



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

HERMANNY MATOS DA SILVA SOUSA

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AGREGAÇÃO E DESNATURAÇÃO DA
 β -LACTOGLOBULINA**

**PALMAS – TO
2019**

HERMANNY MATOS DA SILVA SOUSA

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AGREGAÇÃO E DESNATURAÇÃO DA
 β -LACTOGLOBULINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Tocantins como exigência
parcial para obtenção do título de bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora Prof. Dra. Glêndara Aparecida de
Souza Martins.

Co-orientador: Dr Paulo de Sa Peixoto

PALMAS – TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S725i Sousa, Hermanny Matos Silva.

Influência da temperatura na agregação e desnaturação da β -Lactoglobulina. / Hermanny Matos Silva Sousa. – Palmas, TO, 2021.
33 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2021.

Orientadora : Glêndara Aparecida de Souza Martins
Coorientador: Paulo de Sá Peixoto

1. Desnaturação . 2. Agregação . 3. β -Lactoglobulina. 4. RMN. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

HERMANNY MATOS SILVA SOUSA

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AGREGAÇÃO E DESNATURAÇÃO DA β-LACTOGLOBULINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Tocantins como
exigência parcial para obtenção do título de
bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovada em: 15/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Glêndara Aparecida de Souza Martins
Orientador(a)
Instituição: Universidade Federal do Tocantins.

Prof. Dr. Paulo de Sá Peixoto
Examinador (a) Externo (a)
Instituição: Institut National de Recherche Agronomique.

Prof. Dr. XXXX
Examinador (a) Interno (a)
Instituição: Universidade Federal do Tocantins.

AGRADECIMENTOS

Agora finaliza-se um ciclo em minha vida, parece que foi ontem que estava me mudando pra Palmas - TO, sozinho e sem conhecer ninguém, dando a cara a tapa para realizar mais sonho, e que sonho. Hoje posso falar com orgulho; Pai, Mãe, seu filho agora é um engenheiro de alimentos formado na Universidade Federal do Tocantins.

E como meu pai sempre fala, um homem não vai a lugar nenhum sozinho, e realmente, se cheguei aonde estou hoje, foi devido a minha perseverança e a cada anjo que Deus colocou no meu caminho, para me dar forças nos momentos mais difíceis e assim conseguir seguir em frente. E como já dizia Milionário e José Rico: “Nesta longa estrada da vida, vou correndo e não posso parar, na esperança de ser campeão..... Este é o exemplo da vida.”

Sendo assim, só tenho a agradecer a Deus pelo dom da vida, pela minha família, meus amigos, minha saúde e por cada oportunidade que o senhor me proporcionou e me proporciona a cada dia que levanto da cama e vou enfrentar esse mundão a fora. E lhe prometo sempre dar o meu melhor e honrar cada oportunidade que o senhor me proporcionar.

O agradecimento mais especial de todos, a minha família, aos meus pais Herbert Matos Silva e Odineide da Silva Sousa, ao meu irmão Herbert Filho e a famosa Katy, por sempre me apoiarem e me incentivarem a cada decisão tomada no decorrer dessa minha jornada, agradecer a educação que eles me deram, que foi um diferencial para eu conseguir chegar até aqui.

Falam que família só temos uma, porém Deus foi tão bom comigo, que além da minha família de sangue, ele me deu mais três famílias.

A primeira foi a família Sevilha, que me acolheram quando eu cheguei em Palmas. Nunca tiveram contato nenhum comigo ou com minha família, mas se propuseram a me acolher. Me trataram como um filho, muito obrigado Alberto e Sueleni Sevilha.

Logo ao final do meu segundo período, eu estava diante de um dos professores que mais me ajudaria a crescer como pessoa e como acadêmico, professor doutor Thiago Lucas de Abreu Lima, em uma entrevista para estágio não obrigatório no Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos, para os íntimos, Família LaCiMP, e para os de fora, Constelação LaCimP kkkk. Onde não poderia deixar de ressaltar o carinho com que fui recebido pela técnica do LaCiMP, Josineide Pereira, que sempre me ajudou e me aconselhou em diversos momentos da minha trajetória, tornando-se uma verdadeira amiga e conterrânea.

Na sequência tive o prazer em conhecer e trabalhar com a professora doutora Denise Gomes Alves, com quem tive meu primeiro projeto de iniciação científica (PIBIC), que sempre me ajudou, me orientou e me aconselhou durante todo o projeto, o qual finalizamos com sucesso.

Logo em seguida, tive o prazer em conhecer e trabalhar com a professora doutora Glêndara Aparecida de Souza Martins, a qual se tornou uma mãe, uma amiga, uma psicóloga, minha orientadora de TCC, futuramente minha orientadora no mestrado, e que tenho como fonte de inspiração, que sempre me motiva a seguir em frente, em busca de novos desafios e que me deu um lema pra vida, “Missão dada, é missão cumprida.” em outras palavras, é a minha “leoa”.

E na metade da minha trajetória, Deus me concedeu a graça de conhecer a Família Leite, família a qual me faltam palavras para agradecer o carinho e amor que me deram, a forma que me acolheram, que me deram apoio, que me tornaram um filho deles. Muito obrigado a toda Família Leite, em especial ao Seu Edgar, a Dona Neusa e a Nathalia.

Gostaria de agradecer também ao professor doutor Paulo de Sa Peixoto, que juntamente com a professora Glêndara Martins, me proporcionaram uma experiência ímpar na minha, que foi a realização de um sonho, realizar um estágio em Lille - França. Uma experiência que me amadureceu muito, foi um divisor de águas em minha vida.

Agradecer também a Luisa Scudeller, que me ajudou muito no estágio e na adaptação a cidade de Lille, onde me apresentou o melhor dessa cidade linda, a qual me apaixonei. E no final desse estágio, me falaram que me tornei um verdadeiro “lilloa” kkkk.

Não poderia deixar de agradecer os amigos que fui adquirindo durante todo meu trajeto, e que sempre me apoiaram e me deram uma palavra de incentivo: Khaiston Keslley, , Eduarda Moreira, Gabriel Feitosa, Rômulo Alves, Diana Lopes, Camila Mariane, Romilda Ramos, Gabriela Fonseca, Dhayna Sobral, Fefa, M. Pereira, Luara e a Comadre Francisca.

Para muitos tudo isso pode parecer pouco, contudo, para mim, são meu mundo, são minha vida. E graças a cada momento e a cada pessoa que Deus colocou na minha vida, hoje posso encher a boca e falar, eu sou um vencedor.

RESUMO

Em sua composição, o leite apresenta água, carboidratos, gordura, proteína, minerais e vitaminas. As duas principais proteínas, β -lactoglobulina e α -lactalbumina têm sido objeto de inúmeros estudos para elucidar e explorar possíveis relações estrutura / função que provoquem agregações e incrustações nocivas a indústria de leite. Nesse sentido, com o objetivo entender a influência da temperatura na desnaturação e agregação da proteína β -lactoglobulina (β -LG) na presença ou não de íons de cálcio, desenvolveu-se este trabalho. A amostra utilizada consiste em um isolado proteico de β -lactoglobulina a 97% de pureza, sendo preparadas 5 soluções hidratadas de β -lactoglobulina, utilizadas tanto para a análise de granulometria a laser quanto para a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Na temperatura a 75°C a análise granulométrica mostrou que a amostra “Branco” apresenta aglomerados maiores em relação à amostra “Gelo”, devido ao tempo de aquecimento que foi de 1 hora para “Branco” e 30 minutos para “Gelo”. Já na leitura de RMN das amostras A e B, observou-se que existem algumas diferenças de sobreposição no espectro considerando a ausência e presença de cálcio. Para a temperatura a 80°C e 90°C, na análise granulométrica, observou-se que as amostras “Aquecimento” (C) desnaturaram e gelificaram muito rápido, impossibilitando, inclusive, a realização da leitura, pois já não estavam mais no estado líquido. Na leitura de RMN das amostras C e D, pode-se observar que existem algumas diferenças no espectro, devido ao tempo e ao método de aquecimento na presença do cálcio que diferem de uma amostra para outra. Assim, conclui-se que quanto maior a temperatura menor será o tempo necessário para a desnaturação da proteína. Não obstante, a temperatura é diretamente proporcional a ação do cálcio, ou seja, quanto maior a temperatura, maiores aglomerados proteicos iram se formar na presença do cálcio.

Palavras-chaves: Desnaturação. Agregação. β -lactoglobulina

ABSTRACT

In its composition, the milk presents water, carbohydrates, fat, protein, minerals and vitamins. The two main proteins, β -lactoglobulin and α -lactalbumin have been the subject of numerous studies to elucidate and explore possible structure / function relationships that cause aggregations and incrustations harmful to the milk industry. In this sense, in order to understand the influence of temperature on the denaturation and aggregation of the β -lactoglobulin protein (β -LG) in the presence or not of calcium ions, this work was developed. The sample used consists of a protein isolate of β -lactoglobulin at 97% purity, and 5 hydrated solutions of β -lactoglobulin are prepared, both for the analysis of laser granulometry and for Nuclear Magnetic Resonance (NMR). At the temperature at 75°C the particle size analysis showed that the "White" sample presented larger clusters in relation to the "Ice" sample due to the heating time from 1 hour to "White" and 30 minutes to "Ice". In the NMR reading of samples A and B, it was observed that there are some differences of overlap in the spectrum considering the absence and presence of calcium. For the temperature at 80 ° C and 90 ° C, in the granulometric analysis, it was observed that the "Heating" (C) samples denatureed and gelled very fast, even making the reading impossible, since they were no longer in the liquid state. In the NMR reading of samples C and D, it can be observed that there are some differences in the spectrum due to the time and the heating method in the presence of calcium that differ from one sample to another. Thus, it is concluded that the higher the temperature the shorter the time required for denaturation of the protein. However, the temperature is directly proportional to the action of calcium, that is, the higher the temperature, the larger the protein agglomerates will form in the presence of calcium.

Keywords: Denaturation. Aggregation. β - Lactoglobulin

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Composição das proteínas do soro do leite..... | 12 |
| Tabela 2: Soluções utilizadas na leitura do Granulométrico a laser. | 17 |
| Tabela 3: Soluções utilizadas na leitura do RMN | 17 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: α -lactalbumina. Fonte: Protein Data Bank in Europe | 13 |
| Figura 2: α -lactalbumina. Fonte: Protein Data Bank in Europe | 14 |
| Figura 3: Desnaturação e Agregação da β -lactoglobulina. Fonte: PEIXOTO et al., 2019 | 16 |
| Figura 4: : Gráfico da análise granulométrica das amostras a 75°C..... | 20 |
| Figura 5: Espectro quantitativo ^1H feito a 75 ° C para ambas soluções de BLG , onde “Gelo” com (linhas azuis) e sem cálcio “Branco” (linhas verdes). Setas vermelhas destacam as regiões com diferenças entre os dois espectros. | 21 |
| Figura 6: Espectro quantitativo ^1H feito a 75 ° C para ambas soluções de BLG , onde “Gelo” com (linhas azuis) e sem cálcio “Branco” (linhas verdes). | 22 |
| Figura 7: Gráfico da análise granulométrica da amostra a 90°C..... | 23 |
| Figura 8: Espectro quantitativo ^1H feito a 90 ° C para ambas soluções de BLG , onde cálcio, “Aquecimento” com (linhas azuis) e “Gelo” com (linhas verdes). | 24 |
| Figura 9: Espectro quantitativo ^1H feito a 90 ° C para ambas soluções de BLG , onde cálcio, “Aquecimento” com (linhas azuis) e “Gelo” com (linhas verdes). | 24 |
| Figura 10: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C e 80°C para ambas soluções de BLG , onde “Gelo – 80°C” com (linhas azuis) e “Gelo – 90°C” com (linhas verdes). | 25 |
| Figura 11: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C e 80°C para ambas soluções de BLG , onde “Gelo – 80°C” com (linhas azuis) e “Gelo – 90°C” com (linhas verdes). | 25 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1.Leite: composição e processamento | 12 |
| 2.2.Agregação e desnaturação proteica | 14 |
| 3.MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3.1.Soluções | 16 |
| 3.1.1.Soluções utilizadas na granulometria a laser | 17 |
| 3.1.2.Soluções utilizadas para Ressonância Magnética Nuclear (RNM)..... | 17 |
| 3.2.Granulometria a laser | 18 |
| 3.3.Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 18 |
| 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 4.1.Amostras A 75°C | 20 |
| 4.1.1.Análise Granulométrica..... | 20 |
| 4.1.2.Análise De RMN..... | 21 |
| 4.2.Amostras a 80°C e 90°C | 22 |
| 4.2.1.Análise Granulométrica..... | 22 |
| 4.2.2.Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 23 |
| 5.CONCLUSÃO | 27 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |

1. INTRODUÇÃO

O leite é um produto atrativo ao consumidor face aos eminentes benefícios para a saúde (DINO, 2018). Atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar como maior produtor leiteiro em todo o mundo, resultado apontado pela Embrapa Gado de Leite (ZOCCAL, 2018).

Os ingredientes à base de proteína láctea são amplamente utilizados na indústria de alimentos devido ao seu alto valor nutricional e suas propriedades funcionais, como emulsificação, formação de espuma e encapsulação (BUGGY et al., 2016, DOHERTY et al., 2011, RYAN et al., 2013, TAVARES et al., 2014). Hoje, eles são ingredientes comuns em bebidas esportivas, substitutos de refeições e fórmulas infantis (EARLY, 2012, SMITHERS, 2015).

A proteína do leite bovino contém 80% (p / p) de caseínas e 20% (p / p) de proteína do soro do leite (GASPARD et al., 2017). A estabilidade térmica das proteínas do soro tem sido objeto de extensa pesquisa e há muitos relatos na literatura sobre a desnaturação e agregação de proteínas do soro sob diferentes condições de solução e processamento (ANEMA, 2009, RYAN et al., 2013, SAĞLAM et al., 2014; BOLDRINI et al., 2015; VIAPIANA, 2017).

Nesse contexto, Fitzsimons, Mulvihill e Morris (2007) relataram que a desnaturação e os processos de agregação de proteínas do soro podem ser separados em dois estágios separados, onde o primeiro estágio é a desnaturação da estrutura nativa da proteína e o segundo estágio é o rearranjo da estrutura da proteína, resultando em agregação. O processo de desnaturação é reversível e ocorre dissociação de ligações intermoleculares (ou seja, não covalentes e, em alguns casos, dissulfeto) e desdobramento parcial das moléculas de β -lactoglobulina (FITZSIMONS et al., 2007). Em temperaturas superiores a 70 ° C, ocorre agregação irreversível, que resulta na formação de agregados devido à interação do grupo sulfidril, intercâmbios de dissulfeto, juntamente com a contribuição de interações hidrofóbicas e / ou eletrostáticas não covalentes (HOFFMANN e VAN MIL, 1997, VERHEUL et al., 1998).

A formação de depósitos incrustantes em superfícies de trocadores de calor é um grande problema industrial de plantas de processamento de leite, que envolve a limpeza frequente das instalações, resultando em excesso de água de lavagem e uso de produtos químicos. Vários estudos relataram os custos econômicos associados à incrustação. A necessidade frequente de limpeza de equipamentos resultante do processo de incrustação respondem por cerca de 80% total dos custos da produção (BANSAL et al., 2006; JURADO-ALAMEDA et al., 2014; BUGGY et al., 2018).

. A agregação de proteínas tem sido demonstrada como o resultado da presença de inúmeros íons que favorecem o crescimento de agregados e incrustações de superfície (CROGUENNEC et al., 2004; SIMMONS et al., 2007; PETIT et al., 2011; DISSANAYAKE et al., 2013; AKKERMN et al., 2016; BUGGY et al., 2018; TRIANI et al., 2019). Além disso, sabe-se que a presença de cálcio tem sido associada a gelificação induzida termicamente de proteínas do soro de leite, como β -lactoglobulina (β -lg) (BARBUT & FOEGEDING, 1993; HONGSPRABHAS, BARBUT e MARANGONI, 1999; ERABIT et al., 2013; NDOYE et al., 2013; CARNOVALE et al., 2016 MOUDRÁ et al., 2017).

Desta maneira, esse trabalho tem por objetivo entender a influência da temperatura na desnaturação e agregação da proteína β -lactoglobulina (β -LG) na presença ou não de íons de cálcio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite: composição e processamento

A composição do leite bovino varia de acordo com vários fatores: rebanho, região, ano, mês, período de conservação da amostra e escore de células somáticas (RIBEIRO NETO et al., 2012; KOLETZKO et al., 2013; MARTIN et al., 2016). No entanto, a composição básica reportada pela literatura, é composto por água, carboidratos, gordura, proteína, minerais e vitaminas. A quantidade de água se apresenta em um nível de 87-88% e 12-13% de elementos sólidos. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas (MCDONALD et al., 2010; KON & COWIE, 2016).

As proteínas do soro do leite são uma mistura de proteínas isoladas ou concentradas a partir de soro de leite. O soro de leite é o resíduo que resulta da coagulação do leite durante a fabricação do queijo. As proteínas do leite apresentam em sua composição 80% caseína e 20% proteínas do soro. Sendo que as proteínas do soro são subdivididas, em sua maioria, em: β - lactoglobulinas, α - lactoalbuminas, albuminas séricas, protease-peptona e imunoglobulinas, como cita Tabela 1 (VIAPIANA, 2017).

Tabela 1: Composição das proteínas do soro do leite. Fonte: VIAPIANA, 2017

| Proteínas | Composição |
|--|-------------------|
| β - lactoglobulina | 48% |
| α - lactoalbumina | 19% |
| Protease - Peptona | 20% |
| Albuminas Serica | 6% |
| Immunoglobulinas | 8% |

O leite bovino normal contém 30-35 g de proteína / litro. Cerca de 80% dessas proteínas estão presentes em micelas de caseína que são grandes complexos esféricos contendo 92% de proteína e 8% de baixa massa molecular, principalmente sais inorgânicos, como fosfato de cálcio (MICHAELSEN et al., 2014; HOCHWALLNER et al., 2014; HALE&ROWE, 2017).

Hoje em dia a proteína do leite é amplamente utilizada na alimentação humana, devido a facilidade com que as proteínas podem ser purificadas a partir do leite cru, dessa forma contribuindo para sua caracterização. Sendo assim, as proteínas do leite são uma das melhores caracterizadas de todos os alimentos proteicos; por exemplo, as estruturas primárias de todas as

proteínas do leite bovino são conhecidos e até mesmo as estruturas tridimensionais do soro maior proteínas são conhecidas (SWAISGOOD, 2003).

As proteínas do soro do leite, um grupo de proteínas solúveis em ácido, representam aproximadamente 20% da proteína total no leite bovino. As duas principais proteínas, β -lactoglobulina (18,3 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa) têm sido objeto de inúmeros estudos. O propósito tem sido principalmente elucidar e explorar possíveis relações estrutura / função. Ambas as proteínas fornecem alto valor nutritivo e são utilizadas na produção de bebidas nutritivas, como fórmulas infantis e bebidas energéticas.

A α -lactalbumina (α -LA) é a segunda proteína de soro mais prevalente no leite bovino, é composta por 123 resíduos de aminoácidos. A ligação do cálcio a α -LA causou uma estabilidade pronunciada na estrutura nativa da proteína. Esta proteína pode ligar-se a outros íons metálicos, como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} . A capacidade de ligação do íon metálico é a característica mais importante do α -LA. Além disso, a proteína poderia interagir com ácidos graxos, vitaminas e polifenóis (LIANG, ZHANG, ZHOU, & SUBIRADE, 2013; DELAVARI et al., 2015 ;MOHAMMADI & MOEENI, 2015a , b; CHENG et al., 2018).

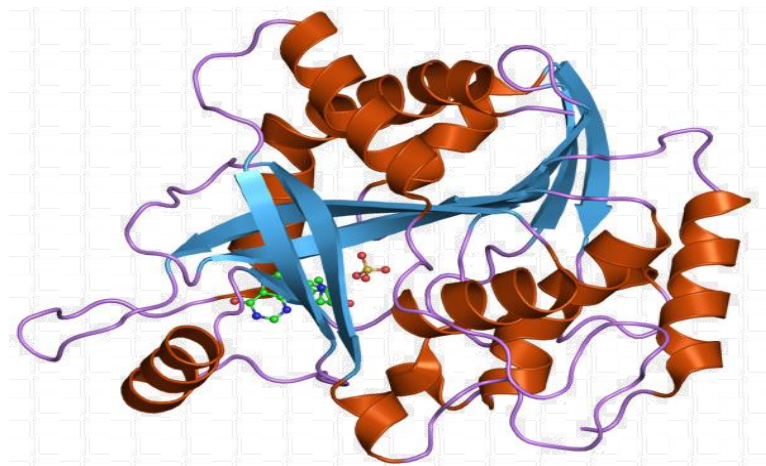


Figura 1: α -lactalbumina. Fonte: Protein Data Bank in Europe

Além disso, a β -lactoglobulina oferece uma gama de propriedades tecno-funcionais úteis, tais como espessamento, emulsificação, gelificação ou formação de espuma. A exposição das proteínas do soro ao calor é um passo de processamento industrial comum que provoca alterações estruturais nas proteínas e que podem levar a aumentos na viscosidade e / ou formação de redes de gel potencialmente extensivas acima de uma concentração de proteína crítica (BRODKORB, et al., 2016).

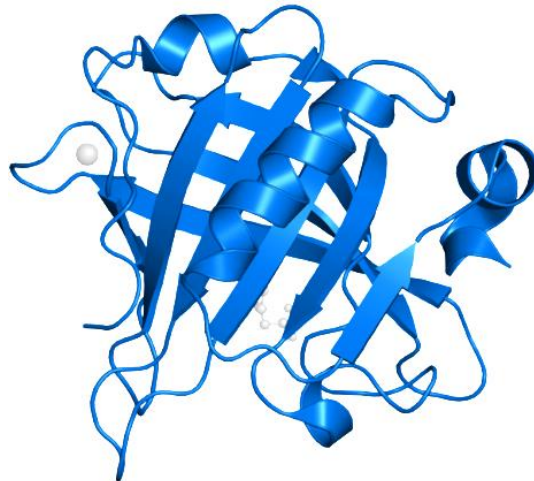


Figura 2: β -lactalbumina. Fonte: Protein Data Bank in Europe

A β -lactoglobulina é a principal proteína de soro de leite secretada no leite de ruminantes, como a vaca ou ovelha. Esta proteína pode ser isolada prontamente e, desse isolamento do leite realizado, inicialmente, por Palmer (1934).

As formas comerciais de proteínas do soro são: isoladas de proteína de soro de leite (WPI) e concentrado de proteína de soro de leite (WPC). Este último contém lactose, gordura e quantidades variáveis de sais de cálcio, além de proteínas de soro de leite. Em geral, a estabilidade física das emulsões estabilizadas por WPI é qualitativamente similar às aquelas estabilizadas por β -lg (DEMETRIADES, et al., 1997). É conhecido que todas as proteínas globulares sofrerão desdobragem, desnaturação e subsequente agregação quando aquecidas acima de 70 °C (EUSTON, et al., 2000 e SLIWINSKI, et al., 2003). A estrutura final das emulsões estabilizadas com proteína de soro de leite pode ser ajustada entre líquido e sólido, alterando as condições de tratamento térmico, pH e força iônica, os fatores que controlam o grau de desdobramento e agregação de proteínas (DICKINSON, 2012).

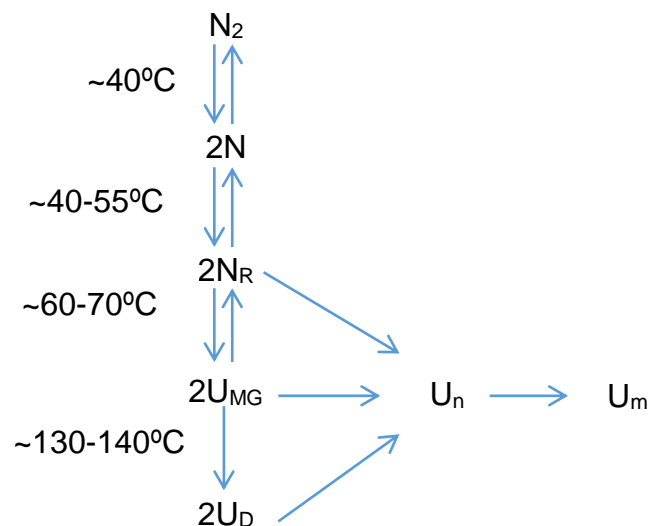
2.2. Agregação e desnaturação proteica

Segundo WIJAYANTI et al. (2014), MARZE et al. (2015) e XU et al. (2015), a agregação de proteínas do soro é representada por β -Lg como uma proteína principal do soro do leite. À temperatura ambiente, a β -Lg existe em equilíbrio entre as formas dimérica e monomérica, mas a temperaturas acima de 40°C e pH variando de 6 a 9, os dímeros se dissociam em monômeros e esta dissociação é reversível a baixas temperaturas. Entretanto, em altas

temperaturas, o β -Lg desnatura e perde a estrutura nativa secundária e terciária, podendo participar de reações de agregação irreversíveis. A estrutura terciária é estabilizada por duas ligações dissulfureto e é fortemente dependente da temperatura e do pH (TOLKACH e KULOZIK, 2007; BELLO et al., 2014.; BELLO et al., 2016a, b.; CARNOVALE et al., 2016). A taxa do agregado de proteínas do soro é controlada pelas condições do processo, tais como concentrado protéico, pH, temperatura e presença de outros componentes (SADEGHINEZHAD et al., 2013).

Existe uma relação direta entre incrustação e desnaturação da proteína quando o leite é processado em trocadores de calor. A β -lactoglobulina é uma proteína de soro mais sensível ao calor e torna-se pioneira na formação de depósitos. O comportamento da β -lactoglobulina é crucial para a incrustação, pois sofre desnaturação irreversível e consequente exposição de grupos hidrofóbicos em alta temperatura (MAHDI et al., 2009; CROGUENNEC et al., 2004; TOLKACH e KULOZIK, 2007).

À temperatura ambiente, o β -Lg é encontrado em solução com o dímero nativo (N_2), que se dissocia em monômeros em temperaturas acima de 40°C ($2N$). Quando a temperatura está entre 40 e 55°C , a β -Lg sofre uma pequena alteração na sua estrutura terciária e no meio do estado-R, que tem adequação para agregação ($2N_R$). O aumento da temperatura acima de 60°C provoca o desdobramento reversível de β -Lg e a formação induzida termicamente de um estado de glóbulo fundido ($2U_{MG}$). O desdobramento adicional de β -Lg ocupa espaço e uma estrutura residual permanece abaixo de 100°C . Finalmente, acima de 130°C , a desnaturação irreversível de β -Lg ocorre devido à destruição da estrutura secundária da proteína ($2U_D$). Então, as moléculas β -Lg participam de interações intermoleculares irreversíveis por meio de ligações hidrofóbicas e troca de tiol e, consequentemente, resultam na formação de polímeros e agregados (U_n , U_m) (PETIT et al., 2011; MAHDI et al., 2009, WIT, 2009, TOLKACH et al., 2007).



A agregação de proteínas tem sido demonstrada como o resultado da presença de inúmeros íons que favorecem o crescimento de agregados, bem como a incrustação de superfície, que ocorre devido à neutralização da carga superficial da proteína (PETIT et al., 2011; CARNOVALE et al., 2016).

A figura 3 apresenta o processo de desnaturação da β – lactoglobulina, juntamente com os íons de cálcio se ligando na proteína desdobrada formando então um agregado proteico.

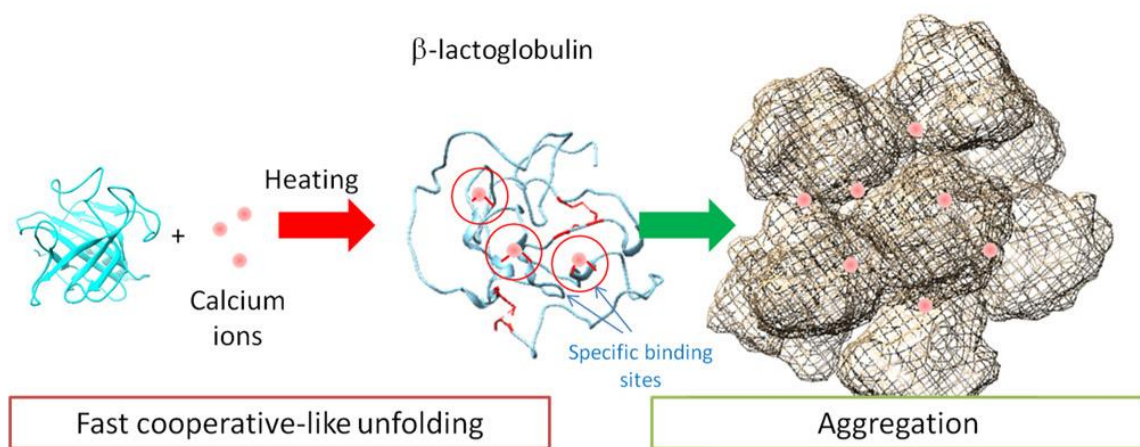


Figura 3: Desnaturação e Agregação da β -lactoglobulina. Fonte: PEIXOTO et al., 2019

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido juntamente com a equipe INRA - PIHIM a intégre l' Unité Matériaux et Transformations (UMET) dá Université Lille 1, localizada em Villeneuve d'Ascq – Lille, FR em parceria com o Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos (LaCiMP), da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Palmas –Tocantins.

A amostra utilizada consiste em um isolado proteico de β -lactoglobulina a 97% de pureza para a realização da pesquisa.

3.1. Soluções

Foram preparadas 5 soluções hidratadas de β -lactoglobulina, sendo usadas tanto para a análise de granulometria a laser quanto pra a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.1.1. Soluções utilizadas na granulometria a laser

As amostras utilizadas na granulometria a laser foram hidratadas com água Milli-Q, sendo foi realizado o acompanhamento cinético de desnaturação e agregação para cada tipo de solução (Tabela 2).

Tabela 2: Soluções utilizadas na leitura do Granulométrico a laser.

| Temperatura | Tipo | Modo de preparo |
|--------------------|-------------|---|
| 75°C | Gelo | Aquecida durante 1 hora no banho maria a 75°C, em uma concentração de 20g/L de BLG e sem adição de cálcio, sendo reservada em seguida em gelo, juntamente com uma alíquota de Cálcio até obterem mesma temperatura. Após, o cálcio é adicionado na solução, em concentração final de 6:1. A solução é reservada em temperatura ambiente. |
| 75°C | Branco | Aquecida durante 4 horas no banho maria a 75°C, em uma concentração de 20g/L de BLG e sem adição de cálcio para representar um “Branco”, em concentração final de 6:0. |
| 90°C | Aquecimento | Aquecida durante 30min no banho maria a 90°C, em uma concentração de 20g/L de BLG, com adição de cálcio, com concentração final de 6:1. A solução em temperatura ambiente. |
| 90°C | Gelo | Aquecida durante 30min no banho maria a 90°C, em uma concentração de 20g/L de BLG e sem adição de cálcio, sendo reservada em seguida em gelo, juntamente com uma alíquota de Cálcio até obterem a mesma temperatura. Após, o cálcio é adicionado na solução, em concentração final de 6:1. A solução é reservada em temperatura ambiente. |

3.1.2. Soluções utilizadas para Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises do RMN, tiveram as soluções hidratadas com água deionizada (D2O) e depois foram aquecidas em suas respectivas temperaturas (75, 80 e 90°C) e após esse processo, ficavam reservadas por volta de 12 horas em gelo até o momento da leitura (Tabela 3).

Tabela 3: Soluções utilizadas na leitura do RMN

| Temperatura | Tipo | Modo de preparo |
|--------------------|-------------|--|
| 75°C | Gelo | Aquecida durante 4 horas no banho maria a 75°C, em uma concentração de 20g/L de BLG dissolvida em D2O sem adição de cálcio, e em seguida é reservada em gelo, juntamente com uma alíquota de cálcio, até a hora da leitura no RMN-Líquido. O cálcio foi adicionado na amostra na hora da leitura, em concentração final de 6:1. Antes de realizar a leitura, a amostra foi centrifugada. |

| | | |
|------|-------------|--|
| 75°C | Branco | Aquecida durante 4 horas no banho maria a 75°C, em uma concentração de 20g/L de BLG dissolvida em D2O sem adição de cálcio para representar um “Branco”, e em seguida é reservada em gelo até a hora da leitura no RMN-Líquido, em concentração final de 6:0. Antes de realizar a leitura, a amostra foi centrifugada. |
| 80°C | Gelo | Aquecida durante 1 hora e 30 minutos no banho maria a 80°C, em uma concentração de 20g/L de BLG dissolvida em D2O sem adição de cálcio, e em seguida é reservada em gelo, juntamente com uma alíquota de cálcio, até a hora da leitura no RMN-Líquido. O cálcio foi adicionado na amostra na hora da leitura, em concentração final de 6:1. Antes de realizar a leitura, a amostra foi centrifugada. |
| 90°C | Aquecimento | Aquecida durante 30 minutos no banho maria a 90°C, em uma concentração de 20g/L de BLG dissolvida em D2O com adição de cálcio, reservada em gelo até a hora da leitura no RMN-Sólido, em concentração final de 6:1. Antes de realizar a leitura, a amostra foi centrifugada. |
| 90°C | Gelo | Aquecida durante 30 minutos no banho maria a 90°C, em uma concentração de 20g/L de BLG dissolvida em D2O sem adição de cálcio, e em seguida é reservada em gelo, juntamente com uma alíquota de cálcio, até a hora da leitura no RMN- Líquido. O cálcio foi adicionado na amostra na hora da leitura, em concentração final de 6:1. Antes de realizar a leitura, a amostra foi centrifugada. |

3.2. Granulometria a laser

A análise granulométrica foi realizada pela técnica de difração de laser no equipamento Static Light Scattering Mastersizer 2000 da Malvern Instruments Ltd, England, na qual uma alíquota de 5 ml a 10 ml da amostra foi colocada no vortex, aplicando 15 s de ultrassom com deslocamento ultrassônico de 12,5 conforme escala do equipamento, com potência mínima de 60%. Os gráficos foram gerados pelo software Mastersize da Malvern v. 5.60.

As leituras foram realizadas na granulometria a laser, com uma obscuridade mínima de 15%. As soluções tipo “Gelo” e “Branco” tinham suas leituras realizadas em dois tempos diferentes, nos primeiros 30 minutos iniciais e após 4 horas. Já as soluções do tipo “Aquecimento” tiveram suas cinéticas realizadas nos tempos de 30 min, 2 horas e 4 horas.

3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados com a finalidade de estudar a desnaturação e subsequente agregação de BLG após o aquecimento, na presença de cálcio. Com isso foi

possível acompanhar a evolução temporal da quantidade de proteínas nativas, desnaturadas e agregadas. Para fazer uma distinção mais clara entre desnaturação e agregação, a difusão lateral e pico de análise espectral foram monitorados (PEIXOTO et al., 2019).

Para o RMN adiciona em um tubo de 5 mm de vidro, uma alíquota de trezentos microlitros da solução de BLG e cem microlitros de óleo mineral Nujol, a fim de evitar a evaporação da água durante o experimento, em seguida centrifuga-se a própria e é adicionada ao equipamento. O equipamento realiza a leitura da amostra em diferentes faixas de temperatura e tempo podendo assim acompanhar a desnaturação e agregação da proteína BLG.

As experiências de RMN foram realizadas num espectrômetro Bruker AVANCE III e AVANCE NEO 900 US2 (^1H 900 MHz) equipado com um criossonda TCI de 5 mm e uma sonda de banda larga de 5 mm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amostras A 75°C

4.1.1. Análise Granulométrica

A figura 4 apresenta as respostas da análise granulométrica. Observa-se que na primeira leitura a amostra “Branco” (A), apresenta aglomerados maiores em relação à amostra “Gelo” (B), devido ao tempo de aquecimento que foi de 1 hora para “Branco” e 30 minutos para “Gelo”, devido que, quanto maior o tempo de exposição da proteína ao calor, maior será o desdobraimento da própria, disponibilizando assim mais sítios para o cálcio agir e formar aglomerados (SIMMONS et al., 2007). (Figura 4).

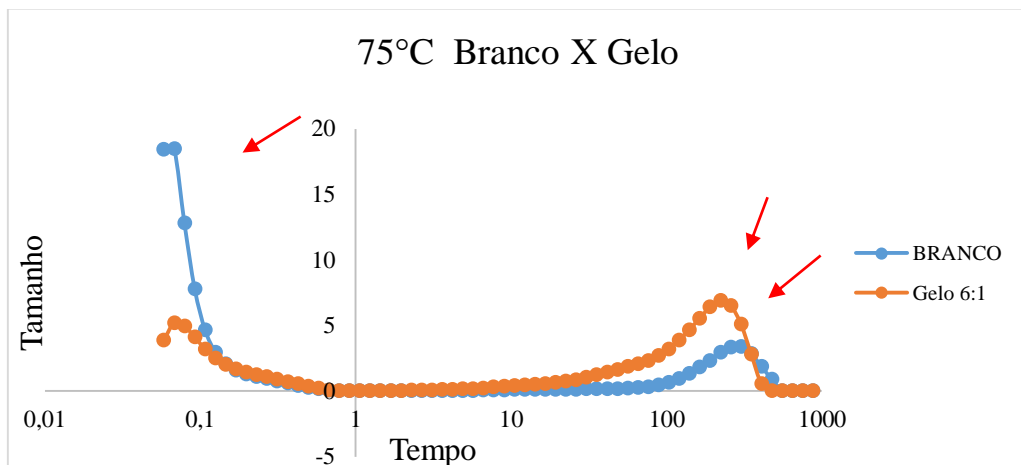


Figura 4: : Gráfico da análise granulométrica das amostras a 75°C.

O processo que leva à agregação β -LG começa com temperaturas em torno de 75°C, exibindo um rápido aumento da cinética com o aumento da temperatura (PETIT et al., 2011). Com isso nota-se que em tais temperaturas, (75°C), foi necessário utilizar mais tempo de aquecimento em comparação as demais amostras.

Observa-se na amostra A que a proteína desnaturou e formou microaglomerados. Já na amostra B, a proteína foi desnaturando e a presença do cálcio agiu como agente cimentante unindo as proteínas desnaturadas e formando um macroaglomerado. Nesse sentido, Jeyarajah et al. (1994) e Petit (2011) destacam que a presença de íons de cálcio é um dos fatores mais importantes que reagem com a temperatura e propulsiona a agregação da β -LG, e aumenta a taxa de desdobraimento, bem como na taxa de agregação. Com o decorrer do tempo a proteína

β -LG é desnaturada com a baixa e “alta” temperatura a qual está condicionada e ao ser desnaturada, o cálcio presente na solução se liga aos sítios específicos desdobrados, formando aglomerados maiores que o tamanho natural da proteína que é de 18,3 kDa (PEIXOTO et al., 2018).

4.1.2. Análise De RMN

A figura 5 apresenta a leitura de RMN das amostras A e B. Observa-se que existem algumas diferenças de sobreposição no espectro considerando a ausência e presença de cálcio.

As setas vermelhas destacam as regiões com diferenças entre os dois espectros, onde nota-se que a amostra B possui maiores aglomerados ao se comparar com a amostra A, devido à presença do cálcio.

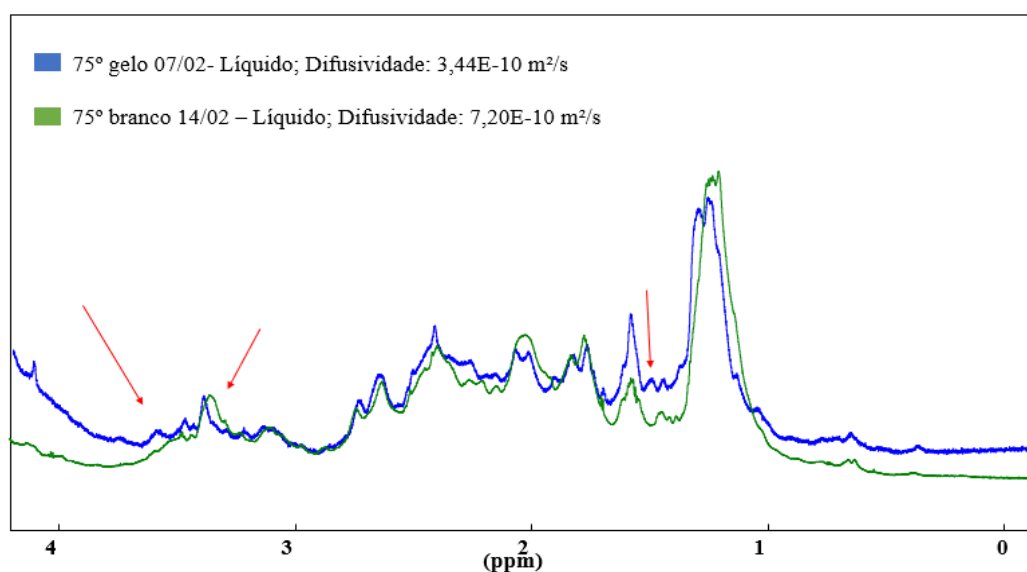


Figura 5: Espectro quantitativo ^1H feito a 75°C para ambas soluções de BLG, onde “Gelo” com (linhas azuis) e sem cálcio “Branco” (linhas verdes). Setas vermelhas destacam as regiões com diferenças entre os dois espectros.

De acordo com Peixoto et al., 2018, observa-se poucas diferenças no espectro resultante da mensuração de aglomerados proteicos na ausência e na presença de cálcio a 60°C . Segundo os autores, o espectro mostra alguns desvios de prótons específicos indicando uma interação local com o cálcio.

A difusividade é influenciada diretamente por três fatores: soluto, viscosidade e temperatura. Quanto maior a difusividade (de uma substância em relação à outra), mais rápido

elas difundem-se uma na outra, aumentando assim o tamanho do agregado (DING et al., 2008; LANG et al., 2012)

Nesse sentido, ao comparar as difusividades das amostras, pode-se perceber que a amostra B possui aproximadamente o dobro do tamanho da amostra A, o que pode ser explicado devido à presença do cálcio que se ligou as proteínas desnaturadas e formou macroaglomerados.

Na figura 6 nota-se que a partir de 7,5 ppm a amostra B, apresenta mais agregados do que a amostra A.

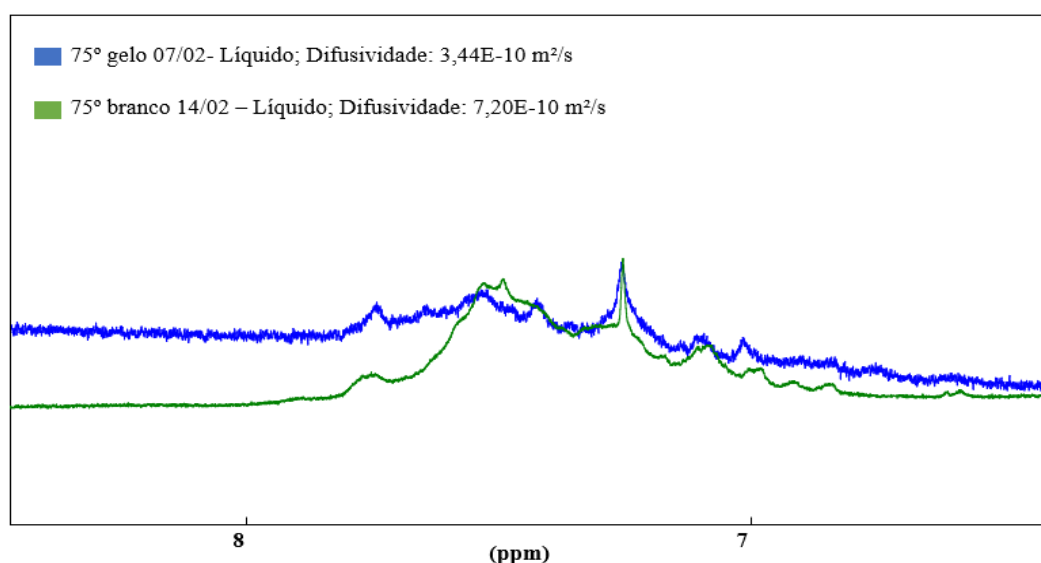


Figura 6: Espectro quantitativo ^1H feito a 75°C para ambas soluções de BLG, onde “Gelo” com (linhas azuis) e sem cálcio “Branco” (linhas verdes).

4.2. Amostras a 80°C e 90°C

4.2.1. Análise Granulométrica

A figura 7 apresenta a análise granulométrica para duas amostras, “Aquecimento” (C) e “Gelo” (D). A amostra C foi submetida à alta temperatura, 90°C , durante 30 minutos na presença de cálcio, dessa forma, a amostra desnaturou e gelificou muito rápido, impossibilitando realizar a leitura, pois já não estava mais no estado líquido.

Já a amostra D, foi submetida às mesmas circunstâncias, porém com a ausência do cálcio, contudo, devido à temperatura, desnaturou rapidamente as proteínas, solidificando-as parcialmente. As taxas cinéticas são altamente dependentes da temperatura.

A leitura granulométrica da amostra D foi realizada com os resíduos líquidos da solidificação da amostra, assim, não apresentando macroaglomerados no final da leitura.

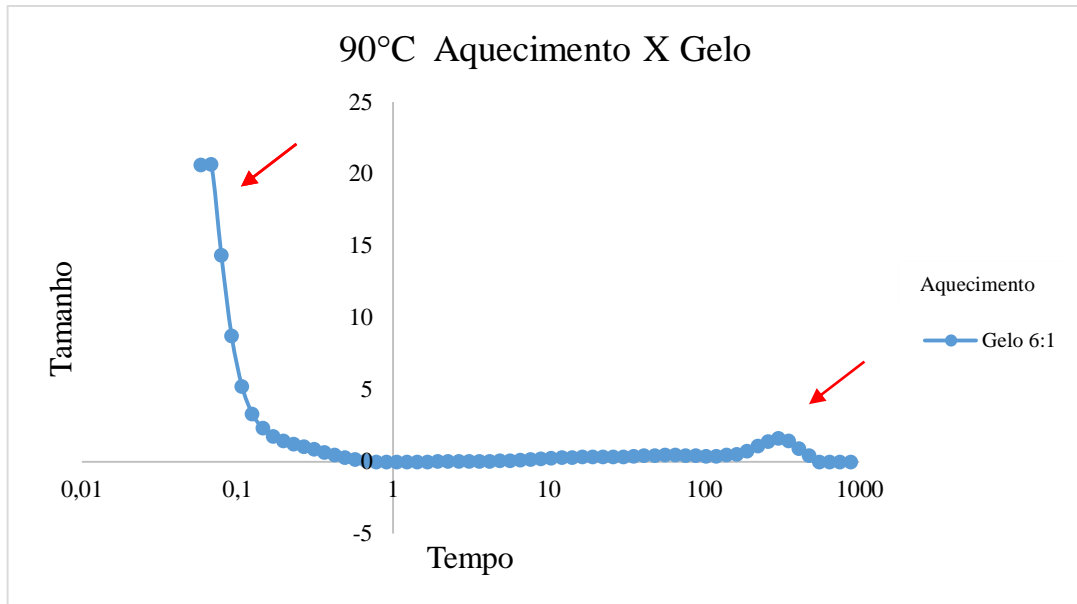


Figura 7: Gráfico da análise granulométrica da amostra a 90°C.

4.2.2. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A figura 8 contém a leitura de RMN das amostras C e D. Pode-se observar que existem algumas diferenças no espectro, sendo destacadas com setas vermelhas. Tais diferenças são apresentadas devido ao tempo e ao método de aquecimento na presença do cálcio que diferem de uma amostra para outra.

Estudos realizados mostram que o desdobraimento e a agregação exibem diferentes dependências de temperatura: com o aumento da temperatura há um aumento elevado da taxa de desdobraimento, e induz um aumento moderado na agregação na presença de cálcio. (PETIT et al., 2011). Nesse contexto, a amostra C foi aquecida na presença do cálcio, então o seu poder de agregação é maior devido ao fato do cálcio estar presente no ato da desnaturação agindo instantaneamente a alta temperatura. Já na amostra D, a solução foi aquecida sem a presença de cálcio, e depois sendo resfriada. O cálcio foi, então, adicionado na solução a baixa temperatura, restringindo, assim, o seu poder calcinante, formando menos agregados quando comparados ao seu efeito em alta temperatura.

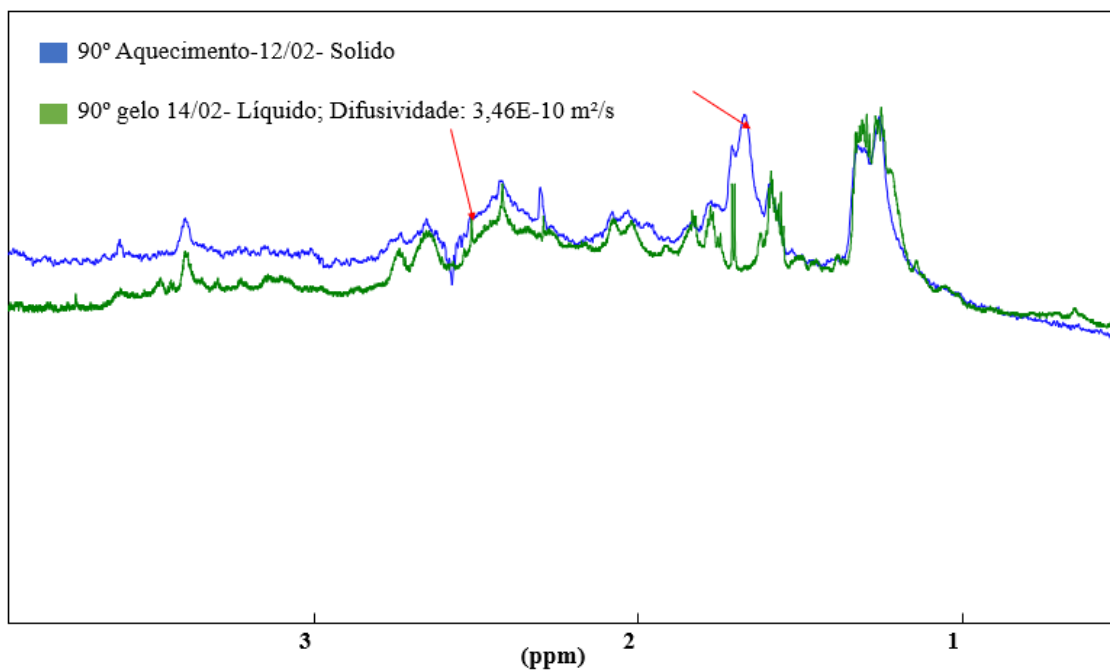


Figura 8: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C para ambas soluções de BLG , onde cálcio, “Aquecimento” com (linhas azuis) e “Gelo” com (linhas verdes).

Na figura 9 nota-se que a amostra D não sofreu tanta desnaturação ao se comparar a amostra C, isso se deve ao método de aquecimento a qual foi submetida.

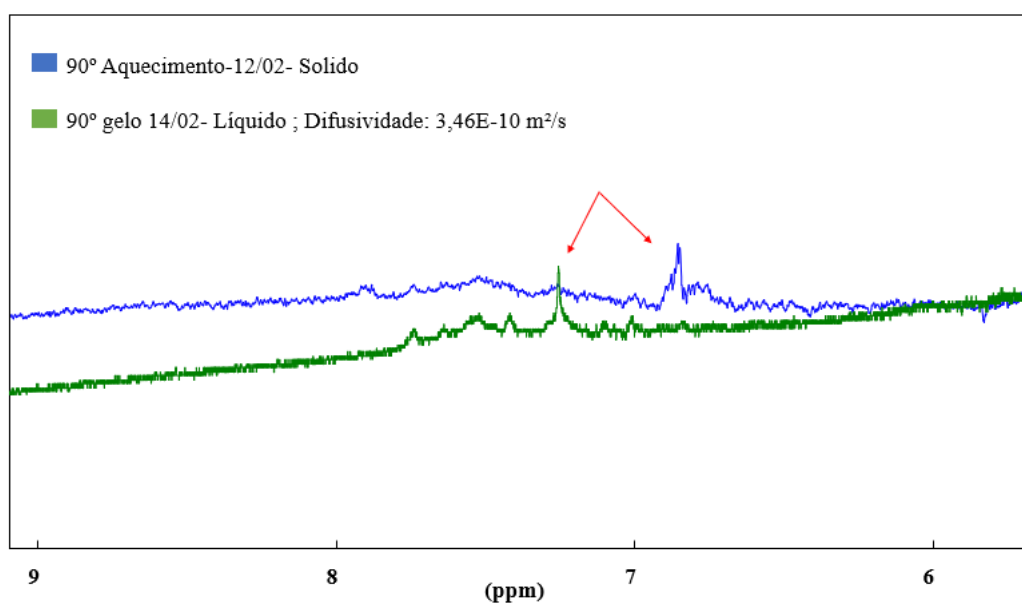


Figura 9: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C para ambas soluções de BLG , onde cálcio, “Aquecimento” com (linhas azuis) e “Gelo” com (linhas verdes).

Analisando a figura 10 da leitura de RMN das amostras a 80°C – “Gelo” (E) e 90°C – “Gelo” (F), observa-se que quase não existe diferença entre os espectros, por causa da pequena

diferença entre as altas temperaturas utilizadas e por passarem pelo mesmo método de aquecimento.

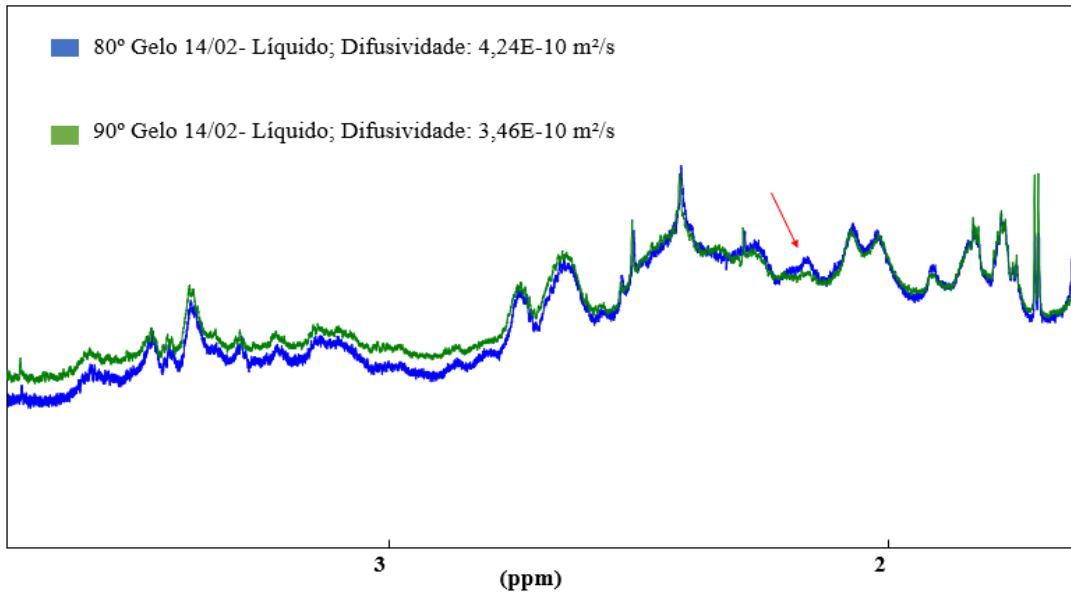


Figura 10: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C e 80°C para ambas soluções de BLG, onde “Gelo – 80°C ” com (linhas azuis) e “Gelo – 90°C ” com (linhas verdes).

Ao comparar as difusividades das amostras na figura 11, pode-se perceber que a diferença entre ambas é pequena, porém a amostra F, que esteve submetida a uma maior temperatura, formou aglomerados maiores em relação a amostra E, que esteve submetida a uma menor temperatura.

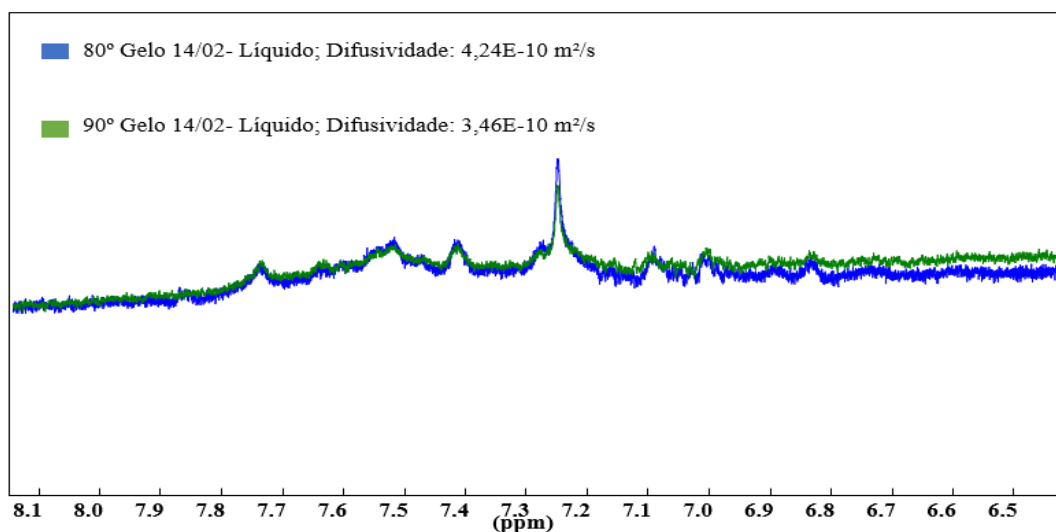


Figura 11: Espectro quantitativo ^1H feito a 90°C e 80°C para ambas soluções de BLG, onde “Gelo – 80°C ” com (linhas azuis) e “Gelo – 90°C ” com (linhas verdes).

Nesse sentido, em altas temperaturas, a literatura destaca que a β -Lg desnatura e perde a estrutura nativa secundária e terciária, podendo participar de reações de agregação irreversíveis (WIJAYANTI et al. 2014, SADEGHINEZHAD et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

Na temperatura de 75 ° C, os agregados formados eram pequenos em comparação com os agregados fortes formados a temperaturas mais elevadas. Na temperatura de 80°C, formou-se uma quantidade maior de agregados. A temperatura de 90°C causou desnaturação da proteína em poucos minutos e com maiores sítios para o cálcio se ligar, tornando assim a textura da amostra sólida. Assim, pode-se concluir quanto maior a temperatura menor será o tempo para a desnaturação da proteína. Já a temperatura é diretamente proporcional a ação do cálcio, quanto maior a temperatura, maiores aglomerados proteicos iram se formar na presença do cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMAN, Marije et al. Effect of heating strategies on whey protein denaturation—Revisited by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 152-166, 2016.
- ANEMA, S.G. The whey proteins in milk: Thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk. M. Boland, H. Singh, A. Thompson (Eds.), *Milk proteins: From expression to food* (2nd ed.), Academic Press, Cambridge, MA (2009), pp. 269-318.
- BANSAL, B., Chen, X.D., 2006. A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 27–33
- BARBUT, S., & FOEGEDING, E. A. (1993). Ca²⁺-induced gelation of pre-heated whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 58, 867e871.
- BELLO, Martiniano. Structural and energetic requirements for a second binding site at the dimeric β -lactoglobulin interface. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 34, n. 9, p. 1884-1902, 2016a.
- BELLO, Martiniano; FRAGOSO-VÁZQUEZ, M. Jonathan; BASURTO, José Correa. Energetic and conformational features linked to the monomeric and dimeric states of bovine BLG. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 625-636, 2016b.
- BELLO, Martiniano; GARCÍA-HERNÁNDEZ, Enrique. Ligand entry into the calyx of β -lactoglobulin. **Biopolymers**, v. 101, n. 7, p. 744-757, 2014.
- BOLDRINI, F. M.; TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. T. Extração de Proteínas do Soro de Leite por Coacervação com Polissacarídeo e Sua Utilização em Formulação Cosmética. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 10, n. 1, 2015.
- BRODKORB A., CROGUENNEC T., BOUHALLAB S., KEHOE J.J. (2016) Heat-Induced Denaturation, Aggregation and Gelation of Whey Proteins. In: McSweeney P., O'Mahony J. (eds) *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York, NY.
- BUGGY, A. K. et al. Pilot-scale formation of whey protein aggregates determine the stability of heat-treated whey protein solutions—Effect of pH and protein concentration. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 12, p. 10819-10830, 2018.
- BUGGY, A.K.; MCMANUS, J.J.; BRODKORB, A.; CARTHY, N.M. Stabilising effect of α -lactalbumin on concentrated infant milk formula emulsions heat treated pre- or post-homogenisation. *Dairy Science and Technology* (2016), pp. 1-15.
- CARNOVALE, V et al. Effect of various calcium concentrations on the interactions between β -lactoglobulin and epigallocatechin-3-gallate. **International dairy journal**, v. 59, p. 85-90, 2016.
- CHENG, H. et al. Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 242-252, 2018.

CROGUENNEC, T.; O'KENNEDY, B.T.; MEHRA, R. Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*. 2004. 14. 399-409.

DELAVARI, B. et al. Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocolloids*, v. 45, p. 124-131, 2015.

DEMETRIADES, K.; COUPLAND, J.N.; MCCLEMENTS, D.J. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J Food Sci*, 62 (1997), pp. 342-347.
Dickinson, E. Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocoll*.

DICKINSON, E. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food hydrocolloids*, v. 28, n. 1, p. 224-241, 2012.

DING, F.; DOKHOLYAN, N.V. Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in Cu, Zn superoxide dismutase folding and aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(50): p. 19696-701.

DINO. Brasil é o 4º maior produtor de leite do mundo, segundo dados. IN, *Revista Exame*, 2018. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/negocios/dino/brasil-e-o-4-maior-produtor-de-leite-do-mundo-segundo-dados/>. Acesso em 25 de Maio de 2019.

DISSANAYAKE, M.; RAMCHANDRAN L.; DONKOR, O.N.; VASILJEVIC, T. Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. *International Dairy Journal*, v. 31, n. 2, p. 93-99, 2013

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON C. ; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*, 25 (2011), pp. 1604-1617.

EARLY, R. Dairy products and milk-based food ingredients.
D. Baines, R. Seal (Eds.), *Natural food additives, ingredients and flavourings*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK (2012), pp. 417-445.

ERABIT, N.; FLICK, D.; ALVAREZ, G. Effect of calcium chloride and moderate shear on β -lactoglobulin aggregation in processing-like conditions. *Journal of food engineering*, v. 115, n. 1, p. 63-72, 2013.

EUSTON, S.R.; FINNIGAN, S.R.; HIRST, R.L. Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocoll*, 14 (2000), pp. 155-161.

FITZSIMONS, S.M.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 21 (2007), pp. 638-644.

GASPARD, S.; AUTY, M.A.E.; KELLY, A.L.; O'MAHONY, J.A.; BRODKORB, A. Isolation and characterisation of κ -casein/whey protein particles from heated milk protein

concentrate and role of κ -casein in whey protein aggregation. *International Dairy Journal* Volume 73, October 2017, Pages 98-108.

HALE, T. W. et al. **Medications and Mothers' Milk 2017**. Springer Publishing Company.

HOCHWALLNER, H. et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. **Methods**, v. 66, n. 1, p. 22-33, 2014.

HOFFMANN, M.A.; VAN MIL, P.J. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: Role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997), pp. 2942-2948.

HONGSPRABHAS, P., BARBUT, S., & MARANGONI, A. G. (1999). The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with $\text{Ca}\beta\beta$. *Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 32, 196e202.

JEYARAJAH, S.; ALLEN, J. C. Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 80–85.

JURADO-ALAMEDA, E. et al. Study of heat-denatured whey protein removal from stainless steel surfaces in clean-in-place systems. **International dairy journal**, v. 38, n. 2, p. 195-198, 2014.

KOLETZKO, B. et al. Early influences of nutrition on postnatal growth. In: **Recent Advances in Growth Research: Nutritional, Molecular and Endocrine Perspectives**. Karger Publishers, 2013. p. 11-27

KON, S. K.; COWIE, A. T. (Ed.). **Milk: the mammary gland and its secretion**. Elsevier, 2016.

LANG, L., et al., Fibrillation precursor of superoxide dismutase 1 revealed by gradual tuning of the protein-folding equilibrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012.

LIANG, L.; ZHANG, J.; ZHOU, P.; SUBIRADE, M. Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 754-761, 2013.

MAHDI, Y.; MOUHEB, A.; OUFER, L. A Dynamic model for milk fouling in a plate heat exchanger. *Applied Mathematical Modelling*. 2009. 33. 648-662.

MARTIN, C.; LING, P.; BLACKBURN, G. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 279, 2016.

MARZE, S.; GAILLARD, C.; ROBLIN, P. In vitro digestion of emulsions: high spatiotemporal resolution using synchrotron SAXS. *Soft Matter* 2015, 11, 5365– 5373
Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 50(2015), pp. 358-366

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSOM, R. G. Lactation. In: *Animal Nutrition*. 7.ed. New York: Person, 2010. cap 16, p. 405-406.

MICHAELSEN, Kim F.; GREER, Frank R. Protein needs early in life and long-term health. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 3, p. 718S-722S, 2014.

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine alpha-lactalbumin. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 458-467, 2015a.

MOHAMMADI, F.; MOEENI, M. Study on the interactions of *trans*-resveratrol and curcumin with bovine alpha-lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking. **Materials Science and Engineering: C**, v. 50, p. 358-366, 2015.

MOUDRÁ, K. et al. The combined effects of fat content, calcium chloride, and coagulant concentration on the development of cheese curd structure. **International dairy journal**, v. 73, p. 92-97, 2017.

NDOYE, F. T. et al. In-line characterization of a whey protein aggregation process: Aggregates size and rheological measurements. **Journal of food engineering**, v. 115, n. 1, p. 73-82, 2013.

PALMER, A.H. (1934) The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk. *J. BioI. Chem.*, 104, 359-72.

PEIXOTO, P.D.S et al. Formation of β -lactoglobulin aggregates from quite, unfolded conformations upon heat activation. **Langmuir**, v. 35, n. 2, p. 446-452, 2018.

PEIXOTO, P.D.S.; TRIVELLI, X.; ANDRÉ, C.; MOREAU, A.; DELAPLACE, G. Formation of β -Lactoglobulin Aggregates from Quite, Unfolded Conformations upon Heat Activation. *Langmuir* 2019, 35, 446–452.

PETIT, J., HERBIG, A. L., MOREAU, A., & DELAPLACE, G. (2011). Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy Science*, 94, 5794e5810.

RIBEIRO NETO AC, BARBOSA SBP, JATOBÁ RB, SILVA AM, SILVACX, SILVA MJA, ET AL. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012; 64(5): 1343-51.

RYAN, K.N.; ZHONG, Q. EA Foegeding Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability—A hypothesis paper. *Journal of Food Science*, 78 (2013).

SADEGHINEZHAD, E.; KAZI, S.N.; BADARUDIN, A.; ZUBAIR, M.N.M; DEHKORDI, B.L.; OON, C.S. A review of milk fouling on heat exchanger surfaces. *Rev Chem Eng*. 2013. 29 (3). 169-188.

SAGLAM, D.; VENEMA, P.; DE VRIES, R.; VAN DER LINDEN, E. Exceptional heat stability of high protein content dispersions containing whey protein particles. *Food Hydrocolloids*, 34 (2014), pp. 68-77.

SIMMONS, M. J. H.; JAYARAMAN, P.; FRYER, P. J. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 2, p. 517-528, 2007.

SLIWINSKI, E.L.; ROUBOS, P.J.; ZOET, F.D.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; WOUTERS, J.T.M. Effects of heat on physicochemical properties of whey protein-stabilised emulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 31 (2003), pp. 231-242.

SMITHERS, G.W. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48 (2015), pp. 2-14.

SWAISGOOD, H.E. CHEMISTRY OF THE CASEINS. Cap 3, pg 139. In **ADVANCED DAIRY CHEMISTRY-I PROTEINS**. Originally published by Kluwer Academic 1 Plenum Publishers, New York in 2003.

TAVARES G.M.; CROGUENNEC, T.; CARVALHO, A.F.; BOUHALLAB, S. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 37 (2014), pp. 5-20.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin. *Lait*. 2007. 87. 301-315.

TRIANI, R.; FOEGEDING, E. A. Heat stability of whey protein ingredients based on state diagrams. **International dairy journal**, v. 91, p. 25-35, 2019.

VERHEUL, M.; ROEFS, S.P.; DE KRUIF, K.G. Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998), pp. 896-903

VIAPIANA, I.V. Dossiê Proteínas do Soro do Leite. **Food Ingredients Brasil**, Nº 41 – 2017.

WIJAYANTI, H.B.; BANSAL, N. DEETH, H.C. Stability of whey protein during thermal processing: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2014. 13. 1235-1251.

XU, A. Y.; MELTON, L. D.; JAMESON, G. B.; WILLIAMS, M. A. K.; MCGILLIVRAY, D. J. Structural Mechanism of Complex Assemblies: Characterisation of Beta-Lactoglobulin and Pectin Interactions. *Soft Matter* 2015, 11, 6790– 6799

ZOCCAL, R. Indicadores da produção mundial de leite... In **ANUÁRIO LEITE**. Pg 18. Embrapa, São Paulo, 2018.