoalbumina.....	52
Figura 8 -	Gráfico da solubilidade da β -Lactoglobulina em diferentes pHs em função da concentração de proteína.....	52
Figura 9 -	Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da β -Lactoglobulina.....	53
Figura 10 -	Gráfico da solubilidade das Nanoestruturas em função pHs.....	54
Figura 11 -	Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina em função da concentração NaCl e de proteína em óleo de soja.....	59
Figura 12 -	Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina em função da concentração de NaCl e de proteína em óleo de oliva.....	59
Figura 13 -	Índice da Atividade Emulsificante da β -lactoglobulina em função da concentração de sal e de proteína em óleo de soja.....	60
Figura 14 -	Curva de Titulação Calorimétrica da β – Lactoglobulina em α -Lactoalbumina.....	61
Figura 15 -	Gráfico do Potencial Zeta da α -Lactoalbumina pura em solução aquosa, em função do pH.....	63
Figura 16 -	Gráfico do Potencial Zeta da β -Lactoglobulina pura em solução aquosa, em função do pH.....	63
Figura 17 -	Gráfico do Potencial Zeta da mistura de α -Lactoalbumina e β -	

	Lactoglobulina, pura em solução aquosa, em função do pH.....	64
Figura 18 -	Gráfico do Potencial Zeta das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, em função do pH.....	65
Figura 19 -	Gráfico do Potencial Zeta das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em função da concentração das proteínas.....	65
Figura 20 -	Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina e das nanoestruturas com 15 minutos de aquecimento.....	69
Figura 21 -	Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina e das nanoestruturas com 30 minutos de aquecimento.....	69
Figura 22 -	Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina e das nanoestruturas com 90 minutos de aquecimento.....	70
Figura 23 -	Tempos de decaimento da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 15 minutos de aquecimento.....	71
Figura 24 -	Tempos de decaimento da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 30 minutos de aquecimento.....	71
Figura 25 -	Tempos de decaimento da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 90 minutos de aquecimento.....	71
Figura 26 -	Microscopia de Transmissão Eletrônica das nanoestruturas num aumento de 20000 x.....	74
Figura 27 -	Raios das partículas da Microscopia de Transmissão Eletrônica num aumento de 50000 x.....	74
Figura 28 -	Microscopia de Transmissão Eletrônica das nanoestruturas das nanoestruturas num aumento de 12000 x.....	74
Figura 29 -	Microscopia de Força Atômica das nanoestruturas.....	75
Figura 30 -	Perfil das nanoestruturas da figura 29.....	76
Figura 31 -	Microscopia de Força Atômica das nanoestruturas.....	76
Figura 32 -	Gráfico do perfil das nanoestruturas da figura 31.....	76
Figura 33 -	Microscopia de Força Atômica das nanoestruturas.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 3,0 em função da concentração de NaCl.....	44
Tabela 2 -	Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 4,6 em função da concentração de NaCl.....	45
Tabela 3 -	Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 5,4 em função da concentração de NaCl.....	45
Tabela 4 -	Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 7,6 em função da concentração de NaCl.....	46
Tabela 5 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 3,0 em função da concentração de NaCl.....	47
Tabela 6 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 4,6 em função da concentração de NaCl.....	48
Tabela 7 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 5,4 em função da concentração de NaCl.....	48
Tabela 8 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 7,6 em função da concentração de NaCl.....	48
Tabela 9 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina em função do pH e da concentração de proteína.....	50
Tabela 10 -	Solubilidade da β -Lactoglobulina em função do pH e da concentração de proteína.....	50
Tabela 11 -	Solubilidade das Nanoestruturas em função do pH.....	53
Tabela 12 -	Solubilidade da α -Lactoalbumina, β -Lactoglobulina e das Nanoestruturas em função do pH.....	55
Tabela 13 -	ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.....	55
Tabela 14 -	ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da α -Lactoalbumina para o óleo de oliva.....	55
Tabela 15 -	ANOVA da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.....	56
Tabela 16 -	ANOVA da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de oliva.....	56

Tabela 17 -	ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.....	56
Tabela 18 -	ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.....	56
Tabela 19 -	ANOVA da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.....	56
Tabela 20 -	ANOVA da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.....	57
Tabela 21 -	Regressão da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.....	57
Tabela 22 -	Regressão da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.....	57
Tabela 23 -	Regressão do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.....	58
Tabela 24 -	Parâmetros termodinâmicos do sistema β – Lactoglobulina em α -Lactoalbumina.....	62
Tabela 25 -	Raio hidrodinâmico da α -Lactoalbumina em função do pH.....	66
Tabela 26 -	Raio hidrodinâmico da β -Lactoglobulina em função do pH.....	67
Tabela 27 -	Diferentes formas estruturais da β -Lactoglobulina em função do pH.....	67
Tabela 28 -	Raio hidrodinâmico das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em função da concentração das proteínas, no pH 7,3.....	68
Tabela 29 -	Raios Hidrodinâmicos das misturas de α - Lactoalbumina e β -Lactoglobulina e das nanoestruturas.....	72

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	14
2 -	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 -	Proteínas do soro do leite.....	16
2.1.1 -	β -Lactoglobulina.....	16
2.1.1.1 -	Função biológica e funcional da β -Lactoglobulina.....	16
2.1.2 -	α -Lactoalbumina.....	17
2.1.2.1 -	Função biológica e funcional da α -Lactoalbumina.....	18
2.2 -	Nanotecnologia e Nanoestruturas.....	18
2.2.1 -	Aplicações da Nanotecnologia na área de alimentos.....	20
2.3 -	Solubilidade.....	22
2.4 -	Emulsão.....	23
2.4.1 -	Métodos turbidimétricos.....	24
2.5 -	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	25
2.6 -	Potencial Zeta.....	27
2.7 -	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	30
2.8 -	Microscopia Eletrônica de Transmissão Eletrônica (TEM).....	33
2.9 -	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	35
3 -	OBJETIVOS.....	36
3.1 -	Objetivo Geral.....	36
3.2 -	Objetivos Específicos.....	36
4 -	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 -	Materiais e Métodos.....	37
4.2 -	Nanoestruturas de α - Lactoalbumina e β -Lactoglobulina.....	37
4.3 -	Solubilidade.....	38
4.4 -	Solubilidade das Nanoestruturas.....	38
4.5 -	Emulsão.....	39
4.5.1 -	Determinação da Fração de Volume de Óleo.....	39
4.5.2 -	Determinação do Índice da Atividade Emulsificante (EAI) e Estabilidade da Emulsão (ES).....	40

4.6 -	Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	40
4.7 -	Potencial Zeta.....	41
4.8 -	Determinação do tamanho das partículas	41
4.9 -	Espalhamento Dinâmico de Luz.....	42
4.10 -	Microscopia de Transmissão Eletrônica.....	42
4.11 -	Microscopia de Força Atômica.....	43
4.12 -	Análise Estatística.....	43
5 -	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 -	Solubilidade.....	44
5.2 -	Solubilidade das Nanoestruturas.....	53
5.3 -	Emulsão.....	55
5.3.1 -	Índice da Atividade Emulsificante e Estabilidade da Emulsão.....	55
5.4 -	Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	61
5.5 -	Potencial Zeta.....	63
5.6 -	Tamanho das Partículas.....	66
5.7 -	Espalhamento Dinâmico de Luz	68
5.8 -	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM).....	73
6 -	CONCLUSÃO	79
7 -	TRABALHOS FUTUROS	81
8 -	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O setor de lácteos da Zona da Mata Mineira, onde se localiza a Universidade Federal de Viçosa, e a região do Sudoeste da Bahia, que abriga a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, ao mesmo tempo em que oferece diferentes produtos lácteos busca a diversificação de seu portfólio de derivados de soro de leite visando agregar valor ao soro oriundo da fabricação de queijos.

Levantando em consideração o alto custo do descarte do efluente e o valor nutricional do soro, é interessante a utilização do soro ou de seus componentes, sob várias formas, dentro e fora da indústria de alimentos. Nos últimos anos, várias pesquisas foram realizadas, visando o desenvolvimento de novas tecnologias para tais finalidades, promovendo desta forma, o reaproveitamento do soro e evitando a poluição dos rios e esgotos (Mizubuti, 1994).

Atualmente, a maior parte do soro produzido é desidratada ou transformada em bebida láctea, o que já agrega valor ao soro. No entanto, acredita-se que o emprego da nanotecnologia no setor de lácteos, como na produção de nanoestruturas, poderá levar à formulação de outro derivado de soro, tais como hidrolisados protéicos, com elevado valor comercial, funcional e nutricional.

As proteínas do soro de leite são produtos de alto valor agregado, funcional e biológico com uso, como ingredientes, em uma grande variedade de formulações de alimentos devido às suas propriedades de gelificação, capacidade de formação de espumas e alto valor nutritivo. As características físico-químicas das proteínas do soro de queijo sugerem que as mesmas sejam substâncias adequadas ao preparo de novos produtos alimentícios, como os funcionais, e também de produtos não-alimentícios. As proteínas β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina do soro de leite têm sido utilizadas no desenvolvimento de matrizes com base em nanopartículas, visando à liberação controlada de compostos bioativos. As nanopartículas de proteínas são capazes de carregar compostos bioativos sem a ocorrência de ligações químicas, em virtude do seu tamanho e da sua estrutura conformacional (Coester et al, 2000; Rhaese et al, 2003; Gunasekaran et al, 2007).

As nanoestruturas protéicas podem ser incorporadas aos alimentos visando à distribuição de nutrientes de forma controlada, como antioxidantes, aromatizantes e nutracêuticos, dentre outros. As nanoestruturas têm a vantagem de escoar de forma imperceptível pelo sistema imunológico e por barreiras que o corpo utiliza para manter fora substâncias indesejadas, como a parede estomacal. Compostos farmacêuticos reformulados

como nanopartículas podem alcançar partes do corpo onde as formulações atuais não conseguem e aumentar sua biodisponibilidade, com efeitos colaterais menores. Assim como a indústria farmacêutica, agroquímica e de cosméticos, as companhias de alimentos e bebidas também estão realizando experiências com o uso de nanocápsulas para liberação controlada de ingredientes ativos, que se dissolvem ou se difundem no alimento sob determinado estímulo. As nanotecnologias podem ser aplicadas em alimentos funcionais, os quais respondem às demandas do corpo e podem distribuir nutrientes de modo mais eficiente. Vários grupos de pesquisas estão trabalhando para desenvolver novos alimentos “por demanda”, os quais permanecem inertes no corpo e liberam os nutrientes para as células quando for necessário.

Ao buscar alternativas para o reaproveitamento das proteínas do soro espera-se contribuir para a obtenção de compostos lácteos com potencial de industrialização no Brasil, com impactos tanto na diversificação da oferta de produtos derivados de soro quanto no aumento da competitividade do setor com a inserção de novos produtos no mercado.

Assim, este projeto envolve a produção de nanoestruturas de proteínas do soro de leite, β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina, com vistas a futuras aplicações na área alimentar, tais como: alteração de propriedades funcionais e reológicas de alimentos, na produção de embalagens ativas para alimentos ou na liberação controlada de antioxidantes durante a vida de prateleira de bebidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteínas do soro do leite

As proteínas remanescentes no soro de leite apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo (Sgarbieri, 1996; Zinsly et al., 2001). Em contrapartida, apresenta também singulares propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes e cápsulas protetoras (Modler, 2000; Wong et al., 1996).

2.1.1 β -Lactoglobulina

A proteína β -Lactoglobulina esta presente no soro do leite de muitos mamíferos e não se limitando à família dos bovídeos (Abreu, 2005).

Quatro variantes genéticas da β -lactoglobulina foram identificadas no leite bovino. São as variantes A, B, C e D, respectivamente. A estrutura primária da β -lactoglobulina consiste em 162 resíduos de aminoácidos. A sua estrutura secundária, quando estudada na faixa de pH de 2 a 6, apresenta (10 a 15)% de α -hélice, 43% de folha- β e 47% de estrutura não ordenada (Pieter et al., 2006).

É a proteína presente em maior quantidade no soro de leite bovino (cerca de 50%). Com relação às proteínas totais do leite, ela representa 12%. A β -Lactoglobulina é uma proteína globular de Massa Molar (MM) 18,36 kDa para a variante genética A e 18,28 kDa para a variante B. É encontrada principalmente como um dímero em pH neutro e apresenta ponto isoelétrico em pH 5,2 (Fox e McSweeney, 1998).

2.1.1.1 Função biológica e funcional da β -Lactoglobulina

O alto teor de β -Lactoglobulina no soro de leite bovino inviabiliza a adição do soro “in natura” em alimento infantil, pois é considerado um componente alergênico (Abreu, 2005).

A β -Lactoglobulina é a proteína majoritária do soro do leite de ruminantes; é uma pequena proteína globular amplamente utilizada como ingrediente alimentar devido ao seu valor nutricional e sua capacidade de formar géis, e emulsões. Outra característica da β -Lactoglobulina é a sua capacidade de formar gel a frio, induzida pela adição de cátions, e que resulta na formação de uma rede de ligações cruzadas através de Ca^{2+} com grupos carboxílicos da β -Lactoglobulina desnaturada. Além de suas características funcionais, ela é conhecida por ser resistente à degradação pela pepsina no estômago (Chen *et al.*, 2006) e quimotripsina, em razão da sua conformação molecular estável (Antunes, 2003).

A β -Lactoglobulina é capaz de transportar pequenas substâncias hidrofóbicas como vitamina A e retinol (Taulier e Chalikian, 2001). A β -Lactoglobulina tem ainda um efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa (Dai-Dong *et al.*, 1990). A proteção seria devido a um efeito antioxidante pela presença de grupo tiol na proteína. Os peptídeos derivados da β -Lactoglobulina bovina podem também influenciar fortemente no nível de colesterol sérico (Nagoka *et al.*, 2001).

2.1.2 α -Lactoalbumina

A α -Lactalbumina possui duas variantes genéticas (A e B) que já foram identificadas, porém somente a variante B tem sido encontrada em leite das raças bovinas ocidentais (Sgarbieri, 2005).

Em termos quantitativos, a α -Lactalbumina é a segunda proteína do soro (15%-25%) do leite bovino e o principal do leite humano. Com massa molar de 14,2 kDa, caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina. A α -Lactalbumina é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui a capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção. Além disso, a fração α -Lactalbumina apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Haraguchi *et al.*, 2006).

A α -Lactalbumina tem uma alta afinidade pelo Ca^{+2} e outros íons metálicos como Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} e Al^{+3} . No tratamento térmico severo, que causa ruptura de suas ligações dissulfeto, os grupos sulfidrilos livres reagem com grupos semelhantes da β -Lactoglobulina, formando ligações intermoleculares (Sgarbieri, 2005).

2.1.2.1 Função biológica e funcional da α -Lactoalbumina

Muitas são as propriedades funcionais associadas a α -Lactoalbumina, e entre elas estão:

- Propriedades anti-carcinogênicas e antimicrobianas;
- Redução do estado de estresse e efeito hipocolesterolêmico;
- Efeito contraceptivo (Rocha, 2008).

2.2 Nanotecnologia e nanoestruturas

A nanotecnologia começou a ser discutida em 1959, pelo físico Richard Feynman, mas só pôde ter avanços significativos em suas aplicações a partir da década de 80 com o desenvolvimento de microscópios especiais. As abordagens da física e da química podem ser utilizadas para o desenvolvimento de nanoestruturas. A abordagem física (top-down) se relaciona com a redução das dimensões de dispositivos, ou miniaturização; e, a química (bottom-up) com a montagem de estruturas a partir de átomos e moléculas (Poole Jr. e Owens, 2003).

Os materiais produzidos em dimensão nanométrica são comumente definidos como aqueles contendo componentes muito pequenos e/ou características estruturais (partículas, fibras ou grãos) com pelo menos uma dimensão no intervalo de 1 a 100 nm. Nanocompostos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compostos que apresentam novas propriedades quando comparados aos materiais convencionais, devido às suas características em tamanho nanométrico (Liu *et. al*, 2007).

As drásticas e surpreendentes mudanças nas propriedades dos materiais em nanoescala são a chave para entender o poder e o potencial único da nanotecnologia. Essas mudanças são chamadas de “efeitos quânticos”. Sem alterar a substância, só reduzindo o tamanho dos materiais, eles podem ter novas propriedades, como condutividade elétrica, elasticidade, maior resistência, cor diferente e maior reatividade. Características diferentes das que essas mesmas substâncias têm em escala micro ou macro. Por exemplo, o carbono na forma de grafite é macio e maleável, diminuído à nanoescala, pode ser mais resistente e seis vezes mais leve do que o aço. O óxido de zinco é branco e opaco, em nanoescala torna-se transparente (Nanotecnologia, 2009).

A importância da ciência na dimensão da nanotecnologia reside no fato de que, à medida que a escala do objeto que se manipula aproxima-se do intervalo de 0,1 a 100

nanômetros, leis da física existentes no mundo na escala em que estamos familiarizados, como a gravidade, ganham menor importância. Reações químicas também podem ocorrer entre diferentes elementos químicos em proporções muito menores, dado que partículas nanométricas apresentam uma área de contato muito maior. Este fato torna-se um desafio para os cientistas, mas constitui-se também numa oportunidade para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades e funcionalidades antes impossíveis de serem atingidas (Poole Jr. e Owen, 2003, Instituto Inovação, 2005; Kane e Stroke, 2007).

Os entusiastas dizem que a nanotecnologia é a coisa mais importante que aconteceu na Terra desde a Revolução Industrial. Que, átomo a átomo, molécula a molécula, ela possibilitará re-fazer o mundo criado pelo ser humano, desencadeando uma onda de inovações em tudo. Em 2007, em muitos países, especialmente do Norte, 1.300 empresas, de 76 setores, com investimentos de US\$ 14 bilhões, realizavam pesquisas nas áreas de eletrônica, engenharia, máquinas, vestuário, defesa, veículos, agricultura, alimentação, nutrição, medicina, odontologia, cosméticos, entre outros, utilizando a nanotecnologia como base para o desenvolvimento de seus produtos. Quando o Governo Federal lançou o primeiro edital na área da Nanociência e Nanotecnologia, em 2001, a nanotecnologia começou a tomar uma forma mais institucionalizada no Brasil (Nanotecnologia, 2009).

Atualmente, a embalagem e o monitoramento de alimentos são o foco principal de pesquisa e desenvolvimento nanotecnológico do setor alimentício. Mas crescem também as pesquisas envolvendo a liberação controlada de aditivos e de compostos bioativos em alimentos. Além de auxiliar na liberação de nutrientes, as nanopartículas poderão ser usadas em alimentos para alterar suas propriedades funcionais e/ou reológicas. Por exemplo, a adição de nanopartículas a sistemas coloidais, como margarina e maionese, está em estudo sob as alegações de aumentar a vida de prateleira, prolongar a sensação do sabor na boca, alterar a textura e melhorar a estabilidade do produto. Algumas propriedades de proteínas que se adequam à fabricação de nanoproductos são a mobilidade por alteração conformacional, o desenovelamento e a ultraespecificidade (Instituto Inovação, 2005; Moraru, et al., 2003).

Nanomateriais derivados de proteínas são normalmente biodegradáveis, não-antigênicos, metabolizáveis, propícios a modificações de superfície e se ligam covalente às drogas e outras substâncias (Weber et al., 2000).

A produção de nanoestruturas de proteínas do soro de leite, puras ou conjugadas com polissacarídeo, tem em vistas aplicações na área terapêutica, na área alimentar com alteração de propriedades funcionais e reológicas de alimentos, na produção de embalagens ativas para

alimentos ou na liberação controlada de antioxidantes durante a vida de prateleira de bebidas (Wen et al, 2005).

Apesar de várias pesquisas em nanotecnologia se apresentarem ainda em estágio de desenvolvimento, diversos produtos baseados na nanotecnologia já são comercializados, como vidros para automóveis, óculos de sol, tecidos, equipamentos esportivos, protetores solar e cosmético, televisores, chips e memórias para computadores e *minilabs* (The Nano Investor, 2008).

2.2.1 Aplicações da nanotecnologia na área de alimentos

Nanosensores: verifica-se que os microsensores vêm reduzindo de tamanho e expandindo sua capacidade de sensoriamento. Nanopartículas ou nanosuperfícies podem ser projetadas para, na presença de um contaminante, disparar um sinal elétrico/químico ou desencadear uma reação enzimática na presença de um contaminante, tal como uma bactéria. Com as tecnologias atuais, os testes de contaminação microbiana em alimentos levam de 2 a 7 dias. Assim, com o desenvolvimento de pequenos sensores, mais rápidos, para detectar patógenos em alimentos não apenas se estenderá o alcance da agricultura industrial e do processamento de alimentos em larga escala como também será beneficiada a área de segurança alimentar (Goldfarb, 2003).

Embalagens: as embalagens que incorporam nanomateriais podem ser “inteligentes”, o que significa que podem responder a condições ambientais ou alertarem o consumidor sobre contaminação e/ou presença de patógenos. Pesquisadores estão trabalhando em filmes/embalagens produzidas com nanopartículas com sensores incrustados que detectarão patógenos em alimentos. Chamada de tecnologia da “língua eletrônica”, os sensores podem detectar substâncias em partes por trilhão e disparariam uma alteração na cor da embalagem, para alertar o consumidor se um alimento se tornou contaminado ou se está se deteriorando (Gardner, 2004).

A nanotecnologia está sendo usada também para desenvolver embalagens antimicrobianas para produtos e embalagens “ativas” que absorvem o oxigênio, mantendo dessa forma os alimentos frescos (Stark, 2004).

Liberação de compostos: as nanoestruturas têm a vantagem de escoar de forma imperceptível pelo sistema imunológico e por barreiras que o corpo utiliza para manter fora substâncias indesejadas, como a parede estomacal. Compostos farmacêuticos reformulados

como nanopartículas podem alcançar partes do corpo onde as formulações atuais não conseguem e aumentar sua biodisponibilidade, com efeitos colaterais menores. As nanopartículas também podem ser usadas como veículos para inserir clandestinamente compostos no corpo humano. Companhias farmacêuticas vêm desenvolvendo métodos de liberação fármacos com base em nanopartículas através da pele ou por inalação. Também estão utilizando tecnologias de produção de nanocápsulas para introduzir compostos ativos no corpo de animais. As cápsulas podem ser funcionalizadas para aderirem a lugares específicos no corpo, ou serem ativadas por uma perturbação externa, como pulso magnético ou ultrassom. Assim como a indústria farmacêutica, agroquímica e de cosméticos, as companhias de alimentos e bebidas também estão realizando experiências com o uso de nanocápsulas para liberação controlada de ingredientes ativos, que se dissolvem ou se difundem no alimento sob determinado estímulo (Versic, 2004; Nseafs, 2003).

Produtos alimentícios contendo aditivos em escala nanométrica já estão comercialmente disponíveis. Uma versão em escala nanométrica de carotenóides vem sendo comercializada para uso em refrescos, sucos de frutas e margarinas. Alguns tipos de carotenóides são antioxidantes e podem ser convertidos em Vitamina A no corpo. A formulação em nanoescala torna-os mais facilmente absorvíveis pelo corpo, e também aumenta a vida de prateleira (Scott, 2002; Gallemebeck, 2005; Marineau, 2004).

Muitas empresas no Brasil têm fabricado e/ou comercializado produtos nanoparticulados. Abaixo se encontram listadas algumas empresas e universidades e algumas de suas aplicações presentes no nosso dia a dia:

- **Brasken** - nanocompósitos de polipropileno e polietileno;
- **Bunge** - tinta branca com nanoalumínio;
- **CVD Vale** - ponta odontológica com “nanodiamante”;
- **Degussa** - AEROSIL-R972®, uma sílica hidrofóbica;
- **Embrapa** - língua eletrônica, um sensor gustativo para avaliação de bebidas;
- **Faber Castell** - grafite com nanopartículas organometálicas;
- **Henkel** - Bonderite NT-1, camada nanocerâmica que aumenta a resistência de metais à corrosão;
- **Mitsui Chemicals America** - resina com nanocristal NOTIO™, para uso em aplicações interiores e exteriores em automotivos, em embalagens (de cosméticos, eletrônicos, industriais e de especialidade) e em construção e engenharia;
- **Novelprint** – rótulo autoadesivo de nanomateriais que propicia isolamento térmico entre a pele da mão e uma garrafa gelada;

- **Oxiten** – nanolátex;
- **Plástico Mueller (Brasil)** - fábrica peças para veículos, no Fiat Idea, por exemplo, usa-se nanoargila para substituir a fibra de vidro em partes do carro;
- **Santista** - tecidos Technopolo Light, Technopolo Fit, Image e Image Giz com acabamento NanoComfort;
- **UFPE** - o n-Domp, um dosímetro de raios UV;
- **UFSCar** – nanopigmentos;
- **UNESP** - pele artificial para queimaduras ou feridas graves (Nanotecnologia, 2009).

2.3 Solubilidade

Entre as propriedades funcionais das proteínas, a solubilidade é empregada como um parâmetro para as possíveis aplicações dos ingredientes protéicos em diferentes condições de processamento sendo, então um pré-requisito crítico para uso da proteína em bebidas, alimentos fluidos, emulsões, entre outros. Alta solubilidade é necessária para a manifestação de várias propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e formação de espuma dependem das características de solubilidade do ingrediente protéico (Antunes, 2003, Fennema, 1993, Vojdani, 1996).

A solubilidade de proteína relaciona-se com as interações hidrofóbicas (proteína-proteína) e hidrofílicas superficiais (proteína-solvente). Diversos fatores podem influenciar a solubilidade protéica:

- **pH:** no ponto isoelétrico (pI) as proteínas apresentam sua mais baixa solubilidade. Interações proteína-proteína aumentam porque forças eletrostáticas das moléculas estão em um mínimo e menos água interage com as moléculas de proteína, favorecendo a agregação e posteriormente a precipitação das proteínas. (Antunes, 2003);
- **Carga superficial:** muitas proteínas são completamente insolúveis no pI, enquanto outras são ainda solúveis. β -Lactoglobulina é quase 90% solúvel no seu ponto isoelétrico em solução aquosa (1 mg/mL, pH 5,1); α -Lactoalbumina apresenta em torno de 68% da solubilidade (1 mg/mL, pH 5,0). Em valores de pH acima ou abaixo do pI maior quantidade de água irá interagir com proteínas. As curvas de solubilidade têm, em geral, formato de U (Antunes, 2003);

- Temperatura: a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura entre (0 e 50)°C. Por outro lado, baixas temperaturas, às vezes desestabilizam estruturas protéicas quando o principal fator estabilizador de estrutura terciária é a interação hidrofóbica que, ao contrário de ligações de hidrogênio e eletrostáticas, são mais fracas em baixas temperaturas (Antunes, 2003);
- Força iônica: em baixas concentrações de sais a solubilidade em geral aumenta, porque os íons salinos tendem a se associar às proteínas contribuindo para uma maior hidratação e/ou repulsão das moléculas protéicas, portanto, há uma maior solubilidade da proteína. Ao contrário, em elevada concentração salina, os íons salinos formam uma camada de hidratação e assim competem com a proteína pelas moléculas de água presentes no meio, ocasionando a perda de água de hidratação das moléculas protéicas, o que leva a uma maior atração entre as moléculas protéicas e à formação de precipitado (Sgarbieri, 1996).

2.4 Emulsão

A crescente demanda do consumidor por produtos naturais e saudáveis tem contribuído para aumentar o interesse pelo estudo dos ingredientes utilizados na fabricação de alimentos, tais como os agentes emulsificantes. Diversos trabalhos têm mostrado que as proteínas alimentares auxiliam na formação e na estabilidade de emulsões (Duarte et al. , 1998).

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura termodinamicamente instável de dois líquidos imiscíveis, sendo necessário fornecer energia para dispersar os líquidos e assim o sistema minimizar sua energia livre por formação de partículas esféricas da fase dispersa. As proteínas do soro atuam como agentes surfactantes, ou seja, diminuem a tensão interfacial na interface óleo/água, formando um filme muito coeso e delgado em torno das gotículas de óleo. Também estabilizam a emulsão contra a floculação e a coalescência (Antunes, 2003).

Floculação ocorre quando duas ou mais gotas colidem e associam uma as outras mantendo suas formas e integridades individuais e coalescência é um processo por onde dois ou mais gotas se juntam para formar uma única gota de tamanho maior (McClements, 2008).

As propriedades emulsificantes são importantes em muitos alimentos e são comumente discutidas em termos da Estabilidade da Emulsão e do Índice da Atividade Emulsificante. A concentração de proteína, sua solubilidade, pH do meio, concentração de

sacarose e cloreto de sódio afetam as propriedades emulsificantes da maioria das proteínas. Outros fatores como design de equipamentos, forma do recipiente, razão da adição de óleo, tipo de óleo e natureza das proteínas têm sido investigados (Costa et al., 2009).

No decorrer da emulsificação, as proteínas do leite são capazes de rapidamente adsorver na superfície das gotículas de óleo, reduzindo a tensão interfacial e formando grossas camadas que impedem a coalescência das gotículas. A adsorção de proteínas na interface óleo-água é termodinamicamente favorável, porque os resíduos hidrofóbicos da proteína são removidos da fase aquosa e são orientados para a fase oleosa, seguindo o rearranjo estrutural da proteína na interface. Em consequência, a estrutura da proteína fica adsorvida em um lugar intermediário entre os estados nativos e totalmente desnaturado, por vezes referido como glóbulo (Raikos et al., 2010).

O Índice da Atividade Emulsificante (EAI) e a Estabilidade da Emulsão (ESI) são dois índices utilizados para avaliar as propriedades emulsificantes das proteínas. Pearce e Kinsella (1978) definiram Índice da Atividade Emulsificante como unidades de área interfacial estabilizados por unidade de massa de proteínas/emulsificantes e foram estimadas pela turbidez da emulsão em um comprimento de onda de 500nm e Boye et al. (2010) afirmaram que a Estabilidade da Emulsão mede a capacidade da emulsão de resistir a mudanças na sua estrutura ao longo de um período de tempo definido.

2.4.1 Métodos Turbidimétricos

A capacidade de uma proteína formar uma emulsão está relacionada à sua capacidade de adsorver e de estabilizar a interface óleo-água. Da mesma forma, a estabilidade de uma emulsão deve estar relacionada com a constância da área interfacial.

A teoria de Mie para o espalhamento de luz por partículas esféricas dispersas indica que há uma relação simples entre a turbidez e a área interfacial de uma emulsão. Medidas de turbidez são obtidas usando um simples espectrofotômetro de laboratório (Pearce e Kinsella, 1978).

A turbidez de um sistema é dada por:

$$T = \frac{2,303A}{l} \quad (1)$$

Onde A é a absorvância observada no tempo 0 e l é o comprimento da cubeta (Pearce e Kinsella, 1978).

Segundo Cameron et al. (1991), Kinsella e Pearce (1978) utilizaram esta relação como a base para o cálculo do Índice de Atividade Emulsionante (EAI). Eles definiram o Índice da Atividade Emulsificante como $EAI = \frac{2T}{\phi C}$ (2), onde C é a concentração de proteína (g/mL) por unidade de volume de fase aquosa antes da emulsão formada e ϕ é a fração de volume de óleo da emulsão. Afirmando que o EAI tinha unidade de metros quadrados de área interfacial por grama de emulsificante, quando na verdade valores de EAI dependem do ϕ e a derivação da fórmula não foi apresentada. Sendo assim, o índice da Índice da Atividade Emulsificante corrido por é:

$$EAI = \frac{2T}{(1 - \phi)C} \quad (3)$$

2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A ITC tem sido uma técnica muito utilizada para avaliar a termodinâmica de diversos sistemas, como por exemplo: Proteína-Proteína (Pierce et al., 1999; Leavitt e Freire 2001; Baker e Murphy, 1996), Complexos de Ciclodextrinas (Sousa et al., 2008; Sousa et al. 2008; Turnbull et al., 2003), Carboidratos (Swaminathan et al., 1998), α -Lactoalbumina complexada com Ca^{+2} (Vanhooren et al., 2002), Proteínas e Nanopartículas (De et al., 2007), RNA (Salim e Feig, 2008), DNA (Damian et al., 2009) e Proteínas e Peptídeos (Fanghanel et al, 2006), Lisozima e Conalbumina (Sousa et al, 2009).

Uma contribuição do ITC para a biotecnologia é a alta precisão na medida da estequiometria de ligação, pois cada injeção é controlada computacionalmente. A alta precisão é obtida porque os reagentes são analisados em sua forma nativa (Doyle, 1997).

Segundo Pierce et al. (1999) a calorimetria de titulação isotérmica é o melhor meio disponível para a medição das propriedades termodinâmica de uma interação proteína-proteína. Em um único experimento, os valores da constante de associação (K_a), a estequiometria (n), e a entalpia de ligação (ΔH°) são determinados.

A medição de um sistema permite a determinação de parâmetros termodinâmicos como: a variação entálpica do processo de mistura (ΔH°), que é medida diretamente, através da variação do fluxo de calor; a variação da entropia (ΔS°) e da energia livre de Gibbs (ΔG°), obtidas indiretamente por equações termodinâmicas, proporcionando um perfil completo da termodinâmica da interação molecular (Gomes, 2009). Isso é possível porque ΔS° e ΔG° podem ser obtidos a partir das equações 2 e 3 (Sousa, 2007).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5)$$

Um experimento típico de ITC é realizado com a adição gradual de um dos reagentes na cela de reação contendo o outro reagente. A reação química criada por cada injeção libera ou absorve uma certa quantidade de calor proporcional à quantidade de reagente que se liga à proteína em uma injeção particular e à variação da entalpia de ligação característica (ΔH°) para a reação. Instrumentos modernos de ITC operam visando o princípio de compensação de calor, assim a resposta instrumental (sinal de medida) é a quantidade de energia (microcalorias por segundo) necessária para manter a diferença de temperatura constante entre as células de reação e de referência (Leavitt e Freire, 2001).

Durante o processo de titulação por ITC, caso as espécies tituladas e titulantes sejam passíveis de sofrerem interações, ocorrerá uma variação de entalpia (ΔH°) uma vez que haverá quebra e formação de interações entre as espécies. Como a cela é isotérmica essa variação de energia não poderá se refletir como um aumento de temperatura no sistema. Sendo a pressão constante, durante a titulação, ΔH° será equivalente à quantidade de calor recebida ou fornecida pelo sistema, lembrando que o calorímetro é adiabático, mas a cela onde ocorre a titulação é isotérmica (Sousa, 2007).

Para sistemas que interagem segundo uma estequiometria fixa, ou seja, não tendem a formar agregados moleculares em solução, e ainda apresentam valores relativamente altos para a constante de interação, o perfil da curva de titulação calorimétrica tende a ser uma sigmóide, como visto na figura 1.

Esta curva pode ser dividida em duas regiões:

- 1- onde há excesso de titulado e cada injeção produzirá uma variação de entalpia diferente de zero.
- 2- onde há excesso de titulante e não mais haverá a uma variação de entalpia (Sousa, 2007).

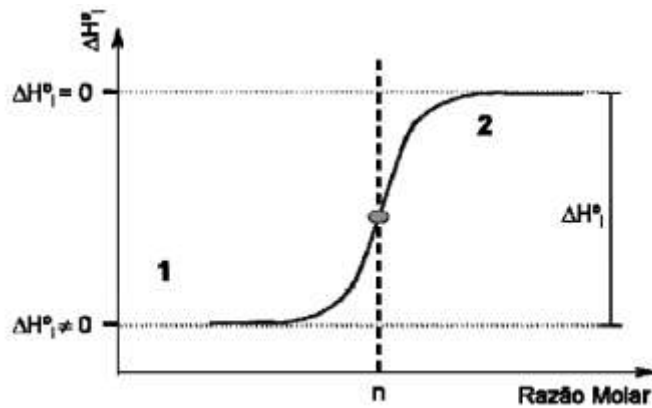


Figura 1. Representação de uma titulação calorimétrica de variação de entalpia (ΔH°) por razão molar (n) (Sousa, 2007).

2.6 Potencial Zeta

A medida de Potencial Zeta é o potencial no plano de cisalhamento. Ele não é exatamente o potencial da superfície (carga superficial), mas é o potencial de interesse prático na estabilidade da dispersão, pois ele determina as forças intermoleculares. Sua magnitude é bastante sensível às variações do meio, e serve como ferramenta para definição das melhores condições de trabalho. Seu valor está intimamente relacionado ao pH, sendo normalmente positivo em regiões ácidas, e negativo em regiões básicas. O valor de pH para o qual o Potencial Zeta é nulo é denominado ponto isoelétrico (pI), e a região em torno desse valor correspondem à região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático (Soares, 2009; Jiang et al., 2009).

Muitas substâncias adquirem cargas elétricas na superfície quando postas em contacto com um líquido polar (água). A carga elétrica superficial é responsável por uma acumulação de íons de carga oposta (contra-íons) junto à superfície da partícula. As forças eletrostáticas atraem os íons de carga contrária ao colóide, enquanto que a agitação térmica e o movimento browniano são responsáveis pela distribuição homogênea na massa líquida. Esse sistema composto de cargas, superfície do colóide e camada do sinal contrário, é chamado de dupla camada (Scribd, 2010).

Os movimentos desordenados, de origem térmica, afetam todos os íons contribuindo para a formação de uma camada difusa que é o potencial eletrostático que se estabelece devido à diferente concentração de cargas, no interior da dupla camada elétrica. A dupla camada elétrica é dividida por uma fronteira imaginária, designada por "*plano de Stern*", que separa

os íons adsorvidos na superfície (camada de *Stern*) dos que constituem a camada difusa (Scribd, 2010).

A figura abaixo apresenta esquematicamente o sistema da partícula coloidal e seus potenciais (Malvern Instruments, 2010).

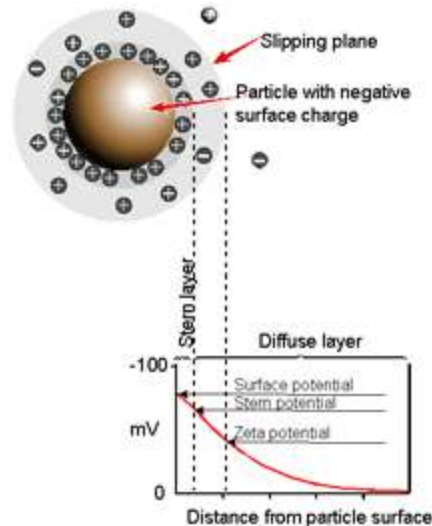


Figura 2. Representação esquemática do Potencial Zeta

O Potencial Zeta é uma função da carga da camada difusa e sua extensão é proporcional à velocidade, ou seja, quanto maior a densidade e extensão da camada difusa, maior será a velocidade da partícula dispersa sob a ação de um campo elétrico, ao passo que o atrito entre as partículas e o líquido que contém a camada difusa será menor (Schoenhals, 2006).

O potencial ζ não pode ser medido diretamente, mas pode ser calculado a partir dos valores da mobilidade eletroforética. A mobilidade eletroforética (μ) é definida como sendo a velocidade linear (v) por unidade de gradiente de potencial elétrico (X), expressa em $m^2/V.s$:

$$\mu = \frac{v}{X = \Delta v} \quad (6)$$

Pode-se relacionar a mobilidade eletroforética e potencial ζ quando:

- As partículas não se deformam sob a ação do campo elétrico;
- O movimento das partículas sujeitas ao campo elétrico é laminar (Scribd, 2010).

A técnica de mobilidade eletroforética consiste em introduzir uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida mover-se-ão na direção do eletrodo da carga contrária,

tão mais rapidamente quanto maior sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. (Instrutécnica, 2010).

Contudo, para determinados valores de força iônica do meio, a que corresponderá uma dada espessura da dupla camada elétrica ($1/\kappa$), o raio da partícula (r) pode influenciar a relação entre a mobilidade eletroforética e o Potencial Zeta, de acordo com os seguintes critérios:

- $\kappa r < 0.1$ - força iônica do meio muito baixa e partículas muito pequenas, utiliza-se a equação de *Hückel*;
- $\kappa r > 300$ - as partículas têm uma grande dimensão, em comparação com a espessura da dupla camada elétrica (κ), utiliza-se a equação de *Smoluchowski*. Neste grupo de partículas estão as proteínas;
- $\kappa r > 0.1$ e $\kappa r < 300$ - a dimensão da maior parte dos substratos biológicos e bioquímicos é tal que para qualquer força iônica do meio os valores do produto entre a espessura da dupla camada elétrica e o raio da partícula variam em geral entre 0.1 e 300. Neste grupo incluem-se todas as substâncias bioquímicas de dimensões inferiores a 1 μm . Em tais situações o cálculo do Potencial Zeta tem que ser feito recorrendo a relações matemáticas mais complicadas (Scribd, 2010).

Assumindo que o fluido seja newtoniano, relacionando à velocidade do fluido à velocidade da partícula ($V_{\text{partícula}} = -V_z$) e usando a definição de eletromobilidade (η), obtém-se a equação de Smoluchowski para o cálculo do Potencial Zeta (Soares, 2009).

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon_0\epsilon} \quad (7)$$

Onde ζ é o Potencial Zeta (mV), η é a viscosidade do fluido (mPa.s), μ é a mobilidade eletroforética ou eletromobilidade ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$), ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo ($\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$) e ϵ constante dielétrica do meio.

Quanto maior o Potencial Zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e esta força supera a tendência natural à agregação. A estabilidade vem porque as forças repulsivas evitam a agregação. Valores baixos podem indicar instabilidade coloidal e podem levar à agregação (Instrutécnica, 2010).

2.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O *espalhamento dinâmico de luz* (do inglês Dynamic Light Scattering - DLS), também conhecido como *espectroscopia de correlação de fótons* (do inglês Photon Correlation Spectroscopy - PCS) ou *espalhamento quase elástico de luz* (do inglês Quasi Elastic Light Scatt - QELS), é uma técnica poderosa para analisar a dinâmica de partículas e macromoléculas em soluções e para determinar a distribuição de tamanho das partículas (Holler et al., 2009).

As técnicas de espalhamento são utilizadas na caracterização de diversos sistemas tais como: nanopartículas, micelas, polímeros, proteínas e DNA. Por meio dessas técnicas é possível determinar o tamanho, a forma e possíveis interações das partículas. Na figura 3 tem-se uma representação contendo os principais componentes das técnicas de espalhamento (Mageste, 2009).

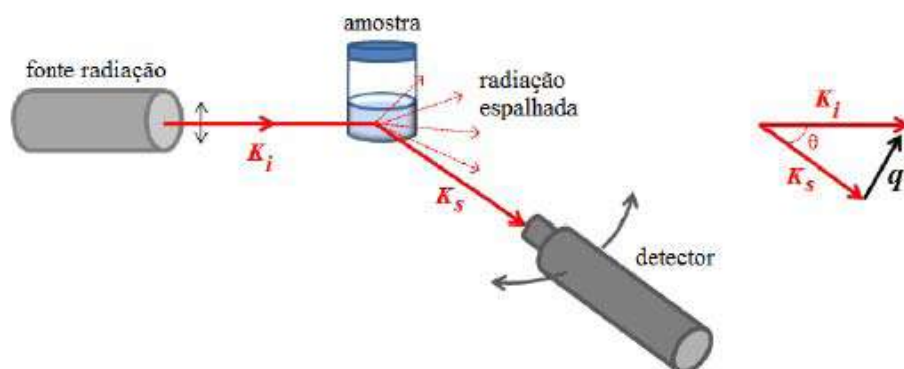


Figura 3. Esquema básico de um de um espalhador de luz, constituído de uma fonte de radiação a definição do vetor de espalhamento \mathbf{q} , onde \mathbf{K}_i é o vetor da onda incidente e \mathbf{K}_s o vetor da onda espalhada (Mageste, 2009).

Quando moléculas em um volume iluminado são sujeitas a um campo elétrico oscilante proveniente do feixe de luz, suas cargas experimentam uma força e são aceleradas. A consequência é que cada uma dessas moléculas funciona como uma fonte de luz de mesmo comprimento de onda. A intensidade total espalhada em certo ângulo em relação ao feixe incidente (chamado ângulo de espalhamento) é o resultado da soma (superposição) do campo elétrico irradiado por todas as cargas do volume iluminado e, conseqüentemente, seu valor depende da posição exata das cargas. Esse é o princípio da técnica de espalhamento estático de luz. Essas mesmas moléculas na região iluminada estão em constante movimento de

translação, rotação e vibração em virtude das interações térmicas. Devido a este movimento a posição das cargas está variando continuamente, levando a uma flutuação temporal do campo elétrico total espalhado. A partir da análise dessas flutuações é possível obter informações sobre a dinâmica tanto translacional quanto rotacional das moléculas (Teixeira, 1997).

Seja uma propriedade $A(t)$ que evolui no tempo e que depende da posição e do momento de todas as partículas em um sistema. Uma vez que o número de partículas é normalmente muito grande o comportamento de $A(t)$ aparece como um ruído aparentemente aleatório (Figura 4) (Teixeira, 1997).

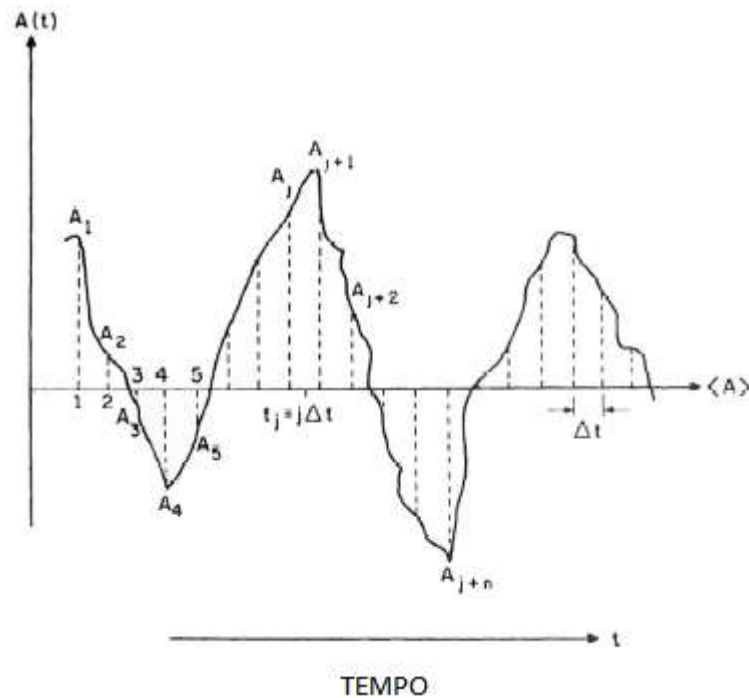


Figura 4. Variável $A(t)$ cujo valor flutua no tempo em torno de seu valor médio $\langle A \rangle$ que independe do tempo. O eixo do tempo é dividido em intervalos discretos Δt (Berne e Pecora, 2000).

O sinal ruidoso $A(t)$ da Figura 4 em tempos diferentes, t e $t + \tau$, podem ter valores diferentes de modo que $A(t) \neq A(t + \tau)$. No entanto quando o intervalo de tempo τ é pequeno em relação ao tempo típico das flutuações o valor de $A(t + \tau)$ é muito próximo de $A(t)$. A função de autocorrelação ($C(\tau)$) é obtida a partir da correlação entre uma mesma grandeza medida em tempos diferentes e é definida como (Teixeira, 1997):

$$C(\tau) = \langle A(0)A(\tau) \rangle \cong \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t + \tau) dt \quad (8)$$

Onde T é o tempo total do experimento e o símbolo $\langle \dots \rangle$ representa a média do conjunto. Dividindo a curva contínua da figura 4 em N intervalos discretos de tempo Δt com $t = j\Delta t$, $\tau = n\Delta t$ e $T = N\Delta t$ com $j = 1, 2, \dots, N$ de tal modo que a propriedade A varie pouco durante um tempo Δt , pode-se aproximar a equação (8) por (Teixeira, 1997):

$$C(\tau) = \langle A(0)A(\tau) \rangle \cong \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A_j A_{j+n} \quad (9)$$

No experimento envolvendo a luz o que é efetivamente medido é a intensidade da luz espalhada I . A função de autocorrelação para a intensidade espalhada é dado por (Teixeira, 1997):

$$C(\tau) = \langle A(0)A(\tau) \rangle \cong \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t+\tau)dt \cong \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N A_j A_{j+n} \quad (10)$$

Para dispersões de partículas onde não há nenhuma interação significativa entre elas, sabe-se que a função de autocorrelação decai exponencialmente na forma (Teixeira, 1997):

$$C(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle = A + B e^{\left(\frac{-2\tau}{\tau_c}\right)} \quad (11)$$

Onde A e B são parâmetros de ajuste e τ_c é o tempo de decaimento da exponencial. Analisando os valores limites de $C(\tau)$ é fácil ver que $A = \langle I \rangle^2$ e $B = [\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2]$. Flutuações lentas da intensidade levam a uma exponencial que precisam de um longo período de tempo para aproximar-se do valor assintótico ou, em outras palavras, com um tempo de decaimento alto (Teixeira, 1997).

A velocidade das flutuações reflete-se na taxa de decaimento de $C(\tau)$. O tempo de decaimento relaciona-se com a difusividade das partículas em solução pela equação:

$$\frac{1}{\tau_c} = Dq^2 \quad (12)$$

Sendo D o coeficiente de difusão das partículas e q o módulo do vetor de espalhamento, dado pela equação 13:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (13)$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação, n é o índice de refração do meio e θ o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente. Uma das aplicações básicas da técnica de correlação de fótons é a determinação do raio médio de dispersões coloidais em meios viscosos. A partir da obtenção da curva de autocorrelação de intensidade e determinação dos tempos de decaimento τ_c para uma série de valores de q^2 obtém-se o coeficiente de difusão, e, finalmente, pode-se obter o raio hidrodinâmico R_h de partículas pela equação 14, (Navier-Stokes):

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (14)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann ($k_B = 1,381 \times 10^{-23}$ J/K), T é a temperatura e η é a viscosidade do solvente (Teixeira, 1997).

Para uma esfera a relação de Navier-Stoker é utilizada para calcular o raio hidrodinâmico da partícula R_h . Para partículas não-esféricas, o raio hidrodinâmico é o raio de uma esfera hipotética que deveria apresentar o mesmo coeficiente de difusão translacional de uma partícula não-esférica (Holler et al., 2009).

Um parâmetro muito importante nos resultados de espalhamento dinâmico é o índice de polidispersividade. No experimento DLS, é feita a análise de cumulantes da função autocorrelação (expansão em série de Taylor) e um modelo matemático de ajuste aos dados é obtido. Assumindo-se que a amostra segue uma distribuição gaussiana, o índice de polidispersividade é igual à razão entre a variância da amostra e a média. Para índices acima de 0,7 os resultados obtidos pelo modelo de cumulante não são confiáveis, pois se relacionam a amostras bastante polidispersas. Índices abaixo de 0,08 compreendem materiais quase monodispersos (Soares, 2009).

2.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10⁻⁵ mm Hg.

Um microscópio moderno de transmissão possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho

do feixe eletrônico. Entre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância com respeito aos fenômenos de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra (Padilha, 2010).

Um feixe de elétrons é produzido e acelerado no canhão eletrônico, sofrendo uma primeira focalização na sua saída, denominada “crossover” do canhão. A seguir, o feixe passa por duas lentes magnéticas, C1 e C2 (Figura 5), que são ajustadas para iluminar a amostra com um feixe de elétrons, geralmente paralelos e com uma seção de alguns micrometros. Ainda neste trecho existe uma abertura (diafragma) que controla a coerência, intensidade e paralelismo do feixe. A este conjunto que conduz os elétrons do canhão até a amostra dá-se o nome de sistema de iluminação (Tosin, 2000).

Então, um conjunto de lentes magnéticas objetivas captura o feixe espalhado que atravessou a amostra, em especial na direção direta, e trabalha-o para conseguir a formação de uma imagem nítida e ampliada sob uma tela fosforescente. Muitas vezes o que se deseja enxergar é o padrão de difração. Entres estas lentes, outros diafragmas são posicionados para controle de intensidade e contraste. Todo o instrumento opera em alto vácuo (Tosin, 2000).

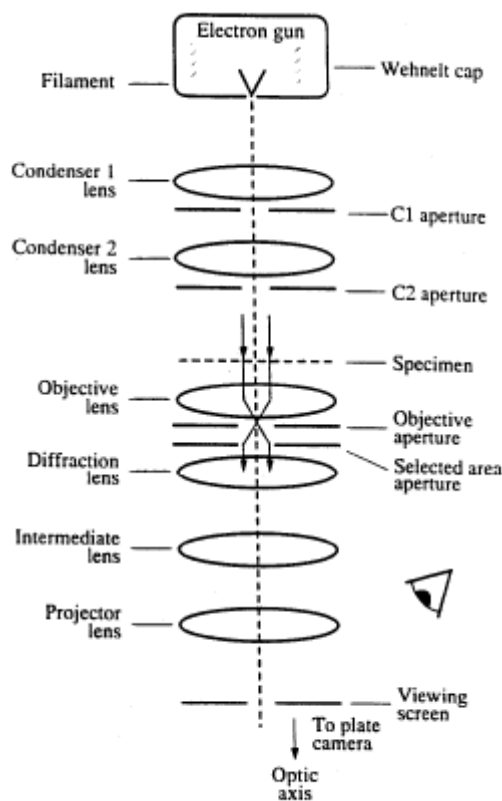


Figura 5. Configuração típica de um TEM (Tosin, 2000).

2.9 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As diversas técnicas de AFM podem fornecer uma variedade de informações sobre a amostra como dureza, rugosidade, elasticidade da superfície, imagens topográficas em três dimensões, entre outras características.

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se nas forças de interação a curta distância entre a ponta e a superfície da amostra. Estas forças de interação são associadas principalmente a forças do tipo Van der Waals, forças decorrentes da polarização de moléculas ou de forças intermoleculares atrativas de longo alcance e repulsivas de curto alcance. Quando começa a aproximação, surgem forças de atração bipolar (negativas) entre os átomos da ponta e da superfície da amostra. Estas forças atrativas aumentam até que as interações entre as órbitas eletrônicas passam a dominar, o que resulta em forças repulsivas, levando a um valor de força positivo e então, pode-se dizer que a ponta está em contato com a superfície (Santos, 2008).

Três modos são comumente usados em microscópio de força atômica: *modo com contato*, *modo sem contato* e *modo de toque*. O modo com contato é o mais comum, neste caso a ponta está em constante contato com a superfície da amostra, a maioria das medidas de AFM é realizada sob condições de pressão ambiente ou em líquidos e, assim, as forças de tensão superficial de gases absorvidos ou da camada de líquido podem puxar a ponta para baixo. No modo de toque o braço oscila a uma frequência de algumas centenas de quilohertz. A oscilação é realizada a uma força constante e a amplitude é monitorada continuamente. O braço é posicionado de forma que a ponta toca a superfície apenas na parte inferior de cada ciclo de oscilação. O modo sem contato é o menos comum, no qual a ponta flutua poucos nanômetros acima da amostra. As forças atrativas de Van Der Waals entre o ponto e a amostra são detectadas quando a ponta varre a superfície, sendo estas forças substancialmente mais fracas do que aquelas detectadas no modo com contato (Holler et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar nanoestruturas das proteínas β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina do soro do leite.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar propriedades funcionais das proteínas β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina em termos de solubilidade, Estabilidade da Emulsão e Índice da Atividade Emulsificante;
- Determinar propriedades físicas e químicas das proteínas β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina em termos de tamanho de partícula, potencial zeta e calorimetria;
- Caracterizar as nanoestruturas de β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina obtidas em função da:
 - ✓ Análise estrutural e morfológica;
 - ✓ Distribuição de tamanho;
 - ✓ Tamanho médio das partículas;
 - ✓ Potencial Zeta;
 - ✓ Solubilidade

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Métodos

Os sistemas estudados foram compostos por proteínas α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina puras, misturas protéicas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina e por nanoestruturas protéicas.

Os experimentos de Calorimetria, Tamanho de Partícula e Potencial Zeta foram realizados no Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas-Gerais - MG. O experimento de Espalhamento Dinâmico de luz foi realizado no Laboratório de Microfluidica e Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa-MG. Os experimentos de Solubilidade e Emulsão foram realizados no Laboratório de Operações e Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa-MG. As imagens de Microscopia de Transmissão Eletrônica foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – MG e as imagens de Microscopia de Força Atômica foram feitas no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Viçosa – MG. As proteínas α -Lactoalbumina (90% pureza, 5,5% umidade, 97% proteína, 0,5% gordura, 3,0% cinza, <0,5% lactose) e β -Lactoglobulina (93,6% pureza, 5,0% umidade, 97,8% proteína, 0,3% gordura, 1,8% cinza, <0,5% lactose) foram gentilmente doadas pela Davisco Foods Internacional Inc. (Eden Prairie, MN, USA). Ambas as proteínas foram usadas diretamente sem purificação prévia.

4.2 Nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina

A síntese das nanoestruturas foi feita por meio de gelificação ou Self-Assembly. As soluções de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina foram preparadas nas concentrações desejadas e misturadas em uma proporção de 2:1 (α -Lactoalbumina/ β -Lactoglobulina), com ajuste de pH em torno de 7,0, pH fisiológico. O ajuste do pH foi feito com NaOH 0,1N. A solução foi levada para aquecimento em banho termostático (Banho Termostatizado, TE-184, Tecnal, Brasil) a $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos e em seguida refrigerada até 5°C antes da caracterização.

4.3 Solubilidade

Os dados de solubilidade para a α - Lactoalbumina e β -Lactoglobulina puras foram obtidos de acordo com a metodologia proposta por Kakalis e Regenstein (1986) e por Mohan (1995) com modificações. Em uma eppendorf foi adicionada certa quantidade de proteína pura (2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 ; 10,0) mg em 2 mL de solução tampão, no pH predefinido (3,0 ; 4,6 ; 5,4 ; 7,6) contendo o sal a ser avaliado (NaCl) nas concentrações de (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6) mol/L. Para o estudo da solubilidade em função do pH e da concentração de proteína, foi adicionada a proteína (1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 ; 6,0 ; 8,0 ; 10,0) mg da amostra de proteína em 2 mL de solução tampão, no pH predefinido (3,0; 4,6; 5,4; 7,6). Os tampões utilizados foram Glicina – HCl (pH 3,0), Citrato – Ácido Cítrico (pH 4,6), Citrato - Fosfato (pH 5,4) e Tris - HCl (pH 7,6). Os sistemas foram agitados em um dispositivo que simula um tanque agitador contendo uma bomba peristáltica Masterflex L/S TM (Cole-Parmer Instrument Company, United States) com rotação de 14 rpm por 1 hora, a 25 °C. Logo após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 8497 x g por 20 min a 8 °C (Centrifuga refrigerada Sigma, modelo 4 K 15 C N° 10743, Alemanha). Após a centrifugação, uma alíquota foi retirada do sobrenadante para análise de proteína. O conteúdo protéico do sobrenadante foi determinado por leitura direta da absorbância a 280 nm (espectrofotômetro Cary 50, Varian, Austrália).

A solubilidade foi calculada segundo Pelegri e Gasparetto (2003) com modificações:

$$S = \left[\frac{M_P}{M_S} \right] * 100 \quad (15)$$

Em que S (%) é o teor de proteína solúvel presente na amostra, M_P é a massa de proteína no sobrenadante (mg), M_S é a massa inicial da amostra (mg).

4.4 Solubilidade das Nanoestruturas

A solução de nanoestruturas foram congeladas em placas de Petri num Ultra-Freezer (Ultra-Freezer vertical – 40 , Terroni, Brasil) por aproximadamente 12 horas a -40°C, em seguidas as amostras foram liofilizadas (Liofilizador LS 3000, Terroni, Brasil) por 10 horas.

Os dados de solubilidade para as nanoestruturas foram obtidos de acordo com a metodologia proposta por Kakalis e Regenstein (1986) e por Mohan (1995) com modificações. Em uma eppendorf foi adicionada 2mg de amostra liofilizada em 2 mL de solução tampão, no pH predefinido (3,0 ; 4,6 ; 5,4 ; 7,6). Os tampões utilizados foram Glicina – HCl (pH 3,0), Citrato – Ácido Cítrico (pH 4,6), Citrato - Fosfato (pH 5,4) e Tris - HCl (pH 7,6). Os sistemas foram agitados em um dispositivo que simula um tanque agitador contendo uma bomba peristáltica Masterflex L/S TM (Cole-Parmer Instrument Company, United States) com rotação de 14 rpm por 1 hora, a 25 °C. Logo após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 8497 x g por 20 minutos a 8 °C (Centrifuga refrigerada Sigma, modelo 4 K 15 C N° 10743, Alemanha). Após a centrifugação, uma alíquota foi retirada do sobrenadante para análise de proteína. O conteúdo protéico do sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) a 595 nm (espectrofotômetro Cary 50, Varian, Austrália).

Para o preparo do reagente de Bradford foram dissolvidos 100 mg de Comassie Blue em 50 mL de etanol 95%, adicionar 100 mL de H₃PO₄ 85% e completado para 1 L. Dessa forma, as concentrações finais foram: 0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Foram pipetados 100 µL de sobrenadante a 5 mL de reagente de Bradford.

A solubilidade foi calculada segundo a equação 15.

4.5 Emulsão

4.5.1 Determinação Volume de Óleo da Emulsão (Φ)

A fração de volume de óleo foi obtida pela secagem de 5 g de emulsão em placa de Petri “overnight” até peso constante em estufa microprocessada com circulação forçada de ar (Modelo Q 314M – 242, Quimis, Brasil) a 105°C. A fração de volume de óleo foi calculada por (Antunes, 2003):

$$\phi = \frac{C - A - E(B - C)}{C - A + (A - C)\left\{\frac{(1 + E)D_o}{D_s} - E\right\}} \quad (16)$$

Onde A é a massa da placa de Petri (g); B é o somatório das massas da placa de Petri e da amostra (g); C é a soma da massa da placa de Petri (g) com a massa da amostra seca (g); D_o é a densidade do óleo (g/m^3); D_s é a densidade da solução de proteína (g/m^3) e E é a concentração de proteína (g/mL).

4.5.2 Determinação do Índice da Atividade Emulsificante (EAI) e Estabilidade da Emulsão (ES)

O Índice da Atividade Emulsificante foi avaliado pelo método turbidimétrico proposta por Pearce e Kinsella (1978) com modificações de Cameron et al. (1991) e a Estabilidade da Emulsão foi avaliada pelo método turbidimétrico proposta por Pearce e Kinsella (1978) com modificações de Jiang et al. (2009). O Índice da Atividade Emulsificante foi determinado em diferentes concentrações de proteína (0,025; 0,05; 0,075; 0,1 ; 0,2% m/v) em pH 7,0 Tampão Fosfato (pH fisiológico) e em diferentes concentrações de sal (NaCl) (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 mol/L). Onde 30 mL de solução de proteína foram adicionados a 10 mL do óleo (soja e oliva) e homogeneizada no UltraTurrax (IKA DI 25 Basic, Alemanha), à temperatura de refrigeração (5°C) em velocidade de 13500 rpm por 3 minutos. Logo após a formação da emulsão, foram retiradas alíquotas de 20 μL que foram diluídas em 10 mL de solução 0,1% de Dodecil Sulfato de Sódio. Em seguida, foi feita a leitura de absorvância a 500 nm.

O Índice da Atividade Emulsificante (m^2/g) foi calculado de acordo com Cameron et al. (1991) equação 3.

A Estabilidade da Emulsão (%) foi calculada de acordo a fórmula proposta por Jiang et al. (2009):

$$ES = \left(\frac{A_{10}}{A_0} \right) * 100 \quad (17)$$

Onde A_{10} é a absorvância com 10 minutos e A_0 é a absorvância inicial.

4.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A Calorimetria de Titulação Isotérmica da β -Lactoglobulina em α -Lactoalbumina foi feita em um microcalorímetro (NanoITC da TA Instruments, United States), a 25°C . Cada experimento de titulação consistiu em 49 injeções sucessivas de uma solução aquosa de 10

mM de β -Lactoglobulina em uma solução aquosa de 1 mM de α -Lactoalbumina. Um intervalo de 300 segundos foi programado entre cada ponto, tempo suficiente para que o sinal retornasse à linha de base garantindo o equilíbrio do sistema. A primeira injeção de 1 μ L foi descartada para eliminar o efeito da difusão do material da seringa na cela calorimétrica. As adições subsequentes foram injetadas em volume constante de 5 μ L da solução de β -Lactoglobulina e no tempo de injeção de 1s. Para o processo estudado os dados obtidos foram tratados pelo *software* NanoAnalyse do próprio calorímetro.

4.7 Potencial Zeta

As medidas de Potencial Zeta foram feitas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom) que se baseia na técnica Laser Doppler Velocimetry. As amostras foram preparadas contendo 0,5 mg de proteína em 1 mL de água a 25°C. A determinação do Potencial Zeta foi feita em soluções aquosas de proteína pura (0,5 mg/mL) em valores de pH 1,9; 2,5; 3,6; 4,0; 5,6; 6,3; 7,2; 8,7; 9,4; 10,8 onde o pH foi corrigido com HCl ou NaOH. As medidas de Potencial Zeta para a mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina (0,5 mg/mL) em solução aquosa foram obtidas nos valores de pH 1,7; 2,7; 3,7; 4,5; 5,4; 6,4; 7,3; 8,7; 9,4 e 10,4. As medidas de Potencial Zeta para as nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina (2 mg/mL) em solução aquosa foram obtidas nos valores de pH 2,2; 3,0; 7,3; 8,2; 9,7 e as medidas de Potencial Zeta para as nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina (pH 7,3) em solução aquosa foram obtidas nos valores de concentração de 0,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/mL.

4.8 Determinação de tamanho de partícula

As medidas de tamanho de partícula foram feitas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom) e são fundamentados na técnica de espalhamento dinâmico de luz para determinação de tamanho de partícula. As amostras foram preparadas contendo 0,5 mg de proteína em 1 mL de água a 25°C. As medidas de tamanho foram realizadas variando o pH das soluções de proteína pura (0,5 mg/mL) em solução aquosa. O pH foi corrigido com HCl ou NaOH de acordo os valores de pH pré-determinados (1,9; 2,5; 3,6; 4,0; 5,6; 6,3; 7,2; 8,7; 9,4 e 10,8). Para as nanoestruturas de α -Lactoalbumina e

β -Lactoglobulina (pH 7,3) em solução aquosa foram obtidas nos valores de concentração de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/mL.

4.9 Espalhamento Dinâmico de Luz

As medidas de tamanho de partículas das nanoestruturas foram feitas em um Espalhador Dinâmico de luz (Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A), detector modelo BI – APD, serial nº A6169, Laser estado sólido no vermelho 661 nm BR labs, correlacionador TurboCorr de 522 canais, alinhamento e posicionamento (Goniômetro, modelo BI – 200SM). Para evitar oscilações o aparelho foi montado em uma mesa ótica, com amortecimento. O controle de temperatura foi de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O aparelho foi fixo em 30° . Antes que as medidas fossem realizadas, as amostras foram filtradas em um filtro de seringa de nylon de 0,22 μm (Millipore). Este filtro foi acoplado a um sistema de circulação de fluidos (BI – SFS, Brookhaven Instruments Corporation, U.S.A), por cerca de 1 hora. O aquecimento foi feito no goniômetro num sistema onde a fonte de calor foi um enrolamento com fios de cobre (200 voltas), com corrente tipicamente de 1A e tensão de 10 – 30 volts. Erro de temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. O resfriamento foi feito a temperatura ambiente por (5 a 6) horas. A função correlação foi acumulada tempo o suficiente para que o sistema apresentasse pouco ruído experimental. O tempo de acumulação para a mistura de α - Lactoalbumina e β -Lactoglobulina foi de 3 horas e para as nanoestruturas foi de 1 hora. É importante informar que durante o experimento a amostra não foi retirada do aparelho para minimizar problemas de contaminação e perturbação do sistema. Ou seja, desde a filtração até a síntese das nanoestruturas os experimentos foram realizados dentro do aparelho.

4.10 Microscopia de Transmissão Eletrônica

Uma gota de amostra foi colocada em uma telinha de cobre e seca naturalmente por 24 horas. Depois as imagens foram feitas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss, modelo EM 109, Oberkochen, Alemanha), em magnitudes de 12000, 20000 e 50000x respectivamente, com voltagem de aceleração de 80 kV.

4.11 Microscopia de Força Atômica

Uma gota da solução foi colocada sobre a superfície de mica e seca naturalmente por 1 hora. As imagens foram feitas no Modo de Contato intermitente (semi-contato), em um Microscópio de SPM modelo NTEGRA Probe Nanolaboratory (Molecular Devices and Tools for NanoTechnology, NT-MDT), montado em um sistema passivo de isolamento de vibrações constituído de cordas elásticas. Este microscópio tem a capacidade operar em diferentes modos de microscopia de tunelamento e microscopia de força atômica, podendo realizar ensaios em líquidos ou atmosferas controladas.

4.12 Análise Estatística

Os experimentos de formação de emulsão e de solubilidade para as proteínas separadamente foram conduzidos em esquema fatorial, segundo um delineamento inteiramente casualizado, DIC. Para a emulsão o esquema fatorial foi de 4x5 com quatro concentrações de NaCl (0; 0,1; 0,2; 0,3 mol/L) e cinco concentrações de proteína (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 % m/v), constituindo de 20 tratamentos e duas repetições, totalizando 40 unidades experimentais para cada tipo de óleo. Para a solubilidade em função da concentração de proteína e pH, o esquema fatorial foi 8x4, com oito concentrações de proteína (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 mg) e quatro valores de pH (3,0; 4,6; 5,4; 7,6), constituindo de 32 tratamentos e duas repetições, totalizando 64 unidades experimentais. Para a solubilidade das nanoestruturas em função do pH o experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado ,DIC, onde a solução de nanoestruturas se encontrava em numa concentração de 2mg/mL e quatro valores de pH (3,0; 4,6; 5,4; 7,6), constituindo de 4 tratamentos e duas repetições, totalizando 8 unidades experimentais. Os dados experimentais foram analisados usando o procedimento PROC GLM do software estatístico SAS (SAS versão 9,0, Cary, NC, SAS, Institute, Inc., 2002). A confiabilidade da equação do modelo polinomial obtido foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação, R^2 , os resultados das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico pelo teste de Fisher (F, $p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Solubilidade

As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os dados de solubilidade em função do pH (3,0; 4,6; 5,4 e 7,6), da concentração do sal NaCl (0; 0,2; 0,4 e 0,6 mol/mL), correspondente a força iônica (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mol/L) da concentração da proteína β -Lactoglobulina (2; 4; 6; 8 e 10 mg/mL).

Os dados de solubilidade da β -Lactoglobulina em todos os valores de pH estudados se apresentaram altos, cerca de 90%. Em torno do pH 5,4, faixa do seu pI, as solubilidades não exibiram variação considerável, estando em concordância com Vojdani (1996) que afirmou que a β -Lactoglobulina é cerca 90% de solúvel em pI em solução aquosa (1 mg/mL, pH 5,1).

Tabela 1. Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 3,0 em função da concentração de NaCl.

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubiliade (%)
3,0	2	0	98,5
3,0	2	0,2	99,2
3,0	2	0,4	94,1
3,0	2	0,6	94,8
3,0	4	0	96,8
3,0	4	0,2	97,4
3,0	4	0,4	95,2
3,0	4	0,6	88,2
3,0	6	0	90,1
3,0	6	0,2	91,2
3,0	6	0,4	89,6
3,0	6	0,6	91,3
3,0	8	0	90,1
3,0	8	0,2	93,8
3,0	8	0,4	93,6
3,0	8	0,6	92,9
3,0	10	0	96,3
3,0	10	0,2	98,8
3,0	10	0,4	98,4
3,0	10	0,6	95,6

Tabela 2. Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 4,6 em função da concentração de NaCl.

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubilidade (%)
4,6	2	0	92,6
4,6	2	0,2	95,4
4,6	2	0,4	96,9
4,6	2	0,6	99,4
4,6	4	0	84,6
4,6	4	0,2	87,4
4,6	4	0,4	83,9
4,6	4	0,6	82,8
4,6	6	0	77,5
4,6	6	0,2	82,9
4,6	6	0,4	80,4
4,6	6	0,6	75,9
4,6	8	0	79,3
4,6	8	0,2	79,6
4,6	8	0,4	81,9
4,6	8	0,6	72,3
4,6	10	0	92,3
4,6	10	0,2	90,7
4,6	10	0,4	96,3
4,6	10	0,6	91,6

Tabela 3. Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 5,4 em função da concentração de NaCl.

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubilidade (%)
5,4	2	0	86,3
5,4	2	0,2	94,8
5,4	2	0,4	92,5
5,4	2	0,6	97,5
5,4	4	0	86,8
5,4	4	0,2	92,9
5,4	4	0,4	96,5
5,4	4	0,6	95,6
5,4	6	0	94,6
5,4	6	0,2	92,4
5,4	6	0,4	98,0
5,4	6	0,6	89,8
5,4	8	0	98,3
5,4	8	0,2	96,9
5,4	8	0,4	94,2
5,4	8	0,6	93,7
5,4	10	0	95,0
5,4	10	0,2	97,3
5,4	10	0,4	98,3
5,4	10	0,6	92,4

Tabela 4. Solubilidade da β -Lactoglobulina em pH 7,6 em função da concentração de NaCl.

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubilidade (%)
7,6	2	0	83,3
7,6	2	0,2	96,1
7,6	2	0,4	93,7
7,6	2	0,6	97,5
7,6	4	0	92,1
7,6	4	0,2	97,7
7,6	4	0,4	95,6
7,6	4	0,6	94,5
7,6	6	0	93,2
7,6	6	0,2	90,2
7,6	6	0,4	94,1
7,6	6	0,6	94,4
7,6	8	0	93,0
7,6	8	0,2	93,3
7,6	8	0,4	91,5
7,6	8	0,6	94,3
7,6	10	0	95,6
7,6	10	0,2	93,7
7,6	10	0,4	92,8
7,6	10	0,6	86,3

As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os dados de solubilidade em função do pH (3,0; 4,6; 5,4 e 7,6), da concentração do sal NaCl (0; 0,2; 0,4 e 0,6 mol/mL), correspondente a força iônica de (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mol/L) e da concentração da proteína α -Lactoalbumina (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/mL).

O valores da solubilidade para a α -Lactoalbumina foi de 90% para os pHs de 5,4 e 7,6, sendo que no pH 3,0 a solubilidade apresentou um valor médio de 67,7% de solubilidade e no pH de 4,6, faixa em torno do seu pI, a solubilidade foi mínima, em torno de 46%.

Tabela 5. Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 3,0 em função da concentração de NaCl.

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubiliade (%)
3,0	2	0	74,7
3,0	2	0,2	83,8
3,0	2	0,4	59,1
3,0	2	0,6	60,7
3,0	4	0	81,3
3,0	4	0,2	71,0
3,0	4	0,4	45,2
3,0	4	0,6	55,3
3,0	6	0	56,1
3,0	6	0,2	71,6
3,0	6	0,4	48,4
3,0	6	0,6	37,5
3,0	8	0	87,8
3,0	8	0,2	73,4
3,0	8	0,4	60,6
3,0	8	0,6	78,1
3,0	10	0	89,3
3,0	10	0,2	72,1
3,0	10	0,4	74,3
3,0	10	0,6	73,0

Tabela 6. Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 4,6 em função da concentração de NaCl

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubiliade (%)
4,6	2	0	37,5
4,6	2	0,2	49,8
4,6	2	0,4	42,3
4,6	2	0,6	43,8
4,6	4	0	43,7
4,6	4	0,2	54,9
4,6	4	0,4	52,1
4,6	4	0,6	45,9
4,6	6	0	47,3
4,6	6	0,2	50,9
4,6	6	0,4	56,0
4,6	6	0,6	53,3
4,6	8	0	39,2
4,6	8	0,2	47,4
4,6	8	0,4	44,1
4,6	8	0,6	42,3
4,6	10	0	42,3
4,6	10	0,2	41,9
4,6	10	0,4	41,5
4,6	10	0,6	39,9

Tabela 7. Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 5,4 em função da concentração de NaCl

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubilidade (%)
5,4	2	0	83,6
5,4	2	0,2	88,5
5,4	2	0,4	99,9
5,4	2	0,6	89,2
5,4	4	0	96,6
5,4	4	0,2	98,1
5,4	4	0,4	99,0
5,4	4	0,6	99,8
5,4	6	0	98,8
5,4	6	0,2	98,9
5,4	6	0,4	97,0
5,4	6	0,6	95,8
5,4	8	0	99,8
5,4	8	0,2	99,3
5,4	8	0,4	99,8
5,4	8	0,6	98,7
5,4	10	0	98,8
5,4	10	0,2	97,5
5,4	10	0,4	98,6
5,4	10	0,6	91,0

Tabela 8. Solubilidade da α -Lactoalbumina em pH 7,6 em função da concentração de NaCl

pH	Concentração (mg/ml)	NaCl (M)	Solubilidade (%)
7,6	2	0	98,4
7,6	2	0,2	90,1
7,6	2	0,4	98,9
7,6	2	0,6	98,3
7,6	4	0	93,1
7,6	4	0,2	96,7
7,6	4	0,4	96,6
7,6	4	0,6	95,2
7,6	6	0	94,9
7,6	6	0,2	98,5
7,6	6	0,4	98,6
7,6	6	0,6	97,7
7,6	8	0	87,0
7,6	8	0,2	89,5
7,6	8	0,4	81,5
7,6	8	0,6	93,1
7,6	10	0	79,8
7,6	10	0,2	82,6
7,6	10	0,4	85,2
7,6	10	0,6	86,3

Sousa et al. (2009) avaliaram o efeito do pH e da concentração de sal na solubilidade da α -Lactoalbumina. Os valores de solubilidade mínimos foram encontrados no pH 4,0, que é, provavelmente, o ponto isoelétrico da proteína. Em valores de pH inferiores a 5,0 ocorreu

uma mudança na estrutura da proteína, uma vez que a acidificação do meio conduz à liberação do íon Ca^{2+} , a uma desnaturação reversível e a um processo de agregação. Já em valores de pH básico, verificou-se que a solubilidade aumentou em relação aos outros valores de pH. Os autores ajustaram um modelo polinomial de 4ª ordem aos dados de solubilidade.

Já Rodiles-López et al. (2008) avaliaram a solubilidade da α -Lactoalbumina, em valores de pH 3, 5, 7 e 9, sob o efeito da alta pressão hidrostática. Para as amostras na ausência da alta pressão hidrostática o maior valor de solubilidade foi obtido em pH 9,0 (91,4%) e o menor valor foi obtido em pH 5,0 (73,6%). Em pHs 3,0 e 7,0 não houve variação significativa ($p > 0,05$) da solubilidade (cerca de 85%).

De acordo com Fennema (1993), em pH alcalino, acima de 7,0, as moléculas de proteína apresentam cargas negativas (COO^-) em sua superfície e a repulsão entre as mesmas aumenta, diminuindo assim as interações proteína-proteína e aumentando as interações proteína-água, aumentando assim a solubilidade.

No presente trabalho foi observada uma concordância com o comportamento descrito por Rodiles-López et al. (2008) e Sousa et al. (2009). Observando que nos pHs de 3,0 e 4,6 (Tabela 5 e 6) a α -Lactoalbumina apresentou baixos valores para a solubilidade. Porém os menores valores foram encontrados no pH 4,6, valor na faixa do seu pI. Para os demais valores de pH (5,4 e 7,6), foram obtidos dados de solubilidade, em torno de 90%.

Em relação à concentração salina o mesmo comportamento apresentado pela β -Lactoglobulina se aplica a α -Lactoalbumina.

A solubilidade protéica aumentou com o aumento da força iônica, em valores compreendidos entre 0 e 0,2 mol/mL. Já com força iônica de 0,4 mol/L apresentou menores valores de solubilidade e na concentração salina de 0,6 mol/mL a solubilidade aumentou novamente.

A influência da concentração de proteína no comportamento da solubilidade foi de difícil interpretação. De acordo com Vojdani (1996) a agregação da proteína aumenta em concentrações altas. O controle deste problema é alcançado quando se mantêm a concentração de proteína entre (1-3) mg/mL. Para que o estudo da variação da concentração de proteína seja válido, a solubilidade foi analisada novamente, porém apenas em função do pH e da concentração de proteína.

A tabela 9 apresenta os dados de solubilidade da α -Lactoalbumina em função do pH (3,0; 4,6; 5,4 e 7,6) e da concentração de proteína (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/mL).

Tabela 9. Solubilidade da α -Lactoalbumina em função do pH e da concentração de proteína.

<i>Solubilidade da α-Lactoalbumina</i>				
<i>Concentração (mg/mL)</i>	<i>pH</i>			
	<i>3</i>	<i>4,6</i>	<i>5,4</i>	<i>7,6</i>
1	38,66	36,36	55,13	82,23
2	65,04	39,44	67,62	86,95
3	72,38	43,1	69,54	91,11
4	78,7	42,43	72,37	95,35
5	77,14	41,88	76,24	96,65
6	76,97	39,35	75,96	94,67
8	78,19	48,21	96,17	98,6
10	78,53	47,36	96,64	98,19

A tabela 10 apresenta os dados de solubilidade em função do pH (3,0; 4,6; 5,4 e 7,6) e da concentração da proteína β -Lactoglobulina (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg/mL).

Tabela 10. Solubilidade da β -Lactoglobulina em função do pH e da concentração de proteína.

<i>Solubilidade da β-Lactoglobulina</i>				
<i>Concentração (mg/mL)</i>	<i>pH</i>			
	<i>3</i>	<i>4,6</i>	<i>5,4</i>	<i>7,6</i>
1	96,69	91,29	92,5	94,12
2	97,48	90,77	87,95	93,73
3	95,25	84,3	84,1	83,34
4	92,83	80,41	78,55	81,49
5	89,55	78,19	76,09	74,87
6	93,63	79,83	78,14	83,51
8	93,04	76,68	92,85	93,57
10	95,35	79,93	94,42	94,63

Todos os fatores para a solubilidade da α -Lactoalbumina foram significativos ($p < 0,05$). O melhor modelo ajustado foi o modelo quadrático, com $R^2 = 0,68$.

O modelo polinomial de 2ª ordem (equação 18) foi utilizado para ajustar os dados de solubilidade da proteína.

$$S = 130,49 - 38,58pH + 3,62conc + 4,20pH^2 \quad (18)$$

Os comportamentos da solubilidade nos pHs de 3,0, 4,6, 5,4 e 7,6, em diferentes valores de concentração de α -Lactoalbumina estão apresentados no Figura 6.

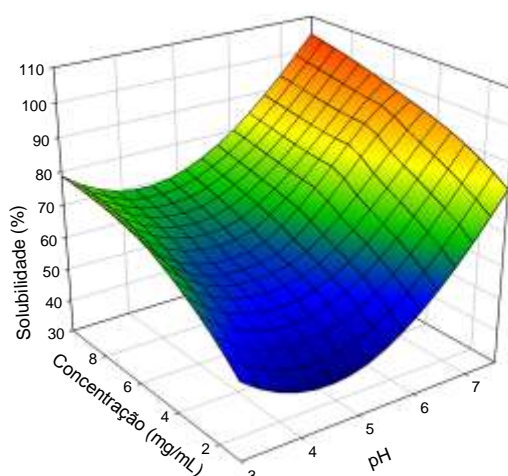


Figura 6. Gráfico da solubilidade da α -Lactoalbumina em diferentes pHs em função da concentração de proteína.

A solubilidade aumentou à medida que aumentava a concentração de proteína, porém a partir da concentração de 7 mg/mL a solubilidade começou a assumir um comportamento constante. Provavelmente, a partir deste ponto a concentração de proteína não influenciou mais na solubilidade, e o sistema possivelmente ficou saturado.

Os valores mínimos foram encontrados em pH 4,6 que é, provavelmente, o ponto isoelétrico (pI) da proteína. No ponto isoelétrico (pI) as proteínas apresentam sua mais baixa solubilidade, interações proteína-proteína aumentam porque forças eletrostáticas das moléculas estão num mínimo e menos água interage com as moléculas de proteína, o que torna uma condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem e se agregam e, possivelmente, precipitem (Antunes, 2003).

Em valores de pH alcalinos ,acima de 7,0, verifica-se que os dados de solubilidade foram elevados quando comparados com os outros pHs.

Os efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da α -Lactoalbumina estão apresentados na Figura 7.

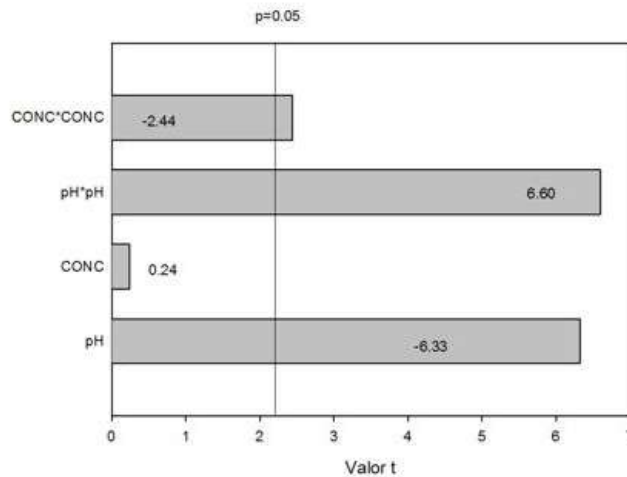


Figura 7. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da α -Lactoalbumina.

O gráfico de Pareto, sobre a solubilidade mostra que a relação quadrática do pH tem maior efeito sobre a solubilidade da α -Lactoalbumina e a concentração tem pouca efeito na solubilidade da α -Lactoalbumina.

Os fatores para a solubilidade da β -Lactoglobulina foram significativos ($p < 0,05$). O melhor modelo ajustado foi o modelo quadrático, com $R^2 = 0,74$.

O modelo polinomial de 2ª ordem (equação 19) foi utilizado para ajustar os dados de solubilidade da proteína.

$$S = 129,53 - 14,84pH + 0,24conc + 1,37pH^2 - 0,452pH * conc \quad (19)$$

O comportamento da solubilidade nos pHs de 3,0, 4,6, 5,4 e 7,6, em diferentes valores de concentração de β -Lactoglobulina estão apresentados no figura 8.

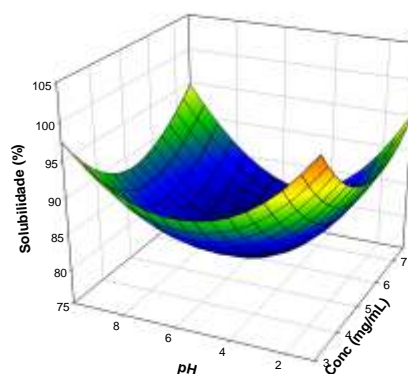


Figura 8. Gráfico da solubilidade da β -Lactoglobulina em diferentes pHs em função da concentração de proteína.

Os efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da β -Lactoglobulina estão apresentados na Figura 9.

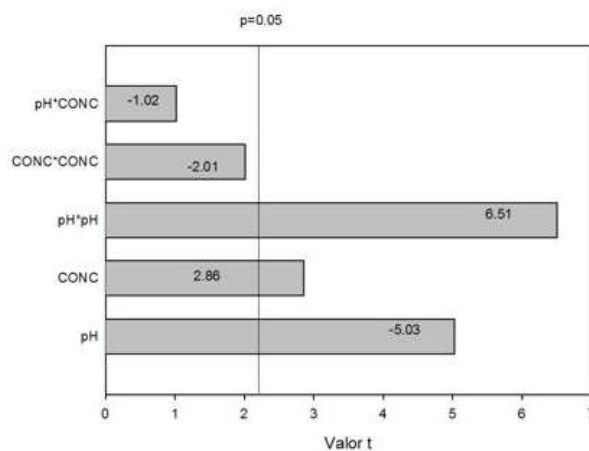


Figura 9. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis concentração e pH sobre a solubilidade da β -Lactoglobulina.

O gráfico de Pareto, sobre a solubilidade mostra que a relação quadrática do pH tem maior efeito sobre a solubilidade da α -Lactoalbumina e a concentração também tem um importante efeito na solubilidade da β -Lactoglobulina, em relação ao efeito da concentração na solubilidade da α -Lactoalbumina.

5.2 Solubilidade das nanoestruturas

A tabela 11 apresenta os dados de solubilidade das nanoestruturas em função do pH (3,0; 4,6; 5,4 e 7,6).

Tabela 11. Solubilidade das Nanoestruturas em função do pH.

pH	Solubilidade
3	70,68
4,6	81,30
5,4	99,41
7,6	96,67

A solubilidade das Nanoestruturas foi significativa ($p < 0,05$). O melhor modelo ajustado foi o modelo linear, com $R^2 = 0,69$.

O modelo polinomial de 1ª ordem (equação 20) foi utilizado para ajustar os dados de solubilidade das Nanoestruturas.

$$S = 86,14 - 15,42pH \quad (20)$$

O comportamento da solubilidade das nanoestruturas em função do pH está apresentado na Figura 10.

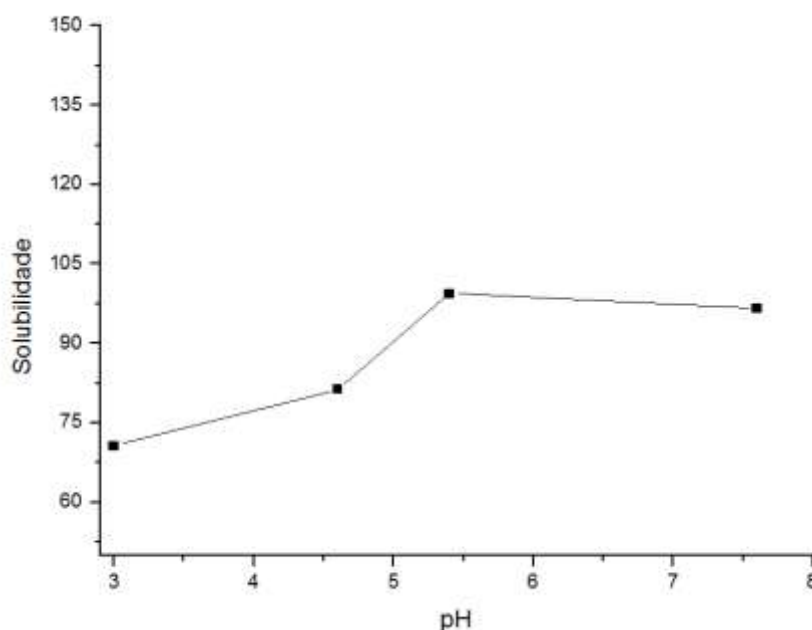


Figura 10. Gráfico da solubilidade das Nanoestruturas em função pHs.

Segundo os valores apresentados na tabela 11 os valores de solubilidade para as nanoestruturas no pH em torno 7,3, pH fisiológico, encontram –se entre 70,7 e 99,4. O comportamento representado no gráfico mostra que a solubilidade é linear e aumenta à medida que aumenta o pH. Porém apresenta uma leve queda no valor da solubilidade no pH de 7,6. Na tabela 12 estão apresentados os valores de solubilidade da α -Lactoalbumina, β -Lactoglobulina e das nanoestruturas em função do pH para melhor compreensão do comportamento da solubilidade das nanoestruturas. De acordo os valores apresentados na tabela 12 é possível concluir que a solubilidade das nanoestruturas é fortemente influenciada pela β -Lactoglobulina na maioria dos valores de pH, apenas no pH 3,0 que o valor da solubilidade das nanoestruturas se aproxima do valor da solubilidade da α -Lactoalbumina, possivelmente seja a α -Lactoalbumina que esteja influenciando a solubilidade, ou seja, esteja presente em maior quantidade na superfície.

Tabela 12. Solubilidade da α -Lactoalbumina, β -Lactoglobulina e das Nanoestruturas em função do pH.

pH	α -Lactoalbumina	β -Lactoglobulina	Nanoestruturas
3	65	97,5	70,7
4,6	39,4	90,8	81,3
5,4	67,6	87,9	99,4
7,6	86,9	93,7	96,7

5.3 Emulsão

5.3.1 Índice da Atividade Emulsificante e Estabilidade da Emulsão

O resumo da análise de variância para o Índice da Atividade Emulsificante e para a Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina e da α -Lactoalbumina em função da concentração de proteína e da força iônica para o óleo de soja e oliva está apresentado nas tabelas 13 a 20.

Tabela 13. ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	3840,4339
Sal	3	25585,6595
Conc x Sal	9	1583,3889

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 14. ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da α -Lactoalbumina para o óleo de oliva.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	2091,1953
Sal	3	55609,1993
Conc x Sal	9	13801,8316

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 15. ANOVA da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	1781,79673*
Sal	3	1804,6415*
Conc x Sal	9	99,1131

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 16. ANOVA da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de oliva.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	527,7433*
Sal	3	1991,7609*
Conc x Sal	9	103,5951

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 17. ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	22850,5832*
Sal	3	36479,6535*
Conc x Sal	9	4317,325

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 18. ANOVA do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	6788,7782
Sal	3	10724,0527
Conc x Sal	9	1034,0696

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 19. ANOVA da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	226,1362
Sal	3	259,627
Conc x Sal	9	220,6362

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 20. ANOVA da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.

Fontes de Variação	G.L	Q.M
Conc	3	142,0342
Sal	3	485,9323
Conc x Sal	9	216,2369

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

O Índice da Atividade Emulsificante da α -Lactoalbumina não foi significativo ($p>0,05$) tanto para o óleo de soja como para o óleo de oliva. A Estabilidade da Emulsão foi significativa ($p<0,05$) para o fator concentração de proteína e concentração de sal, tanto para o óleo de soja como para o óleo de oliva. A Estabilidade da Emulsão da solução de β -Lactoglobulina não foi significativa ($p>0,05$) para os dois tipos de óleo, já o Índice da Atividade Emulsificante foi significante ($p<0,05$), porém apenas para os dados do óleo de soja.

O resumo da análise de variância da regressão da Estabilidade da emulsão da α -Lactoalbumina para óleo de soja e oliva e Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de soja em função da concentração de proteína e da concentração de sal estão apresentados nas tabelas 21, 22 e 23.

Tabela 21. Regressão da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M	R ²
Regressão	5	1971,1824	76%
Resíduo	26	122,3044	
Total	31		

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 22. Regressão da Estabilidade da Emulsão da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva.

Fontes de Variação	G.L	Q.M	R ²
Regressão	5	1316,7978	67%
Resíduo	26	126,0273	
Total	31		

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 23. Regressão do Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina para o óleo de soja.

Fontes de Variação	G.L	Q.M	R ²
Regressão	5	38177,9804	76%
Resíduo	26	2317,4161	
Total	31		

(*)significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Um modelo polinomial de segunda ordem (equação 21) foi usado para ajuste dos dados da Estabilidade da Emulsão (ESI) da α -Lactoalbumina para o óleo de soja:

$$ESI = sal^2 + conc \quad (21)$$

Um modelo polinomial linear (equação 22) foi usado para ajuste dos dados da Estabilidade da Emulsão (ESI) da β -Lactoglobulina para o óleo de oliva:

$$ESI = sal + conc \quad (22)$$

A regressão do Índice da Atividade Emulsificante se apresentou significativa em todos os parâmetros, desdobrando a interação $conc \times sal$, somente a concentração de 0,1% de β -Lactoglobulina foi significativo a 5% de probabilidade. Um modelo polinomial de segunda ordem foi usado para ajuste dos dados da β -Lactoglobulina para o óleo de soja (equação 23):

$$EAI = conc^2 + sal + conc * sal \quad (23)$$

Dados da Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina em função da concentração de NaCl e de proteína nos óleos de oliva e soja estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

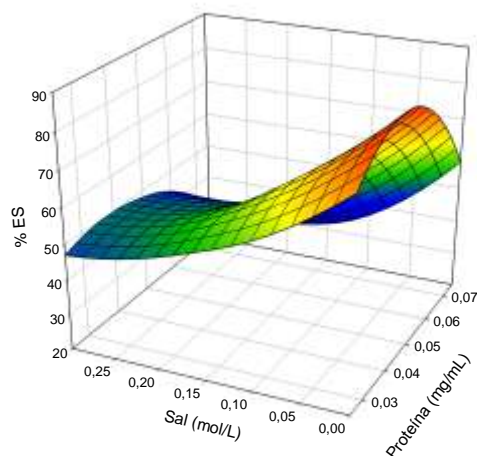


Figura 11. Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina em função da concentração NaCl e de proteína em óleo de soja.

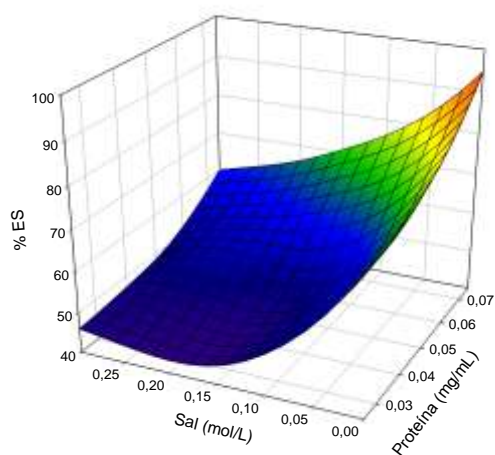


Figura 12. Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina em função da concentração de NaCl e de proteína em óleo de oliva.

Os valores da Estabilidade da emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja ficaram entre (31,4 – 69,6) % e para o óleo de oliva entre (43,9 – 87,9) %.

A Estabilidade da emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de soja tende a aumentar com o incremento da força iônica. À medida que se aumenta a concentração de proteína aumenta a estabilidade até a concentração de 0,05%, depois desta concentração a estabilidade tem um comportamento contrário. O ponto máximo da estabilidade é dado na concentração de 0,05% de proteína e 0,3 mol/L de NaCl.

Segundo Duarte et al. (1998) nas emulsões, as gotículas de gordura possuem carga elétrica resultante dos grupamentos protéicos ionizados, como também dos íons provenientes

da água. Dessa maneira, os íons oriundos do sal se depositam em uma dupla camada, uma vez que o sistema necessita estar eletricamente neutro. Como a densidade de cargas decresce exponencialmente com a distância do centro desse sistema, a adição crescente de sal provoca uma redução das forças de repulsão entre as gotículas de gordura que, então, tendem a se aproximar levando à floculação e à perda da estabilidade.

A estabilidade da emulsão para o óleo de oliva cresce à medida que aumenta a concentração de proteína e a concentração de sal.

Comparando os dois óleos o óleo de oliva apresentou maiores valores de estabilidade. E este comportamento é visto na figura 12.

A diferença do comportamento da atividade do óleo de soja para o óleo de oliva se dá pela diferenciação no perfil de ácidos graxos de cada óleo. No óleo de soja os ácidos graxos são predominantemente poliinsaturados de cadeia longa (Lubisco, 2007). Já o óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico, um ácido de cadeia longa monoinsaturada e o de soja apenas 22,3% (Vieira et. al, 2005). Esta variação de composição faz com que o óleo de soja seja mais reativo que o óleo de oliva, porém também se torna menos resistente a mudanças na estrutura ao longo do tempo (Boye et al., 2010).

Dados do Índice da Atividade Emulsificante da β -lactoglobulina em função da concentração de sal (NaCl) para o óleo de soja estão apresentados na figura 13.

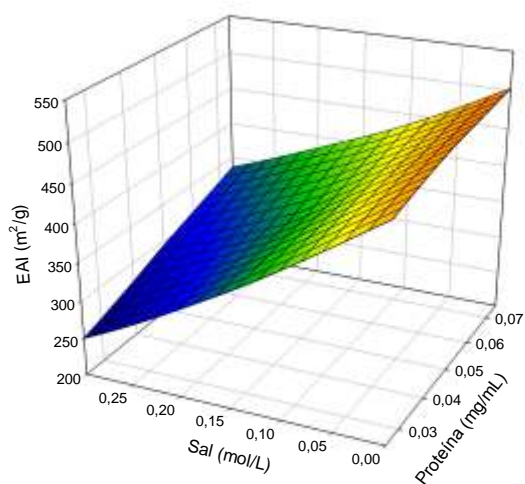


Figura 13. Índice da Atividade Emulsificante da β -lactoglobulina em função da concentração de sal e de proteína em óleo de soja.

O Índice da Atividade Emulsificante para β -Lactoglobulina variou entre (277,9 a 509,3) (m^2/g).

Segundo Herceg et al. (2007), o Índice da Atividade Emulsificante (EAI) se dá pela área de interface estabilizada por unidade de massa de proteína. Sendo assim no experimento com a β - Lactoglobulina, ela se propagou na superfície da interface água-óleo, mudando a sua conformação estrutural na interface e, conseqüentemente estabilizando uma área de superfície maior, obtendo maiores valores do Índice da Atividade Emulsificante.

Como o Índice da Atividade Emulsificante mede a quantidade de óleo que pode ser emulsificado por unidade de massa (Boye et al, 2010), o aumento da Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina em função da concentração de proteína e da concentração de sal era esperado, já que o óleo de soja é um óleo mais reativo do que o de oliva.

A técnica turbidimétrica é uma técnica pouco precisa para expressar as propriedades emulsificantes. Na emulsão, mesmo que estabilizada pela energia mecânica fornecida ao sistema, existe uma energia atribuída à cinética dos glóbulos de gordura dentro da emulsão, sendo necessária a utilização de aparelhos mais sofisticados e sensíveis para detectar a dinâmica da formação da emulsão e expressar mais confiadamente os parâmetros desta propriedade funcional.

5.4 Calorimetria de Titulação isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica foi usada com o intuito de conhecer a estequiometria do sistema α - Lactoalbumina e β -Lactoglobulina. Tal informação era necessária para a formação das nanoestruturas, já que a proporção inicialmente testada de 1:1 não foi suficiente para a formação das mesmas.

Na figuras 14 está apresentada a curva de titulação isotérmica para β -Lactoglobulina (10 μ m) em α -Lactoalbumina (1 μ M).

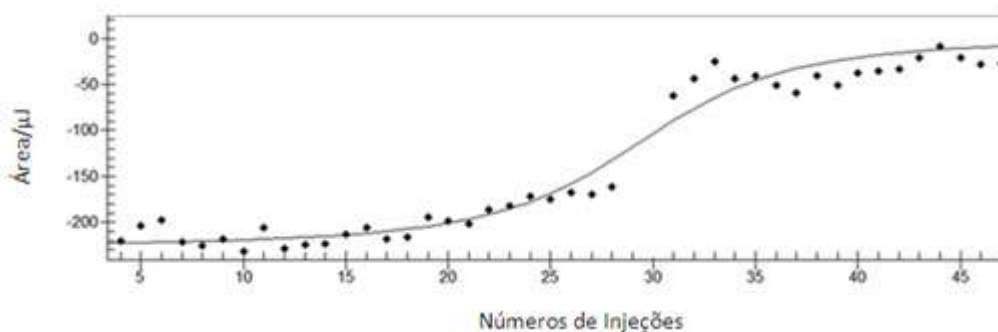


Figura 14. Curva de Titulação Calorimétrica da β – Lactoglobulina em α -Lactoalbumina.

Cada medida na titulação calorimétrica fornece um fluxo de energia que gera um pico que representa a energia associada à injeção de um pequeno volume da solução da seringa na solução presente na célula de amostra. À medida que a solução presente na célula de amostra vai atingindo a saturação, o sinal de energia liberada vai diminuindo até atingir a saturação completa. Integrando a área de cada pico (energia liberada ao longo de um intervalo de tempo) obtêm-se a medida da entalpia (Reis, 2010) e a uma curva de forma sigmóidal.

Para tanto foi possível obter o coeficiente estequiométrico da reação, de cerca de 1,66 correspondendo a um complexo de estequiometria 2:1 de β -Lactoglobulina em α -Lactoalbumina. Adicionalmente, por meio do ajuste não linear, obtido pelo próprio programa, foi possível estimar a constante de formação do complexo β -Lactoglobulina/ α -Lactoalbumina e seu valor está apresentado na Tabela 24. De posse do valor da variação de entalpia do processo obtido experimentalmente e com a utilização de equações clássicas da termodinâmica (Sousa, 2007) foi possível determinar ainda os termos ΔG° e $T\Delta S^\circ$, também apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Parâmetros termodinâmicos do sistema β – Lactoglobulina em α -Lactoalbumina.

N (mol)	K	ΔG° (kJ/mol)	ΔH°(kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)
1,66	32950	-25,79	-4,55	21,24

A formação do complexo constituído pelas moléculas de β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina foi espontânea, com uma variação de energia de $\Delta G^\circ = -25,79$ kJ/mol. A entalpia, expressa as interações intermoleculares presentes nos diferentes microambientes, para a complexação entre a β -Lactoglobulina e α -Lactoalbumina um processo exotérmico ($\Delta H^\circ = -4,55$ kJ/mol) foi observado e, a este fenômeno, pode ser atribuído a quebra e formação de interações; principalmente, a força da interação do ligante com a proteína-alvo ou da proteína-proteína, por meio, das interações químicas (Van der Waals, Ligações de hidrogênio, e outras).

A contribuição entrópica ($T\Delta S^\circ = 21,24$ kJ/mol) pode ser atribuída a balanços de solvatação/dessolvatação das espécies durante o processo, à variação no número de espécies no produto em relação aos reagentes, à mobilidade molecular, à mistura, à agregação, e às alterações conformacionais das macromoléculas, ou seja, este parâmetro termodinâmico é formado por uma componente configuracional que caracteriza a probabilidade da distribuição espacial das moléculas no sistema (Leavitt e Freire, 2001; Reis, 2010).

5.5 Potencial Zeta

Medidas do Potencial Zeta da α -Lactoalbumina, β -Lactoglobulina (5 mg/mL) puras e da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, estão apresentados nas figuras 15, 16 e 17, respectivamente. A concentração das proteínas puras foi de 5mg/mL e a mistura das proteínas foi feita numa proporção de 1:1 em solução aquosa.

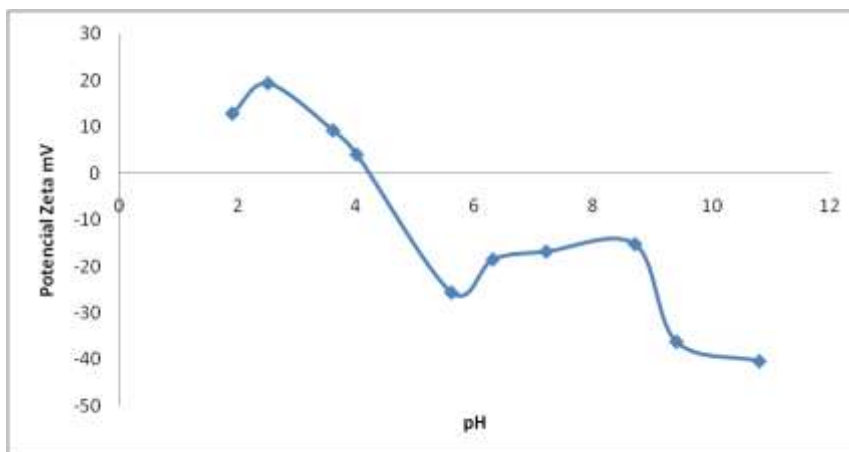


Figura 15. Gráfico do Potencial Zeta da α -Lactoalbumina pura em solução aquosa, em função do pH.

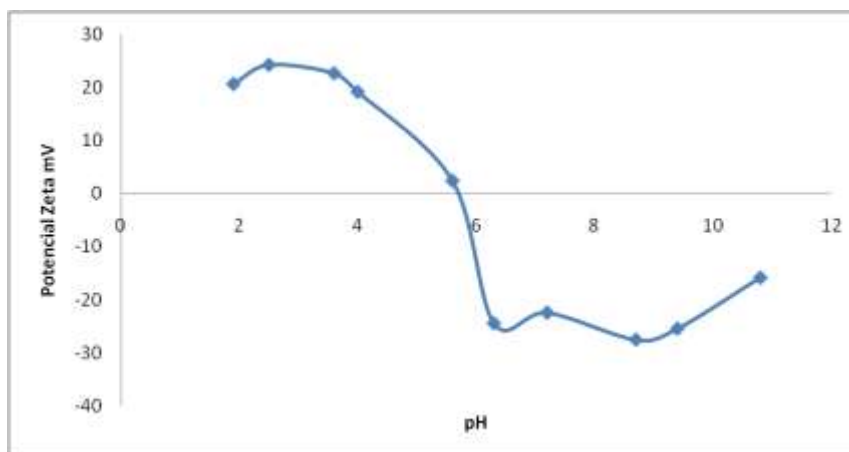


Figura 16. Gráfico do Potencial Zeta da β -Lactoglobulina pura em solução aquosa, em função do pH.

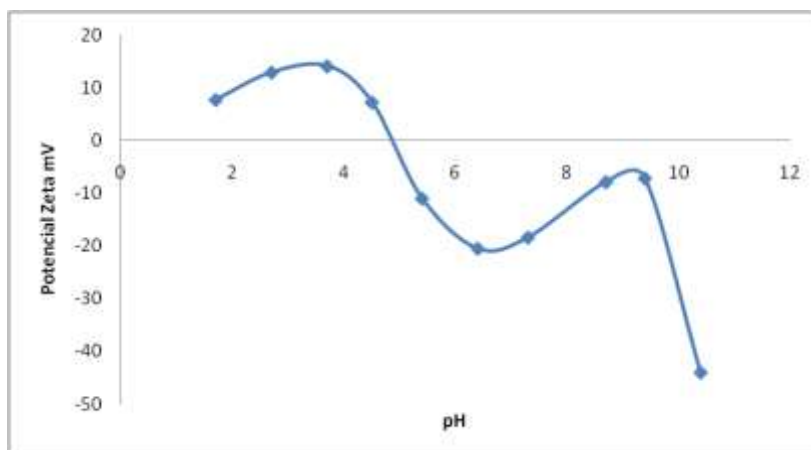


Figura 17. Gráfico do Potencial Zeta da mistura de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, pura em solução aquosa, em função do pH.

O Potencial Zeta foi zero para a α -Lactoalbumina no pH 4,2 e para a β -Lactoglobulina no pH 5,8, valores muito próximos dos valores de pI encontrados na literatura de (4,65 – 4,8) para a α -Lactoalbumina (Kim e Baum, 1998; Thompson et al. 2009) e de (5,2 – 5,35) para β -Lactoglobulina (Sgarbieri, 2005; Thompson et al. 2009), tais variações de valores de pH se explicam pelo polimorfismo característico da α -Lactoalbumina e da β -Lactoglobulina. Para a mistura das proteínas e nanoestruturas o Potencial Zeta no ponto zero foi 5,0, mostrando que o pI das soluções das proteínas juntas e depois do tratamento térmico continuam em torno do valor de pI das proteínas separadamente.

Quando o pH é muito distante do ponto isoelétrico, o valor absoluto do potencial zeta se torna maior. A repulsão eletrostática é dominante sobre a força de Van der Waals e a aglomeração é reprimida. Quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico, a força repulsiva está enfraquecida devido à baixa carga de superfície e o valor absoluto de zeta potencial se torna menor (Jiang et al., 2009).

Nas figuras 18 e 19 estão apresentados o Potencial Zeta das nanoestruturas na concentração de 2 mg/mL em diferentes pHs e o Potencial Zeta das nanoestruturas no pH 7,3 em diferentes concentrações das proteínas.

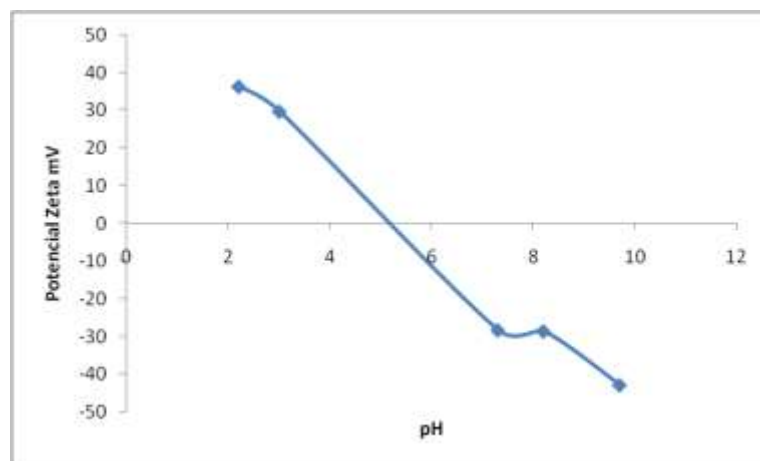


Figura 18. Gráfico do Potencial Zeta das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, em função do pH.

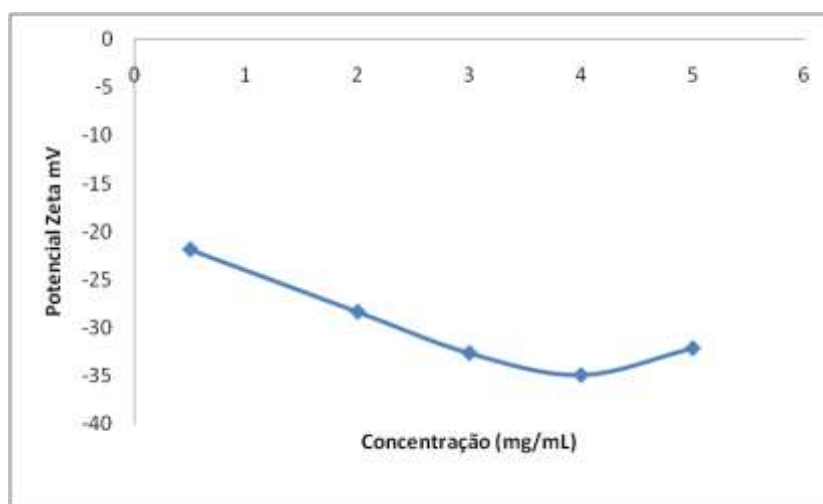


Figura 19. Gráfico do Potencial Zeta das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em função da concentração das proteínas.

Hu et al. (2007) produziram nanogéis de Ovoalbumina e Ovotransferina via “Self-Assembly”. As proteínas estudadas apresentam pI muito próximos, 4,8 e 6,8, respectivamente. Como a α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, apresentam pI próximos, 4,2 e 5,4, respectivamente, as considerações dos autores são válidas: o valor zero do Potencial Zeta da Ovoalbumina e da Ovotransferina apareceu próximo dos seus pIs, concluindo que a superfície do nanogel está composta por ambas as moléculas de proteína.

O comportamento do Potencial Zeta em função do pH para as proteínas isoladas, misturadas e nas nanoestruturas foi o mesmo, ou seja, os valores foram positivos para pHs acima dos pIs e negativos para pHs abaixo deles. E o comportamento do Potencial Zeta para as nanoestruturas em função da concentração das proteínas, em pH 7,3, foi o mesmo

apresentado na figura 19, pois à medida que se aumentou a concentração protéica, houve diminuição do Potencial Zeta.

Suspensões estáveis e instáveis são geralmente obtidas a cada 30 ou -30 mV. Partículas com potencial Zeta mais positiva do que 30 mV ou mais negativo de -30 mV são normalmente consideradas estáveis (Malven Instruments). Em termos de estabilidade, na figura 19, as nanoestruturas mais estáveis se encontram em concentração de proteína maiores que 2 mg/mL.

5.6 Tamanho das partículas

Os raios hidrodinâmicos das proteínas puras α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em solução aquosa, na concentração de 0,5 mg/mL, numa proporção de 1:1, estão apresentados nas tabelas 25 e 26, respectivamente.

Conforme a tabela 25 a α -Lactoalbumina apresentou raios variando entre (1,63 e 189,8) nm. Nos valores de pH de 3,6; 4,0 e 5,6, em torno do ponto isoelétrico, foram encontrados raios superiores a 70 nm indicando a presença de aglomerados. Nos demais pHs as moléculas de proteína estão provavelmente em suas formas mais simples (monômeros e dímeros). Alguns autores informam que esta alteração de tamanho de sua estrutura é reversível a depender do pH (Sgabieri, 2005; Fox e McSweeney, 1998, Sousa et al., 2009).

Tabela 25. Raio hidrodinâmico da α -Lactoalbumina em função do pH.

pH	PDI	Raio (nm)	Massa Molar (kDa)
1,9	0,369	2,18 ± 0,45	21 ± 4,9
2,5	0,386	1,89 ± 0,39	15 ± 6,4
3,6	0,36	79,23 ± 25,49	9,34x10 ⁴ ± 3x10 ⁴
4	0,354	142,5 ± 58,38	3,69x10 ⁵ ± 7,58x10 ⁴
5,6	0,412	189,8 ± 69,54	7,21x10 ⁵ ± 1,53x10 ⁵
6,3	0,707	2,28 ± 0,42	23,2 ± 9,9
7,2	0,374	2,00 ± 0,37	17,2 ± 6,5
8,7	0,632	1,63 ± 0,33	10,6 ± 6,6
9,4	0,52	2,46 ± 1,0	27,6 ± 9,8
10,8	0,511	2,053 ± 0,09	18,1 ± 1,3

No ponto isoelétrico a proteína normalmente apresenta a menor solubilidade. A interação proteína-proteína aumenta porque as forças eletrostáticas das moléculas são minimizadas e a molécula de proteína faz menos interações com a água. Esta é uma condição

favorável para as moléculas de proteína se aproximem uma das outras, agreguem e possivelmente precipitem (Vojdani, 1996).

Os raios hidrodinâmicos apresentados na tabela 26 para a β -Lactoglobulina isolada exibiram um aumento de tamanho nos pHs 4,0; 5,6 e 6,3. Nos demais pHs a variação do raio foi mínima indicando uma pequena influencia do pH sobre o tamanho das partículas nas regiões distantes do pI.

Tabela 26. Raio hidrodinâmico da β -Lactoglobulina em função do pH.

pH	PDI	Raio (nm)	Massa Molar (kDa)
1,9	0,515	2,30 \pm 0,26	23,8 \pm 7,1
2,5	0,465	1,49 \pm 0,12	8,6 \pm 0,9
3,6	0,567	2,06 \pm 0,21	18,3 \pm 3,5
4	0,523	192,0 \pm 54,15	7,41x10 ⁵ \pm 1,52x10 ⁵
5,6	0,399	169,5 \pm 41,97	5,53x10 ⁵ \pm 1,37x10 ⁵
6,3	0,445	202,0 \pm 41,82	8,34x10 ⁵ \pm 1,38x10 ⁵
7,2	0,483	2,45 \pm 0,97	27,4 \pm 2,2
8,7	0,465	2,41 \pm 0,25	26,2 \pm 4,4
9,4	0,689	2,02 \pm 0,80	17,5 \pm 8,0
10,8	0,438	2,60 \pm 0,19	31,6 \pm 7,6

Taulier et al. (2001) afirmam que entre os pH 2 e 13 a β -Lactoglobulina exibe uma série de transições estruturais. Nos pHs entre 4 e 5 ocorre a transição da proteína de dímero a octômero, tal como sugerido por uma variedade de métodos biofísicos, como espalhamento de luz, eletroforese, ultra centrifugação e espectroscopia NMR.

Alguns autores apresentam diferentes formas estruturais e comportamento da β -Lactoglobulina em diferentes pHs. Uma lista destas informações está na tabela 27.

Tabela 27. Diferentes formas estruturais da β -Lactoglobulina em função do pH.

pH	Forma	Referência
1,0 - 2,0	mudança apenas na estrutura secundária	Sgarbieri,2005
perto de 3,0	dímeros	Taulier et al,2001
< 3,5	monômeros	Antunes, 2003 ; Fox e McSweeney, 1998
2,5 - 4,0	dímeros - monômeros	Sgarbieri,2005
4,0 - 5,0	dímeros - octômeros	Taulier et al,2001
4,6 - 5,5	dímeros - octômeros	Fox e McSweeney,1998
5,2	octômeros	Antunes, 2003
pH neutro	dímeros	Fox e McSweeney,1998
> 7,5	monômeros	Antunes, 2003 ; Fox e McSweeney, 1998
6,5 - 8,5	transição de Tanford*	Sgarbieri,2005

* alterações localizadas das estruturas secundária e terciária, sem uma mudança na conformação global da proteína

Em solução, as cadeias laterais de aminoácidos estão envolvidas em diferentes interações, tais como força de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Vojdani, 1996).

A tabela 28 apresenta os raios hidrodinâmicos das nanoestruturas, para diferentes concentrações de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina, onde a relação α -Lactoalbumina: β -Lactoglobulina foi mantida em 2:1, no volume de 3 mL.

Tabela 28. Raio hidrodinâmico das nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em função da concentração das proteínas, no pH 7,3.

Concentração (mg/mL)	PDI	Raio (nm)	Massa Molar (kDa)
1	0,202	1,31 \pm 0,41	6,4 \pm 2,6
2	0,388	27,94 \pm 0,13,76	8,15 $\times 10^3$ \pm 4,01 $\times 10^3$
3	0,389	26,65 \pm 12,57	7,29 $\times 10^3$ \pm 3,44 $\times 10^3$
4	0,395	29,83 \pm 16,04	9,5 $\times 10^3$ \pm 5,11 $\times 10^3$
5	0,407	33,41 \pm 16,97	1,24 $\times 10^4$ \pm 6,29 $\times 10^3$

De acordo com os resultados apresentados na tabela 28 pode-se concluir que a formação de nanoestruturas estáveis se dá a partir da concentração de 2 mg/mL de cada proteína. O aumento no tamanho das partículas foi proporcional ao aumento da concentração.

5.7 Espalhamento Dinâmico de Luz

Nas figuras 20, 21 e 22 estão apresentados as curvas de correlação normalizadas da mistura proteica (α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina) e das nanoestruturas formadas a 80°C, nos tempos de 15, 30 e 90 minutos de aquecimento.

Quanto às curvas de correlação é notável a diferença existente entre as duas amostras. A mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina isenta do processo de gelificação, ou seja, sem passar pelas etapas de aquecimento e resfriamento, possui um tempo de decaimento diferente das nanoestruturas.

A organização existente nas nanoestruturas produziu uma curva com diferença no comportamento quando comparado com a mistura de proteínas. Mesmo considerado que as proteínas e o meio sejam os mesmos, e que o sistema passou apenas por uma modificação física. As novas estruturas formadas se movimentam mais lentamente do que as estruturas da mistura que é observado por um deslocamento das curvas de correlação para tempos maiores.

Quanto ao tempo de aquecimento testado (15, 30 e 90 minutos), as figuras 20, 21 e 22 exibem uma curva de correlação mais deslocada para tempos maiores (curva em verde), indicando que os processos termodinâmicos são mais lentos em comparação às outras curvas. Isso significa que as estruturas nessa solução têm maiores dimensões (equações $\frac{1}{\tau_c} = Dq^2$ e $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$).

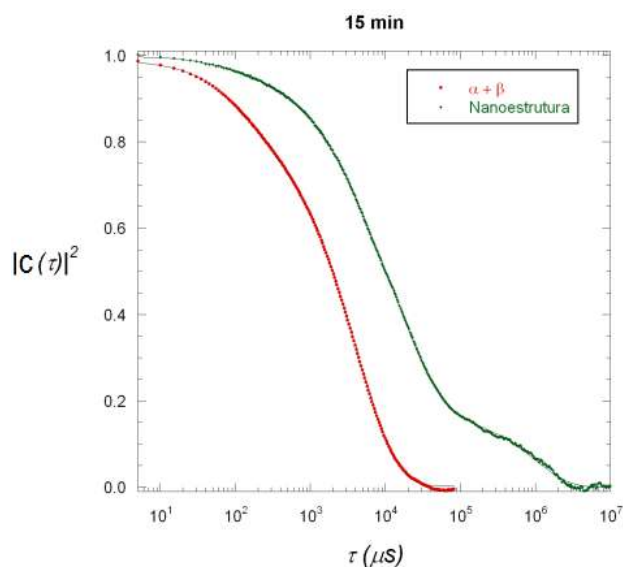


Figura 20. Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina e das nanoestruturas com 15 minutos de aquecimento.

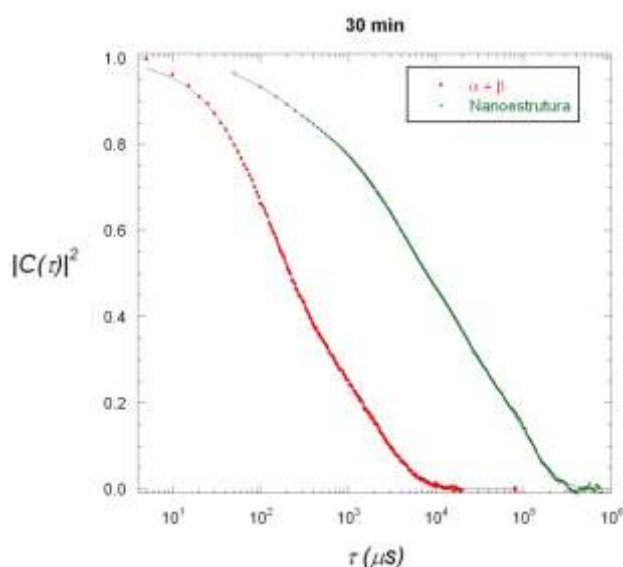


Figura 21. Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina e das nanoestruturas com 30 minutos de aquecimento.

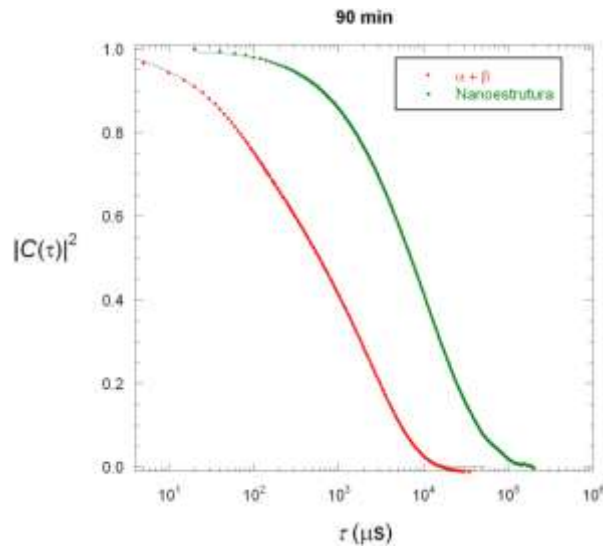


Figura 22. Curvas de Correlação normalizadas da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina e das nanoestruturas com 90 minutos de aquecimento.

Nas Figuras 23, 24 e 25 estão apresentadas as distribuições de tempos de decaimento das misturas proteicas de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina e das nanoestruturas nos tempos de (15, 30 e 90) minutos de aquecimento, a 80°C .

Verifica-se que abaixo a mistura de proteínas apresentou dois picos e quando passou pelo processo de gelificação para formação das nanoestruturas apresentou três picos. Isso mostra que este comportamento é próprio da amostra, pois perdura nos três tempos de aquecimento avaliados.

A presença de vários picos, tanto na mistura de proteínas como nas nanoestruturas caracteriza uma amostra com várias populações. Com o processo de gelificação as distribuições se deslocam para valores de diâmetros maiores, com isso as nanoestruturas ficaram mais lentas.

Para reduzir a presença de poeira e formação de aglomerados, a amostra foi filtrada antes de aquecer até que a função correlação apresentasse pouco ruído experimental (curvas em vermelho nas Figuras 23, 24 e 25).

A etapa de filtração da amostra antes do aquecimento foi realizada usando filtros cujo tamanho do poro foi grande o suficiente para garantir que parte da amostra não ficasse retida (poros de $0,22\ \mu\text{m}$). A rigor outros fatores devem ser controlados e alterados para que a homogeneidade das partículas seja alcançada, tais como pH do meio e força iônica.

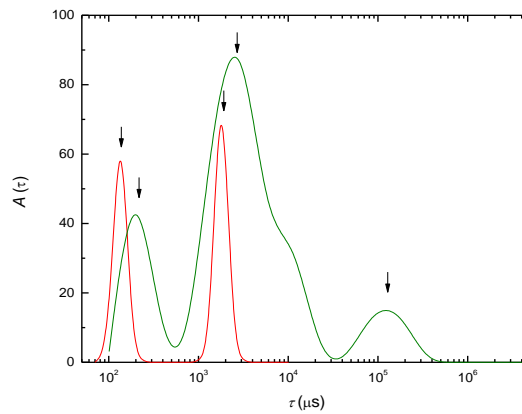


Figura 23. Tempos de decaimento da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 15 minutos de aquecimento.

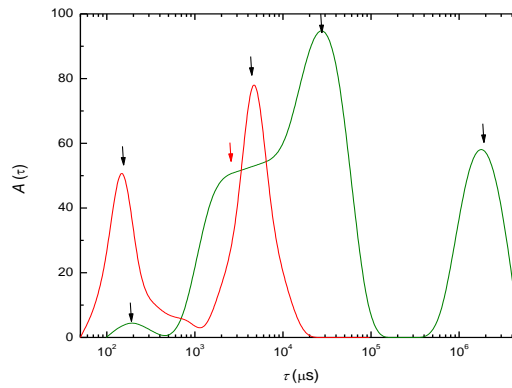


Figura 24. Tempos de decaimento da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 30 minutos de aquecimento.

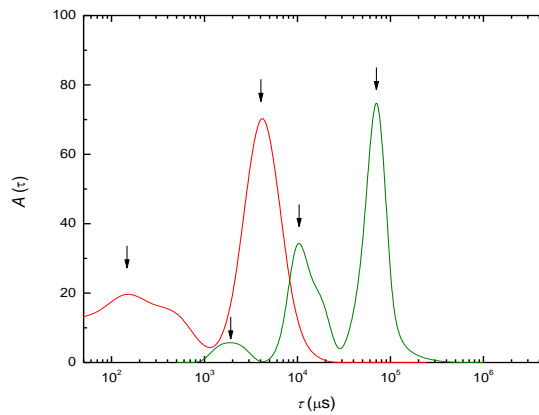


Figura 25. Tempos de decaimento da mistura de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina em vermelho e das nanoestruturas, em verde, com 90 minutos de aquecimento.

Na tabela 29 estão apresentados os raios hidrodinâmicos das misturas proteicas e das nanoestruturas nos tempos de (15, 30 e 90) minutos de aquecimento.

Os raios foram calculados para tempos de decaimento indicados por setas em preto nas figuras 23, 24 e 25, não foi considerada a existência de picos não definidos, porém na figura 24 a existência de um pico pouco definido, seta em vermelho, é representada porque o seu raio hidrodinâmico foi considerável e se enquadrava na faixa dos raios hidrodinâmicos das nanoestruturas.

Tabela 29. Raios Hidrodinâmicos das misturas de α - Lactoalbumina e β - Lactoglobulina e das nanoestruturas.

	Raio Hidrodinâmico (nm)					
	Mistura de α -lactoalbumina e β - Lactoglobulina		Nanoestruturas			
	1° pico	2° pico	1° pico	2° pico	3° pico	4° pico
15 minutos	1,3	18	1,2	25,4	1237,6	
30 minutos	1,5	49	1,8	22	265,3	17220
90 minutos	1,5	43,8	20,1	112,5	743,4	

A tabela 29 apresenta dois picos na amostra antes da gelificação, o menor atribuído as proteínas e o segundo um pouco maior atribuído a aglomerados. É possível observar que nos tempos de 15 e 30 minutos das nanoestruturas a existência de um primeiro pico com raios hidrodinâmicos bem inferiores aos demais (1,2 e 1,8 nm), isto pode se atribuir a proteínas que não gelificaram e no terceiro pico para 15 minutos e quarto pico para 30 minutos a presença de partículas de raios muito grandes (1,2 e 17,2 μ m) associado a presença de aglomerados e sujeira da amostra.

Os aglomerados são estruturas desuniformes e de superfície irregular (Figura 30), sua associação não apresenta uma estruturação organizada como a apresentada nas nanoestruturas (Figura 29).

O tempo de aquecimento de 90 minutos apresenta uma distribuição de tamanhos ideal, pois os picos representam nanoestruturas de raios hidrodinâmicos numa faixa aceitável de tamanho e indica que toda a amostra foi gelificada. Os tamanhos encontrados neste tratamento caracteriza uma amostra com nanoestruturas de proteína com várias tamanhos. A faixa de tamanho encontra no tratamento de 90 minutos esta em concordância com Yu et al (2006) que produziram nanogel de Lisozima e Ovoalbumina onde as proteínas foram gelificadas a 80°C por 90 minutos e os raios hidrodinâmicos das partículas variaram de 70 – 1146 nm em diferentes valores de pH (8 – 10) e Pan et al (2007) que trabalharam com nanopartículas de β -Caseína mais Lisozima na faixa de pH de 5,0 onde na superfície se encontrava uma maior

quantidade de moléculas de Lisozima o menor raio hidrodinâmico encontrado foi de 290 nm e pH de 10,0 onde na superfície se encontrava uma maior quantidade de moléculas de Ovoalbumina o menor raio hidrodinâmico encontrado foi de 197 nm.

O tratamento de 30 minutos foi escolhido como o melhor tempo de aquecimento em detrimento ao de 90 minutos, mesmo que o tratamento de 90 minutos tenha apresentado uma distribuição de tamanhos uniforme, ou seja, dentro da escala de nanômetros.

Porém a escolha do tempo de aquecimento não se dá apenas pela curva de decaimento, porque na temperatura de 80°C e no tempo de 90 minutos é possível que comece a desnaturação das proteínas comprometendo a formação da rede. Segundo Antunes (2003), a desnaturação da β -Lactoglobulina depende do tempo de exposição a certa temperatura e, acima de 70°C ocorrem alterações de conformação, com exposição de grupos tióis (-SH) e aminos (-NH₂). Portanto, o tempo de 30 minutos se torna ideal para a produção das nanoestruturas.

A existência de 3 picos nas análise de distribuição de tamanho nas nanoestruturas indica que a gelificação aumenta a polidispersidade do sistema. Segundo Yu et al. (2006), o processo de gelificação segue três passos essenciais depois do calor inicial de desnaturação dos alimentos protéicos: a formação de agregados através de interação hidrofóbica, o enrijecimento dos agregados através das reações sulfridrilas-dissulfeto e um grande aumento na elasticidade resultante da formação de ligações de hidrogênio sobre refrigeração.

Uma limitação na análise de Espalhamento Dinâmico de Luz pode levar a uma conclusão não tão real do sistema analisado, pois a técnica apresenta os tamanhos em função da intensidade de luz espalhada. Uma pequena quantidade de partículas que são muito grandes espalhará bem mais do que partículas pequenas que pelo seu tamanho espalharão bem menos, mesmo que estejam em maior quantidade. A proporção entre os tamanhos de cada tratamento não foi obtido, para tanto Microscopias de Transmissão Eletrônica foram feitas para conhecer a morfologia do sistema.

5.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM)

Nas figuras 26, 27 e 28 estão apresentadas as imagens de microscopias de transmissão eletrônica das nanoestruturas.

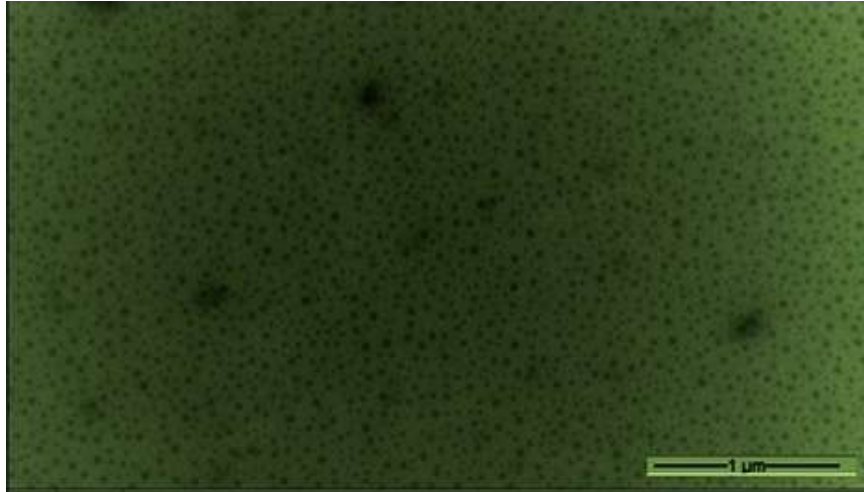


Figura 26. Microscopia de Transmissão Eletrônica das nanoestruturas em um aumento de 20000 vezes.

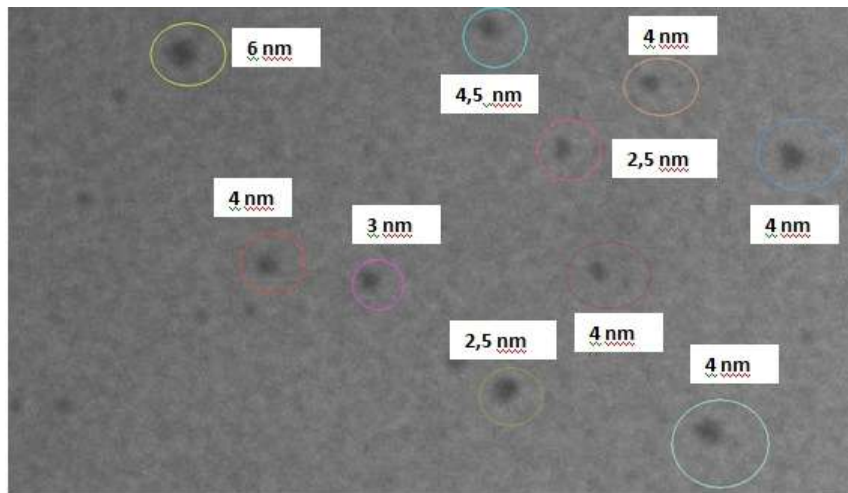


Figura 27. Raios das partículas da Microscopia de Transmissão Eletrônica em um aumento de 50000 vezes.

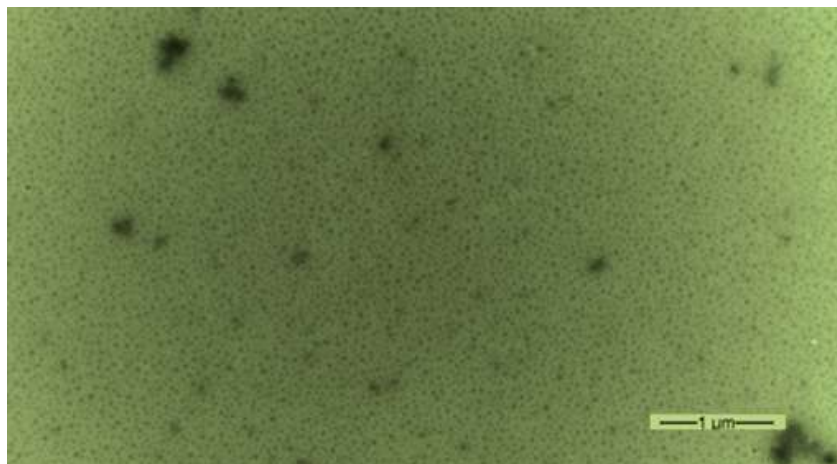


Figura 28. Microscopia de Transmissão Eletrônica das nanoestruturas em um aumento de 12000 vezes.

As imagens (Figuras 26, 27 e 28) feitas no TEM mostram que a solução contendo nanoestruturas apresentou partículas esféricas e aparentemente uniformes, porém existem alguns sítios de agregação, resultados concordantes com os obtidos por Yu et al. (2006) que sintetizaram de proteínas globulares de cargas opostas e Pan et al. (2007) que sintetizaram nanopartículas de β -Caseína e Lisozima.

Na figura 27, foi ampliada uma região da figura 26 e circuladas algumas estruturas. Para a medida do raio das mesmas foi utilizado o programa de análises de imagens o IMAGEJ (National Institutes of Health, United States). De acordo com os valores fornecidos pelo programa, os raios das nanoestruturas não variaram muito, ficando compreendido entre (2,5 - 6) nm, sendo que o diâmetro de 4 nm encontrado na maior parte das nanoestruturas.

Esta pequena variação nos valores dos diâmetros é conclusiva de que a amostra é uniforme. As manchas mais escuras na imagem 26 caracterizam a presença de aglomerados na amostra analisada. As mesmas são registradas também na imagem de AFM, figura 29. Tais aglomerados possuem alturas de cerca de 240 nm. A sua existência é inevitável, pois as proteínas utilizadas para a produção das nanoestruturas se associam facilmente.

Nas figuras 29, 31, 33 estão apresentadas as imagens de microscopias de força atômica das nanoestruturas. Nas figuras 30 e 32 estão apresentados perfis das nanoestruturas.

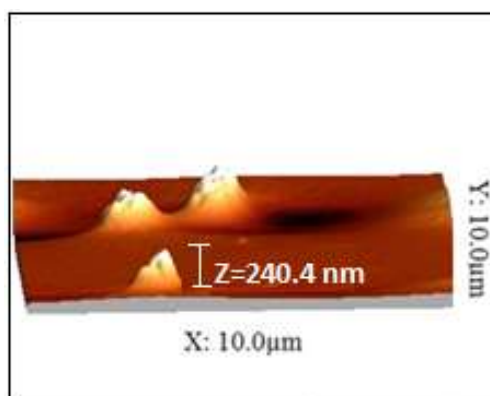


Figura 29. Microscopias de Força Atômica das nanoestruturas.

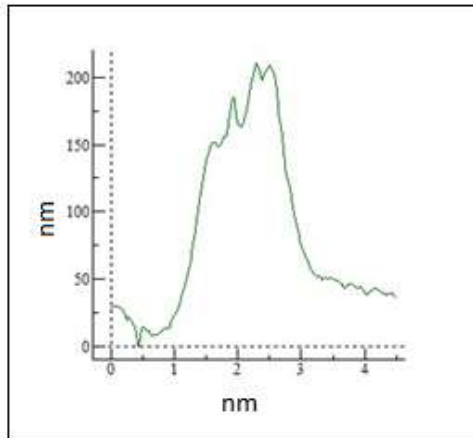


Figura 30. Perfil da superfície da nanoestrutura da figura 26.

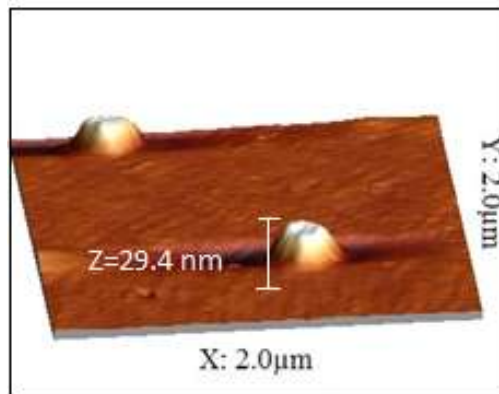


Figura 31. Microscopias de Força Atômica das nanoestruturas.

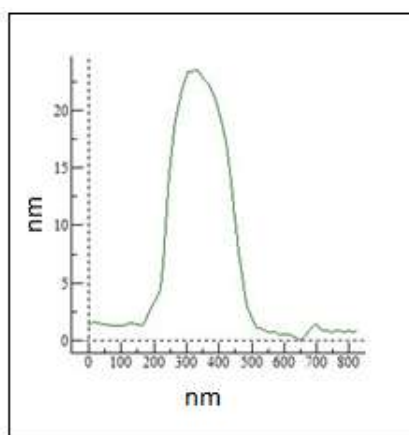


Figura 32. Perfil da superfície da nanoestrutura da figura 28.

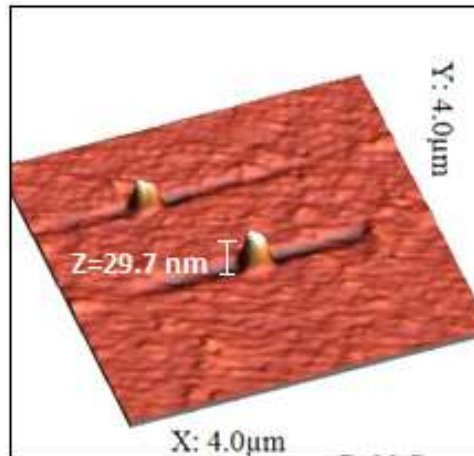


Figura 33. Microscopias de Força Atômica das nanoestruturas.

Nas análises de Microscopia de Transmissão Eletrônica (raios com 2,5 a 6 nm) e Força Atômica (raios com 12,4 nm), os raios se apresentaram menores do que os raios do Espalhamento Dinâmico de Luz (raios com 20,1 a 743,4 nm). Pois no Espalhamento Dinâmico de Luz o raio apresentado é o raio hidrodinâmico (entumecido) das partículas e as Microscopias de Transmissão Eletrônica e a de Força Atômica apresentam o raio das partículas seca. A diferença nos tamanhos das partículas obtidas no Espalhamento Dinâmico de Luz e das partículas obtidas nas microscopias também foi encontrada por Yu et al. (2006), Pan et al. (2007) e Hu et al. (2007).

O modo de operação semi-contato adotado para a análise no microscópio de força atômica tem a vantagem de minimizar os possíveis danos à superfície da amostra quando comparado com o modo de contato. Isto pode ocorrer porque no modo de contato, existe o risco da ponta arranhar a superfície ou num caso extremo rasgá-la, se a força aplicada for grande o suficiente, isso ocorre porque a sonda fica em contato com a amostra durante a varredura. Outra vantagem é que o modo semi-contato apresenta maior resolução quando comparado com modo de contato, devido a maior intensidade de força de interação entre a sonda e a superfície (Santos, 2008).

Devido às implicações geradas pelos danos as pontas, a análise de tamanho da partícula mais confiável é do eixo Z, ou seja, altura das nanoestruturas.

As imagens geradas pelo AFM são imagens da topografia de uma região. As imagens acima indicam uma amostra que possui aglomerados (figura 29) com alturas de cerca de 240 nm, e com uma superfície (figura 30) irregular, já nas figuras 31 e 33 as nanoestruturas são bem definidas, com superfície esférica e com tamanhos entre 29,4 e 29,7 nm. Pela reprodução

continuada de estruturas isoladas e esféricas dentro da amostra, é conclusivo a homogeneidade da mesma.

6 CONCLUSÃO

Solubilidade da α -Lactoalbumina

- Quanto ao pH, os menores valores de solubilidade (cerca de 37,5 – 56%) foram encontrados no pH 4,6, na faixa do pI (pH 4,2). Para os demais pHs (5,4 e 7,6) foram obtidos dados de solubilidade em torno de 90%;
- Quanto à concentração salina, a solubilidade aumentou nos teores de sal de (0 a 0,2) mol/mL, decresceu em 0,4 mol/L e aumentou novamente a partir de 0,6 mol/L;
- Quanto à concentração de proteína, a solubilidade aumentou com a elevação da concentração de proteína; porém a partir da concentração de 7 mg/mL a solubilidade assumiu um comportamento constante.

Solubilidade da β -Lactoglobulina

- Foram observados valores solubilidade em torno de 90% em praticamente todos os pHs, inclusive no pH próximo do seu ponto isoelétrico (pH 5,4);
- Quanto à concentração salina, a solubilidade aumentou nos teores de sal de (0 a 0,2) mol/mL, decresceu em 0,4 mol/L e aumentou novamente a partir de 0,6 mol/L;
- Quanto à concentração de proteína, a solubilidade aumentou com a elevação da concentração de proteína; porém a partir da concentração de 7 mg/mL a solubilidade assumiu um comportamento constante.

Solubilidade das Nanoestruturas

- A solubilidade das nanoestruturas varia de 70,7 a 99,4;
- A solubilidade predominantemente influenciada pela β -Lactoglobulina.

Emulsão

- O Índice da Atividade Emulsificante da β -Lactoglobulina em óleo de soja aumentou com a elevação das concentrações de sal e de proteína;

- A Estabilidade da Emulsão da α -Lactoalbumina para o óleo de oliva aumentou com a elevação nas concentrações de sal e proteína. Para o óleo de soja apresentou seu valor máximo na concentração de proteína de 0,05% m/v, depois diminuiu.

Calorimetria de Titulação Isotérmica

- A estequiometria do sistema β -Lactoglobulina em α -Lactoalbumina é de 2:1;
- Processo espontâneo e exotérmico.

Potencial zeta

- Os resultados de Potencial Zeta em função do pH para as proteínas isoladas, misturadas e nas nanoestruturas foram os mesmos, ou seja, os valores foram positivos em condições de pH acima dos pIs e negativos em condições de pH abaixo dos pIs.

Tamanho de partícula

- As proteínas se aglomeram apenas na região de seus pIs. Nos demais pHs apresentaram raios mínimos indicando que estavam em suas formas mais simples (monômeros e dímeros);
- A formação de nanoestruturas estáveis se dá a partir da concentração de 2 mg/mL de proteínas.

Espalhamento de luz

- O Espalhamento Dinâmico de Luz forneceu raios das nanoestruturas na faixa de (22 a 265,3) nm para o tempo de aquecimento de 30 minutos a 80°C, binômio tempo e temperatura ideal para a formação das nanoestruturas.

Microscopia de Transmissão Eletrônica e Microscopia de Força Atômica

- A Microscopia de Transmissão Eletrônica forneceu raios das nanoestruturas na faixa de (2,5 a 6) nm;
- Força Atômica forneceu raios das nanoestruturas na faixa de 12,4 nm;
- As nanoestruturas são predominantemente esféricas e uniformes.

7 TRABALHOS FUTUROS

É viável o estudo para avaliar a possibilidade da α -Lactoalbumina e a β -Lactoglobulina isoladamente ou misturas com outras proteínas do soro, ovo e soja, formem nanocápsulas que sejam capazes de incorporar substâncias, tais como vitaminas e ácidos graxos. Pois é sabido que as proteínas são pH-sensível, ou seja, respondem a estímulos de mudança de pH. E com a finalidade de obtenção de nanoestruturas mais estáveis, evitando a agregação que as proteínas do soro sofrem em certas faixas de pH e alta concentração salina, pode-se usar outro biomaterial natural ou sintético menos instáveis que as proteínas, tais como polissacarídeos, para sintetizar novas nanoestruturas.

A presente pesquisa avaliou a possibilidade de formação de nanoestruturas de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina conjugadas, além de um estudo do comportamento destas proteínas em relação à variação de pH e concentração salina.

8 REFERÊNCIAS

- Abreu, L. R. **Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005. (Textos acadêmicos da Pós-Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite e Ovos).
- Antunes, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo, Ed. Manole, 2003.
- Baker, B. M.; Murphy, K. P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. **Biophysical Journal**, v.71, p.2049-2055, 1996.
- Berne, B. J.; Pecora, R. **Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics**. Dover publications. Mineola, New York, 2000.
- Boye, J.; Zare, F.; Pletch, A. Review - pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, n.43, p.414-431, 2010.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- Cameron, D. R.; Weber, M. E.; Idziak, E. S.; Neufeld, R. J.; Cooper, D. G. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula of emulsifying activity index. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.39, p.655-659, 1991.
- Chen, L.; Subiradi, M. Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. **Biomaterials**, n.26, p.6041-6053, 2006.
- Coester, C.; Kreuter, J.; Briesen, H. V.; Langer, K. Preparation of avidin-labelled gelatin nanoparticles as carriers for tiotynylated peptide nucleic acid (PNA). **International Journal of Pharmaceutics**, n.196, p.147-149, 2000.
- Costa, A. R.; Coimbra, J. C. R.; Sousa, R. C. S.; Oliveira, F. C.; Oliveira, R. M.; Rezende, J. R. **Propriedades emulsificantes de concentrado protéico de soro: efeito das concentrações de proteína e sal**. In. 26º Congresso Nacional de Laticínios – Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG. EPAMIG, 2009.
- Dai-Dong, J. X.; Novak, G.; Hardy, J. Stabilization of vitamin C by β -lactoglobulin during heat treatment. **Science des Aliments**, v.10, n.393, 1990.
- Damian, L.; Marty-Detraves, C.; Winterhalter, M.; Fournier, D.; Paquereau. Single-strand DNA translation initiation step analyzed by Isothermal Titration Calorimetry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.385, p.296-301, 2009.

De, M. Chang-Cheng, Y.; Sudhanshu, S.; Rotello, V.M. Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: a thermodynamic study. **Journal of the American Chemical Society**, n.129, p.10747-10753, 2007.

Doyler, M. Characterization of binding interactions calorimetry. **Current Opinion in Biotechnology**, n.8, p.31-35, 1997.

Duarte, A. J.; Carreira, R. L.; Junqueira, R. G.; Coelho, J. V.; Silvestre, M. P. C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: efeito do pH e do tempo (1). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, 1998.

Duarte, A. J.; Carreira, R. L.; Junqueira, R. G.; Coelho, J. V.; Silvestre, M. P. C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: efeito da adição de NaCl (2). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, 1998.

Fanghanel, J.; Wawra, S.; Lucke, C.; Wildemann, D. F. Isothermal calorimetry as a tool to investigate slow conformational changes in proteins and peptides. **Analytical Chemistry**, v.78, n.13, 2006.

Fennema, O. R. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia. 1993, 1095p

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**, Ireland: Blackie Academic e Professional. 1998, 478p.

Gallemebeck, F., **Nanotecnologia e seus impactos no setor industrial**. 2005. Disponível em: <http://www.iqm.unicamp.br/profs/fernagal.html>. Acesso em out./2010.

Gardner, E. **Brainy food: academia, industry sink their teeth into edible nano**. Small Times, 2002. Disponível em: <http://www.electroi.com>. Acesso em out./2010.

Goldfarb, B. Food-borne pathogens stimulating microarray-based biosensor development. **Nanobiotech News**, v.1, n.19, 2003.

Gomes, D. S. B. **Formação e caracterização de micelas reversas de (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃ em P-Xileno**. Viçosa, MG, UFV, 2009. (Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Viçosa).

Gunasekaran, S.; Ko, S.; Xiao, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.31-40, 2007.

Haraguchi, F. K.; Abreu, W. C.; Paula, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

Herceg, Z.; Rezek, A.; Lelas, V.; Kresic, G.; Franetovic, M. Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, n.79, p. 279-286, 2007.

Holler, E. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6 ed. São Paulo: Bookman, 2009.

Hu, J.; Yu, S.; Yoa, P. Stable amphoteric nanogels of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. **Langmuir**, v.23, p.6358-6364, 2007.

Instrutécnica – Instrumento para Pesquisa e Indústria. **Potencial Zeta e Estabilidade Coloidal**, 2010. Disponível em: www.instrutec.com.br. Acesso em out./2010

Kane, R. S.; Stroock, A. D. Nanobiotechnology: protein-nanomaterial interactions. **Biotechnology Progress**, n.23, p.316-319, 2007.

Kim, S; Baum, J. Electrostatic interactions in the acid desnaturation of α -Lactalbumin determined by NMR. **Protein Science**, v.7, p.1930-1938, 1998.

Instituto Inovação. **Nanotecnologia**, 2005. Disponível em: www.institutoinovacao.com.br. Acesso em out./2010.

Kakalis, L. T.; Regenstein, J. M. **Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein**. Journal of Food Science. v.51, n.6, p.1445-1447, 1986.

Jiang, J.; Chen, J.; Xiong, Y. L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.57, p.7576-7583, 2009.

Jiang, J.; Oberdorster, G.; Biswas, P. Characterization of sizer, surface charge, and agglomeration state of nanoparticles dispersions for toxicological studies. **Journal Nanopart Research**, n.11, p.77-89, 2009.

Leavitt, S.; Freire, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, n.11, p.560-566, 2001.

Liu, H. E.; Webster, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v.28, p.354-369, 2007.

Lubisco, D. S. **Composição de ácidos graxos e livre escolha em dietas iniciais de frangos de corte**. Porto Alegre, RS. 2007. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Mageste, A. B. **Aplicação da microcalorimetria e do espalhamento de raios-X a baixos ângulos no estudo da interação poli (óxido de etileno) e dodecil sulfato de sódio: efeito de cosolutos iônicos**. Viçosa, MG, 2009. (Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Viçosa).

Malvern Instruments. **Zeta potencial: an introduction in 30 minutes**. Zetasizer Nano series technical note, 2010. Disponível em: www.malvern.co.uk. Acesso em out./2010.

Martineau, B., Fish-Oil cookies. **Technology Review**, 2004.

Mc Lements, D.J. **Whey protein-stabilized emulsions**. In: Onwulata, C.I.; Huth, P.J. Whey processing, functionality and health benefits. IFT Press, Blackwell Publications, p.63-97, 2008.

Mizubuti, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.15, n.1, p.80-94, março/1994.

Modler, H. W. **Milk processing - Food proteins: processing applications**. Wiley-VCH, Inc., p.1-21. 2000.

Moraru, C. I.; Panchapakesan, C. P.; Huang, Q.; Takhistov, P.; Liu, S.; Kokini, J.L. Nanotechnology: a new frontier in food science, **Food Technology**, v.57, n.12, p.25, 2003.

Mohan, C. **Buffers: a guide for the preparation and use of buffers in biological systems**. San Diego, USA, Calbiochem-EMD. 1995, p.38.

Nagoka, S.; Futamura, Y.; Miwa, K.; Awano, T.; Yamauchi, K.; Kanamaru, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.281, p.11-17, 2001.

The Nano Investor News. 2005. Disponível em: www.nanoinvestornews.com. Acesso em out./2010.

Nanotecnologia: novas tecnologias. **A manipulação do invisível**. Centro Ecológico, 2009. Disponível em: <http://www.boell-latinoamerica.org/downloads/RevistaNanotecnologia.pdf>. Acesso em out./2010.

Nseafs. **Scale science and engineering for agriculture and food system**. 2003. Disponível em: www.nseafs.cornell.edu. Acesso em out.2010.

Padilha, A. F., **Microscopia**. 2010. Disponível em: www.angelfire.com. Acesso em out./2010.

Pan, X.; Yu, S.; Xiao, P.; Shao, Z. Self-assembly of casein and lysozyme. **Journal of Colloid and Interface Science**, n.316, p.405-412, 2007.

Pearce, K. N e Kinsella, J. E. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.716-723, 1978.

Pelegrine, D. H.; Gasparetto C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.57-65, 2003.

Pierce, M. M, Raman, C. S.; Nall, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. **Methods**, n.19, p.213-221, 1999.

Pieter, W.; Wouters, J. T. M.; Geurts, T. J. **Dairy science and tecnologia**. 2 ed. New York, USA: Taylor & Francis Group. 2006, 762p.

Poole Jr., C. P.; Owens, F. J. **Introduction to nanotechnology**. New Jersey: Ed. Wiley, 2003.

Raikos, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. **A Review Food Hydrocolloids**, n.24, p.259-265, 2010.

Reis, M. F. T. **Micelas reversas formadas por surfactante/solvente orgânico/água: estudo termodinâmico e aplicação para extração de proteínas da semente de jaca**. Itapetinga, BA: UESB, 2010. (Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia).

Rhaese, S.; Briesen, H. V.; Rubsamen-Waigmann, H.; Kreuter, J.; Langer, K. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. **Journal of Controlled Release**, n.92, p.199-208, 2003.

Rocha, R. A. **Combinação das técnicas de precipitação ácida e complexação para obtenção de frações enriquecidas de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do isolado protéico de soro de leite.** Viçosa, MG: UFV, 2008. (Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa).

Rodiles-Lopéz, J. O.; Jaramillo-Flores, M^a. E.; Gutiérrez-Lopéz, G. F.; Hernández-Arana, A.; Fosado-Quiroz, R. E.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Hernández-Sanchez, H. Effect of High Hydrostatic Pressure on Bovine α -Lactoalbumin Functional Properties. **Journal of Food Engineering**, n.87, p.363-370, 2008.

SAS – Institute, **SAS User's Guide: Statistics.** Versão 9,0. SAS Inst. North Carolina, USA; Inc., Cary, , 2004.

Salim, N. N.; Feig, A. L. **Isothermal titration calorimetry of RNA.** Methods, 2008.

Santos, D. F. A. **Microscopia de Força Atômica *In-Situ* de Superfícies de Membranas Poliméricas de Nafion com Nanopartículas de Sílica Incorporadas.** Viçosa, MG: UFV, 2008. (Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Viçosa).

Schoenhals, M. **Avaliação da Eficiência do Processo de Flotação Aplicado ao Tratamento Primário de Efluentes de Abatedouro Avícola.** Florianópolis, SC: UFV, 2006. (Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Santa Catarina).

Scott, A. **BASF takes big steps in small tech, focusing on nanomaterials.** 2002. Disponível em: Small Times online, www.smalltimes.com. Acesso em out./2010.

Sgarbieri, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996, 517p.

Scribd. **Fenômenos interfaciais.** 2010. Disponível em: www.scribd.com/doc/35421042/fenomenos-interfaiais. Acesso em out./2010.

Soares, V. F. **Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários.** Belo Horizonte, MG: UFMG, 2009. (Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Minas Gerais).

Sousa, F. B. **Estudo e caracterização estrutural e termodinâmica de compostos de inclusão formados entre antidepressivos e ciclodextrinas.** Belo Horizonte, MG: UFMG, 2007. (Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais).

Sousa, F. B.; Denadai, A. M. L.; Lula, I. S.; Nascimento Jr. C. S.; F. Neto, N. S. G.; Lima, A.C.; Almeida, W. B.; Sinisterra, R. D. Supramolecular self-assembly of cyclodextrin and higher water soluble guest: thermodynamics and topological studies. **Journal of the American Chemical Society**, n.130, p.8428-8436, 2008.

Sousa, F. B.; Denadai, A. M. L.; Lula, I. S.; Lopes, J. F.; Santos, H. F.; Almeida, W. B.; Sinisterra, R. D. Supramolecular complex of fluoxetine with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical study. **International Journal of Pharmaceutics**, n.353, p.160-169, 2008.

Sousa, R. C. S.; Coimbra, J. S. R.; Lafetá, J. A. Q.; Saraiva, C. S.; Costa, A. R. **Efeito do pH e da concentração de sal na solubilidade da α -Lactoalbumina do soro de leite.** Instituto de

Laticínios Cândido Tostes, *In.* 26º Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora, MG: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2009.

Sousa, R. C. S.; Coimbra, J. S. R.; Silva, L. H. M.; Silva, M. C. H.; Rojas, E. E. G.; Vicente, A. A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography**, v.877, n.24, p.2579-2584, 2009.

Stark D. **Nanotechnology today: real life examples of nano applications**. Conference "Future of Nanomaterials", 2004.

Swaminathan, C. P.; Surolia, N. S.; Surolia, A. Role of water in the specific binding of mannose and mannoligosacharides to concanavalin. **Journal of the American Chemical Society**. n.120, p.5153-5159, 1998.

Taulier, N.; Chalikian, T. Characterization of pH-induced transitions of β -LG: ultrasonic, densitometric, and spectroscopy studies. **Journal Molecular Biology**, v.14, p.873-889, 2001.

Teixeira, A. V. N. C. **Espalhamento de luz: correlação de fótons**. 1997. Disponível em: http://www.ufv.br/dpf/320/Espalhamento_Luz.pdf. Acesso em: out./2010.

Thompson, A.; Boland, M.; Singh, H. Milk proteins: from expression to food. **Food Science and Tecnology, Internacional Series**, New Zeland, 2009, p.533.

Tosin, G., **Medidas para a caracterização e análise de materiais: microscopia de transmissão eletrônica**. 2000. Disponível em: <http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/TEM.pdf>. Acesso em: out./2010.

Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?. **Journal of the American Chemical Society**, n.125, p.14859-14866, 2003.

Versic R. J. **Flavor Encapsulation: An Overview**". 2004. Disponível em: <http://www.rtdodge.com/flovrvw>. Acesso em: out./2010.

Vieira, F. C. V.; Pierre, C. T.; Castro, H. F. **Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática**. *In.* VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.

Vojdani, F.; Hall, G. M. **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic e Professional, cap.2, p.11-60, 1996.

Vanhooren, A.; Vanhee, K.; Noyelle, K.; Majer, Z.; Joniau, M.; Hanssens, I. Strutral basic for difference in heart increments for Ca^{+2} binding two α -Lactalbumins. **Biophysical Journal**, v.82, p.407-417, 2002.

Weber, C.; Coester, C.; Kreuter, J. E.; Langer, K. Desolvation process and surface characteristics of protein nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.194, p.91-102, 2000.

Wen, X.; Shi, D.; Zhang, N. H. S. **Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology**. Nalwa, v.1, p.1-23, 2005.

Wong, D. W. S.; Carmirand, W. M.; Pavlat, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.8, p.807-844, 1996.

Yu, S.; Yoa, P.; Jiang, M.; Zhang, G. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. **Biopolymers**, v.83, p.148-158, 2006.

Zinsly, P. F.; Sgarbieri, V. C.; Dias, N. F. G. P.; Jacobucci, H. B.; Pacheco, M. T. B.; Baldini, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.4, p.1-8, 2001.