



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LETICIA VIEIRA EMILIANO CAMARGO

**ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA EM MEIO ÁCIDO NA
PRESENÇA DE ÍONS DE CÁLCIO – SOB AQUECIMENTO**

PALMAS – TO

JULHO 2019

LETÍCIA VIEIRA EMILIANO CAMARGO

ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA EM MEIO ÁCIDO NA
PRESENÇA DE ÍONS DE CÁLCIO – SOB AQUECIMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia de
Alimentos, Universidade Federal do
Tocantins, como parte do requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Glêndara
Aparecida de Souza Martins

Co-orientador: Dr. Paulo Peres de Sá
Peixoto Júnior

PALMAS – TO

JULHO/2019

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

C172e Camargo, Leticia Vieira Emiliano.

ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA EM MEIO
ÁCIDO NA PRESENÇA DE ÍONS DE CÁLCIO – SOB AQUECIMENTO. /
Leticia Vieira Emiliano Camargo. – Palmas, TO, 2019.

28 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientadora : Glêndara Aparecida de Souza Martins

Coorientador: Paulo Peres de Sá Peixoto Júnior

1. SOROPROTEÍNA. 2. β -LACTOGLOBULINA. 3. AGREGAÇÃO. 4.
TEMPERATURA. 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

LETÍCIA VIEIRA EMILIANO CAMARGO

ESTUDO DA CONFORMAÇÃO DA β -LACTOGLOBULINA EM MEIO ÁCIDO NA PRESENÇA DE ÍONS DE CÁLCIO – SOB AQUECIMENTO

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas-TO, Curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 15 / 07 / 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). Glândara Aparecida de Souza Martins, UFT

Prof. Dr(a). Solange Cristina Carreiro, UFT

Prof. Dr. Paulo Eduardo Peres de Sá Peixoto, INRA - França

Palmas-TO, 2019

*Dedico à memória do meu avô,
Geraldo Silva, um dos meus maiores
incentivadores durante essa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Deus tem um propósito para a vida de cada um. Eu sei disso porque fiz diversos planos para minha vida acadêmica, não queria de jeito nenhum me graduar aqui na UFT, queria desbravar o Brasil em busca do meu sonho. Sim, a Engenharia de Alimentos para mim era um sonho. No ensino médio tive um despertar pela Engenharia, era monitora de matemática e meu professor perguntou o que eu iria fazer, disse “psicologia”, e ele, com palavras que não irei me lembrar agora, falou que seria um desperdício, pois eu me destacava muito na área das exatas.

No segundo ano do ensino médio conheci minha musa inspiradora: Adriana Souza. Estava num simpósio de profissões, no Colégio Marista, e ela falou sobre a Engenharia de Alimentos com tanto amor. Descobri ali, é isso que eu quero. Fiz o vestibular, fiquei de suplente, entrei na segunda chamada. Desisti do meu diploma regular, sai do colégio antes de terminar o ano letivo, através do certificado de conclusão pelo ENEM isso foi possível. Perdida, mas cheia de esperanças eu fui. E no primeiro dia de aula, em meio de vários rumores de “bixovai morrer”, quem era a professora da primeira matéria, numa segunda-feira?? Adriana. Aquiloaqueceu meu coração.

Passei grande parte do primeiro período isolada do restante da turma, não tinha muitos amigos. O PET (Programa de Educação Tutorial) do curso e o Centro Acadêmico (CA) foram nos recepcionar, achei linda a forma como o PET nos acolheu e decidi que queria fazer parte disso. No segundo período preparei tudo e me inscrevi. Muita gente me desmotivou, muitos desacreditaram de mim, mas eu acreditei e foi suficiente. Passei em primeiro lugar e estou até hoje neste grupo. O que dizer deste grupo? Entrei tão perdida, a protegida pelo tutor, prof. Abraham Zuniga, “cuidado com a de menor”. Tinha só 17 anos, hoje sou a anciã do grupo. Durante todo esse tempo de petiana aprendi muito, chorei: de emoção, de raiva, de alegria. Pensei diversas vezes em desistir, mas minha mãe sempre me aconselhava a seguir firme. Agradeço demais a cada um que passou por minha vida seja dentro ou fora do PET. Fiz amigos para vida toda, vocês são a família que pude escolher dentro da UFT.

Agradeço em especial à minha família, principalmente à minha mãe, Marcia Vieira. Ela sempre acreditou em mim e nunca me diminuiu por eu ter escolhido a Engenharia de Alimentos. Muito ouvi “por que não escolheu medicina? Engenharia civil?” “Isso não dá dinheiro”. Obrigada, essas palavras me motivaram a seguir em frente e mostrar que posso ser quem eu quiser. Minha família foi meu porto seguro quando em vários momentos fiquei sem esperanças, pensei que não fosse conseguir. Mas eu consegui. Amo muito vocês.

Ao decorrer da universidade, fiz amizades, mantive as que já tinha antes. Obrigada amigos do ETI Pe. Josimo, do Dom Alano, do Marista e agora da UFT. Amigos agregados dos rolês e viagens da vida: obrigada!! Amo vocês.

Não poderia deixar de agradecer ao meu primeiro orientador, prof. Paulo Cleber. Me inseriu na área da pesquisa e foi um dos meus maiores incentivadores durante todo tempo que trabalhamos juntos. Fizemos muitas viagens e pesquisas, aprendi muito com o senhor. Muito obrigada.

A minha segunda orientadora, prof.^a Glêndara Martins, só tenho a agradecer por me proporcionar uma das minhas maiores realizações até hoje: estágio fora do país. Obrigada por ter nos mostrado um pouquinho do que a senhora viveu lá. Obrigada por todos os puxões de orelha, por ter acreditado em mim. Não foi fácil, mas fizemos acreditarem que foi. Obrigada por todas as conversas durante a escrita desse TCC que não foram poucas e que me impulsionaram a seguir firme e não desistir.

Não poderia deixar de agradecer também ao meu orientador do estágio, prof. Paulo Peixoto, obrigada por cada indagação e por ter nos recebido de portas-abertas. A experiência que vivi no INRA com toda certeza me fez refletir sobre muitas coisas. Agradeço a todos que nos apoiaram e ampararam tanto nesse processo. São conexões que quero manter. A vida em outro país nos molda de uma forma incrível. Obrigada Lille – França.

Durante esse percurso de formação foram tantas emoções, bem clichê, mas é assim mesmo. Agradeço por último à mim. Queria poder ter sido melhor, porém já me sinto imensamente grata pelo caminho que percorri. No fim é sempre você por você. Agradeço muito por nunca ter desistido, por ter lutado. Não foi simples, nada é. Fui aluna, petiana, monitora, diretora do CA, pesquisadora, viajante e agora estou a poucos passos de ser Engenheira de Alimentos.

Obrigada Deus por ter me guiado enquanto eu caminhava!

RESUMO

A β -lactoglobulina (β -lg), é uma proteína globular considerada pequena, possui cada monômero com 162 aminoácidos. Normalmente, em pH neutro e temperatura ambiente, está na forma de dímeros, forma nativa – onde cada subunidade tem o peso molecular de aproximadamente 18,3 kDa. Além da temperatura, o valor do pH e o teor de cálcio são fatores bem conhecidos que influenciam a desnaturação e agregação da proteína do soro do leite. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo estudar as alterações na estrutura da β -lactoglobulina (β -lg) causadas pelo aquecimento, na presença de íons cálcio (Ca) em meio ácido. Com base nas condições estabelecidas durante os experimentos foi possível constatar, através da granulometria por difração a laser (DL), que a alteração do pH e o aquecimento modificam o tamanho das partículas das soluções estudadas. Já na investigação via ressonância nuclear magnética (RMN) observou-se em pHs baixos a agregação é menor devido as temperaturas utilizadas, portanto o fenômeno que mais destaca-se é a desnaturação, principalmente nas amostras em que foram aquecidas previamente.

Palavras-chave: β -LACTOGLOBULINA; AGREGAÇÃO; TEMPERATURA.

ABSTRACT

β -lactoglobulin (β -lg), a globular protein considered small, has each monomer with 162 amino acids. Usually, at neutral pH and ambient temperature, it is in the form of dimers, native form - where each subunit has the molecular weight of approximately 18.3 kDa. In addition to temperature, the pH value and the calcium content are well known factors that influence the denaturation and aggregation of the whey protein. In this context, the present work aimed to study the changes in β -lactoglobulin (β -lg) structure caused by heating in the presence of calcium ions (Ca) in acid medium. Based on the conditions established during the experiments, it was possible to verify, through the Laser Diffraction (LD) granulometry, that the pH change and the heating modifies the particle size of the studied solutions. In the investigation by nuclear magnetic resonance (NMR) it was observed in low pHs the aggregation is smaller due to the temperatures used, so the phenomenon that stands out most is denaturation, especially in the samples in which they were previously heated.

Keywords: β -LACTOGLOBULIN; AGGREGATION; TEMPERATURE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura terciária da β -Lactoglobulina	13
Figura 2 – Experimentos (DL) realizados com pH 3,5	19
Figura 3 – Experimentos (DL) realizados com pH 4,0	20
Figura 4 – Experimentos (DL) realizados com pH 5,0	21
Figura 5 – Espectros de RMN líquido: diferentes pHs.....	23
Figura 6 – Espectros de RMN sólido: diferentes temperaturas de pré-aquecimento ..	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro lácteo, do leite bovino e do leite humano	12
Tabela 2 – Influências causadas por cada faixa de pH estudados por TAULIER & CHALIKIAN (2001).....	14
Tabela 3 – Condições experimentais esquemáticas das amostras para leitura na granulometria a laser	16
Tabela 4 – Condições experimentais das amostras do RMN sólido.....	17
Tabela 5 – Condições experimentais das amostras do RMN líquido	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 β -Lactoglobulina	12
2.2 Desnaturação e Agregação	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Planejamento e Preparo da amostra	16
3.2 Granulometria por Difração à Laser (DL).....	16
3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)	17
3.4 Análise dos dados.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Granulometria por Difração à Laser (DL).....	18
4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	22
5 CONCLUSÃO	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

O leite possui duas classes de proteínas: a caseína (80%) e as proteínas séricas (20%), no qual a segunda dá origem ao concentrado ou isolado proteico de soro, comumente chamado de “*whey protein*”, termo em inglês usado para referenciar as proteínas do soro (BROWNLOW et al., 1997; CROGUENNEC, 2004; PINHEIRO ALVES et al., 2014; SGARBIERI, 2004; V. MORR; A. FOEGEDING, 1990).

A β -lactoglobulina (β -lg) é o maior peptídeo do soro, cerca de 18,3 kDa, estando presente numa proporção de 45% a 57% da fração proteica. Apresenta o maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, equivalentes aos aminoácidos essenciais como isoleucina, leucina e valina (GARCIA, 2017).

Entender o comportamento dessa proteína é um interesse particular da indústria de laticínios, devido ao potencial que a β -lg tem de afetar o processamento dos produtos advindos do leite; como por exemplo, a agregação da β -lg gerada pelo tratamento térmico, contribui para o acúmulo de resíduos nos trocadores de calor utilizados na produção do leite (CROWTHER et al., 2016; KONTOPIDIS; HOLT, 2004).

Além da temperatura, o valor do pH e o teor de cálcio (Ca) são fatores bem conhecidos que influenciam a desnaturação e agregação da proteína do soro do leite. O Ca está envolvido no crescimento e na deposição dos agregados da β -lg formando pontes covalentes entre monômeros, agregados e minerais na superfície da β -lg. Além de participar do mecanismo de desnaturação diminuindo a temperatura na qual o processo começa. Já o pH atua na estrutura da proteína causando alteração do tamanho dos agregados e influencia diretamente no tempo de desnaturação (PETIT et al., 2011; RENARD et al., 1998; SPIEGEL; HUSS, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo estudar as alterações na estrutura da β -lactoglobulina (β -lg) causadas pelo aquecimento, na presença de íons cálcio (Ca) em meio ácido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 β -Lactoglobulina

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos, são cadeias que interagem e se dobras em formas tridimensionais com funcionalidade específicas. Executam funções essenciais nas células, compõem membranas, enzimas, são parte do sistema imunológico, precursoras de hormônios e formam os músculos (BROERSEN, 2005; GARCIA, 2017).

Diversos trabalhos apontam características sobre o comportamento e as qualidades nutricionais das proteínas solúveis do soro do leite, também conhecidas como “*whey protein*” termo em inglês, cujas principais são: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas e albumina de soro. No leite bovino, 45 a 57% dos peptídeos do soro são representados pela β -lactoglobulina. Quantitativamente, a α -lactoalbumina está em segundo lugar, com 15% a 25% no leite bovino e a principal do leite humano (CROWTHER et al., 2016; GARCIA, 2017; PINHEIRO ALVES et al., 2014; SGARBIERI, 2005).

Na Tabela 1, pode-se observar que quando se compara o leite bovino e o humano, nota-se que a β -lactoglobulina é predominante no leite bovino, como explica Sgarbieri (2004) em seu estudo sobre as propriedades fisiológicas e funcionais das proteínas do soro de leite.

Tabela 1 – Quantidades, em gramas por litro, das principais proteínas de soro lácteo, do leite bovino e do leite humano.

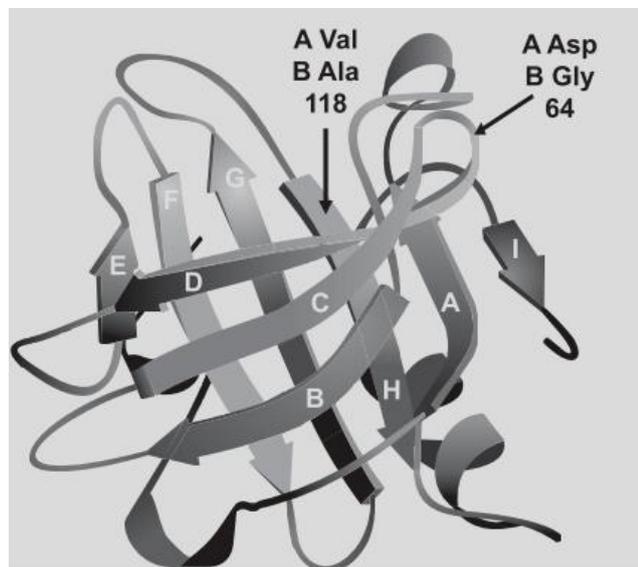
Proteínas do soro (g/L)	Leite bovino	Leite humano
β -lactoglobulina	3,2	desprezível
α -lactalbumina	1,2	2,8
Soralbumina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Desprezível	0,4

Fonte: Adaptado de Sgarbieri (2004).

A β -lactoglobulina (β -lg), é uma proteína globular considerada pequena, possui cada monômero com 162 aminoácidos com uma cisteína livre e duas pontes de dissulfeto. Normalmente, em pH neutro e temperatura ambiente, está na forma de dímeros, forma nativa – onde cada subunidade tem o peso molecular de aproximadamente 18,3 kDa (BROWNLOW et al., 1997b; CROGUENNEC; MOLLÉ; MEHRA, 2004).

Na figura 1 pode-se observar a estrutura terciária da β -lg. Em sua revisão sobre o soro de leite e suas proteínas, Poppi et al (2010) cita Brownlow (1997) onde este explicou de forma extensa a conformação espacial da β -lg. Concluindo que a molécula compreende 9 segmentos em folhas β antiparalelas que se arranjam formando uma espécie de cálice achatado. Devido a isso, pequenas moléculas hidrofóbicas podem se ligar no seu interior, acarretando propriedades funcionais de grande aproveitamento para indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor (POPPI et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura terciária da β -Lactoglobulina.



Fonte: Adaptado de Poppi et al. (2010).

As proteínas de soro apresentam basicamente todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações nutricionais, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

2.2 Desnaturação e Agregação

A desnaturação é um processo no qual há a quebra das estruturas secundária e terciária de uma proteína, que pode ocorrer quando estas forem submetidas ao aquecimento, agitação, radiações ultravioleta e visível, raios X, entre outros. Com essas influências externas, as proteínas sofrem mudanças nas suas propriedades, sendo destruídas principalmente as suas

características fisiológicas. Agentes químicos também podem acarretar alterações estruturais nas proteínas, como ácidos e bases fortes, alguns solventes orgânicos, determinados compostos orgânicos neutros e metais pesados, mesmo que não causem alteração na sequência dos aminoácidos, podem gerar transformações na molécula, tornando-a insolúvel e a dificultando a cristalização desses compostos (CROGUENEC; MOLLÉ; MEHRA, 2004; LEEB et al., 2015; RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2015)

A desnaturação resulta na mudança da conformação, rompem-se ligações que estabilizam essa conformação, causando então um desenrolamento das cadeias peptídicas, onde as proteínas se tornam menos solúveis e quimicamente mais reativas. As proteínas nativas solúveis em saís no seu ponto isoelétrico (pI) normalmente, quando desnaturadas, tornam-se insolúveis (DELAHAIJE et al., 2016; RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2015)

O aquecimento das proteínas de soro pode acarretar a perda da solubilidade devido à desnaturação, principalmente na faixa de pH 4.0 a 6.5. As características de solubilidade dessas proteínas estão profundamente relacionadas às condições térmicas empregadas em sua produção. Condições as quais podem ser controladas para que haja a solubilidade requerida para um produto específico, por exemplo. Dentre as condições ambientais referentes à solubilidade proteica, a principal é a temperatura, no qual o pH, força iônica e velocidade de aquecimento, influenciam em conjunto neste efeito (GOMAA et al., 2016; KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004; RENARD et al., 1998; SPIEGEL; HUSS, 2002)

O pH na faixa de 6,5 e 7,5 proporciona melhor efeito de agregação da β -lg induzida pelo aquecimento. Os agregados formados em pH 6,5 são os mais hidrofóbicos e podem ser utilizados como carreadores bioativos (PEREZ et al., 2014).

Na tabela abaixo (Tabela 2) têm-se as principais características estruturais da β -lg devido a alteração do pH, essas alterações foram classificadas em cinco transições como foi mostrado na revisão de Sgarbieri (2005) demonstrando os estudos de Taulier & Chalikian (2001).

Tabela 2 – Influências causadas por cada faixa de pH estudados por TAULIER & CHALIKIAN (2001).

Faixa de Ph	Influências na β -LG
1,0 – 2,0	Mudanças estruturais, contudo, em grande parte, preserva a sua estrutura secundária;
2,5 – 4,0	Verifica-se a passagem de dímero a monômero;

4,5 – 6,0	Ocorrem pequenas alterações na estrutura terciária, sem transformação significativa na estrutura secundária;
6,5 – 8,5	Acontece a transição de Tanford, acompanhada por alterações localizadas das estruturas secundária e terciária, sem mudança na conformação global da proteína;
9,0 – 12,5	Verifica-se a desnaturação alcalina, além de resultar a ruptura de qualquer estrutura dimérica nativa, transformando-se em monômeros desdobrados.

Fonte: Autor (2019) adaptado de Sgarbieri (2005).

A β -lg é uma proteína termossensível, portanto, diversos efeitos são produzidos por ação da temperatura, dentre eles a exposição de regiões da molécula apropriada para diferentes tipos de interação com outros componentes, em sistemas complexos. Modificações reversíveis começam ao redor de 50 °C e irreversíveis acima de 65-70 °C. Em pH neutro, o aquecimento origina em primeiro lugar a monomerização da proteína nativa, seguida de uma perda da conformação globular compacta (GALANI; APENTEN, 1999; JURADO-ALAMEDA et al., 2014; PAVLOV; HSU, 2018; SGARBIERI, 2005)

Durante tratamento térmico da β -lg, em solução, os seguintes fenômenos ocorrem:

Dímero ↔ Monômeros ↔ Flexibilização da estrutura terciária → Agregação

A formação de agregados ocorre em dois estágios, primeiramente via criação de pequenas partículas durante a desnaturação da proteína nativa, então, no segundo estágio acontece a agregação ou aglomeração dessas partículas através de colisões dentro do campo de fluxo para formar partículas maiores. No leite, interações entre caseína, β -lg e Ca formam agregados, enquanto no “*Whey Protein Concentrate – WPC*” – concentrado proteico de soro de leite – essa formação se dá unicamente através da polimerização da β -lg sozinha, uma vez que não há caseína presente e Ca está em pouca quantidade quando comparado ao leite (SIMMONS; JAYARAMAN; FRYER, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento e Preparo da amostra

Os experimentos em sua maioria foram realizados no “*Institut National de la Recherche Agronomique*” Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica – INRA, Villeneuve d’Ascq, França. Buscou-se testar alguns fatores para observar o comportamento da estrutura da β -Lg utilizando então a combinação entre: aquecimento, adição/ausência de cálcio e correção do pH. Foram feitas análises granulométricas e de ressonância nuclear magnética (RMN).

A amostra de β -Lactoglobulina utilizada foi a Prolacta 95, pó fornecido pela Lactalis Ingredients (F-35230 Bourgbarré, France). Foram preparadas as soluções na concentração 50 g/L de β -Lg, utilizou-se diferentes proporções de cálcio nas análises, com exceção dos experimentos de RMN aos quais se fixou a proporção Ca/ β -Lg. O pH foi ajustado utilizando solução de HCl [1 M]. As amostras foram aquecidas em banho-maria utilizando as temperaturas de estudo 65, 70 e 90 °C e foi observado o comportamento da solução com o tempo de aquecimento e os fatores: pH e cálcio – cinética da desnaturação e agregação.

3.2 Granulometria por Difração à Laser (DL)

Nos experimentos de granulometria teve-se como objetivo verificar as melhores condições: pH, Ca, tempo e temperatura para realização posteriores análises de RMN. O equipamento utilizado foi o *Mastersize 2000 (Malvern Instruments Ltd, England)*.

Como pode ser visto na tabela abaixo (tabela 3), foram testadas em cada ensaio, os seguintes pHs corrigidos (*): 2,0; 3,5; 4,0 e 5,0. Para cada um deles, preparou-se amostras com diferentes proporções de cálcio/ β -Lg, que foram: 0; 3:1 e 6:1. Além disso, fixou-se os tempos de medição no equipamento (0,5; 1,5 e 4,5 horas). O aquecimento das amostras foi feito em banho-maria, como descrito anteriormente, à temperatura de 65 °C.

Tabela 3 – Condições experimentais esquemáticas das amostras para leitura na granulometria a laser.

	pH corrigido (*)			
Tempo (h)	<u>0,5</u>	<u>1,5</u>	<u>4,5</u>	
	<u>0</u>	<u>1a</u>	<u>2a</u>	<u>3a</u>
Ca/β-Lg	<u>3:1</u>	<u>1b</u>	<u>2b</u>	<u>3b</u>
	<u>6:1</u>	<u>1c</u>	<u>2c</u>	<u>3c</u>

Onde: letra representa a condição da amostra em proporção cálcio/ β -Lg (a, b e c); Número: indica a sequência de leituras da mesma amostra de acordo com o tempo correspondente (1, 2 e 3).

3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Esta análise foi conduzida para estudar a conformação da proteína por meio dos espectros resultantes de cada leitura. Os equipamentos utilizados foram o espectrômetro *Bruker AVANCE III* e o *AVANCE NEO 900 US²* (¹H 900 MHz), para o RMN sólido e líquido, respectivamente.

As amostras foram diluídas em Deutério (D₂O), manteve-se a concentração de β-Lg, 50 g/L, a correção do pH foi feita com solução de HCl a 1 Molar e o aquecimento prévio, quando necessário, realizado em banho-maria por 4 horas. As amostras foram acondicionadas a 5 °C até o momento da análise de RMN.

As tabelas 4 e 5 mostram as condições utilizadas no preparo das amostras para análise de ressonância nuclear magnética, referentes ao aquecimento (quando aplicado), correção do pH e proporção de Cálcio e β-Lg.

Tabela 4 – Condições experimentais das amostras do RMN sólido.

Amostra	Aquecimento prévio (°C)	pH esperado	Ca/β-Lg
1	90	3,5	6:1
2	70	3,5	6:1

Fonte: Autora (2019)

Tabela 5 – Condições experimentais das amostras do RMN líquido.

Amostra	Aquecimento prévio (°C)	pH esperado	Ca/β-Lg
3	-	3,5	6:1
4	-	4,5	6:1

Fonte: Autora (2019)

3.4 Análise dos dados

Granulometria por difração a laser (DL)

Os dados obtidos na DL referem-se aos tamanhos dos agregados, portanto, foram organizados em gráficos: tamanho de partícula x % de volume das partículas analisadas. Utilizou-se o software Excel para a organização dos resultados e construção dos gráficos.

Ressonância Nuclear Magnética (RMN)

Os dados resultantes das leituras nos espectrômetros, RMN sólido e líquido, foram analisados no software TopSpin (Bruker), onde observou-se as características dos espectros e posteriormente plotados no Dmfit 2011 para exposição em forma de figuras. Buscou-se observar as mudanças ocorridas nos espectros e quais as influências das propriedades da solução causaram essas alterações – pH, aquecimento, íons Cálcio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

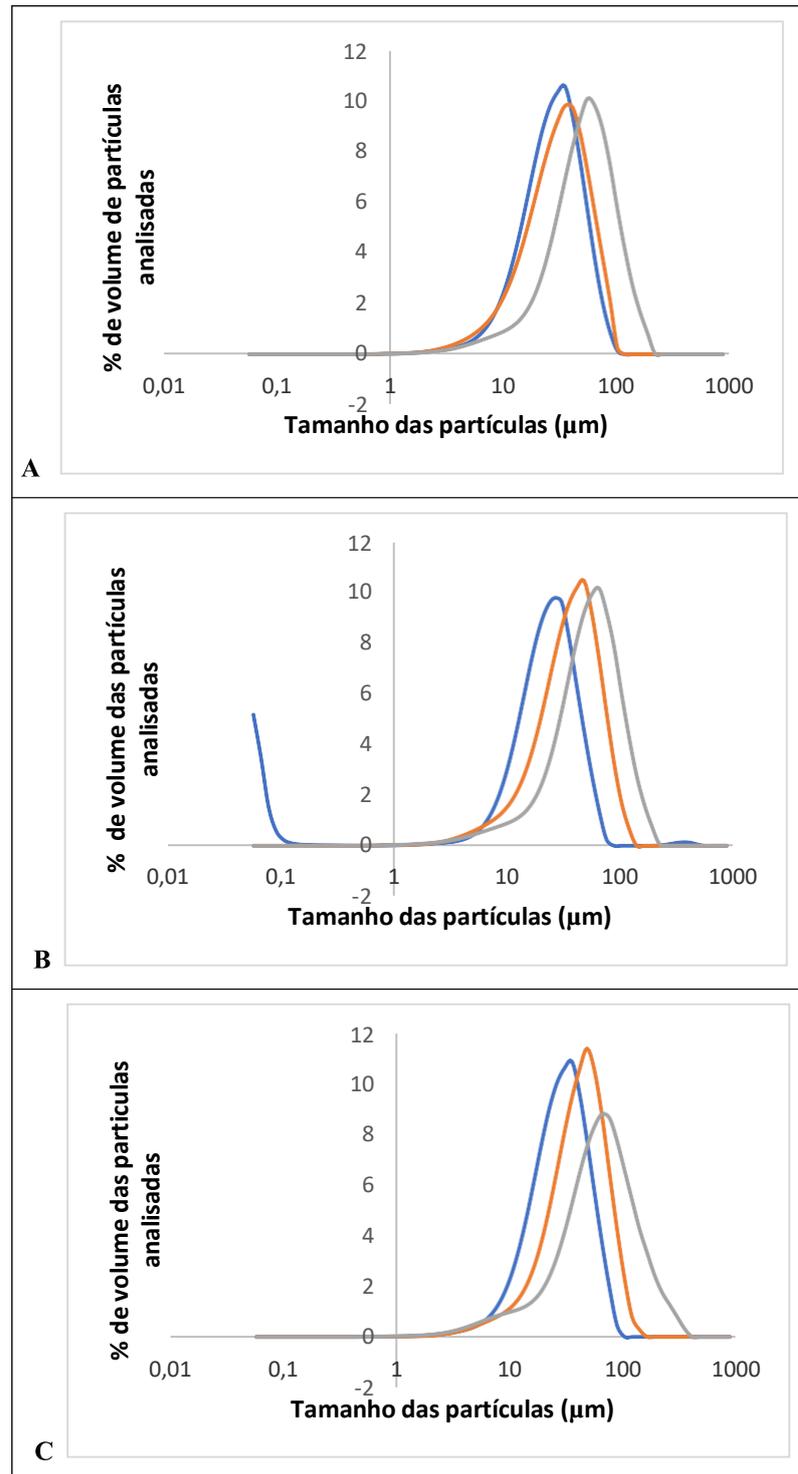
4.1 Granulometria por Difração à Laser (DL)

As amostras de pH 2, não obtiveram boas obscurações no equipamento, abaixo de 5%, portanto, os dados referentes as leituras dessas amostras não podem ser considerados para a construção dos gráficos. Fato que pode ser explicado devido ao pH ser muito baixo comparado ao pH original da solução que é neutro (pH $\pm 6,7$). Renard et al. (1998) destaca que a temperatura de desnaturação aumenta com a diminuição do pH e é significativamente maior em pH 2,0, então, como a temperatura utilizada foi 65 °C, esta não foi suficiente para proporcionar a desnaturação e conseqüentemente agregação detectável pelo equipamento (RENARD et al., 1998).

A figura 2 apresenta os experimentos conduzidos no pH 3,5, onde inicialmente o comportamento da amostra sem Ca se assemelhou ao da amostra de proporção média de Ca (Figura 2A). Após 1,5 horas de aquecimento, houve a incidência de frações inferiores a 0,1 μm somente para a amostra que não continha Ca, para tal entendimento necessita-se de estudo complementar em equipamento mais sensível, como estudo de RMN, por exemplo (Figura 2B).

Ao término do aquecimento, as amostras se comportaram de maneira que as frações de maior tamanho estavam presentes na amostra com maior proporção de Ca, apesar de no geral todas as amostras terem se comportado de maneira semelhante. Aparentemente, neste pH a presença de Ca não é um fator de grande influência na formação de agregados. Embora a agregação ocorra principalmente por meio de reações de troca tiol/dissulfeto em uma faixa de pH neutro ou alcalino, os agregados ligados de forma não covalente são predominantemente formados em um ambiente ácido (SPIEGEL; HUSS, 2002)

Figura 2 – Experimentos (DL) realizados com pH 3,5.

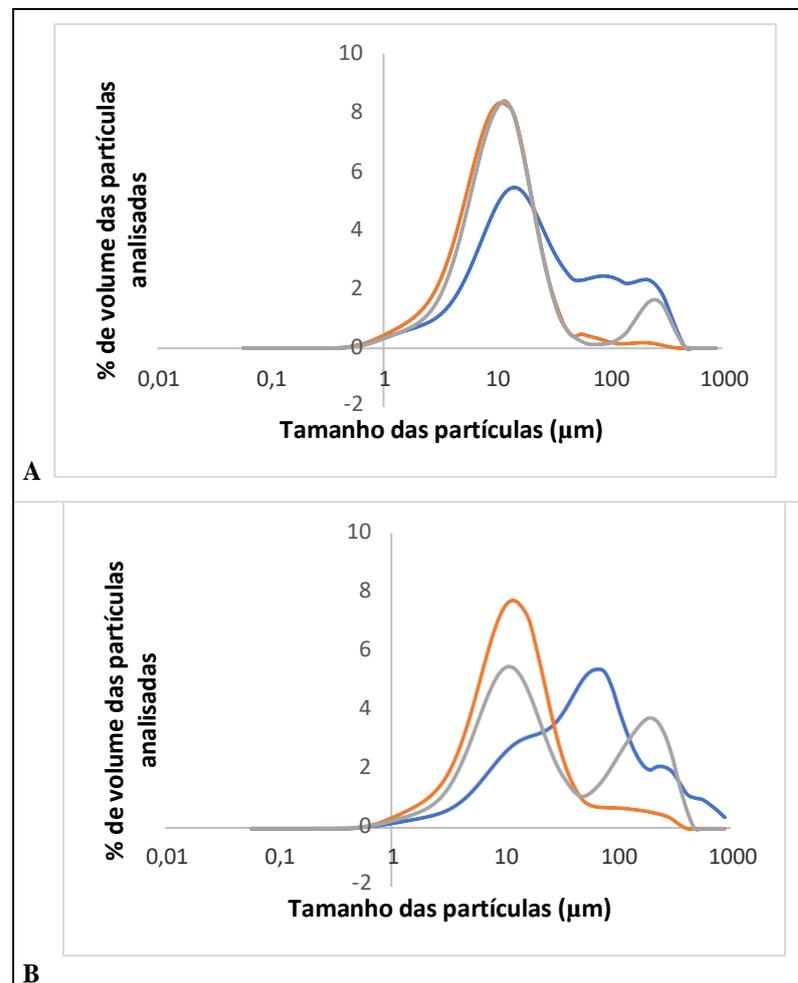


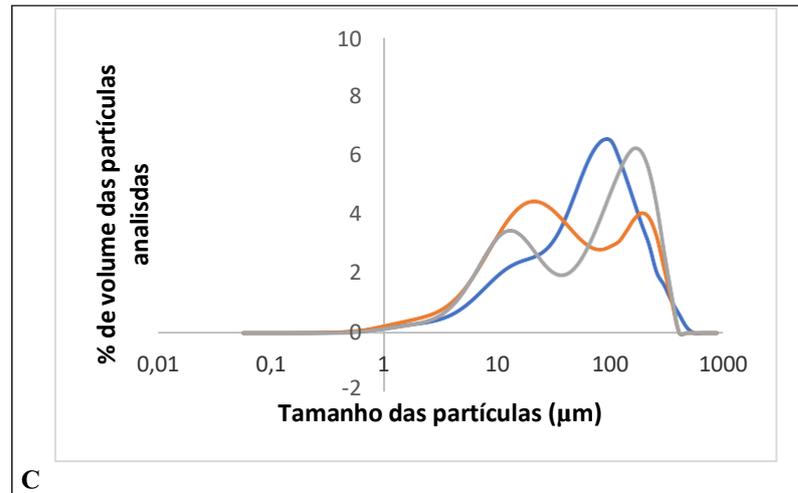
Onde as letras A, B e C representam respectivamente, os tempos 0,5h, 1,5h e 4,5h. As cores azul, laranja e cinza, representam as proporções de Ca/β-Lg, 0; 3:1 e 6:1 respectivamente.

Quando analisado o efeito do aquecimento da β -Lg no pH 4,0, observou-se que inicialmente, a ausência do Ca resultou maiores partículas (Figura 3A). Para a amostra de Ca/ β -Lg 3:1, o aquecimento de 4,5 horas gerou o crescimento das partículas dessa solução, onde de início estavam em sua maioria próximas a 10 μm e ao fim chegaram até 350 μm . Contudo a amostra sem adição de Ca e a amostra Ca/ β -Lg 6:1, obtiveram frações superiores no término do aquecimento (Figura 3C).

Segundo Spiegel (2002), nos seus estudos sobre a β -Lg, a diminuição do pH na faixa de 6,7 a aproximadamente 4,5 resulta em um considerável decréscimo da taxa de desnaturação. Devido a isso, têm-se a obtenção de partículas pequenas na região de pH ácido, que vão crescendo com passar do tempo, quando a taxa de desnaturação aumenta. Além disso, em temperaturas abaixo de 85 $^{\circ}\text{C}$, o desdobramento da proteína ocorre lentamente, o que explica o fato de demandar grande tempo para a completa desnaturação no uso de baixas temperaturas (SPIEGEL; HUSS, 2002).

Figura 3 – Experimentos (DL) realizados com pH 4,0.

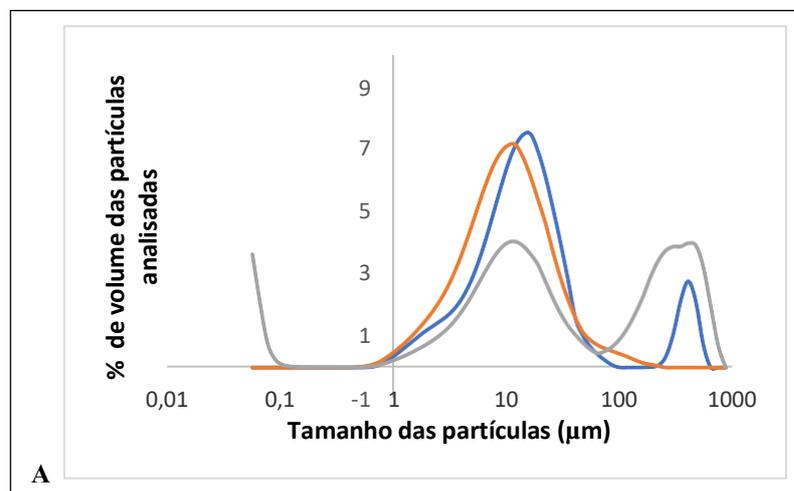


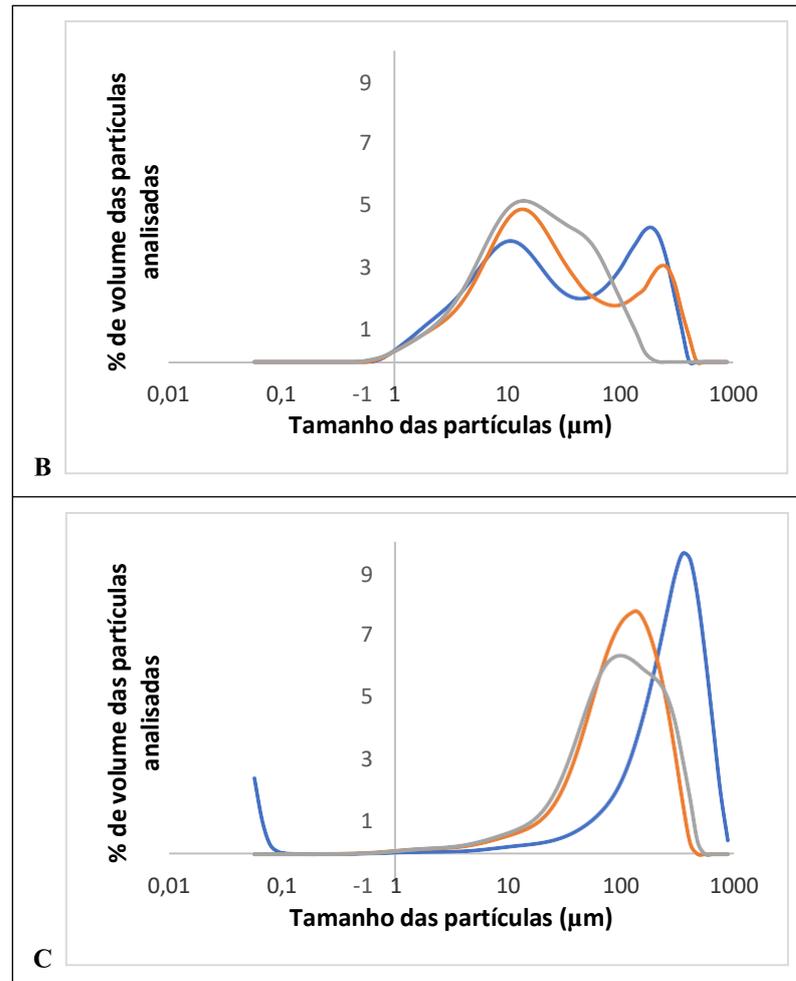


Onde as letras A, B e C representam respectivamente, os tempos 0,5h, 1,5h e 4,5h. As cores azul, laranja e cinza, representam as proporções de Ca/β-Lg, 0; 3:1 e 6:1 respectivamente.

Já no pH 5,0 o comportamento do tamanho da partícula nas primeiras 0,5 horas da amostra com maior quantidade de Ca indicou a incidência de partículas em torno de 0,1 µm, 12 µm e 410 µm, um comportamento desordenado que pode ser devido ao fato de estar próximo ao ponto isoelétrico (pI) da solução de β-Lg (Figura 4A). Em seu pI, a β-lg exibe uma alta estabilidade térmica, como foi discutido por Leeb (2015), portanto, um tempo de aquecimento mais longo é necessário para atingir a desnaturação completa. Além disso, por ser um pH menos ácido, percebe-se ao fim da reação, a incidência de partículas maiores em comparação aos outros pHs estudados neste trabalho

Figura 4 – Experimentos (DL) realizados com pH 5,0.





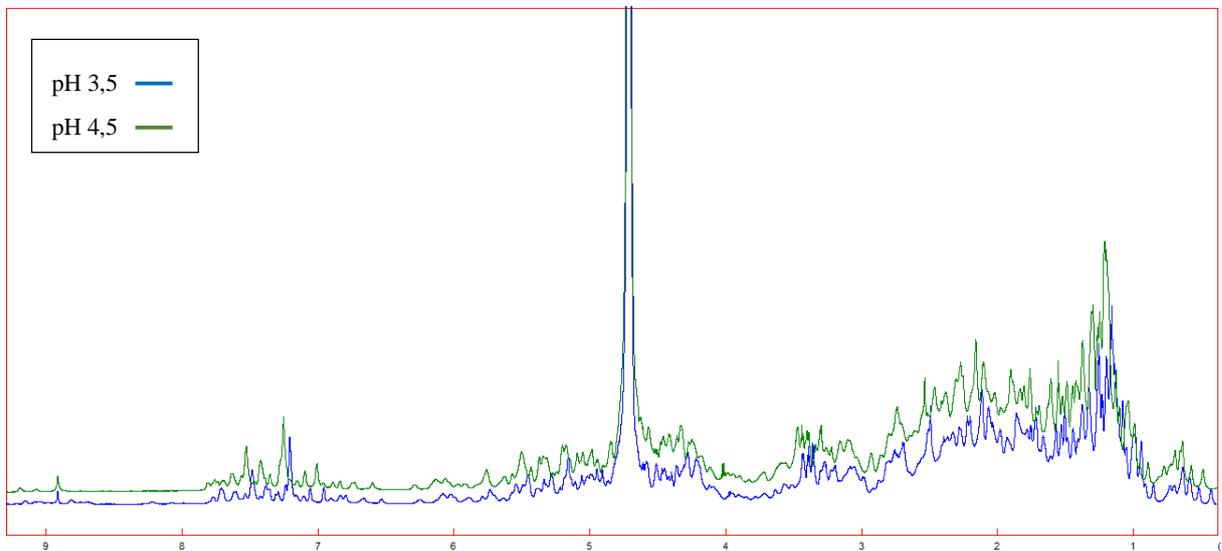
Onde as letras A, B e C representam respectivamente, os tempos 0,5h, 1,5h e 4,5h. As cores azul, laranja e cinza, representam as proporções de Ca/β-Lg, 0; 3:1 e 6:1 respectivamente.

4.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise dos espectros foi feita de modo a comparar a ação do pH (Figura 5) e da temperatura (Figura 6) na proteína, já que todas amostras continham a mesma quantidade de Ca, esse não foi um fator levado a comparação. Espera-se que a agregação aumente a largura das linhas dos picos, o contrário ocorre com a desnaturação (D. S. PEIXOTO et al., 2018).

Na figura 5, têm-se os espectros obtidos a partir do RMN líquido, ao qual estudou-se diferentes pHs. Observou-se pouca desnaturação e conseqüentemente agregação, pois a estrutura de ambos espectros se encontra semelhante à estrutura nativa da proteína – picos finos e de alta intensidade em grande parte do espectro – com a ressalva de que em pH 4,5 alguns picos se diferem, localizados em: ~8 ppm, 5,5-5,0 ppm e 1-0 ppm; onde estes se fundiram e/ou encontram-se em maior largura.

Figura 5 – Espectros de RMN líquido: diferentes pHs.



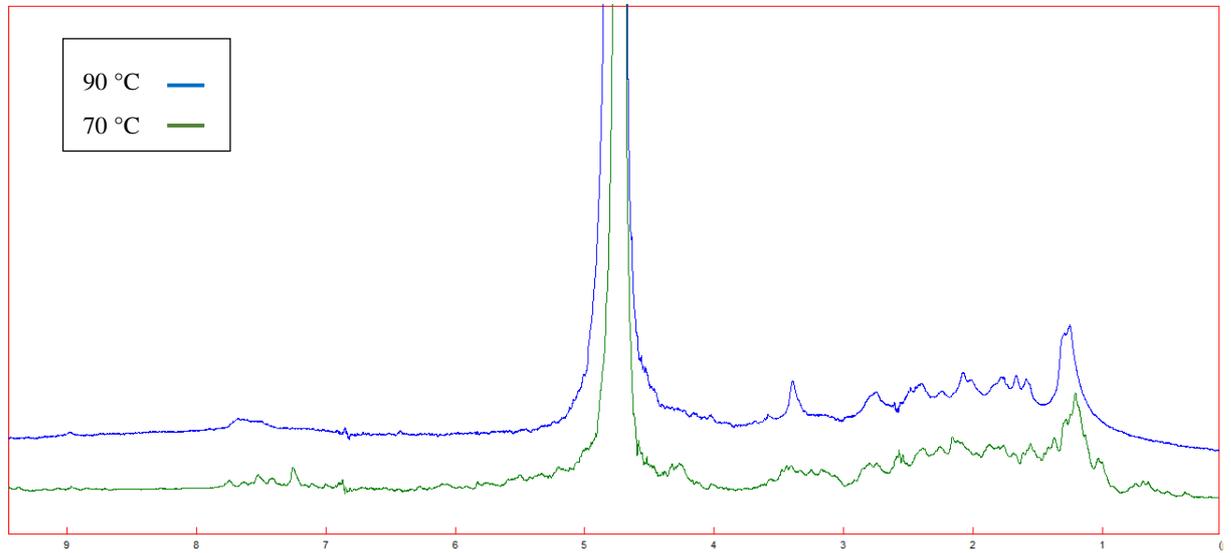
Fonte: Autora (2019)

Na figura 6, têm-se os espectros obtidos das amostras com pH 3,5 e diferentes temperaturas de pré-aquecimento, 90 e 70 °C. Observando os espectros, nota-se que a amostra pré-aquecida a 90 °C resultou em um espectro de poucos picos e baixas intensidades, caracterizando uma alta desnaturação, que pôde ser percebida visualmente pois sua textura ficou tipo gel. A 70 °C, percebe-se picos mais definidos, estreitos e fundidos, indicando que houve uma menor desnaturação, quando comparado a amostra de maior temperatura. Em ambas amostras pode-se dizer que houve agregação.

Essa diferença de 20 °C entre as temperaturas estudadas demonstrou comportamentos diferentes nos espectros analisados. Tal fato pode ter ocorrido devido a combinação temperatura-tempo, uma vez que se utilizou o mesmo tempo de aquecimento e a amostra com maior temperatura obteve melhor desempenho no processo de desnaturação, pois quanto mais alta temperatura, menor o tempo da reação.

De acordo com os estudos de Akkerman (2015) para todas as proteínas do soro, um aumento significativo no grau de desnaturação é observado ao aumentar o tempo de retenção para todas as temperaturas utilizadas em seus experimentos. A interação entre temperatura e tempo de retenção também é significativa. O aumento da temperatura em um tempo de espera fixo impulsiona o acréscimo desnaturação, comparado com o aumento do tempo de espera a uma temperatura fixa (AKKERMAN et al., 2015).

Figura 6 – Espectros de RMN sólido: diferentes temperaturas de pré-aquecimento.



Fonte: Autora (2019)

5 CONCLUSÃO

Com base nas condições estabelecidas no presente estudo foi possível concluir que a alteração do pH atrelado à presença de íons Ca e o aquecimento influenciam na desnaturação e agregação da β -lactoglobulina. A alteração do pH e aquecimento transforma as partículas em solução, estudadas então por seus tamanhos em granulometria por difração a laser (DL). Já na investigação via ressonância nuclear magnética (RMN) conclui-se que em pHs baixos a agregação é menor devido as temperaturas utilizadas, portanto o fenômeno que mais destaca-se é a desnaturação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKERMAN, M. 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, 2015.

BROERSEN, K. Fundamentals of unfolding, refolding and aggregation of food proteins. 2005.

BROWNLOW, S. et al. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - Still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 481–495, 1997a.

BROWNLOW, S. et al. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. **Structure**, v. 5, p. 481–495, 1997b.

CROGUENNEC, T.; MOLLÉ, D.; MEHRA, R. A. J. Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β -lactoglobulin monomers. 2004.

CROWTHER, J. M.; JAMESON, G. B.; HODGKINSON, A. J. AND DOBSON, R. C. J. Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin. **Intech**, v. i, p. 13, 2016.

D. S. PEIXOTO, P. et al. Formation of β -Lactoglobulin Aggregates from Quite, Unfolded Conformations upon Heat Activation. **Langmuir**, v. 35, n. 2, p. 446–452, 19 dez. 2018.

DELAHAIJE, R. J. B. M. et al. Controlling the ratio between native-like, non-native-like, and aggregated β -lactoglobulin after heat treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 21, 2016.

GALANI, D.; APENTEN, R. K. O. Heat-induced denaturation and aggregation of. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 121, n. August, p. 467–476, 1999.

GARCIA, H. A. Proteínas Do Soro Do Leite. **Food Ingredients Brasil**, v. 41, n. 1, p. 26–49, 2017.

GOMAA, A. I. et al. Enhanced Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin Structure Using Microwave Treatment: a Multi-Spectroscopic Study. **Food Biophysics**, v. 11, n. 4, p. 370–379, 2016.

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.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 785–796,

2004.

LEEB, E. et al. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. **Food Chemistry**, v. 187, p. 545–554, 2015.

PAVLOV, G.; HSU, J. T. The pH, temperature, and protein structure effect on β -lactoglobulin A and B separation in anion-exchange chromatography. **AIChE Journal**, v. 64, n. 6, p. 1928–1937, 2018.

PEREZ, A. A. et al. β -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. **Food Chemistry**, v. 158, p. 66–72, 2014.

PETIT, J. et al. Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: Implications in unfolding and aggregation mechanisms. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5794–5810, 2011.

PINHEIRO ALVES, M. et al. Soro De Leite: Tecnologias Para O Processamento De Coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212, 2014.

POPPI, F. A. et al. Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.

RAHAMAN, T.; VASILJEVIC, T.; RAMCHANDRAN, L. Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH—Effects on antigenicity. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4255–4265, 2015.

RENARD, D. et al. Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, n. 1, p. 41–49, 1998.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. Physiological-functional properties of milk whey proteins. **Rev. Nutr, Campinas**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão : Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite Review : Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins AUTHORS. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43–56, 2005.

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.

SPIEGEL, T.; HUSS, M. Whey protein aggregation under shear conditions - Effects of pH-value and removal of calcium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 559–568, 2002.

V. MORR, C.; A. FOEGEDING, E. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technol.**, v. 44, 1990.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. Characterization of pH-induced transitions of β -LG: ultrasonic, densitometric, and spectroscopy studies. **J. Mol. Biol.**, 14:873-889, 2001.