

Carla Eduarda Ladeira Silva

**TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO ENTRE BETACAROTENO E PROTEÍNAS DO
LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
Do Programa de Pós-Graduação em Ciência
E Tecnologia de Alimentos, para obtenção do
Título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Clarissa dos Santos
Pires

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586t
2015
Silva, Carla Eduarda Ladeira, 1991-
Termodinâmica de interação entre betacaroteno e
proteínas do leite / Carla Eduarda Ladeira Silva. - Viçosa,
MG, 2015.
xiii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Ana Clarissa dos Santos Pires.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.64-78.

1. Corantes em alimentos. 2. Caroteno. 3. Albumina.
4. Beta-caseína. 5. Leite - Proteínas. 6. Termodinâmica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

CARLA EDUARDA LADEIRA SILVA

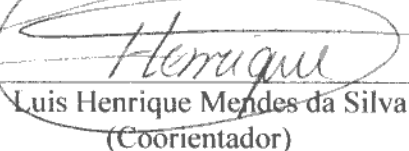
**TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO ENTRE BETACAROTENO E
PROTEÍNAS DO LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

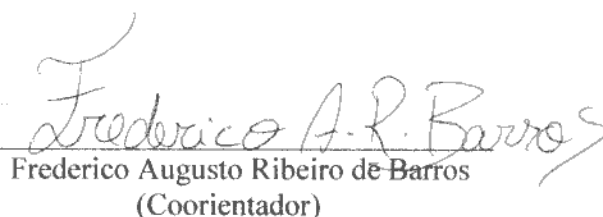
APROVADA: 16 de novembro de 2015.



Eber Antonio Alves Medeiros



Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)



Frederico Augusto Ribeiro de Barros
(Coorientador)



Ana Clarissa dos Santos Pires
(Orientadora)

A Deus por guiar os meus passos, renovar as minhas forças a
cada dia, tornar todas as coisas possíveis, me
dar sabedoria e ser o meu fôlego, o meu escudo, o meu motivo.

DEDICO

“Nos alicerces das grandes descobertas existem grandes falhas, nos alicerces das grandes falhas existem grandes sonhos de superação. Realizar os sonhos implica riscos, riscos implicam escolhas, escolhas implicam erros.

Quem sonha não encontra estradas sem obstáculos, lucidez sem perturbações, alegrias sem aflição. Mas quem sonha voa mais alto, caminha mais longe. Toda pessoa, da infância ao último estágio da vida, precisa sonhar”

(Augusto Cury)

“O teu amor é melhor do que a vida!

Por isso os meus lábios te exaltarão”

Salmos 63:3

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo seu amor incondicional e misericórdia. Obrigada Senhor, por tornar todas as coisas possíveis. Sei que os seus planos são maiores que os nossos e que tudo acontece segundo a sua vontade e no seu tempo, mas até hoje o Senhor tem realizado grandes obras em minha vida e tudo quanto desejei de coração, o Senhor em sua infinita bondade me proporcionou. E nas dificuldades sempre me fez forte.

Agradeço a todos os meus familiares pelo carinho e apoio, em especial à minha mãe, pelo seu amor, amizade e dedicação; ao meu pai Luiz e ao meu “padrasto-pai” Juscelino por todo carinho e apoio sempre; a minha avó Margarida por suas orações, pelo amor e por me acolher em todos os momentos; a minha irmã Flávia pelo carinho, amizade, conversas e companheirismo; ao Josimar pelo amor, cuidado, compreensão e apoio; a equipe de laboratório, Jaqueline, Carini, Natália, Silvânia, Eliara, Ana Beatriz e Ana Flávia pela amizade, carinho, apoio em todos os momentos e por terem tornado os meus dias de trabalho ainda mais prazerosos.

A minha orientadora professora Ana Clarissa dos Santos Pires pela dedicação, apoio, e conhecimentos compartilhados ao longo de todo o tempo de trabalho que pude desenvolver sob sua orientação, desde o meu ingresso no laboratório.

Aos meus coorientadores professor Luis Henrique Mendes da Silva pela dedicação e contribuição não apenas no desenvolvimento deste trabalho, mas também como professor em minha formação; e professor Frederico Augusto Ribeiro de Barros pela disponibilidade e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular pela contribuição no desenvolvimento de algumas análises.

À Universidade Federal de Viçosa, instituição em que me formei e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, a FAPEMIG e a CNPq pelo financiamento do projeto.

BIOGRAFIA

CARLA EDUARDA LADEIRA SILVA, filha de Maria Mariano Ladeira e Luiz Cláudio Silva, nasceu em 18 de abril de 1991, na cidade de Viçosa – MG.

Iniciou seus estudos na Escola Estadual Professor Augusto Saes em 1998, na cidade de Piracicaba – SP. Em 2002 transferiu-se para a Escola Estadual Affonso José Fioravanti, na mesma cidade. No ano de 2006 ingressou na Escola Técnica Coronel Fernando Febeliano da Costa, onde concluiu o ensino médio em 2008, também na cidade de Piracicaba – SP.

Em 2009 iniciou sua graduação no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, onde graduou-se em Bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios em agosto de 2013. Neste mesmo ano iniciou os seus estudos de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na mesma universidade, defendendo sua dissertação em julho de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 β -caseína	4
3.2 Albumina Sérica Bovina	8
3.3 Corantes naturais	11
3.4 Betacaroteno	13
3.5 Interações intermoleculares entre ligantes e proteínas	14
3.6 Técnicas	15
3.6.1 Espectroscopia de Fluorescência	15
3.6.2 Espectrofotometria de UV-vis	21
3.6.2.1 Fotoquímica e Fotofísica de Carotenoides	23
3.6.2.2 Estabilidade do Betacaroteno	27
3.6.3 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material	37
4.2 Métodos	37
4.2.2 Determinação da Concentração Micelar Crítica da β -caseína	37
4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência	37
4.2.3 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura	40
4.2.4 Estabilidade Química do Betacaroteno à Luz	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Espectroscopia de Fluorescência para Albumina Sérica Bovina	42
5.1 Espectroscopia de Fluorescência para β -caseína	50
5.2 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura	55
5.3 Estabilidade Química do Betacaroteno à Luz	56
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da auto-associação de monômeros de β -CN formando micelas.	5
Figura 2. (a) Molécula de pireno e (b) espectro de fluorescência do pireno ($\lambda_{exc} = 338$ nm) na presença de concentrações crescentes de β -CN (mg/mL) em tampão fosfato, pH 7,0, força iônica 0,1M, 25°C, concentração de pireno 1,2 μ M.	6
Figura 3. Representação da BSA indicando os sítios de interações hidrofóbicas (Sudlow I e Sudlow II) e as estruturas secundárias da proteína representadas como fitas com os sub-domínios codificados por cores da seguinte forma: IA, azul; IB, azul claro; IIA, verde; IIB, amarelo; IIIA, laranja; IIIB, vermelho.	9
Figura 4. Estrutura química do Betacaroteno.	14
Figura 5. Espectro de emissão de fluorescência.	17
Figura 6. Diagrama de níveis de energia usado para descrever os foto processos que os carotenoides e polienos podem sofrer, envolvendo seus estados singlete e triplete; ab: absorção; ic: conversão interna; fl: fluorescência; isc: cruzamento intersistema.	25
Figura 7. Termograma obtido em experimentos de nano DSC mostrando mudanças no calor específico em função da temperatura.	35
Figura 8. Log (F0-F/F) versus [Q].	39
Figura 9. Ln K versus 1/T.....	39
Figura 10. Amostras de betacaroteno na câmara de luz	41
Figura 11. (A) Espectros de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0, e (B) espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA induzida por concentrações crescentes de betacaroteno em pH 7,0..	42
Figura 12. (A) Espectros de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 5,0, e (B) espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA induzida por concentrações crescentes de betacaroteno em pH 5,0..	43
Figura 13. Representação da estequiometria de formação do complexo betacaroteno-BSA.	45
Figura 14. (A) Espectro de emissão de fluorescência da BSA desnaturada na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0 e (B) espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA desnaturada induzida por concentrações crescentes de betacaroteno em pH 7,0	47

Figura 15. Representação da estequiometria de formação do complexo betacaroteno-BSA desnaturada .	49
Figura 16. I_3/I_1 versus concentração de beta-caseína.	50
Figura 17. (A) Espectros de emissão de fluorescência na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0 e (B) espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da beta-caseína induzida por concentrações crescentes de betacaroteno em pH 7,0.	53
Figura 18. (A) Termograma da BSA na ausência de betacaroteno; e (B) na presença de 7×10^{-7} mol/L de betacaroteno.	55
Figura 19. Gráficos $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz (horas) do betacaroteno na ausência de proteínas.	56
Figura 20. Gráficos $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz do betacaroteno na presença de diferentes concentrações de beta-caseína.	57
Figura 21. Gráficos $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz do betacaroteno na presença de diferentes concentrações de BSA.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de degradação à luz do licopeno e betacaroteno em sistemas modelos e goiaba liofilizada.	30
Tabela 2. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação para a interação betacaroteno-BSA, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	44
Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e BSA, em pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	46
Tabela 4. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação para a interação betacaroteno-BSA desnaturada, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	48
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e BSA desnaturada, em pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	49
Tabela 6. Medidas de diâmetro de β -CN em diferentes concentrações, pH 7,0, força iônica 0,1 M, 25°C	52
Tabela 7. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação para a interação betacaroteno- β -CN, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	54
Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e β -CN, em pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.	54
Tabela 9. Valores da constante de degradação K_d e tempo de meia-vida de soluções de betacaroteno na ausência e na presença de diferentes concentrações de β -CN ao longo de 3,5 horas de exposição a luz.	58
Tabela 10. Valores da constante de degradação K_d e tempo de meia-vida de soluções de betacaroteno na ausência e na presença de diferentes concentrações de BSA ao longo de 3,5 horas de exposição a luz.	59

RESUMO

SILVA, Carla Eduarda Ladeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2015. **Termodinâmica de interação entre betacaroteno e albumina sérica bovina e beta-caseína.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Frederico Augusto Riberio de Barros.

A cor é um atributo sensorial que influencia de forma decisiva o julgamento dos consumidores quanto a determinado tipo de alimento. Por esta razão, as indústrias alimentícias possuem uma frequente preocupação com a adição de corantes aos seus produtos, de forma a torna-los mais atrativos aos consumidores. Duas classes distintas de corantes estão disponíveis para uso em alimentos, os sintéticos e os naturais. Os corantes sintéticos são mais frequentemente utilizados em virtude de algumas vantagens apresentadas por estes em relação aos naturais, como maior estabilidade frente a diferentes fatores e maior solubilidade em soluções aquosas. Entretanto, estudos toxicológicos têm apontado estes corantes como potenciais causadores de problemas à saúde dos consumidores. Estes estudos, bem como a crescente preocupação dos consumidores com aspectos relacionados à saúde e também medidas legislativas têm motivado a substituição dos corantes sintéticos por aqueles obtidos a partir de fontes naturais, os quais apresentam menores evidências de danos à saúde dos consumidores. Por outro lado, a utilização de corantes naturais em formulações alimentícias ainda é bastante limitada devido principalmente à menor estabilidade e solubilidade destes na matriz alimentícia, por serem, em geral, compostos lipofílicos. As proteínas do leite possuem um importante papel no transporte de moléculas hidrofóbicas, tais como corantes. Diante disso, objetivou-se estudar a interação a nível molecular entre o betacaroteno, um corante natural, e as proteínas lácteas albumina sérica bovina (em suas conformações nativa e desnaturada) e beta-caseína, através de técnicas sensíveis utilizadas em estudos de interações. Os resultados obtidos através da técnica espectroscopia de fluorescência mostraram que em pH 7,0 concentrações crescentes de betacaroteno reduziram a intensidade de fluorescência de ambas as proteínas, beta-caseína e albumina sérica bovina, e que o mecanismo de extinção de fluorescência foi principalmente estático. As constantes de interação associadas a formação do complexo entre o betacaroteno e as proteínas lácteas variaram com as temperaturas estudadas entre $8,43 \times 10^4$ e $4,20 \times 10^7$ L mol⁻¹ para BSA nativa,

$1,11 \times 10^2$ e $5,05 \times 10^2$ L mol⁻¹ para BSA desnaturada e entre $3,34 \times 10^1$ e $2,457 \times 10^3$ L mol⁻¹ para beta-caseína. A estequiometria de formação do complexo (betacaroteno:proteína) também variou entre as proteínas, sendo 1:1 para BSA nativa, 1:3 para BSA desnaturada e 1:2 para beta-caseína. Os valores da variação da energia livre de Gibbs padrão de formação do complexo variaram com a temperatura e foram negativos para todos os sistemas estudados. Entretanto, os valores deste parâmetro obtidos para a beta-caseína foram inferiores em relação aqueles obtidos para a BSA. A formação do complexo em todos os casos foi dirigida pela entropia do sistema. Resultados de fluorescência obtidos no pH 5,0 para a albumina sérica bovina mostraram que a interação entre esta proteína e o betacaroteno foi praticamente constante, provavelmente por questões relacionadas a conformação e distribuição de grupos carregados da proteína neste valor de pH. A estabilidade à luz do corante foi avaliada na presença e na ausência de albumina sérica bovina e beta-caseína e os resultados mostraram que ambas as proteínas protegeram o corante da degradação ocasionada pela luz. Os resultados gerais obtidos apontaram para a utilização eficiente das proteínas lácteas no transporte e estabilização do betacaroteno em sistemas alimentícios.

ABSTRACT

SILVA, Carla Eduarda Ladeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2015. **Thermodynamics of interaction between beta-carotene and bovine serum albumin and beta-casein.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Augusto Frederico de Barros Riberio.

The color is a sensory attribute that influence decisively the judgment of consumers in certain type of food. For this reason, the food industries have a common concern with the addition of coloring to their products in order to make them more attractive to consumers. Two distinct classes of dyes are available for use in foods, synthetic and natural. Synthetic dyes are most often used due to certain advantages presented by these in relation to natural, such as increased stability due to different factors, solubility in aqueous solutions, providing a wide variety of colors and lower production costs. However, toxicological studies have pointed to these dyes as potential troublemakers to the health of consumers, ranging from allergies to cancer development. These studies as well as the growing consumer concern with health-related characteristics and also legislative measures have motivated the replacement of synthetic dyes by those obtained from natural sources, which, although also present drawbacks, have been used for many years with minor evidence of harm to the health of consumers. The use of natural colorants in food formulations is very limited due mainly to decreased stability and solubility thereof in the food matrix, to be treat in general, of lipophilic compounds. Milk proteins have an important role in the transport of hydrophobic molecules such as dyes. The research objective was to study the interaction at the molecular level between beta-carotene, a natural dye, bovine serum albumin and beta-casein, through sensitive techniques used in interaction studies. The results obtained by fluorescence spectroscopy technique showed that at pH 7.0 increasing concentrations of beta-carotene reduced the fluorescence intensity of both proteins, beta-casein and bovine serum albumin, and the fluorescence quenching mechanism is mainly static. Interaction constants associated with complex formation between the beta-carotene and dairy proteins with temperatures studied ranged between $8,43 \times 10^4$ and $4,20 \times 10^7$ L mol⁻¹ for native, BSA, between $1,11 \times 10^2$ and $5,05 \times 10^2$ L mol⁻¹ for denatured BSA and between

$3,34 \times 10^1$ and $2,457 \times 10^3$ L mol⁻¹ for beta-casein. The stoichiometry of the complex formation (beta-carotene:protein) also varied between proteins, being 1:1 to native BSA, 1:3 to denatured BSA and 1:2 for beta-casein. The values of variation of the standard Gibbs free energy of complex formation varied according to temperature and were negative for all systems studied. However, the values of this parameter obtained for beta casein were lower compared to those obtained for BSA. The formation of the complex in all cases was driven by the entropy of the system. Fluorescence results obtained in the pH 5.0 to bovine serum albumin showed that the interaction between this protein and beta-carotene was almost constant, probably issues the conformation and distribution of charged groups of the protein at this pH value. The dye light stability was assessed in the presence and absence of bovine serum albumin and beta-casein and the results showed that both proteins dye protected from degradation caused by light. The overall results obtained pointed to the efficient use of milk protein in the transport and stabilization of beta-carotene in food systems.

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

A cor exerce um papel muito importante na aceitação dos alimentos, sendo um dos primeiros parâmetros de qualidade avaliados pelos consumidores. Diante disso, as indústrias alimentícias possuem uma frequente preocupação com a adição de corantes aos seus produtos visando conferir ou intensificar a coloração dos alimentos, tornando-os mais atrativos.

Com a descoberta dos corantes sintéticos entre os séculos XVIII e XIX um grande número de corantes obtidos de fontes naturais foi substituído. Desde então os corantes sintéticos têm sido largamente utilizados em indústrias de vários setores, incluindo indústrias alimentícias.

Os corantes sintéticos são utilizados frequentemente devido às suas vantagens em relação aos corantes naturais, principalmente no que se refere à estabilidade a luz, temperatura e oxigênio, à solubilidade em meio aquoso e aos custos de produção. Por outro lado, estudos têm demonstrado que a ingestão de corantes sintéticos acima do limite diário estabelecido pela legislação, com base em estudos toxicológicos, pode causar reações adversas aos consumidores, como urticárias, asma, reações imunológicas e até mesmo câncer.

Nos últimos anos, tem sido crescente a preocupação dos consumidores com aspectos relacionados à saúde, especialmente em relação à ingestão de alimentos. Sendo assim, os consumidores aparentemente têm demonstrado maior preferência pelo consumo de produtos que contenham aditivos naturais, incluindo os corantes, em suas formulações. Além das exigências dos consumidores, estudos toxicológicos e medidas legislativas também têm restringido a utilização dos corantes sintéticos.

O betacaroteno ($C_{40}H_{56}$) é um corante natural pertencente à classe dos carotenoides que, além de sua função como corante, possui importantes propriedades benéficas à saúde humana, fatores estes que têm aumentado consideravelmente o interesse na utilização deste composto em alimentos. No entanto, o seu emprego ainda é bastante limitado devido principalmente à sua instabilidade química frente a fatores como exposição ao oxigênio e outros

agentes pro-oxidantes, exposição à luz, ácidos, temperaturas mais elevadas, etc; elevados custos de produção; e menor rendimento de extração.

As proteínas do leite possuem importantes propriedades funcionais, dentre as quais, capacidade de interagir com uma grande variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos como a maioria dos corantes naturais. Devido a estas propriedades, as proteínas lácteas constituem bons sistemas para veicular e estabilizar estas moléculas.

Nesse sentido, a veiculação de betacaroteno por proteínas do leite, como albumina sérica bovina e caseína tem atraído interesse crescente nos últimos anos. Entretanto, para a aplicação eficiente destas proteínas como carreadoras de betacaroteno, é essencial conhecer, em nível molecular, as interações entre estas proteínas e o corante.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a termodinâmica de interação entre o corante natural betacaroteno e as proteínas lácteas β -caseína e albumina sérica bovina, em diferentes condições de temperatura e pH, bem como avaliar a estabilidade da estrutura química do betacaroteno à luz na ausência e na presença de diferentes concentrações de ambas as proteínas lácteas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a constante de interação (K_a) entre betacaroteno e as proteínas β -caseína e albumina sérica bovina em diferentes temperaturas;
- Determinar a estequiometria (n) de formação do complexo entre betacaroteno e as proteínas β -caseína e albumina sérica bovina em diferentes temperaturas;
- Determinar a variação da entalpia padrão de formação de complexo (ΔH°) entre betacaroteno e as proteínas β -caseína e albumina sérica bovina;
- Determinar a variação da energia livre de Gibbs padrão de formação do complexo (ΔG°) e a variação da entropia padrão de formação do complexo (ΔS°) entre betacaroteno e as proteínas β -caseína e albumina sérica bovina para cada temperatura estudada;
- Determinar a variação da entalpia de desnaturação ($\Delta_{des}H$) e a temperatura média de desnaturação (T_m) da albumina sérica bovina na presença de diferentes concentrações do betacaroteno;
- Avaliar a estabilidade química do betacaroteno à luz na ausência de proteínas (em dimetilsulfóxido) e na presença de diferentes concentrações de β -caseína e albumina sérica bovina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O leite é um alimento complexo do ponto de vista molecular, que compõe uma parte importante da dieta humana, principalmente devido ao seu elevado valor nutricional. Sua composição média de macronutrientes (em %, m/m) consiste em 87,1% de água, 4,6% de lactose, 3,3% de proteínas e 4% de gordura (WALSTRA *et al.*, 2006). Dentre os seus constituintes, as proteínas do leite são divididas em dois grupos principais, as caseínas e as proteínas do soro.

3.1 β -caseína

As caseínas são as principais proteínas do leite em relação à concentração, cujo teor no leite varia de 24 a 28 g/L, representando, aproximadamente, 80% das proteínas totais do leite. Consistem em quatro frações: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína (FOX, 2003; LIVNEY, 2010).

Beta-caseína (β -CN) é uma das quatro principais caseínas do leite bovino, cuja estrutura primária é constituída por 209 aminoácidos, possui massa molar de 24 kDA e é rica em prolina, uma aminoácido aromático. A presença deste aminoácido em sua estrutura tende a interromper alfa-hélices, folhas-beta e pontes dissulfeto. Como resultado, esta proteína não apresenta conformação terciária (tridimensional) sendo classificada como uma proteína intrinsecamente não estruturada (desordenada) (TOMPA, 2002). Sua estrutura a torna extremamente estável ao calor e, portanto, não pode sofrer coagulação quando aquecida a 100 °C durante 24 horas ou a 140 °C até 20-25 minutos (FOX e McSEENEY, 2003).

Trata-se de uma proteína anfifílica com dois domínios bem definidos, um domínio hidrofílico N-terminal e um domínio hidrofóbico C-terminal e possui ponto isoelétrico (pI) no pH 5,3 (LIVNEY *et al.*, 2004).

O conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos da β -CN é relativamente alto e a grande maioria destes aminoácidos está agrupada no domínio C-terminal da cadeia polipeptídica desta proteína. Por outro lado, a região N-terminal da cadeia polipeptídica é rica em resíduos de aminoácidos polares e carregados negativamente, incluindo resíduos de fosfoserina (PORTNAYA *et al.*, 2006).

A estrutura anfifílica da β -CN confere a esta proteína a propriedade de se auto associar, sob condições apropriadas, e formar micelas. As micelas de β -CN formadas contêm cerca de 15 a 60 moléculas desta proteína (MIKHEEVA *et al.*, 2003).

As micelas de β -CN são caracterizadas pela presença de um núcleo hidrofóbico central, formado pela interação intermolecular das regiões hidrofóbicas da cadeia polipeptídica desta proteína e por uma região que interage com a interface, formada pelas regiões hidrofílicas carregadas (Figura 1) (O'CONNELL *et al.*, 2003).

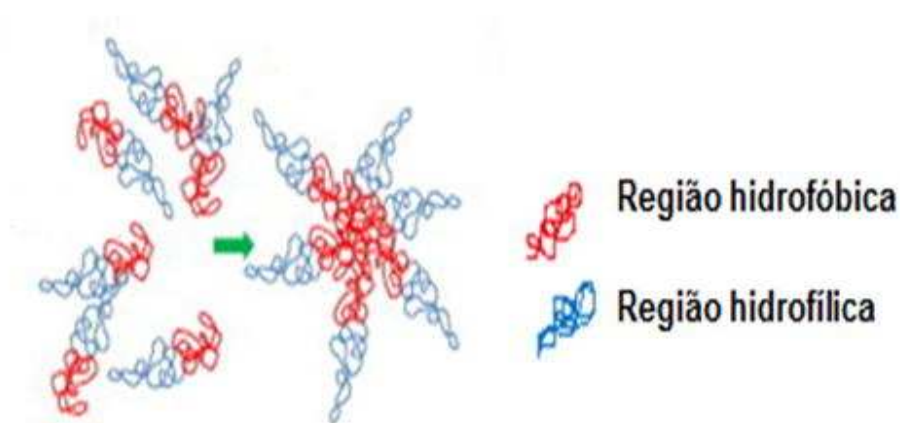


Figura 1. Representação da auto associação de monômeros de β -CN formando micelas. Fonte: LIVNEY (2010) (adaptado).

Acredita-se que o processo de micelização da β -CN seja controlado por duas forças, forças de interação hidrofóbica e forças de repulsão eletrostática, onde as forças de interação hidrofóbica contribuem para a associação dos monômeros e as forças de repulsão eletrostática previnem a agregação das micelas formadas (MIKHEEVA *et al.*, 2003; O'CONNELL *et al.*, 2003; SETTER e LIVNEY, 2015).

Em baixas concentrações de proteína em soluções aquosas ou a temperaturas inferiores a 15 °C, β -CN está na forma de monômeros. Quando a concentração de β -CN atinge a concentração micelar crítica (cmc), monômeros de β -CN se agregam espontaneamente formando as micelas, de forma a reduzir a energia livre de Gibbs do sistema (de KRUIF e GRINBERG, 2002).

A cmc pode ser determinada por diferentes técnicas, como espectroscopia de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz, calorimetria de titulação isotérmica, entre outras e é caracterizada pela mudança brusca em uma determinada propriedade físico-química do sistema com a concentração da molécula.

A determinação da cmc através de espectroscopia de fluorescência emprega o pireno ($C_{16}H_{10}$), um hidrocarboneto policíclico aromático (Figura 2a), como sonda fluorescente. O espectro de emissão de fluorescência do pireno compreende picos vibrônicos que mostram forte dependência com o solvente, especialmente no que se refere à polaridade do solvente (KALYANASUNDARAM e THOMAS, 1977). A Figura 2b mostra o espectro de fluorescência do pireno na presença de concentrações crescentes de β -CN, indicando três picos de emissão.

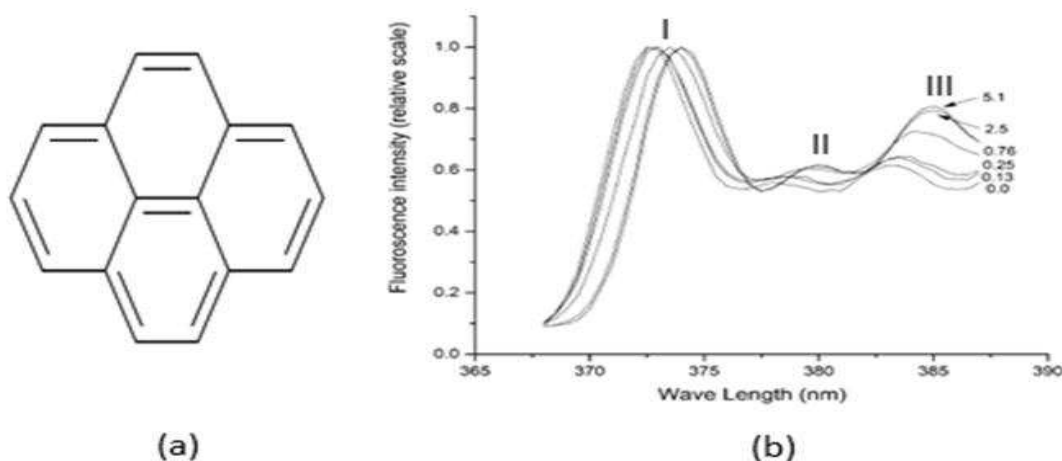


Figura 2. (a) Molécula de pireno e (b) espectro de fluorescência do pireno ($\lambda_{exc} = 338$ nm) na presença de concentrações crescentes de β -CN (0; 0,13; 0,25; 0,76; 2,5; e 5,1 mg/mL) em tampão fosfato, pH 7,0, força iônica 0,1M, 25°C, concentração de pireno 1,2 μ M. Fonte: SETTER e LIVNEY (2015).

A razão entre a intensidade de emissão de fluorescência do terceiro pico (~ 383 nm) e do primeiro pico (~ 373 nm) (I_3/I_1) no espectro de fluorescência do pireno pode ser utilizada como uma medida quantitativa da polaridade do meio. Esta característica torna o pireno uma excelente sonda para determinar com precisão a cmc (KALYANASUNDARAM e THOMAS, 1977).

O pireno é uma molécula altamente hidrofóbica, cuja solubilidade em água é muito baixa (2-3 μ M). Sendo assim, na presença de micelas, o pireno é

preferencialmente solubilizado no núcleo hidrofóbico destas estruturas. À medida que o número de micelas aumenta no sistema, a razão I_3/I_1 também se desloca para valores mais altos (AGUIAR *et al.*, 2003; RAY *et al.*, 2006).

A análise da cmc é relevante, uma vez que permite a determinação de outros parâmetros, os quais fornecem importantes informações sobre a termodinâmica do processo de micelização, como a variação da energia livre de Gibbs padrão de micelização (Equação 1):

$$\Delta_{mic}G^\circ = RT \ln CMC \quad (\text{Equação 1})$$

onde $\Delta_{mic}G^\circ$ é a variação da energia livre de Gibbs padrão de micelização; R é a constante universal dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T é a temperatura (Kelvin); cmc é a concentração micelar crítica.

A cmc da β -CN varia entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, dependendo da temperatura, pH, composição do solvente e força iônica do meio (PORTNAYA *et al.*, 2006). SHAPIRA *et al.* (2010) determinaram a cmc através da distribuição de tamanho de partículas de β -CN em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 0,1 M, a 25 °C e obtiveram a cmc de ~0,5 mg/mL. PORTNAYA *et al.* (2006) encontraram valores de 0,6 a 0,7 mg/mL, nestas mesmas condições, utilizando calorimetria de titulação isotérmica. SETTER e LIVNEY (2015) determinaram a cmc também nas mesmas condições dos sistemas anteriores, por meio de espectroscopia de fluorescência utilizando pireno como sonda fluorescente e obtiveram a cmc de 0,7 mg/mL.

Alguns estudos têm investigado a interação de β -CN com moléculas hidrofóbicas como, por exemplo, vitamina D₃ (FORREST, *et al.*, 2005), vitamina D₂ (SEMO *et al.*, 2007) vitamina A (LIETAER, *et al.*, 1991), ésteres de sucrose (CLARK *et al.*, 1992), corantes (ESMAILI *et al.*, 2011; MEHRANFAR *et al.*, 2013a; 2013b) e fármacos (SHAPIRA *et al.*, 2010; KHODARAHMI *et al.*, 2012). Estes estudos sugerem que as forças de interação hidrofóbica são as responsáveis pela interação destas moléculas com a β -CN.

A estrutura da β -CN contém resíduos de aminoácidos responsáveis pela fluorescência intrínseca desta proteína, dentre os quais, o Triptofano 143 está localizado no principal domínio hidrofóbico da cadeia polipeptídica da β -CN. (COGAN *et al.*, 1976).

3.2 Albumina Sérica Bovina

Soro de leite é um coproduto da fabricação de queijos e fabrico de caseína, responsável por cerca de 20% (m/m) da proteína total do leite, que possui grande importância na indústria de laticínios devido ao elevado volume produzido bem como à sua composição nutricional (BALDASSO *et al.*, 2011).

Em geral a composição do soro de leite consiste em média em 93% de água, 0,6% de proteínas designadas como proteínas de soro de leite, ~5% de lactose, ~0,02% de gordura, ~0,6% de minerais (cálcio, sódio, magnésio, potássio e fósforo), vitaminas hidrossolúveis e outros constituintes presentes em pequenas quantidades (FOEGEDING *et al.*, 2002; FOX e McSWEENEY, 2003).

Proteínas do soro são principalmente uma mistura de proteínas globulares compreendendo β -lactoglobulina (~50% m/m), α -lactoalbumina (~20% m/m), imunoglobulinas (~10% m/m), albumina sérica bovina (~6%, m/m) e outros componentes proteicos menores ou peptídeos, incluindo a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima e fatores de crescimento (WALSTRA e JENNESS, 1984).

Dentre as proteínas do soro, a albumina do soro é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo de muitas espécies (até 40 mg/mL), sendo responsável por cerca de 60% do total de proteínas do plasma (XU *et al.*, 2012).

São atribuídos a esta proteína dois papéis principais: a manutenção da pressão osmótica do sangue e a ligação reversível a uma grande variedade de substâncias endógenas e exógenas, como ácidos graxos, lipídeos, hormônios, fármacos, corantes, entre outros. Esta proteína desempenha importante papel no transporte e deposição destas substâncias (KRAGH-HANSEN, 1981).

A albumina sérica bovina (BSA) é uma proteína globular de massa molar 66,5 kDa (KUN *et al.*, 2009), cuja estrutura primária consiste em uma cadeia com 583 resíduos de aminoácidos e estrutura secundária é 67% α -helicoidal não apresentando nenhuma folha- β em sua estrutura (CARTER e HO, 1994). Apresenta dezessete pontes dissulfeto intramoleculares, as quais contribuem para manter sua conformação tridimensional e formar os três domínios helicoidais homólogos em sua estrutura (I, II e III); e um grupo tiol livre no

resíduo de aminoácido Cys-34, o qual está em sua forma reduzida (LEE e KIM, 2001; GELAMO *et al.*, 2002). A sequência de aminoácidos da BSA é Asp (39), Asn (12), Asx (3), Thr (34), Ser (28), Glu (59), Gln (19), Glx (1), Pro (28), Gly (16), Ala (46), Cys (35), Val (36), Met (4), Ile (14), Leu (61), Tyr (19), Phe (27), Lys (59), His (17), Trp (2) e Arg (23) (MORR & HA, 1993).

A Figura 3 mostra os três domínios que caracterizam a BSA, cada um dividido em subdomínios A e B. Estes domínios exibem diferenças quanto à hidrofobicidade, carga líquida e interações com diferentes ligantes. (KHODARAHMI *et al.*, 2012).

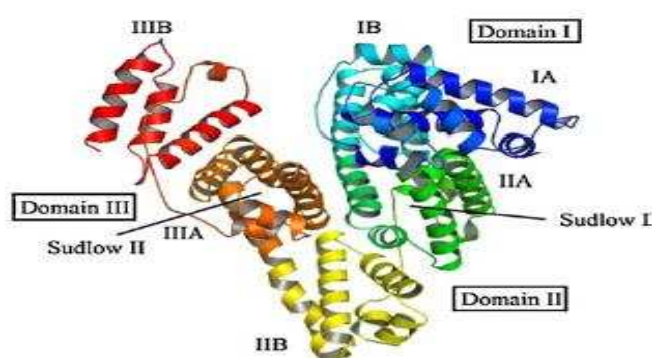


Figura 3. Representação da molécula de BSA indicando os sítios de interações hidrofóbicas (Sudlow I e Sudlow II) e as estruturas secundárias da proteína representadas como fitas com os sub-domínios codificados por cores da seguinte forma: IA, azul; IB, azul claro; IIA, verde; IIB, amarelo; IIIA, laranja; IIIB, vermelho. Fonte: KHODARAHMI *et al.* (2012).

Esta proteína possui um ponto isoelétrico na faixa de pH 4,5 – 5,5 (VALSTAR *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2006) e é caracterizada por uma elevada homologia da sequência (80%) e conformação semelhante com a albumina de soro humano (HSA) (HALDAR *et al.*, 2005).

Do ponto de vista espectroscópico, uma das principais diferenças quanto à estrutura tridimensional entre as duas proteínas é que a HSA possui um resíduo de triptofano (Trp-214) no subdomínio II, enquanto a BSA possui dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212) localizadas em subdomínios IB e II, respectivamente. O resíduo Trp-212 está localizado no interior hidrofóbico da proteína, enquanto o resíduo Trp-134 está localizado em um ambiente hidrofílico, próximo à superfície da proteína (CHENG, 2012).

As moléculas de BSA podem sofrer alterações conformacionais em virtude de fatores como temperatura, pressão, presença de agentes químicos,

pH e interação com ligantes, por exemplo, e é geralmente aceito que estas alterações ocorrem em várias fases e são complexas devido aos três domínios homólogos da proteína se desdobrarem independentemente (JOHANSON *et al.*, 1981; DOCKAL *et al.*, 2000; HUSHCHA, *et al.*, 2000).

O pH é um fator que pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis, bem como em sua carga líquida. Estas mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto as interações que esta proteína realiza com outras moléculas. Próximo ao ponto isoelétrico (pH ~4,8), por exemplo, a BSA exibe estrutura molecular de coração (Figura 3) (KUN *et al.*, 2009).

KUN *et al.* (2009) estudaram mudanças conformacionais na BSA induzidas pelo pH e avaliaram como o diâmetro hidrodinâmico médio da proteína mudou com as variações dos valores de pH do meio, por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Eles observaram que em valores de pH ~5,0 e ~7,0, o diâmetro hidrodinâmico médio não mudou significativamente com o aumento da concentração de proteína, uma vez que, próximo ao *pI* (pH ~5,0), a carga líquida da proteína é aproximadamente zero, o que possibilita a formação de uma fase mais rígida e contraída devido à associação intramolecular entre grupos funcionais carregados negativamente, grupamentos carboxílicos ($-\text{COO}^-$), e positivamente, grupamentos amino ($-\text{NH}_2^+$), na cadeia polipeptídica. Por outro lado, eles observaram que em valores de pH ~3,0 e ~10, o diâmetro hidrodinâmico médio da proteína aumentou, o que sugere que, nestas condições de pH, a proteína exibe conformação mais expandida e os seus grupos carregados tornam-se mais acessíveis e hidratados (solvatados). Essa conformação mais expandida resulta em aumento do volume da proteína na solução, que por sua vez, diminuiu a constante de difusão dessa molécula no meio. Adicionalmente, eles observaram que a constante de difusão diminuiu linearmente com o aumento da concentração da proteína, para ambos os valores de pH, 3 e 10.

A interação entre moléculas de baixa massa molar como corantes e fármacos e albuminas também tende a ocasionar mudanças em suas estruturas secundária e terciária, promovendo alterações em sua conformação (HUSHCHA, *et al.*, 2000).

A espectroscopia de fluorescência têm sido uma técnica bastante utilizada em estudos para determinar parâmetros bem como os mecanismos associados à interação entre BSA e diferentes corantes (BAPTISTA e INDIG, 1998; PAN *et al.*, 2011; SHAHABADI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015).

3.3 Corantes naturais

O emprego de aditivos químicos, como corantes, é um dos mais polêmicos avanços das indústrias de alimentos, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares, especialmente no que se refere à aceitação sensorial. Dentre os atributos sensoriais, a cor influencia de forma decisiva a preferência dos consumidores quanto a determinado tipo de alimento. Por esta razão, as indústrias possuem preocupação frequente com a aplicação de corantes aos alimentos, tornando-os mais atrativos aos consumidores (PRADO e GODOY, 2003).

De acordo com a resolução n. 44 de 25 de novembro de 1977 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, os corantes alimentícios são definidos como a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). Os corantes alimentícios se enquadram na categoria de aditivo alimentar que, segundo a portaria n. 540 de 27 de outubro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação, sem o propósito de nutrir (BRASIL, 2015).

A cor de um alimento pode ser alterada ou degradada durante o processamento do alimento ou armazenamento do produto. Assim, a adição do corante, geralmente, ao final do processamento possui a finalidade de compensar a degradação da cor que pode ocorrer devido a vários fatores como exposição à luz, presença de oxigênio, variações de temperatura e umidade, bem como realçar cores naturalmente presentes em determinados alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Duas classes bem distintas de corantes estão disponíveis para uso em alimentos, os corantes sintéticos e naturais. Dentre estas duas classes, os corantes sintéticos vêm sendo muito utilizados desde a sua descoberta entre os séculos XVIII e XIX e o uso frequente destes corantes deve-se às suas vantagens em relação aos corantes naturais, como apresentação de cores intensas; alta estabilidade a diferentes fatores como luz, oxigênio, temperatura e pH; uniformidade na cor conferida, fornecimento de uma ampla variedade de cores; e custo de produção relativamente baixo. Porém, o consumo de corantes sintéticos pode causar reações adversas aos consumidores, que vão desde simples urticárias, passando por asma e reações imunológicas. Além disso, estes corantes possuem grande potencial carcinogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As exigências do mercado consumidor, estudos toxicológicos realizados com corantes sintéticos e medidas legislativas têm incentivado a substituição destes por corantes naturais, os quais são utilizados há muitos anos com menores evidências de danos à saúde dos consumidores. Entretanto, os corantes naturais apresentam menor estabilidade na matriz alimentícia, baixa solubilidade em soluções aquosas e maiores custos de produção (AZEREDO, 2005).

Os pigmentos naturais em alimentos são derivados de diversas substâncias como substâncias fenólicas e produtos de sua oxidação; derivados de porfirinas, como grupo heme e clorofilas; pigmentos escuros produzidos enzimaticamente ou não-enzimaticamente (Maillard); complexos de metais com proteínas ou compostos fenólicos; carotenoides e pigmentos relacionados (POTHAKAMURY, 1995).

Carotenoides são quimicamente hidrocarbonetos lineares de 40 carbonos, que possuem como característica estrutural comum a cadeia poliênica, um longo sistema de ligações duplas conjugadas (duplas e simples alternadas), que pode ter de 3 a 15 duplas ligações e possui um sistema de elétrons π deslocalizados atuando como cromóforo. O sistema conjugado e rico em elétrons do polieno também é responsável pela atividade antioxidante dos carotenoides, tanto pela absorção do oxigênio singlete quanto de radicais livres, interrompendo as reações em cadeia onde eles estão envolvidos. A

presença destas ligações também facilita a degradação dos carotenoides a partir de grande número de agentes de oxidação (BOON *et al.*, 2010).

Os carotenoides são sintetizados por todos os micro-organismos fotossintéticos e por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos e encontrados em uma variedade de frutas e hortaliças, incluindo cenoura, batata doce, melão, manga, mamão, espinafre e couve e presente também em alguns peixes e mariscos. São amplamente utilizados em preparações nutracêutica e farmacêutica, devido às suas potenciais aplicações como corantes, atividade provitamina A e atividade antioxidante (YOUNG e LOWE, 2001; RAO e HONGLEI, 2002).

São divididos em carotenoides compostos somente por átomos de carbono e hidrogênio (carotenos), tais como o betacaroteno, e os carotenoides oxidados, que apresentam grupos substituintes com oxigênio, como hidroxilas, grupos ceto e epóxi (xantofilas), tais como a astaxantina (CHEN *et al.*, 2010; ZSILA *et al.*, 2003).

3.4 Betacaroteno

Betacaroteno ($C_{40}H_{56}$, massa molar de 536,9 g/mol) é um corante natural, pertencente à classe dos carotenoides (BRASIL, 2015) que pode ser encontrado em uma variedade de fontes vegetais, tais como couve, nabo, espinafre, alface, manga, melão, pimentão, abóbora, cenoura e batata doce (HOLDEN *et al.*, 1999). Pode ser obtido também de diversas espécies de fungos, leveduras e algas. Entretanto, somente certas espécies são capazes de sintetizá-lo em quantidade suficiente para permitir sua produção em escala industrial. Sua estrutura consiste em uma cadeia poliênica com onze ligações duplas conjugadas e um β -anel em cada extremidade da cadeia (Figura 4) (BRITTON, 1995).

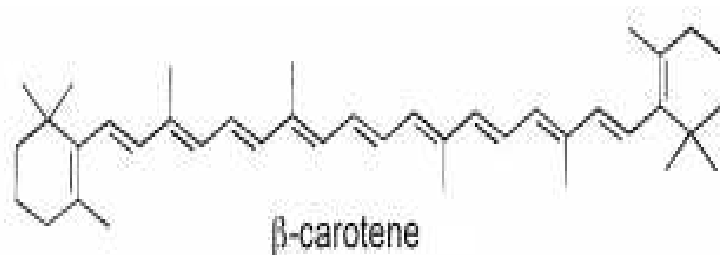


Figura 4. Estrutura química do Betacaroteno. BRITTON (1995).

Como resultado desta estrutura, este carotenoide possui ainda algumas propriedades relacionadas à saúde. Trata-se de um dos mais eficazes precursores de vitamina A, a qual desempenha importante papel na visão, diferenciação celular, desenvolvimento de tecidos, etc (AMBROSIO *et al.*, 2006). Além de atuar como precursor de vitamina A, possui ainda propriedades antioxidantes podendo, conseqüentemente, oferecer proteção contra doenças cardiovasculares e até mesmo contra o câncer (AHERNE *et al.*, 2010).

No entanto, a sua utilização em alimentos é limitada devido principalmente a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, por se tratar de um composto lipofílico, bem como à sua instabilidade química (SOARES e CRAFT, 1992). Dessa forma não pode ser incorporado diretamente em formulações de base aquosa. Em vez disso, geralmente tem que ser introduzido sob a forma de um sistema de entrega coloidal (VELIKOV e PELAN, 2008).

3.5 Interações intermoleculares entre ligantes e proteínas

A energia envolvida na interação intermolecular entre diferentes ligantes e biomoléculas pode resultar de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, ligações de van der Waals e interações hidrofóbicas (HU *et al.*, 2009). Praticamente todos os tipos de interações não-covalentes que ocorrem em interfaces moleculares são acompanhados por um conjunto específico de variáveis termodinâmicas, as quais são muito importantes na interpretação dos resultados obtidos e na determinação das forças motrizes envolvidas no processo termodinâmico do sistema (ROSS e SUBRAMANIAN, 1981). Variáveis termodinâmicas como a variação na energia livre de Gibbs padrão

(ΔG°), variação da entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°) de formação de complexo são importantes para o estudo das interações intermoleculares envolvendo proteínas e outras moléculas.

Ross e Subramanian (1981) caracterizaram a magnitude de variáveis termodinâmicas associadas a vários tipos individuais de interações que podem ocorrer entre ligantes e proteínas. Com base em suas observações, afirmaram que valores negativos de ΔH° e valores positivos de ΔS° indicam que as forças de interação eletrostática e hidrofóbica possuem papel significativo nas interações. Estas variáveis termodinâmicas indicam ainda a sua contribuição para ΔG° , de tal forma que ΔH° negativo e ΔS° positivo são considerados favoráveis à interação, ou seja, reduzem mais a energia livre de Gibbs do sistema. Interações intermoleculares espontâneas ocorrem quando a variação da energia livre de Gibbs associada às interações é negativa ($\Delta G < 0$).

Um processo termodinâmico de interação intermolecular é acompanhado por algum grau de troca de energia entre sistema e vizinhança e, esta energia liberada ou absorvida muitas vezes é muito pequena, sendo necessárias técnicas muito sensíveis para detectá-la (LADBURY, 2004).

O estudo da interação entre corantes e proteínas pode ser realizado por meio de diferentes técnicas dentre as quais se destaca a nanocalorimetria diferencial de varredura e a espectroscopia de fluorescência.

3.6 Técnicas

3.6.1 Espectroscopia de Fluorescência

Luminescência é a emissão de luz por determinadas substâncias e ocorre a partir de estados eletrônicos excitados. Pode ser dividida em dois processos - fluorescência e fosforescência - dependendo da natureza do estado excitado. A emissão de energia a partir de um estado excitado singlete é conhecido como fluorescência, ao passo que fosforescência é a emissão a partir de um estado excitado tripleto. Um estado singlete é um estado eletrônico de uma molécula no qual todos os spins eletrônicos estão emparelhados de modo que nenhum momento angular líquido de spin existe. Já o estado tripleto

é um estado eletrônico que possui dois spins eletrônicos paralelos desemparelhados (HARRY *et al.* , 2008).

Substâncias que emitem fluorescência são denominadas fluoróforos e podem ser divididas em duas classes principais – fluoróforos intrínsecos e extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são aqueles que fluorescem naturalmente; já os extrínsecos são aqueles adicionados à amostra para desempenharem a função de sonda fluorescente (LAKOWICZ, 2006).

As taxas de emissão de fluorescência são tipicamente da ordem de 10^8 s⁻¹, de modo que o tempo de vida de fluorescência típico para moléculas orgânicas está geralmente compreendido no intervalo de 10^{-7} e 10^{-9} nanosegundos. Tempo de vida de um fluoróforo é a média de tempo que ele permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Este tempo, embora curto, é suficiente para o fluoróforo no estado excitado interagir com moléculas externas chamadas supressores (LAKOWICZ, 2006).

Muitas moléculas biológicas, como as proteínas exibem fluorescência. No caso das proteínas, a sua fluorescência intrínseca é devida à presença de aminoácidos aromáticos, como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Dentre estes três aminoácidos, o triptofano é o mais utilizado nos estudos de fluorescência de proteínas devido ao seu rendimento quântico elevado em relação aos demais, o que permite a obtenção de um sinal visível de emissão. O rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo refere-se à razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos por ele (MUNISHKINA e FINK, 2007).

A emissão de fluorescência devida apenas ao triptofano pode ser seletivamente medida através da excitação no comprimento de onda de 295 nm, e é altamente sensível ao ambiente no qual este aminoácido se encontra, apresentando características de fluorescência diferenciadas em cada grau de exposição aos diferentes meios, os quais podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos (LAKOWICZ, 2006).

Espectros de fluorescência são normalmente apresentados como espectros de emissão (Figura 5). Um espectro de emissão é uma curva de intensidade de fluorescência *versus* comprimento de onda.

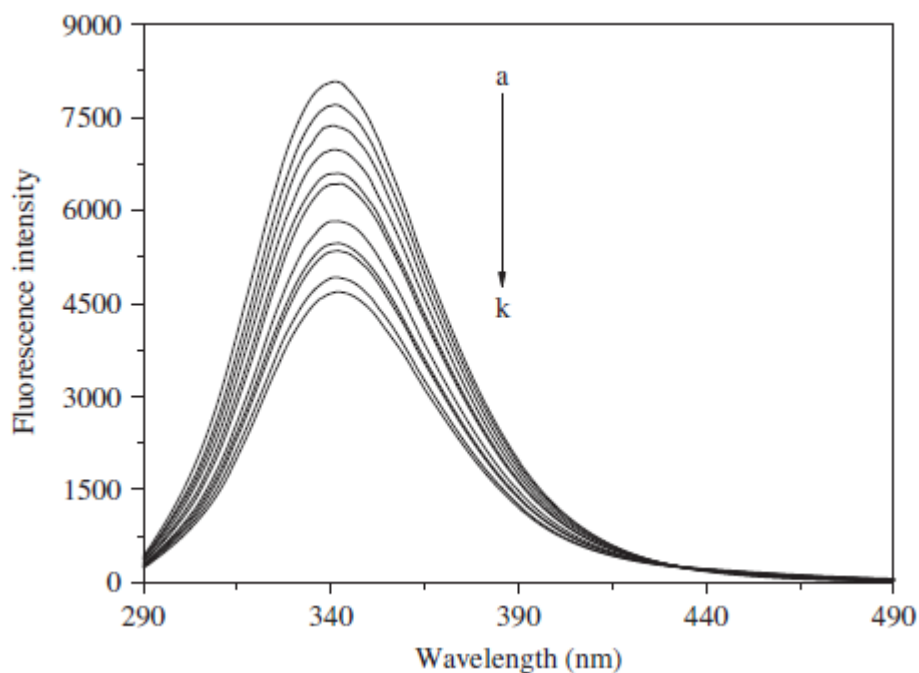


Figura 5. Espectro de emissão de fluorescência. Fonte: HE *et al.* (2011).

A intensidade de fluorescência de um dado fluoróforo pode ser reduzida e esta redução é denominada “quenching” ou supressão. A supressão pode ocorrer por dois mecanismos principais, supressão colisional ou dinâmica e supressão estática. A supressão colisional ou dinâmica ocorre quando o fluoróforo do estado excitado é desativado após colisão com alguma outra molécula, chamada quencher ou supressor e envolve duas reações competitivas - a desativação unimolecular do estado excitado da molécula fluorescente e a desativação bimolecular por interações com moléculas do supressor. A supressão estática é devida à formação de um complexo não fluorescente entre fluoróforo e supressor. Quando este complexo absorve luz retorna imediatamente ao estado fundamental sem a emissão de um fóton (LAKOWICZ, 2006).

As concentrações das moléculas fluorescentes (F^*) na ausência e na presença do supressor são dadas pelas Equações 2 e 3, respectivamente (GOI, 2006):

$$[F^*]^0 = \frac{I_a}{K_f + K_{IC} + K_{ISC}} = \frac{I_a}{K_f + \sum K_i} \quad (\text{Equação 2})$$

$$[F^*] = \frac{I_a}{K_f + \sum K_i + K_q[Q]} \quad (\text{Equação 3})$$

onde $[F^*]^0$ é a concentração da molécula fluorescente na ausência do supressor; $[F^*]$ é a concentração da molécula fluorescente na presença do supressor; I_a é a intensidade de absorção ou a proporção de formação de moléculas excitadas; K_f é a constante de fluorescência; ΣK_i é a soma de todas as outras constantes dos processos de desativação unimolecular, tais como conversão interna (K_{IC}) e o cruzamento entre sistemas (K_{ISC}); K_q é a constante de extinção bimolecular; $[Q]$ é a concentração do supressor.

Em termos de rendimento quântico, temos as Equações 4 e 5.

$$\phi_f^0 = \frac{K_f[F^*]^0}{I_a} = \frac{K_f}{K_f + \Sigma K_i} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\phi_f = \frac{K_f[F^*]}{I_a} = \frac{K_f}{K_f + \Sigma K_i + K_q[Q]} \quad (\text{Equação 5})$$

Dividindo a Equação 4 pela Equação 5 obtém-se a equação 6.

$$\frac{\phi_f^0}{\phi_f} = \frac{K_f + \Sigma K_i + K_q[Q]}{K_f + \Sigma K_i} = 1 + \frac{K_q[Q]}{K_f + \Sigma K_i} \quad (\text{Equação 6})$$

O tempo de vida da substância fluorescente na ausência de supressor (τ_0) é dado pela Equação 7.

$$\tau_0 = \frac{1}{K_f + \Sigma K_i} \quad (\text{Equação 7})$$

Substituindo a Equação 7 na equação 6 obtém-se a equação 8.

$$\frac{\phi_f^0}{\phi_f} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Equação 8})$$

Para simplificar, assume-se que os rendimentos quânticos de emissão são proporcionais às intensidades de fluorescência:

$$\frac{\phi_f^0}{\phi_f} = \frac{I_0}{I}$$

onde I_0 e I representam as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente.

Substituindo os termos rendimentos quânticos pelos termos intensidades de fluorescência na Equação 8, obtemos a Equação 9 conhecida como

equação de Stern-Volmer (RAJENDIRAN e THULASIDHASAN, 2015), que descreve a diminuição da intensidade de fluorescência de um fluoróforo em um processo termodinâmico de supressão de fluorescência por uma determinada molécula supressora:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (\text{Equação 9})$$

onde F_0 e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; K_q é a constante de extinção bimolecular; τ_0 é o tempo médio de vida da molécula, sem qualquer supressor, e o tempo de vida de fluorescência do biopolímero é 10^{-8} s (CHENG, 2012); $[Q]$ é a concentração do supressor; e K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer.

O comportamento linear do gráfico de Stern-Volmer para F_0/F versus $[Q]$ é geralmente indicativo de um processo de supressão colisional ou um processo de supressão estático (THIPPERUDRAPPA *et al.*, 2006). Conhecendo-se τ_0 , pode-se calcular K_q a partir da inclinação da reta (K_{sv}), através da equação 10:

$$K_{sv} = K_q\tau_0 \quad (\text{Equação 10})$$

A supressão dinâmica e estática pode ser distinguida pela sua dependência com a temperatura. Em processos termodinâmicos exotérmicos, no caso de o mecanismo de supressão ser dinâmico, temperaturas mais elevadas resultam em difusão mais rápida da molécula supressora e, conseqüentemente, em maior supressão, isto é, maiores valores de K_{sv} . Por outro lado, no caso de o mecanismo de supressão ser estático, os valores de K_{sv} diminuem com o aumento da temperatura e os valores de K_q são maiores que a constante de difusão da biomolécula ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (QIN *et al.*, 2007; ABOU-ZIED e AL-SHIHI, 2008). Deslocamentos das bandas de emissão máximas também apontam para um mecanismo de supressão estático, uma vez que constituem um indício de que houve formação de complexo entre fluoróforo e supressor (RAJENDIRAN e THULASIDHASAN, 2015).

A fluorescência a partir do aminoácido triptofano é sensível à polaridade do meio no qual este se encontra. Quando o resíduo de triptofano está envolvido em interações hidrofóbicas ou exposto à um ambiente hidrofóbico,

um deslocamento das bandas de emissão máximas para a região correspondente ao azul no espectro eletrônico é observado, ao passo que quando o triptofano está envolvido em ligações de hidrogênio ou exposto a um meio mais hidrofílico, apresenta um deslocamento para a região do vermelho. Deslocamentos das banda máximas de emissão podem ainda sugerir mudanças conformacionais (LAKOWICZ, 2006).

Para o mecanismo de supressão estático, o número de sítios de interação para o supressor na molécula de proteína, bem como a constante de interação entre fluoróforo e supressor podem ser obtidos a partir da curva de regressão de logaritmo duplo (Equação 11) (RAJENDIRAN e THULASIDHASAN, 2015):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (\text{Equação 11})$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência do supressor; F é a intensidade de fluorescência do fluoróforo na presença do supressor; K_a é a constante de interação entre fluoróforo e supressor; n é o número de sítios de interação para o supressor na molécula de proteína; e $[Q]$ é a concentração do supressor.

Os valores de n representam a inclinação da reta e os valores de $\log K_a$ representam o intercepto.

Parâmetros termodinâmicos como a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°) de formação de complexo são importantes para o estudo de interações intermoleculares envolvendo proteínas e podem ser obtidos por meio da espectroscopia de fluorescência.

A variação de entalpia padrão de formação de complexo pode ser obtida por meio da aproximação de Van't Hoff (Equação 12), realizando o experimento de supressão da fluorescência em diferentes temperaturas (PAN *et al.*, 2011):

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (\text{Equação 12})$$

onde K_1 e K_2 são as constantes de interação nas temperaturas 1 e 2, respectivamente; R é a constante universal dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); e T é a temperatura (Kelvin).

Os valores da variação da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo podem ser obtidos a partir da Equação 13 (RAJENDIRAN e THULASIDHASAN, 2015):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (\text{Equação 13})$$

A variação da entropia padrão de formação de complexo pode ser calculada pela equação fundamental de Gibbs (Equação 14) (SHAHABADI *et al.*, 2012).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (\text{Equação 14})$$

3.6.2 Espectroscopia de UV-vis

Empregada há muitos anos, a espectroscopia molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis) vem sendo utilizada na quantificação de inúmeras espécies moleculares orgânicas e inorgânicas e também em amostras bioquímicas em diferentes tipos de materiais (FREITAS, 2006).

A técnica fundamenta-se nas medidas de absorção molecular de substâncias que são estimuladas a sofrer transições eletrônicas devido à absorção de energia quantizada na região UV-Vis. Os espectros de absorção no ultravioleta e no visível constituem um instrumento importante na identificação e elucidação da estrutura de diferentes moléculas. Uma informação relativa a um composto de estrutura desconhecida, por exemplo, pode algumas vezes ser obtida através da comparação direta de seu espectro de absorção com os de compostos-modelo de estrutura conhecida (EWING, 2013).

Em espectroscopia de absorção a energia requerida para a transição a partir de um estado eletrônico de menor energia, para um estado eletrônico de maior energia é exatamente equivalente à energia da radiação eletromagnética que promove a transição (E). Esta energia é dada pela Equação 15:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (\text{Equação 15})$$

onde E é a energia da radiação eletromagnética sendo absorvida; h é a constante universal de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J. s); ν é a frequência da radiação incidente em ciclos por segundo (cps) ou hertz (Hz); c é a velocidade de propagação da luz no vácuo ($2,998 \times 10^{10}$ cm s⁻¹); e λ é o comprimento de onda, em centímetros.

O tratamento quantitativo da absorção de energia radiante pela matéria depende do princípio geral conhecido como lei de Beer (Equação 16). A lei de Beer mostra que para uma determinada substância e a um dado comprimento de onda a absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente, para um mesmo caminho óptico e proporcional ao caminho óptico quando se fixa a concentração. Trata-se de uma lei fundamental para todos os tipos de absorção de radiação eletromagnética, aplicando-se não só a soluções, mas também a gases e sólidos (GONÇALVES, 2001).

$$\log I_0/I_t = abc \quad (\text{Equação 16})$$

onde, $\log I_0/I_t = A$ (absorvância); $k/2,303 = a$ (absortividade); b é a espessura do meio ou espessura interna da cubeta, em centímetro; c é a concentração em g/L.

A constante a da Equação 16 é conhecida como absortividade. A absortividade é uma propriedade da substância enquanto a absorvância é uma propriedade de uma determinada amostra. A lei de Beer indica que a absortividade é uma constante independente da concentração, comprimentos do percurso e intensidade da radiação incidente. Esta lei não faz nenhuma referência ao efeito da temperatura, comprimento de onda ou natureza do solvente. Na prática encontrou-se que a temperatura provoca apenas efeitos secundários, a menos que a variação ocorra em um intervalo muito grande. A concentração da solução varia pouco com a temperatura, uma vez que ocorre variação do volume. As moléculas podem ser mais ou menos influenciadas pelo solvente do meio. Geralmente, alterações ocasionadas pelo solvente são observadas como deslocamentos nas bandas espectrais do composto analisado (EWING, 2013).

A absorção da energia radiante nas regiões do espectro visível e ultravioleta depende primeiramente do número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes.

Embora as moléculas sejam constituídas por átomos, a sua energia depende também dos seus movimentos rotacionais, vibracionais e translacionais. Um mesmo nível eletrônico pode conter níveis energéticos vibracionais, os quais podem conter níveis rotacionais, que por sua vez podem conter níveis energéticos translacionais. As energias dos vários tipos de orbitais moleculares diferem significativamente e os tipos de transições

eletrônicas dependem das energias quantizadas que serão absorvidas. São possíveis quatro tipos de transições conhecidas: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\eta \rightarrow \sigma^*$, $\eta \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (GONÇALVES, 2001).

Os elétrons σ são os mais fortemente atraídos necessitando assim de maior energia para a excitação, esta energia corresponde às regiões do UV distante e extremo, as quais estão fora da faixa dos espectrofotômetros comuns (normalmente 190-900 nm). As transições eletrônicas $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são mais energéticas que as transições $\eta \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Em compostos insaturados e anéis aromáticos as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ são as mais comuns (GONÇALVES, 2001).

As duplas ligações conjugadas produzem absorção a maiores comprimentos de onda. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda onde se observa a absorção. Assim, a molécula de betacaroteno, por exemplo, com onze duplas ligações conjugadas absorve fortemente na região entre 420 a 480 nm (WOOD *et al.*, 2001).

O sistema conjugado completo em compostos insaturados e anéis aromáticos é denominado cromóforo. Quando dois ou mais grupamentos cromóforos estão próximos, seus estados eletrônicos excitados podem interagir. Quando a distância intermolecular torna-se muito próxima, os níveis de energia das moléculas individuais são perturbados e as propriedades espectrais podem ser alteradas (EWING, 2013).

3.6.2.1 Fotoquímica e Fotofísica de Carotenoides

Como consequência natural do aspecto mecânico-ondulatório da matéria, átomos e moléculas só podem existir a determinados níveis de energia. Tais níveis (estados eletrônicos) são subdivididos em níveis de energia vibracional e estes, por sua vez, podem passar por uma transição para estados excitados de maior energia, ao absorver radiação (LAKOWICZ, 2006).

A estrutura eletrônica descreve a distribuição de elétrons na molécula. Elétrons deslocalizados em orbitais de baixa energia (π) e elevada energia (π^*) formados a partir de uma combinação de orbitais atômicos $2p_z$ são importantes na determinação de propriedades fotoquímicas de polienos e carotenoides.

A energia radiante ou radiação eletromagnética pode interagir com as moléculas de várias maneiras diferentes dependendo de sua energia. Quando a energia do fóton é muito baixa, na região das ondas de rádio, por exemplo, há uma interferência apenas com as propriedades magnéticas do núcleo ou elétron, caracterizando uma transição magnética. Se energia do fóton é mais elevada, como as da sub-região do infravermelho distante, há uma interferência com os movimentos rotacionais das moléculas. Aumentando-se ainda mais a energia dos fótons de radiação passa-se a interferir com a vibração das moléculas. Este tipo de transição ocorre na região do infravermelho.

Uma mudança no estado eletrônico de uma molécula é conhecida como transição eletrônica, a qual é normalmente ocasionada por processos radiativos, nos quais a energia dos fótons é ainda mais elevada (regiões do visível e do ultravioleta) e promove a elevação de um ou mais elétrons a níveis energéticos chamados de excitação. As moléculas ou átomos tornam-se excitados, ou seja, apresentam um conteúdo energético superior ao normal. Como um sistema é tanto mais estável quanto menor for o seu conteúdo energético, o sistema adquire certa instabilidade momentânea. Os elétrons ao voltarem aos seus níveis normais de energia, que correspondem aos orbitais mais próximos do núcleo (estado fundamental), liberam o excesso de energia em geral sob duas formas: calor e/ou fluorescência ou fosforescência. Os carotenoides são geralmente considerados como não fluorescentes, embora alguns grupos sejam apontados por exibirem uma emissão muito fraca com um rendimento quântico de fluorescência muito baixo de $\sim 3 \times 10^{-5}$. Outra característica importante da fotofísica de carotenoides e polienos é a aparente ausência de relatos de fosforescência (HARRY *et al.*, 2008).

Para carotenoides, o estado fundamental corresponde a um estado singleto (S_0) e os estados excitados produzidos normalmente também são estados singletes (S_1 , S_2 , etc.) (HARRY *et al.*, 2008).

A excitação eletrônica provoca uma reorganização dos elétrons da molécula, por isso a distribuição dos elétrons no estado excitado difere da distribuição no estado fundamental. Os estados excitados podem possuir tempos de vida extremamente curtos e podem ser desativados por algum caminho fotofísico ao estado fundamental ou sofrer uma reação química e formar novas espécies (FORMOSIN, 1972).

A absorção de radiação ocorre em tempos da ordem de 10^{-15} segundos. Após a absorção, diferentes transições podem ocorrer entre os diferentes níveis de energia. Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão são ilustrados pelo diagrama de Jablonski (Figura 6). Tais diagramas existem em uma variedade de formas e ilustram os vários processos moleculares que ocorrem em estados excitados.

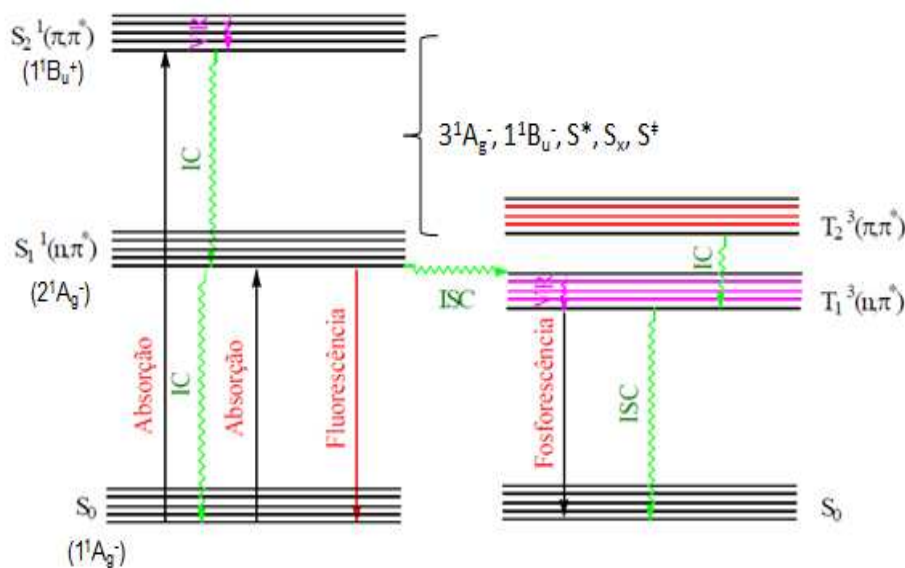


Figura 6. Diagrama de níveis de energia usado para descrever muitos dos foto processos que os carotenoides e polienos podem sofrer, envolvendo seus estados singlete e tripleto; ab: absorção; ic: conversão interna; fl: fluorescência; isc: cruzamento intersistema. Fonte: GILBERT e BAGGOT (1991) (adaptado).

No diagrama de níveis de energia, três estados eletrônicos são retratados: o estado fundamental, S₀, designado como 1¹A_g⁻; estado S₁, designado como 2¹A_g⁻; e estado S₂, designado como 1¹B_u⁺. As mudanças de estado eletrônico (transições eletrônicas) em carotenoides tipicamente envolve a promoção de um elétron de um orbital π de baixa energia para um orbital π* de elevada energia ou vice-versa.

Após a absorção da radiação, vários processos podem ocorrer, uma vez que à molécula é permitido estar em níveis vibracionais mais altos, em um mesmo nível eletrônico S₁ ou S₂. Ocorre então a relaxação para o nível vibracional de menor energia, relaxação vibracional (VR), ainda neste mesmo nível eletrônico, em um tempo da ordem de 10^{-12} segundos. Como o tempo de vida médio de um estado eletrônico excitado é da ordem de 10^{-8} segundos, tal

processo de relaxação interna se completa antes da emissão fluorescente. São possíveis ainda, transições de um nível eletrônico para outro de menor energia através de processos não radiativos como colisões com moléculas do solvente. O processo de relaxação entre níveis eletrônicos excitados é denominado conversão interna (IC). Moléculas no estado eletrônico excitado, S_1 , também podem sofrer uma conversão para o primeiro estado tripleto, T_1 . Esta conversão é chamada cruzamento intersistema (ISC) (LAKOWICZ, 2006).

A transição $1^1A_g^- \rightarrow 1^1B_u^+$ ($S_0 \rightarrow S_2$) domina o espectro de absorção de polienos e carotenoides, estando relacionada com a forte absorção na região visível apresentada por estes compostos, a qual dá origem à sua coloração. Para carotenoides como betacaroteno e licopeno, por exemplo, os rendimentos quânticos de emissão $S_1 \leftrightarrow S_0$ são praticamente desprezíveis ($<10^{-5}$). Para polienos e carotenóides de cadeia longa, outros estados excitados provavelmente situam-se entre os estados $2^1A_g^-$ e $1^1B_u^+$ ($S_1 \rightarrow S_2$) (HARRY *et al.*, 2008).

A longa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas, característica dos carotenoides, torna-os susceptíveis à isomerização geométrica. Tipicamente o isômero geométrico *all-trans* dos carotenoides é a configuração mais favorável termodinamicamente, mas estereoisômeros estáveis *cis* também podem ser produzidos a partir de isômeros *all-trans* por processos térmicos, fotoquímicos e catalíticos. A posição e a forma da banda de absorção no visível são sensíveis ao tamanho da cadeia conjugada de elétrons- π e à presença de grupos funcionais em sua estrutura. Assim, a espectroscopia de absorção é frequentemente utilizada para identificar as estruturas dos carotenoides. A espectroscopia de absorção também confirma a presença de isômeros geométricos através do surgimento de uma outra banda de absorção na região do ultravioleta (~ 340 nm), cuja intensidade é sensível à posição de uma dupla ligação *cis* na cadeia conjugada de elétrons- π . Esta banda de pequeno comprimento de onda é referida como “pico *cis*” e está associada com uma transição $S_0 (1^1A_g^-) \rightarrow S_3 (1^1A_g^+)$, que se torna mais permitida quando a simetria da molécula é reduzida mediante isomerização de uma configuração *trans* para uma configuração *cis*. Os isômeros *all-trans* possuem picos *cis* muito pequenos, algumas vezes até imperceptíveis. Ao contrário, isômeros *cis* possuem picos *cis* que podem apresentar uma intensidade de absorção

próxima à metade daquela correspondente a banda de absorção máxima na região visível do espectro eletrônico (DARIUSZ *et al.*, 2009).

De acordo com Hudson *et al.* (1982) citados por Harry (2008), os espectros de absorção associados às transições $S_0 \rightarrow S_2$ de carotenoides são influenciados pelo solvente. A interação entre o solvente e o grande momento de dipolo associado a esta transição pode deslocar os perfis espectrais. As energias de transição $S_1 \leftrightarrow S_0$ de carotenoides não são tão fortemente afetadas por mudanças do solvente devido ao pequeno momento de dipolo associado a esta transição. Assim, alterações espectrais devidas ao solvente envolvendo transições $S_1 \leftrightarrow S_0$ são menores que aquelas associadas a transições $S_0 \leftrightarrow S_2$.

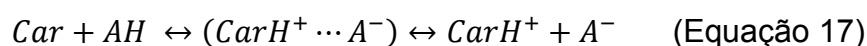
3.6.2.2 Estabilidade do Betacaroteno

Uma série de problemas de estabilidade deve ser superada antes que os carotenoides possam ser utilizados com êxito como aditivos alimentares, uma vez que, estes compostos quando colocados em matrizes alimentícias são menos estáveis que aqueles que ocorrem naturalmente em tecidos vegetais (BRITTON, 1995; POLYAKOV *et al.*, 2006).

A degradação oxidativa do betacaroteno, por exemplo, influencia negativamente a qualidade dos produtos no qual este carotenoide está presente e, conseqüentemente, a aceitação do consumidor (MAO *et al.*, 2009). A susceptibilidade oxidativa de betacaroteno na matriz alimentícia é dependente do seu ambiente molecular e interações com componentes presentes, tais como moléculas pro-oxidantes e antioxidantes (CHAIYASIT *et al.*, 2007; BONNAIRE *et al.*, 2008; BOON *et al.*, 2010).

Um exemplo da susceptibilidade oxidativa do betacaroteno é a presença de metais de transição tais como ferro e cobre (pro-oxidantes) que aceleram a degradação do betacaroteno. Este fato pode ser minimizado pela presença de agentes quelantes como EDTA e desferroxamina (KLINKESORN *et al.*, 2005; BOON *et al.*, 2010). A adição de antioxidantes, tais como ácido ascórbico, compostos fenólicos e α -tocoferol, que promovem a eliminação de radicais livres, também previne a degradação do betacaroteno (GUNASEELAN *et al.*, 2006; KATSUDA *et al.*, 2008; BOU *et al.*, 2011).

O pH do sistema é outro fator que pode influenciar a estabilidade do betacaroteno na matriz alimentícia. Tem sido relatado que a degradação iniciada por agentes pro-oxidantes, tais como o ferro, um mineral comumente presente em alimentos que tem sido relatado como um agente de degradação do betacaroteno, pode ser acelerada a valores baixos de pH, devido à maior solubilidade do ferro nestas condições (RIBEIRO et al., 2003; KISPERT e POLYAKOV, 2010). A exposição do betacaroteno a ácidos também pode produzir pares de íons deste carotenoide ($CarH^+ \cdots A^-$), os quais podem então dissociar para formar um carbocation carotenoide ($CarH^+$), como mostrado na equação 17



A interação entre o betacaroteno e agentes emulsificantes pode promover uma barreira física e eletrostática para os metais de transição e outros agentes pro-oxidantes presentes na matriz alimentícia, os quais poderiam afetar a estabilidade do betacaroteno (FARAJI *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2010). As proteínas do leite, como as proteínas do soro e as caseínas são muitas vezes utilizadas como agentes emulsionantes em alimentos e podem inibir a oxidação, impedindo a penetração de pro-oxidantes no complexo formado entre estas proteínas e o betacaroteno (LIVNEY, 2010).

Bonnie e Choo (1999) sugeriram que o tratamento térmico de carotenoides, na presença de oxigênio também resulta na formação de compostos de degradação voláteis e não voláteis. Kanasawud e Crouzet (1990) avaliaram a formação de compostos voláteis formados a partir da degradação térmica do betacaroteno em solução aquosa, que constitui um modelo mais representativo das condições encontradas em produtos vegetais, do que soluções orgânicas geralmente utilizadas. A cinética de degradação química do betacaroteno seguiu uma relação de ordem zero e após 3 horas de tratamento térmico a 97 °C, na presença de oxigênio, houve 70% de degradação do betacaroteno e foram identificados 24 compostos voláteis principais por meio de cromatografia gasosa. As quantidades dos principais componentes identificados aumentaram quando o conteúdo de oxigênio molecular do sistema foi aumentado. Por outro lado, num meio saturado em nitrogênio, somente concentrações muito baixas de compostos voláteis foram encontradas. Estes resultados indicaram que o oxigênio é o fator determinante

na degradação do betacaroteno submetido a tratamento térmico. O tratamento térmico a 97 °C durante 3 horas também produziu 4 compostos de degradação não voláteis. Em tratamento térmico de 30 °C durante 3 horas somente um composto volátil foi produzido e a maior parte dos outros compostos começaram a aparecer somente quando as temperaturas atingiram 50 °C e acima desta temperatura a produção de compostos voláteis aumentou.

A exposição à luz é um outro fator que promove a degradação de carotenoides e vários mecanismos de ação têm sido propostos. A foto oxidação produz diferentes espécies de degradação (MORTENSEN e SKIBSTED, 1996; KONOVALOVA *et al.*, 2001).

Estudos de Fotólise por Pulso de Laser realizados por Mortensen e Skibsted (1996) produziram resultados que sugerem que a rápida degradação da cor do betacaroteno em alguns solventes, tais como clorofórmio, pode ocorrer devido excitação das moléculas de betacaroteno quando estas absorvem a energia radiante e posterior reação destas moléculas com as moléculas do solvente (clorofórmio neste caso) para formar radicais livres carotenoide-solvente ou radicais betacaroteno. O mesmo trabalho mostrou ainda que as moléculas de betacaroteno no estado excitado podem retornar ao estado fundamental, onde podem ser atacadas por radicais formados durante a reação destas moléculas com as moléculas do solvente.

A foto sensibilidade de alimentos pode ser influenciada por vários fatores como concentração de oxigênio no espaço superior da embalagem e no produto, permeabilidade da embalagem do produto ao oxigênio, temperatura de armazenamento do produto, tempos de exposição à luz, intensidade da luz incidente, distância entre o produto, fonte luminosa, entre outros (LIN e CHEN, 2005; LIMBO *et al.*, 2007; FERREIRA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008), estudaram a degradação à luz do betacaroteno e licopeno, ambos carotenoides, em sistemas modelos de baixa umidade (simulando alimentos desidratados), sistemas modelos aquosos (simulando sucos) e em goiaba liofilizada, por meio da técnica de espectrofotometria de UV-vis. Para os sistemas modelos de baixa umidade, os carotenoides foram impregnados em suportes sólidos (amido de milho, fécula de batata e celulose micro cristalina), sob atmosfera modificada e para os

sistemas modelos aquosos, os carotenoides foram dispersos em água destilada, também sob atmosfera modificada.

Os autores verificaram que a degradação de ambos os carotenoides seguiu uma relação de primeira ordem para todas as condições estudadas e que o licopeno degradou muito mais rapidamente que o betacaroteno em todos os sistemas modelos. O betacaroteno se mostrou mais estável em relação ao licopeno, uma vez que perdas de 65% a 92% ocorreram após 20 dias, dobro de tempo de armazenamento do licopeno.

Em relação aos suportes sólidos utilizados, o licopeno degradou menos em celulose micro cristalina (95%, m/v) e a degradação do betacaroteno foi menor em amido de milho (70%, m/v). Por outro lado, a degradação de ambos os carotenoides foi menor nos sistemas modelos aquosos em relação aos sistemas modelos de baixa umidade, tendo sido de 89% para o licopeno e 65% para o betacaroteno. A degradação do betacaroteno e licopeno em goiaba liofilizada, por sua vez, foi menor em comparação a degradação em todos os sistemas modelos estudados, o que demonstrou que outros constituintes presentes na matriz dos alimentos podem exercer um efeito protetor sobre os carotenoides, influenciando a sua taxa de degradação.

Os autores determinaram ainda as constantes de degradação a partir de gráficos de cinética de degradação de primeira ordem e os tempos de meia-vida (tempos necessários para que a quantidade de determinado composto seja reduzida à metade) para os carotenoides ao longo do tempo de exposição à luz (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de degradação à luz de licopeno e betacaroteno em sistemas modelos e goiaba liofilizada.

Matriz/carotenoide	K_d (d⁻¹)	t_{1/2} (d)	R²
Amido de Milho			
Licopeno	0,385	1,8	0,95
Betacaroteno	0,061	11,0	0,99
Fécula de batata			
Licopeno	0,381	1,8	0,99
Betacaroteno	0,110	6,3	0,97

Celulose micro cristalina			
Licopeno	0,295	2,4	0,97
Betacaroteno	0,128	5,4	0,93
Sistema aquoso			
Licopeno	0,218	3,2	0,98
Betacaroteno	0,053	13,1	0,95
Goiaba liofilizada			
Licopeno	0,074	9,4	0,94
Betacaroteno	0,062	11,2	0,90

Fonte: FERREIRA e RODRIGUEZ-AMAYA (2008).

Nos sistemas modelos, o licopeno apresentou tempos de meia-vida mais curtos no amido de milho e fécula de batata (1,8 dias em ambos os casos). Já o betacaroteno apresentou tempo de vida mais curto em celulose micro cristalina (5,4 dias). Os tempos de meia-vida para ambos os carotenoides foi maior em goiaba liofilizada, em relação aos sistemas modelos, devido ao efeito protetor da matriz do alimento.

Lin e Chen (2005) estudaram a influência da temperatura, oxigênio e luz na estabilidade química de três carotenoides, incluindo o betacaroteno, presentes em suco de tomate processado, durante estocagem por 12 semanas, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Amostras de suco de tomate processado foram acondicionadas em frascos de vidro transparentes, frascos de vidro recobertos com papel alumínio (controle) e latas e submetidas a três temperaturas diferentes (4 °C, 25 °C e 35 °C). A partir das análises destas amostras os autores identificaram diferentes isômeros dos carotenoides estudados. Tipicamente o isômero geométrico *all-trans* dos carotenoides é a configuração mais favorável termodinamicamente, mas estereoisômeros estáveis *cis* também podem ser produzidos a partir de isômeros *all-trans*. Para o betacaroteno foram identificados seis isômeros – *all-trans*, *di-cis*, *9-cis*, *13-cis*, *15-cis*, *di-cis* e *cis-β-caroteno*.

Após armazenamento durante 12 semanas no escuro (frascos recobertos com papel alumínio), os níveis de betacaroteno diminuiram 4,69, 4,87 e 5,71 µg/g a 4 °C, 25 °C e 35 °C, respectivamente. A 4 °C os isômeros *9-cis* e *13-cis* apresentaram aumento nas duas primeiras semanas e após esse período começaram a declinar. Em contraste, *15-cis* e *di-cis-β-caroteno* diminuiram com o aumento do período de estocagem e completa perda foi

encontrada após 12 semanas para a forma 15-cis- β -caroteno e 4 semanas para di-cis- β -caroteno. A 25°C, nenhum 13-cis, di-cis e cis- β -caroteno foi detectado em 3 semanas, enquanto 9-cis e 15-cis não foram identificados em 7 e 12 semanas, respectivamente. Posteriormente houve novamente formação de cis, 9-cis e 13-cis- β -caroteno após 4, 9 e 10 semanas, respectivamente, os quais após este período voltaram a declinar. Resultado semelhante a este foi encontrado a 35 °C, em que ocorreu completa degradação das formas cis, 13-cis, 15-cis e di-cis- β -caroteno em 5, 6, 7 e 3 semanas, respectivamente. Após 10 semanas a forma 13-cis- β -caroteno foi novamente formada e em seguida caiu drasticamente. Estes resultados mostraram que para o betacaroteno no escuro tanto a isomerização quanto a degradação ocorreram simultaneamente.

Sob exposição à luz, a degradação das formas all-trans e cis do betacaroteno ocorreu mais rapidamente do que a isomerização, e de forma mais acentuada em relação ao escuro. A 4°C, nas primeiras 6 semanas os níveis de all-trans- β -caroteno diminuíram de 5,46 $\mu\text{g/g}$, seguido por uma ligeira mudança, enquanto a 25 °C e 35 °C ocorreram quedas de 4,80 e 5,02 $\mu\text{g/g}$ para esta forma nas primeiras 3 semanas. A 4 °C, para os isômeros cis, os níveis de 9-cis- β -caroteno subiram nas primeiras semanas e em seguida caíram, a 4 °C. Por outro lado, os outros isômeros cis mostraram uma tendência declinante e a degradação completa dos isômeros 13-cis, 15-cis, cis e di-cis- β -caroteno ocorreu, respectivamente, em 4, 7, 3 e 3 semanas. Resultados semelhantes foram encontrados a 25 °C e 35 °C e maioria dos isômeros cis foi completamente degradada a 35 °C depois de 3 semanas.

Com relação ao suco armazenado em latas, a temperaturas mais elevadas ocorreu uma degradação mais rápida dos isômeros. Entretanto, em comparação com o armazenamento no escuro, a maioria dos isômeros cis do betacaroteno ocorreu em níveis mais baixos, o que pode ser devido ao fato de que o acondicionamento em lata proporciona um ambiente mais escuro e exclui a exposição ao ar. Após armazenamento durante 12 semanas, as quantidades de all-trans- β -caroteno diminuíram 3,36, 3,48 e 4,16 $\mu\text{g/g}$ a 4 °C, 25 °C e 35 °C, respectivamente. Com relação aos isômeros cis, a 4 °C ocorreram menores alterações, porém à temperaturas mais elevadas maior degradação foi observada. Com exceção do isômero 15-cis- β -caroteno, foi observada uma perda completa de di-cis, 9-cis, cis e 13-cis- β -caroteno após 4, 6, 10 e 5

semanas, respectivamente, a 25°C. A 35°C a perda completa ocorreu em 3, 4, 10 e 3 semanas para estes isômeros.

De forma semelhante aos resultados obtidos para o betacaroteno, maiores temperaturas de estocagem facilitaram a degradação química dos isômeros dos outros dois carotenoides estudados, licopeno e luteína. Entretanto o licopeno foi mais suscetível à degradação química em relação ao betacaroteno e luteína e apresentou maior formação de isômeros. Os três carotenoides apresentam o mesmo número de duplas ligações conjugadas (11 duplas ligações), porém, somente betacaroteno e luteína exibem anéis ionona em sua estrutura. Segundo Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008), o fato de duas duplas ligações estarem presentes nos anéis ionona tanto no betacaroteno quanto na luteína e, portanto, fora do plano de duplas ligações da cadeia poliênica, aparentemente reduz mais a reatividade destes carotenoides em relação ao licopeno.

A presença de oxigênio influenciou a degradação química dos carotenoides estudados frente à luz, uma vez que, estes sofreram uma degradação mais rápida nas amostras controle em relação às amostras acondicionadas em latas onde não havia exposição ao oxigênio atmosférico.

Limbo et al. (2007) estudando mudanças induzidas pela luz em sistemas aquosos de betacaroteno estocados sob lâmpadas fluorescentes e de halogênio a duas pressões parciais de oxigênio, encontraram que o betacaroteno foi degradado durante o armazenamento mesmo a baixas pressões de oxigênio (5 kPa), porém de forma mais lenta em relação a pressão de oxigênio mais elevada (20 kPa). Estes autores também constataram que o tipo de lâmpada utilizado influenciou mais ou menos a degradação do betacaroteno. A lâmpada de halogênio teve menor influência sobre a degradação enquanto as lâmpadas fluorescentes resultaram em maior degradação.

3.6.3 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura

A desnaturação de proteínas é um processo que envolve mudanças em sua estrutura tridimensional sem envolver quebra de ligações peptídicas. A desnaturação devida à temperatura é afetada principalmente pela estabilidade

de interações intra e intermoleculares determinadas por forças moleculares como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e repulsão eletrostática. Além das forças moleculares, a entropia conformacional também desempenha importante papel na determinação do efeito líquido de desnaturação de proteínas (DAMODARAN *et al.*, 2008).

A transição térmica das proteínas do soro de leite ocorre na faixa de temperatura de 62 – 78 °C. A temperaturas maiores que 60 °C ocorre o desdobramento irreversível destas proteínas. As mudanças conformacionais da BSA, por exemplo, são reversíveis entre 42 °C e 50 °C, mas o desdobramento das alfa-hélices de BSA é irreversível entre 52 °C e 60 °C (CONSIDINE *et al.*, 2007). O desdobramento de proteínas do soro de leite devido à temperatura é considerado um processo endotérmico, uma vez que requer o fornecimento de energia na forma de calor para que ocorra e pode ser monitorado por meio da calorimetria diferencial de varredura, técnica que fornece diretamente os dados de variação de entalpia e temperatura associados ao desdobramento (PAULSSON e DEJMEK, 1990).

A nanocalorimetria diferencial de varredura (nano-DSC, do inglês differential scanning nanocalorimetric) é uma técnica muito utilizada em estudos de transições ou processos que são induzidos pela alteração da temperatura. O nanocalorímetro diferencial de varredura é capaz de medir a quantidade de calor absorvida ou liberada por soluções diluídas de biomoléculas quando elas são aquecidas ou resfriadas. A análise de estabilidade proteica envolve a determinação de mudanças no calor específico parcial molar da proteína sob pressão constante. A técnica também pode ser usada para caracterizar a estrutura da macromolécula e investigar a interação entre proteínas e diferentes ligantes (TA INSTRUMENTS, 2015).

Em um experimento típico de nano calorimetria diferencial de varredura envolvendo uma macromolécula como uma proteína, a variação do calor específico da macromolécula em solução é plotada como uma função da temperatura (Figura 7). O perfil experimental obtido compreende a linha base antes do desdobramento, o desdobramento endotérmico e a linha base após o desdobramento. A linha base antes do desdobramento corresponde à diferença entre os calores específicos da proteína na conformação nativa e do solvente, enquanto a linha base após a transição corresponde à diferença entre os

calores específicos da proteína na conformação desdobrada e do solvente (PAGANO *et al.*, 2013).

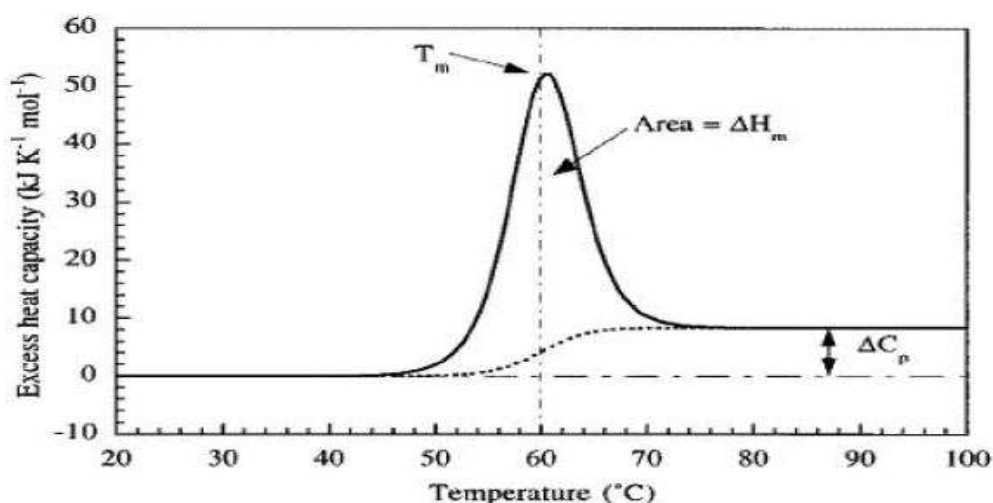


Figura 7. Termograma obtido em experimentos de nano DSC mostrando mudanças no calor específico em função da temperatura. Fonte: BRUYLANTS *et al.* (2005).

A temperatura correspondente ao pico máximo da curva de calor específico *versus* temperatura é a temperatura média de transição (T_m), que geralmente corresponde à temperatura de desnaturação no caso de proteínas, onde as concentrações de proteína nas conformações nativa e desnaturada são iguais. A integração da área sob a curva fornece diretamente a variação da entalpia de desnaturação (equação 18) (PAGANO *et al.*, 2013):

$$\Delta_{des}H(T_m) = \int_{T_i}^{T_f} C_p dT \quad (\text{Equação 18})$$

onde $\Delta_{des}H$ é a variação da entalpia de desnaturação; C_p é o calor específico para o processo de desdobramento.

A estabilidade térmica de uma proteína na presença de um ligante depende da interação preferencial deste último com os estados nativo ou desdobrado da proteína. Se o ligante interage preferencialmente com o estado nativo da proteína, confere estabilização térmica para o biopolímero. No entanto, se o ligante interage preferencialmente com o estado desnaturado da proteína, conduz a uma redução da temperatura de transição térmica do biopolímero (COOPER 1999; BRUYLANTS *et al.*, 2005; CELEJ *et al.*, 2005).

Celej *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade térmica da BSA em pH 7,2, na presença de derivados de anilinoftaleno sulfonado (ácido 8-anilinoftaleno-

1-sulfônico, 1,8-ANS; e ácido 6-anilinoftaleno-2-sulfônico, 2,6-ANS), que são corantes frequentemente utilizados como sondas fluorescentes na determinação de mudanças conformacionais e identificação de sítios hidrofóbicos em proteínas, por exemplo. Eles observaram que a interação de ambos os derivados, 1,8-ANS e 2,6-ANS, aumentaram a estabilidade térmica da BSA, porém o 1,8-ANS teve maior efeito sobre esta estabilidade. Na ausência dos ligantes a BSA apresentou uma temperatura média de transição (T_m) de 59 °C e variação de entalpia de desnaturação ($\Delta_{desn}H$) de 134 kcal/mol. O 1,8-ANS promoveu aumento de 18,7 °C na T_m e de 132 kcal/mol na variação da entalpia de desnaturação ($\Delta_{desn}H$) em relação à BSA pura. Já o 2,6-ANS produziu aumento de 12,3 °C na T_m e 115 kcal/mol na $\Delta_{desn}H$, nas mesmas condições. Maiores concentrações de ambos os corantes também resultaram em maiores T_m e $\Delta_{desn}H$.

Com base nestes resultados, os autores afirmaram que a interação dos corantes com a proteína em sua conformação nativa é predominante. Espectros de fluorescência de ambos os corantes na presença de BSA a 25 °C e 90 °C e em solução tampão-fosfato 100 mM, pH 7,2, apenas a 90 °C foram obtidos com o objetivo de verificar se realmente não ocorria nenhuma interação dos corantes com a proteína em sua conformação desdobrada. Os resultados mostraram que acima da T_m não houve diferença nos espectros de fluorescência dos corantes na presença de BSA desnaturada e de solução tampão apenas. Estes resultados confirmaram que a interação dos corantes com a proteína em sua conformação desdobrada é desprezível nas condições estudadas.

A interação de ligantes com proteínas pode ainda modificar suas estruturas secundária e terciária, promovendo alterações em sua conformação e, uma vez que a desnaturação é um processo cooperativo, toda a cadeia polipeptídica pode ser desnovelada (FREIRE e MURPHY, 1991; RAJENDIRAN e THULASIDHASAN, 2015)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Beta-caseína ($\geq 98\%$ pureza), Albumina Sérica Bovina ($\geq 98\%$ pureza), Betacaroteno ($\geq 93\%$ pureza) e Dimetilsufóxido ($\geq 99,5\%$), foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich. Fosfato de sódio monobásico P.A monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\geq 98\%$ pureza, Vetec Química Fina Ltda.), fosfato de sódio bibásico anidro P. A (NaHPO_4 , $\geq 99\%$ pureza, Impex), cloreto de sódio P.A (NaCl , $\geq 99\%$ pureza, Vetec Química Fina Ltda.), citrato de sódio tribásico P.A ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$ pureza, Impex), ácido cítrico P.A ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$ pureza, Dinâmica Química contemporânea Ltda.). Azida sódica P.A (NaN_3 , $\geq 99\%$ pureza, Impex) foram utilizados no preparo das soluções-tampão.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (cmc) da β -caseína

Foram preparadas soluções de β -CN em concentrações variando de $4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (abaixo da cmc) até $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (acima da cmc) em solução de tampão fosfato, pH 7,0, força iônica 0,1 M. A cada uma destas soluções foram adicionadas alíquotas de 50 μL de uma solução estoque de pireno 94,95 μM em etanol. Os espectros de fluorescência do pireno em concentrações crescentes de β -CN foram obtidos em espectrofluorímetro (CaryEclipse Fluorescence, Agilent). O comprimento de onda de excitação foi 335 nm (abertura de fenda de 5 nm) e as bandas de emissão de fluorescência foram obtidas entre 360 e 420 nm (abertura de fenda de 1,5 nm). Todas as leituras foram realizadas a 25 °C, em duplicata.

4.2.2 Espectroscopia de Fluorescência

Inicialmente foram preparadas soluções de BSA e BSA desnaturada, na concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 0,1 M e em tampão citrato-ácido cítrico pH 5,0. A BSA foi desnaturada em um banho

ultra termostático por meio do tratamento térmico a 80 °C durante 10 minutos. As soluções de β -CN foram preparadas somente em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 0,1 M, na concentração $4,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (acima da cmc). Uma solução estoque de betacaroteno foi preparada na concentração de 1×10^{-5} mol.L⁻¹ em dimetilsulfóxido. A fluorescência intrínseca da proteína foi medida mantendo sua concentração constante (2×10^{-6} mol.L⁻¹) e variando a concentração de betacaroteno de 5×10^{-8} a 1×10^{-6} mol.L⁻¹, utilizando espectrofluorímetro (CaryEclipse Fluorescence, Agilent). Todas as amostras foram preparadas sob vácuo para evitar a degradação oxidativa do corante e a porcentagem de DMSO (v/v) nas amostras não excedeu 6% (SHAPIRA *et al.*, 2010). Os espectros de emissão foram registrados de 281 a 450 nm (com comprimento de onda de excitação de 280 nm), em cinco temperaturas (20, 25, 37, 45 e 55°C).

Para confirmar o mecanismo de supressão, os dados de supressão de fluorescência para a BSA em pH 7,0 foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (Equação 19).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (\text{Equação 19})$$

onde F_0 e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; K_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de meia vida da molécula sem nenhum supressor e o tempo de meia vida do polímero é 10^{-8} s (CHENG, 2012); $[Q]$ é a concentração do supressor; K_{SV} é constante de supressão de Stern-Volmer.

Uma vez que o mecanismo de supressão foi estático, o número de sítios de interação para o corante na molécula de proteína (n), bem como a constante de interação entre as duas espécies estudadas (K_a), foram obtidos pela equação 20 (LAKOWICZ, 2006):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (\text{Equação 20})$$

Os valores de n representam a inclinação da reta e os valores de $\log K_a$ representam o intercepto da equação de regressão linear de $(F_0 - F)/F$ versus $[Q]$ (Figura 8).

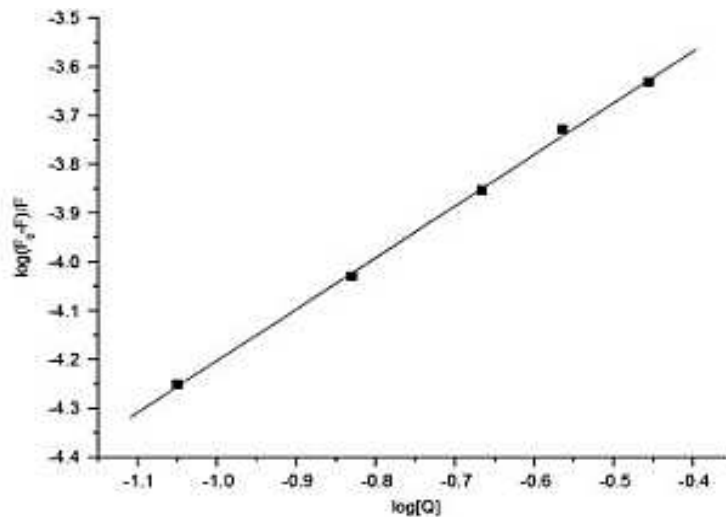


Figura 8. Log (F₀-F/F) versus [Q]. Fonte: ZHANG *et al.* (2011).

A variação de entalpia padrão de formação de complexo foi obtida utilizando a aproximação de Van't Hoff, através da equação 21 (PAN *et al.*, 2011):

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H}{R} \quad (\text{Equação 21})$$

onde K₁ e K₂ são as constantes de interação para as temperaturas 1 e 2, respectivamente; R é a constante universal dos gases ideais (R = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹); e T é a temperatura (Kelvin)

O valor de ΔH° de formação de complexo foi obtido a partir da inclinação da curva ln K x 1/T, conforme mostra a Figura 9.

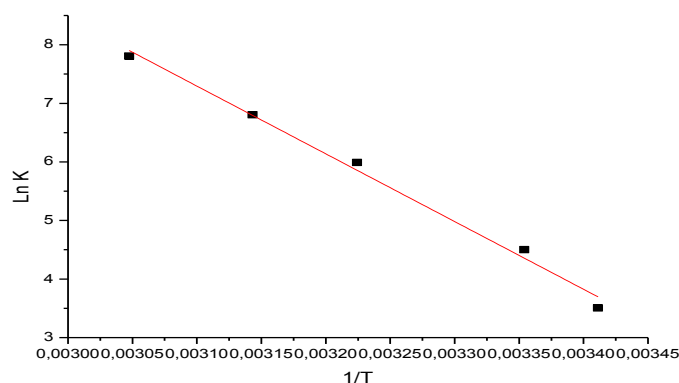


Figura 9. Ln K versus 1/T.

Os valores da variação da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo foram obtidos a partir da equação 22:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (\text{Equação 22})$$

Os valores de ΔG° e ΔH° foram utilizados para obter $T\Delta S^\circ$ a partir da equação 23:

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 23})$$

4.2.3 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura

A fim de verificar se a interação do betacaroteno ocasiona alguma mudança conformacional na BSA, termogramas de nano DSC para a BSA foram obtidos na presença e na ausência deste corante. Para isso, inicialmente foram preparadas as soluções de BSA na concentração de 2×10^{-6} mol.L⁻¹, em tampão fosfato pH 7,0, força iônica 0,1 M e em tampão citrato-ácido cítrico pH 5,0. Uma solução estoque de betacaroteno foi preparada na concentração de 1×10^{-5} mol.L⁻¹ em dimetilsulfóxido. A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções de betacaroteno em BSA em concentrações variando de 5×10^{-8} a 1×10^{-6} mol.L⁻¹, sob vácuo. As amostras foram então analisadas em um nano calorímetro diferencial de varredura (Nano DSC 6300-A – TA instruments, USA). para determinar a variação na taxa de fluxo de calor entre a amostra (solução de proteína adicionada de corante) e a referência (solução de proteína) em função do tempo e temperatura. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 20 a 110 °C sob pressão constante de 3 atm e taxa de aquecimento 1 °C/min.

4.2.4 Estabilidade Química do Betacaroteno à Luz

No teste de estabilidade à luz, foram preparadas amostras de betacaroteno em solvente (tampão fosfato pH 7,0:DMSO, 1:9), volume final de 10 mL, na ausência das proteínas β -CN e BSA (controle) e na presença de diferentes concentrações de BSA (1×10^{-6} , 3×10^{-6} e 5×10^{-6} mol L⁻¹) e concentrações de β -CN abaixo da cmc (4×10^{-6} mol L⁻¹), na cmc (2×10^{-5} mol L⁻¹) e acima da cmc (4×10^{-5} mol L⁻¹). As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, sob vácuo, e estas foram colocadas em uma câmara de luz, sob incidência de duas lâmpadas fluorescentes (correspondente à luz do dia), a temperatura de 25 ± 2 °C (Barros, 2006), como mostra a Figura 10.



Figura 10. Amostras de betacaroteno na câmara de luz.

Foram realizadas varreduras destas amostras na faixa de comprimento de onda de 190 a 900 nm, nos tempos 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 e 3,5 horas utilizando-se um espectrofotômetro Uv-vis. As análises foram realizadas em triplicata. A partir dos dados de absorvância obtidos para as amostras ao longo do tempo de exposição à luz, foram determinados valores da constante de degradação e tempo de meia-vida do corante, que são parâmetros utilizados para estimar a estabilidade do corante ante a incidência a luz. Uma vez que a degradação do corante seguir uma relação de primeira ordem, estes parâmetros podem ser obtidos a partir das equações 24 e 25 (Oliveira, 2011):

$$\ln \frac{ABS_f}{ABS_0} = -K_d t \quad (\text{Equação 24})$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (\text{Equação 25})$$

onde ABS_f é a absorvância no tempo final; ABS_0 é a absorvância no tempo 0; K_d é a constante de degradação; t é o tempo de estocagem; e $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espectroscopia de Fluorescência para Albumina Sérica Bovina

A Figura 11 mostra o espectro de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, na temperatura de 25°C, no valor de pH 7,0 (Figura 11A), bem como o gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, nestas mesmas condições (Figura 9B).

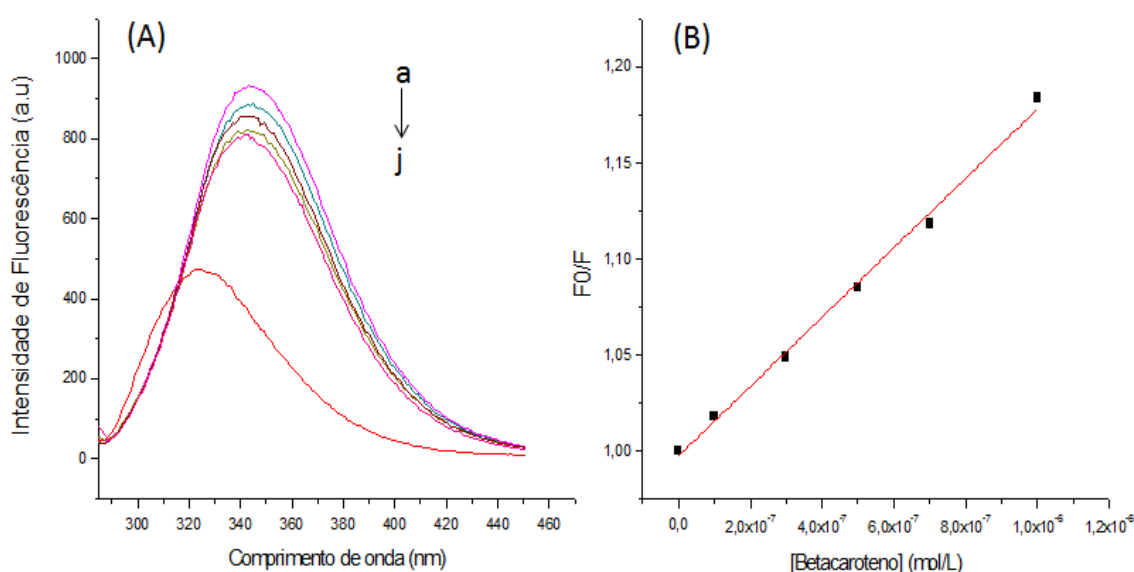


Figura 11. (A) Espectro de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0, $\lambda_{exc} = 280$ nm, $[BSA] = 2 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, a 25 °C. Curvas *a* → *j* correspondem a concentrações crescentes de betacaroteno: 0 a 1×10^{-6} mol L⁻¹; (B) Espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA induzida por concentrações crescentes de betacaroteno, em pH 7,0.

A BSA emite fluorescência especialmente em razão de dois resíduos de triptofano presentes em sua estrutura, um localizado no interior hidrofóbico (Trp 212) e outro localizado na superfície hidrofílica (Trp 134) da proteína. A partir da Figura 9 (A) pode ser observado que no pH 7,0, a 25 °C, a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de betacaroteno. Também pode ser notado que a interação da BSA com betacaroteno conduziu a um deslocamento das bandas de emissão máximas de fluorescência da proteína para a região espectral correspondente ao azul, especialmente a uma concentração mais elevada do corante (344,92 nm para

324,92 nm), o que sugere que o resíduo de Trp foi provavelmente levado a um ambiente mais hidrofóbico e a conformação da proteína foi alterada (XIE *et al.*, 2006). Este deslocamento também aponta para a formação de complexo entre a BSA e o betacaroteno. Resultados semelhantes foram encontrados para as demais temperaturas estudadas, neste valor de pH.

A Figura 12 mostra o espectro de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, na temperatura de 25 °C, no valor de pH 5,0 (Figura 12A), bem como o gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, nestas mesmas condições (Figura 12B).

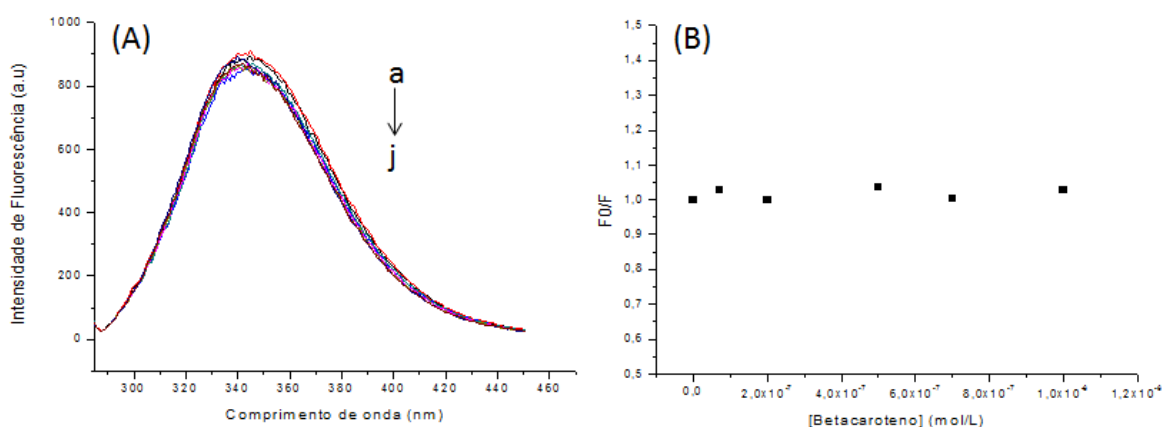


Figura 12. (A) Espectro de emissão de fluorescência da BSA na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 5,0, $\lambda_{exc} = 280$ nm, $[BSA] = 2 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, a 25 °C. Curvas a → j correspondem a concentrações crescentes de betacaroteno: 0 a 1×10^{-6} mol L⁻¹; (B) Espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA induzida por concentrações crescentes de betacaroteno, em pH 5,0.

No pH 5,0 praticamente não houve redução da intensidade de fluorescência da BSA com o aumento da concentração de betacaroteno e não houve deslocamento das bandas de emissão máximas de fluorescência. Resultados semelhantes foram encontrados para as demais temperaturas estudadas, neste valor de pH.

Em geral, com variações do pH do meio, albuminas podem sofrer alterações conformacionais. Esta característica é mais pronunciada na faixa de pH de 2 a 7. Próximo ao ponto isoelétrico (pI) (~5,0) a carga líquida da BSA é praticamente zero, então é formada uma fase mais contraída e rígida devida à

associações entre íons negativamente carregados (grupamentos carboxílicos) e íons positivamente carregados (grupamentos amino) no interior da cadeia polipeptídica da BSA. Desta forma, o volume de BSA na solução é bastante baixo mesmo a concentrações mais elevadas desta proteína. Em pH 5, como está próximo ao pI, a molécula de BSA está mais contraída e rígida e os grupamentos carregados menos acessíveis. Além disso, esta conformação favorece o aumento de interações hidrofóbicas entre segmentos da própria cadeia polipeptídica da proteína (KUN *et al.*, 2009). Estas características de conformação da BSA sugerem que a interação entre a proteína e o corante é menos favorável no pH 5,0 e, embora haja uma pequena interação, ela é praticamente constante.

Os valores de K_q e K_{SV} encontrados para a interação entre betacaroteno e BSA nas cinco temperaturas estudadas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação (n) para a interação betacaroteno-BSA, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	K_{sv} (L mol ⁻¹)	R ²	K_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_a (L mol ⁻¹)	n
β-caroteno - BSA	7,0	20	1,84x10 ⁵	0,9981	1,84x10 ¹³	3,71x10 ⁶	1,2011
		25	1,86x10 ⁵	0,9828	1,86x10 ¹³	1,19x10 ⁵	0,9724
		37	2,00x10 ⁵	0,9848	2,00x10 ¹³	1,58x10 ⁵	0,9734
		45	2,34x10 ⁵	0,9973	2,34x10 ¹³	8,43x10 ⁴	0,9290
		55	1,19x10 ⁵	0,9988	1,19x10 ¹³	4,20x10 ⁷	1,4210

Os resultados obtidos mostraram que embora os valores de K_{sv} aumentem ligeiramente com a temperatura, os valores para a constante de supressão bimolecular (K_q) foram muito maiores que a constante de difusão da biomolécula, indicando que o processo de supressão de fluorescência foi principalmente estático (HE *et al.*, 2011).

A supressão dinâmica e estática pode ser distinguida pela sua dependência com a temperatura. Em processos termodinâmicos exotérmicos, no caso de o mecanismo de supressão ser dinâmico, temperaturas mais elevadas resultam em difusão mais rápida da molécula supressora e,

consequentemente, em maior supressão, isto é, maiores valores de K_{sv} . Por outro lado, no caso de o mecanismo de supressão ser estático, os valores de K_{sv} diminuem com o aumento da temperatura e os valores de K_q são maiores que a constante de difusão da biomolécula ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (QIN *et al.*, 2007; ABOU-ZIED e AL-SHIHI, 2008).

Constantes de interação entre 10^3 e 10^4 L mol^{-1} são moderadas em relação à constantes de interação associadas a fortes complexos formados entre proteínas e ligantes, as quais variam entre 10^7 e 10^8 L mol^{-1} . Entretanto, constantes de interação menores ($10^3 - 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) foram encontradas para vários complexos proteína-ligante, utilizando técnicas espectroscópicas (CHENG, 2012). Os valores obtidos para a constante de interação (K_a) foram superiores a 10^4 para todas as temperaturas estudadas e oscilaram entre valores maiores e menores com o aumento da temperatura. Esta oscilação dos valores de K_a com o aumento da temperatura indica que a estrutura da BSA tem uma importante participação em sua interação com o corante. De acordo com os resultados obtidos, a constante de interação entre betacaroteno e BSA foi maior para a temperatura de 55°C , e este resultado possui implicações importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que sugere que esta seria a melhor temperatura de incorporação do corante na matriz alimentícia.

Os valores de n indicaram que para cada molécula de BSA, há uma molécula de betacaroteno interagindo, formando um complexo de estequiometria 1:1, conforme mostra a Figura 13.

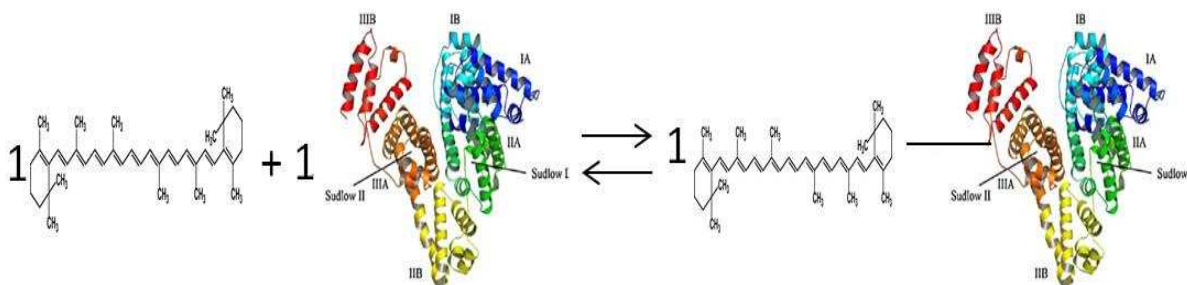


Figura 13. Representação da estequiometria de formação do complexo betacaroteno-BSA.

A interação entre corantes e proteínas podem incluir ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals (HU *et*

al., 2009). A determinação dos parâmetros termodinâmicos como a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°) de formação de complexo são importantes para elucidar as principais forças de interação que atuam para a formação do complexo betacaroteno-BSA. Os valores de ΔH° , ΔG° e $T\Delta S^\circ$ de formação de complexo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e BSA, em pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	ΔH° (kJ/mol)	R^2	ΔG° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$
β -caroteno - BSA	7,0	20	1,62	0,9897	-36,86	38,49
		25			-28,96	30,58
		37			-30,02	31,64
		45			-30,00	31,62
		55			-47,89	49,51

Os valores obtidos para ΔG° foram negativos para todas as temperaturas estudadas, o que indica que a interação entre betacaroteno e BSA é termodinamicamente favorável. Além disso, esta variável termodinâmica possui duas componentes, uma entálpica e outra entrópica, que podem contribuir para a sua redução. A variação de entalpia padrão de formação do complexo foi positiva indicando que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e BSA é entálpicamente desfavorável. Desta forma, é possível afirmar que o processo de formação do complexo é dirigido pelo aumento da entropia do sistema. Molecularmente, um processo termodinâmico que apresenta valores positivos de ΔH° and ΔS° é causado pelo aumento do grau de liberdade translacional das moléculas de água liberadas das camadas de solvatação das moléculas que estão interagindo (BSA e betacaroteno). Este processo é chamado de interação hidrofóbica.

A conformação tridimensional da proteína é importante tanto em relação às suas funções biológicas quanto em relação às interações que ela realiza com diferentes ligantes (DAMODARAN et al., 2008). Visando avaliar a influência da conformação da BSA na interação desta proteína com o

betacaroteno, os experimentos de fluorescência foram repetidos utilizando uma solução de BSA desnaturada em tampão pH 7,0.

A Figura 14 mostra os espectros de emissão de fluorescência da BSA desnaturada na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, a temperatura de 25 °C, em pH 7,0 (Figura 14A) bem como o gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA desnaturada na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, nestas condições (Figura 14B).

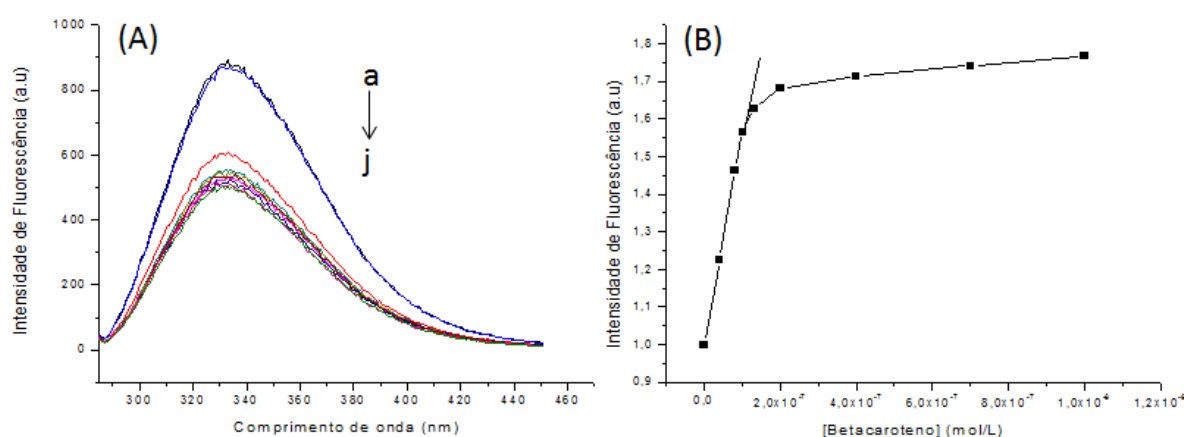


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência da BSA desnaturada na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0 (A), $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $[BSA] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, a 25 °C. Curvas $a \rightarrow j$ correspondem a concentrações crescentes de betacaroteno: 0 a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da BSA desnaturada induzida por concentrações crescentes de betacaroteno, em pH7,0.

A partir da Figura 14A pode ser observado que a intensidade de fluorescência da BSA desnaturada diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de betacaroteno, indicando que o corante suprime a fluorescência emitida pela proteína desnaturada. Entretanto não houve deslocamento dos comprimentos de onda correspondentes aos picos máximos de emissão de fluorescência, mesmo a maiores concentrações de betacaroteno, como observado para a BSA na conformação nativa. Estes resultados corroboram para o fato de os deslocamentos das bandas máximas de emissão de fluorescência da BSA nativa, principalmente a maiores concentrações de betacaroteno, indicarem mudanças na conformação da proteína, induzidas pela sua interação com o betacaroteno. Assim, a interação do betacaroteno ocorre no sítio hidrofóbico da BSA e muda a conformação da proteína.

O gráfico de Stern-Volmer (Figura 14B) mostrou uma relação linear entre F_0/F versus [betacaroteno] até 1×10^{-7} mol L⁻¹ do corante e acima desta concentração, exibiu uma curvatura. O fenômeno ilustrou provavelmente que a proteína interage com o corante e, a uma determinada concentração de corante adicionado ocorre saturação dos sítios de interação (BAPTISTA e INDIG, 1998; MA *et al.*, 2012).

Os valores de K_q e K_{SV} para a interação entre betacaroteno e BSA desnaturada nas cinco temperaturas estudadas foram obtidos para a região linear da curva (MA *et al.*, 2012) e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação para a interação betacaroteno-BSA desnaturada, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	K_{sv} (L mol ⁻¹)	R^2	K_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_a (L mol ⁻¹)	n
β-caroteno - BSA desnaturada	7,0	20	$5,65 \times 10^6$	0,9725	$5,65 \times 10^{14}$	$1,11 \times 10^2$	0,3123
		25	$5,01 \times 10^6$	0,9706	$5,00 \times 10^{14}$	$1,33 \times 10^2$	0,3276
		37	$4,89 \times 10^6$	0,9865	$4,88 \times 10^{14}$	$4,89 \times 10^2$	0,4094
		45	$4,85 \times 10^6$	0,9812	$4,85 \times 10^{14}$	$2,66 \times 10^2$	0,3740
		55	$4,46 \times 10^6$	0,9781	$4,45 \times 10^{14}$	$5,05 \times 10^2$	0,4136

Os valores de K_{sv} tornaram-se menores à medida que a temperatura aumentou e foram maiores quando comparados com os resultados obtidos para a proteína nativa, o que demonstra que houve maior supressão da fluorescência quando a proteína se apresentou na forma desnaturada, provavelmente, em consequência da maior exposição do resíduo de triptofano localizado no núcleo hidrofóbico da macromolécula. Os valores para a constante de supressão bimolecular (K_q) também foram muito superiores ao da constante de difusão da biomolécula, indicando que o processo de supressão de fluorescência é principalmente estático.

Os valores para a constante de interação (K_a) variaram com a temperatura, entretanto foram inferiores àqueles obtidos para a interação do betacaroteno com a BSA nativa. Os valores de n sugerem que há uma molécula de betacaroteno para cada três moléculas de BSA (1:3) (Figura 15).

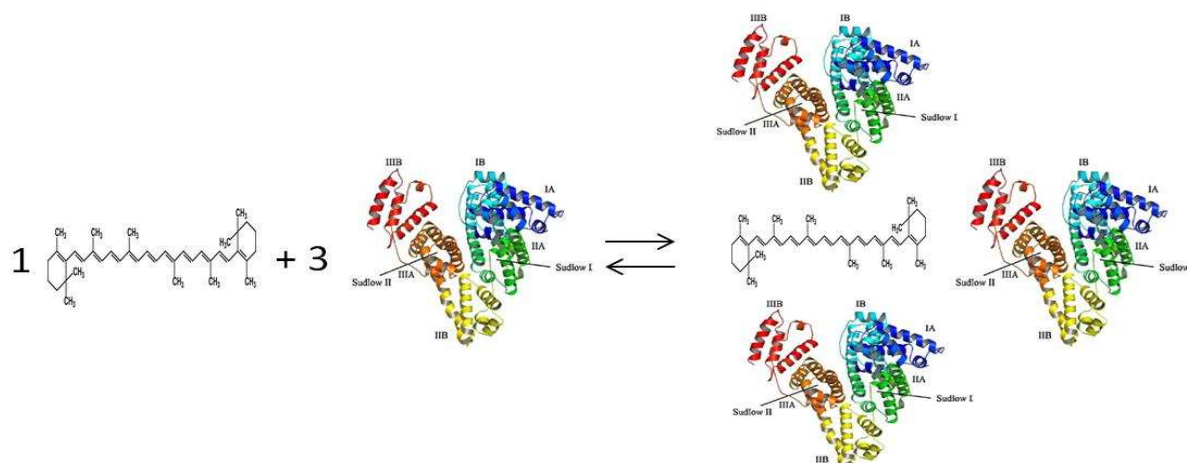


Figura 15. Representação da estequiometria de formação do complexo betacaroteno-BSA desnaturada.

Os valores de ΔH° , ΔG° e $T\Delta S^\circ$ de formação de complexo estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e BSA desnaturada, em pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	ΔH° (kJ/mol)	R^2	ΔG° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$
β -caroteno - BSA desnaturada	7,0	20	33,32	0,9728	-11,48	44,80
		25			-12,14	45,45
		37			-15,97	49,29
		45			-14,77	48,09
		55			-16,98	50,30

Os valores obtidos para ΔG° foram negativos para todas as temperaturas estudadas, o que indica que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e BSA desnaturada favorece a formação do complexo e não dos reagentes. Entretanto, estes valores foram menos negativos que os valores obtidos para a interação entre betacaroteno e BSA nativa, o que indica que a formação do complexo entre o corante e a proteína em sua conformação desnaturada é menos favorável termodinamicamente.

A variação de entalpia de formação do complexo foi positiva, indicando que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e BSA desnaturada é entalpicamente desfavorável, e maior em relação ao valor obtido

para este parâmetro na interação entre betacaroteno e a BSA na conformação nativa. Este aumento observado ocorreu em razão do maior conteúdo de energia necessário para liberar as moléculas de água que solvatavam as regiões hidrofóbicas da BSA, as quais ficaram mais expostas na conformação desnaturada. Assim, a força motriz que rege a interação entre o betacaroteno e a BSA desnaturada é o aumento da entropia do sistema. Quando a proteína está em sua conformação desnovelada há maior exposição de grupos hidrofóbicos para interagirem com o corante, que também é uma molécula hidrofóbica.

5.2 Espectroscopia de Fluorescência para β -caseína

Apesar de serem proteínas do leite, as características e propriedades das proteínas do soro são muito diferentes das caseínas. A β -CN é uma proteína desordenada que tem a capacidade de se auto-organizar na forma de micelas, acima de uma determinada concentração. Visando avaliar o efeito da auto-associação da β -CN na formação de complexo com o betacaroteno, o experimento de espectroscopia de fluorescência foi repetido com micelas de beta-caseína.

A concentração acima da qual moléculas de β -CN se agregaram na forma de micelas nas condições estudadas foi $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como pode ser observado na Figura 16.

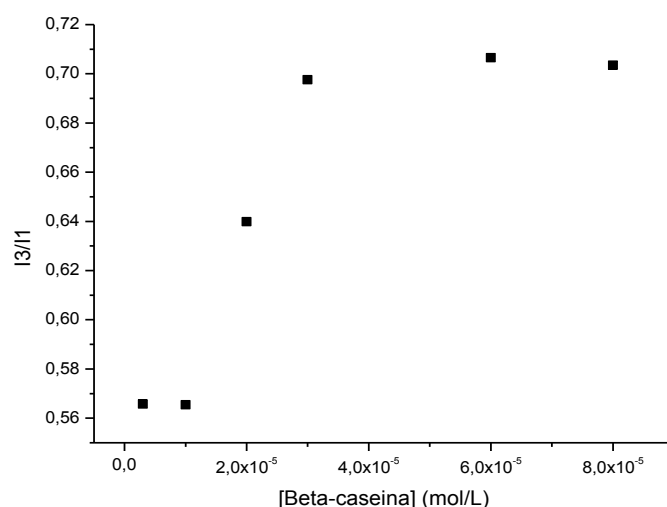


Figura 16. I3/I1 versus concentração de beta-caseína

Em concentrações até $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de β -CN, a razão I_3/I_1 manteve-se constante e aproximadamente igual a 0,56, indicando que até esta concentração não havia ocorrido ainda a agregação dos monômeros de β -CN formando micelas. Entretanto, na concentração de 2×10^{-5} mol L⁻¹ ocorreu aumento da razão I_3/I_1 e acima desta concentração a razão I_3/I_1 manteve-se praticamente constante e aproximadamente igual a 0,7. O aumento na razão I_3/I_1 indicou que micelas de beta-caseína estão sendo formadas no sistema, uma vez que valores maiores para esta razão correspondem a ambientes mais hidrofóbicos. O aumento gradual dos valores da relação I_3/I_1 implica que o processo de micelização da beta-caseína consiste em uma associação sucessiva de monômeros (SETTER e LIVNEY, 2015). O ponto de inflexão da curva foi igual a 2×10^{-5} mol L⁻¹, que é considerado a cmc da proteína (FUGUET *et al.*, 2005; BAHRI *et al.*, 2006). Quando a concentração de β -CN atinge a concentração micelar crítica, monômeros de β -CN se agregam espontaneamente formando as micelas, de forma a reduzir a energia livre de Gibbs do sistema (de KRUIF e GRINBERG, 2002). A energia livre de Gibbs para o processo de micelização da β -CN foi calculada a partir da Equação 1, obtendo-se o valor de -26,82 kJ/mol para este parâmetro.

Bahri *et al.* (2006) determinaram a cmc para o dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante de baixa massa molar utilizado como modelo de sistemas micelares, utilizando o método de tensão superficial. Eles obtiveram a cmc de 2×10^{-3} mol/L para o SDS em tampão fosfato pH 7,0 e 9×10^{-3} mol/L para este surfactante em água. A variação de energia livre de Gibbs para o SDS foi -15,40 kJ/mol em tampão fosfato pH 7,0 e -11,68 kJ/mol em água. Com base nos resultados obtidos por estes autores, a energia livre de Gibbs associada ao processo de micelização da β -CN foi mais negativo que aquela associada ao processo de micelização do SDS. Resultados semelhantes para a cmc da β -CN foram encontrados por Shapira *et al.* (2010), Setter e Livney (2015) e Portnaya *et al.* (2006) utilizando distribuição de tamanho de partículas de β -CN, espectroscopia de fluorescência usando pireno como sonda e calorimetria de titulação isotérmica, respectivamente, nas mesmas condições do sistema.

Medidas de tamanho foram realizadas para soluções de β -CN nas concentrações 0,1 mg/mL (4×10^{-6} mol/L), 0,5 mg/mL (2×10^{-5} mol/L) e 1,0

mg/mL (4×10^{-5} mol/L) utilizando o Zetasizer nano ZS90 (Malvern) para confirmar a presença de monômeros e micelas de beta-caseína (Tabela 6).

Tabela 6. Medidas do diâmetro da β -CN em diferentes concentrações, pH 7,0, força iônica 0,1 M, 25 °C.

Amostra	Tamanho (nm)
β -CN 4×10^{-6} mol L ⁻¹	11,16±0,843
β -CN 2×10^{-5} mol L ⁻¹	19,5±0,845
β -CN 4×10^{-5} mol L ⁻¹	22,37±1,55

Na concentração 4×10^{-6} mol L⁻¹ a β -CN está em sua forma monomérica, enquanto nas demais concentrações está na forma de micelas. Estes resultados estão de acordo com Shapira et al. (2010), que afirmaram que partículas com tamanhos entre 1 e 15 nm correspondem à monômeros, enquanto partículas maiores com tamanhos entre 20 e 42 nm correspondem a micelas de β -CN.

Desta forma, a concentração de β -CN utilizada no experimento de fluorescência foi igual a $4,0 \times 10^{-5}$ mol/L que equivale a duas vezes a cmc da proteína. A Figura 17 mostra o espectro de emissão de fluorescência da β -CN (na forma micelar) na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, a temperatura de 25 °C, em pH 7,0 (FIGURA 17A), bem como o gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da β -CN na presença de diferentes concentrações de betacaroteno, nas mesmas condições (FIGURA 17B).

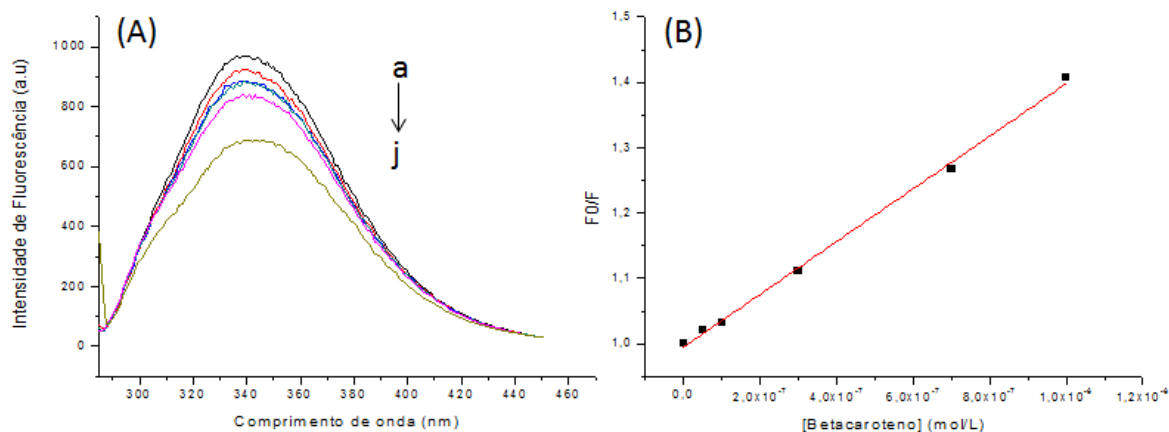


Figura 17. (A) Espectros de emissão de fluorescência da β -CN na presença de diferentes concentrações de betacaroteno em pH 7,0 (A), $\lambda_{exc} = 280$ nm, $[\beta\text{-CN}] = 4,2 \times 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$, a 25 °C. Curvas a \rightarrow j correspondem a concentrações crescentes de betacaroteno: 0 a 1×10^{-6} mol.L $^{-1}$, respectivamente. (B) Espectro de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da β -CN induzida por concentrações crescentes de betacaroteno, em pH 7,0 .

A β -CN emite fluorescência especialmente em razão de um resíduo de triptofano presente em sua estrutura, o triptofano 143, o qual está localizado no principal domínio hidrofóbico desta proteína (SHAPIRA *et al.*, 2010).

A partir da figura 17A pode ser observado que a intensidade de fluorescência da β -CN diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de betacaroteno e houve um pequeno deslocamento das bandas de emissão máximas de fluorescência de 338,92 nm para 342,92 nm, sugerindo formação de complexo. Resultados semelhantes foram encontrados para as demais temperaturas estudadas, neste valor de pH.

Os valores de K_q e K_{SV} para a interação entre betacaroteno e β -CN nas cinco temperaturas estudadas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Constante de extinção de fluorescência (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (K_q), constante de interação (K_a) e número de sítios de interação para a interação betacaroteno- β -CN, pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	K_{sv} (L mol ⁻¹)	R ²	K_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_a (L mol ⁻¹)	n
β-caroteno - BCN	7,0	20	3,15x10 ⁵	0,9945	3,15x10 ¹³	3,34x10 ¹	0,3773
		25	4,03x10 ⁵	0,9975	4,03x10 ¹³	4,84x10 ²	0,5449
		37	6,52x10 ⁵	0,9973	6,52x10 ¹³	1,08x10 ³	0,5619
		45	7,48x10 ⁵	0,9957	7,48x10 ¹³	9,02x10 ²	0,5400
		55	8,28x10 ⁵	0,9950	8,28x10 ¹³	2,45x10 ³	0,5982

Os resultados obtidos mostraram que apesar de os valores de K_{sv} terem sido ligeiramente superiores com o aumento da temperatura, os valores para a constante de supressão bimolecular (K_q) foram maiores que a constante de difusão da biomolécula, indicando que o processo de supressão de fluorescência é principalmente estático.

Os valores obtidos para a constante de interação (K_a) variaram com a temperatura, entretanto foram inferiores a 10⁴ em todos os casos, o que sugere que o betacaroteno interage menos com a β-CN em relação a BSA nativa. Os valores de n sugerem que há uma molécula de betacaroteno para duas moléculas de β-CN (1:2). Sendo assim, a micela de β-CN provavelmente é capaz de carrear várias moléculas de betacaroteno, uma vez que pode ser constituída por 15 a 60 moléculas desta proteína.

Os valores de ΔH° , ΔG° e $T\Delta S^\circ$ de formação de complexo estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos de interação entre betacaroteno e β-CN , pH 7,0, força iônica 0,1 M, a diferentes temperaturas.

Sistema	pH	T (°C)	ΔH° (kJ/mol)	R ²	ΔG° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$
β-caroteno - BCN	7,0	20	96,16	0,9907	-8,55	104,71
		25			-15,32	111,48
		37			-18,02	114,18
		45			-18,00	114,16
		55			-21,30	117,46

Os valores obtidos para ΔG° foram negativos para todas as temperaturas estudadas, o que indica que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e β-CN favoreceu a formação do complexo formado pelas duas espécies químicas. Entretanto, estes valores foram menos negativos que os valores obtidos para a interação entre betacaroteno e BSA

nativa, o que indica que a interação entre betacaroteno e β -CN é menos favorável termodinamicamente.

A variação de entalpia de interação foi positiva indicando que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e β -CN foi entalpicamente desfavorável. Desta forma, a formação do complexo entre estas duas espécies foi regido pelo aumento da entropia do sistema, resultante da interação hidrofóbica entre elas.

5.3 Nanocalorimetria Diferencial de Varredura

A Figura 18 ilustra os termogramas da BSA, obtidos em tampão fosfato pH 7,0 na ausência do betacaroteno (18A) e na presença deste corante na concentração de 7×10^{-7} mol/L (18B).

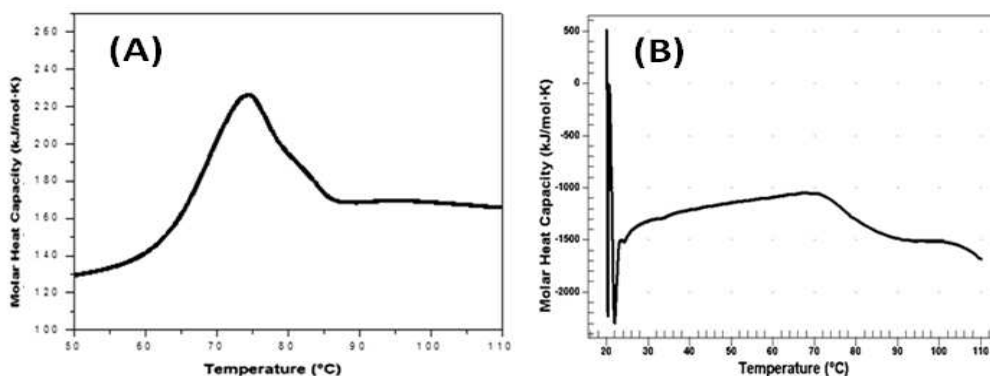


Figura 18. (A) Termograma da BSA na ausência de betacaroteno; e (B) na presença de 7×10^{-7} mol/L de betacaroteno.

A temperatura de desnaturação da BSA em tampão fosfato pH 7,0 foi $74,1 \pm 0,4$ °C. O valor para a variação de entalpia de desnaturação obtido a partir da integração da área sob do curva apresentada na figura 18A foi 891.62 kJ mol^{-1} , o qual está de acordo com valores relatados na literatura (GIANCOLA *et al.* 1997).

Como pode ser observado pelo termograma da figura 18B, o betacaroteno desnaturou a BSA e resultados semelhantes foram observados para todas as demais concentrações de betacaroteno adicionadas. Estes resultados indicam que a interação do betacaroteno, nas concentrações utilizadas, com a BSA promoveu uma mudança conformacional em sua

estrutura e, uma vez que a desnaturação é um processo cooperativo (FREIRE e MURPHY, 1991), toda a cadeia polipeptídica foi desnovelada. Estes resultados também indicam que a conformação desnovelada da proteína, na presença de betacaroteno, é a mais estável termodinamicamente.

5.4 Estabilidade Química do Betacaroteno à Luz

A degradação do betacaroteno em solvente (tampão fosfato pH 7,0:DMSO, 1:9) na ausência de proteínas (controle) seguiu uma relação de primeira ordem. Dessa forma, a constante de degradação do corante nesta condição foi obtida a partir da linearização da curva de $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz apresentado na Figura 19, onde a constante de degradação (K_d) representa a inclinação da curva.

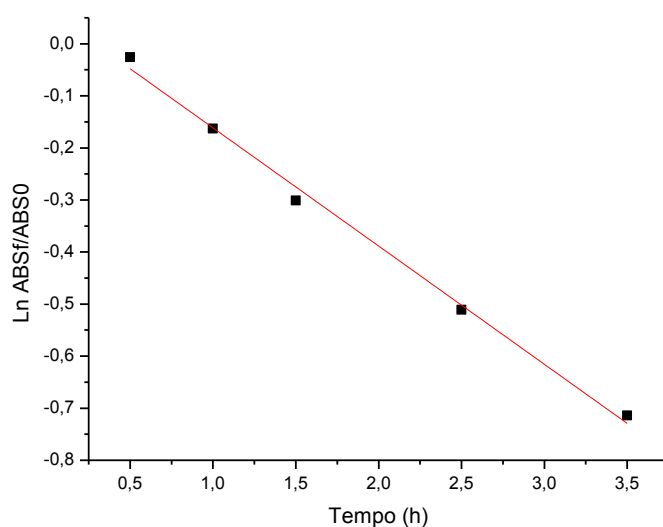


Figura 19: $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz do betacaroteno na ausência de proteínas. Equação: $y = 0,06584 - 0,2271x$ ($R^2 = 0,9935$)

A degradação do betacaroteno na presença de proteínas também seguiu uma relação de primeira ordem, demonstrando que o mecanismo de degradação do corante na ausência e na presença de proteínas é o mesmo. Dessa forma, a constante de degradação do corante nesta condição também foi obtida a partir da linearização da curva $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz.

A Figura 20 ilustra os gráficos de $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz para o corante na presença de diferentes concentrações de β -CN.

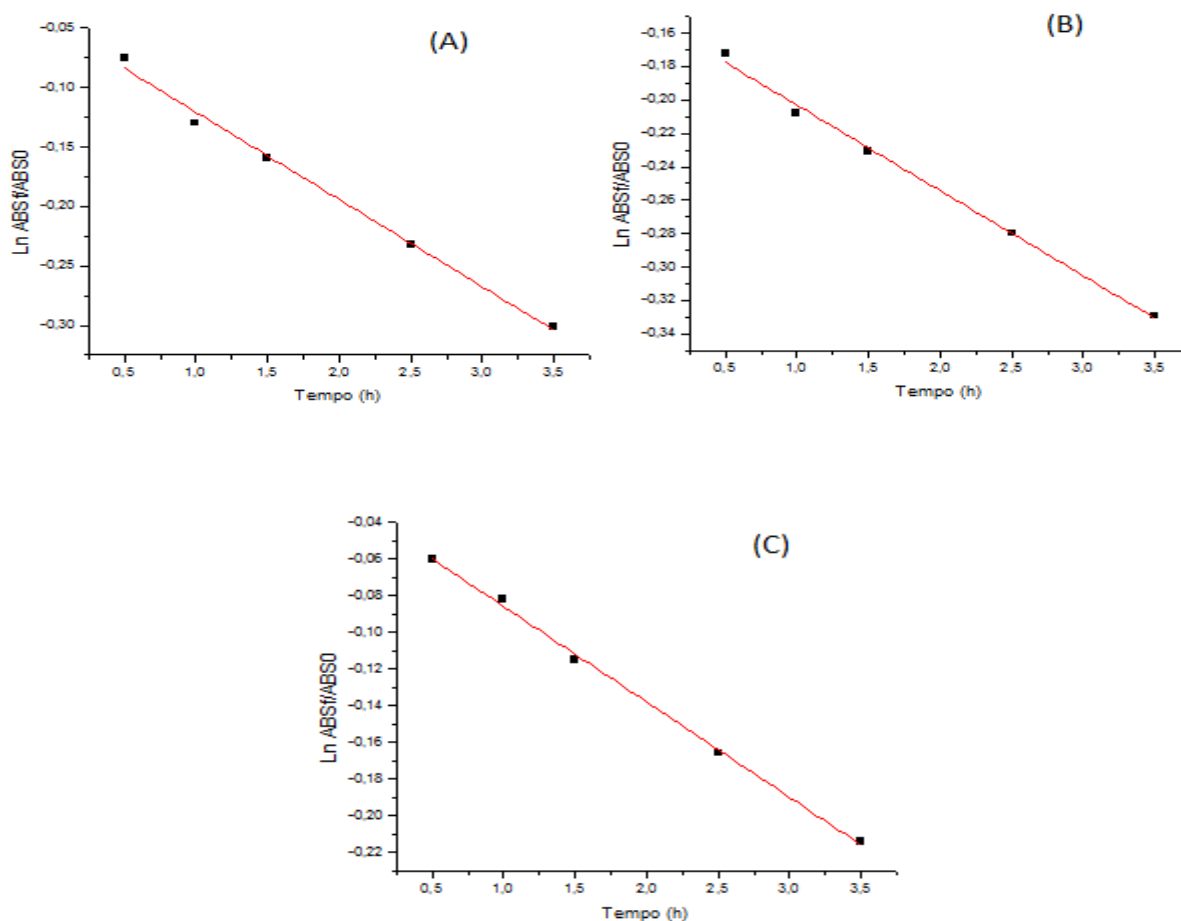


Figura 20. $\ln (ABS_t/ABS_0)$ versus tempo de exposição a luz do betacaroteno na presença de diferentes concentrações de beta-caseína: 4×10^{-6} (abaixo da cmc) (A), equação: $y = -0,04716 - 0,07345x$ ($R^2 = 0,9925$); 2×10^{-5} (na cmc) (B), equação: $y = -0,15194 - 0,05114x$ ($R^2 = 0,9948$); e 4×10^{-5} (acima da cmc) (C), equação: $y = -0,03601 - 0,05140x$ ($R^2 = 0,9991$).

O corante quando na presença de uma concentração na qual a β -CN está na forma monomérica (4×10^{-6} mol/L) degradou mais rapidamente do que quando na presença de micelas de β -CN (2×10^{-5} mol/L e 4×10^{-5} mol/L). Os valores para a constante de degradação e tempo de meia-vida do corante na ausência e na presença de diferentes concentrações desta proteína são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores da constante de degradação (K_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de soluções de betacaroteno na ausência e na presença de diferentes concentrações de β -CN ao longo de 3,5 horas de exposição a luz.

Amostra	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Controle	$2,27 \times 10^{-1}$ ($\pm 0,009$)	3,05
β -CN 4×10^{-6}	$7,34 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,003$)	9,44
β -CN 2×10^{-5}	$5,11 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,002$)	13,56
β -CN 4×10^{-5}	$5,14 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,001$)	13,48

Visando avaliar o efeito de uma proteína globular na estabilização do betacaroteno à luz, a β -CN foi substituída pela BSA. A Figura 21 ilustra os gráficos de cinética de degradação do betacaroteno na presença de diferentes concentrações de BSA.

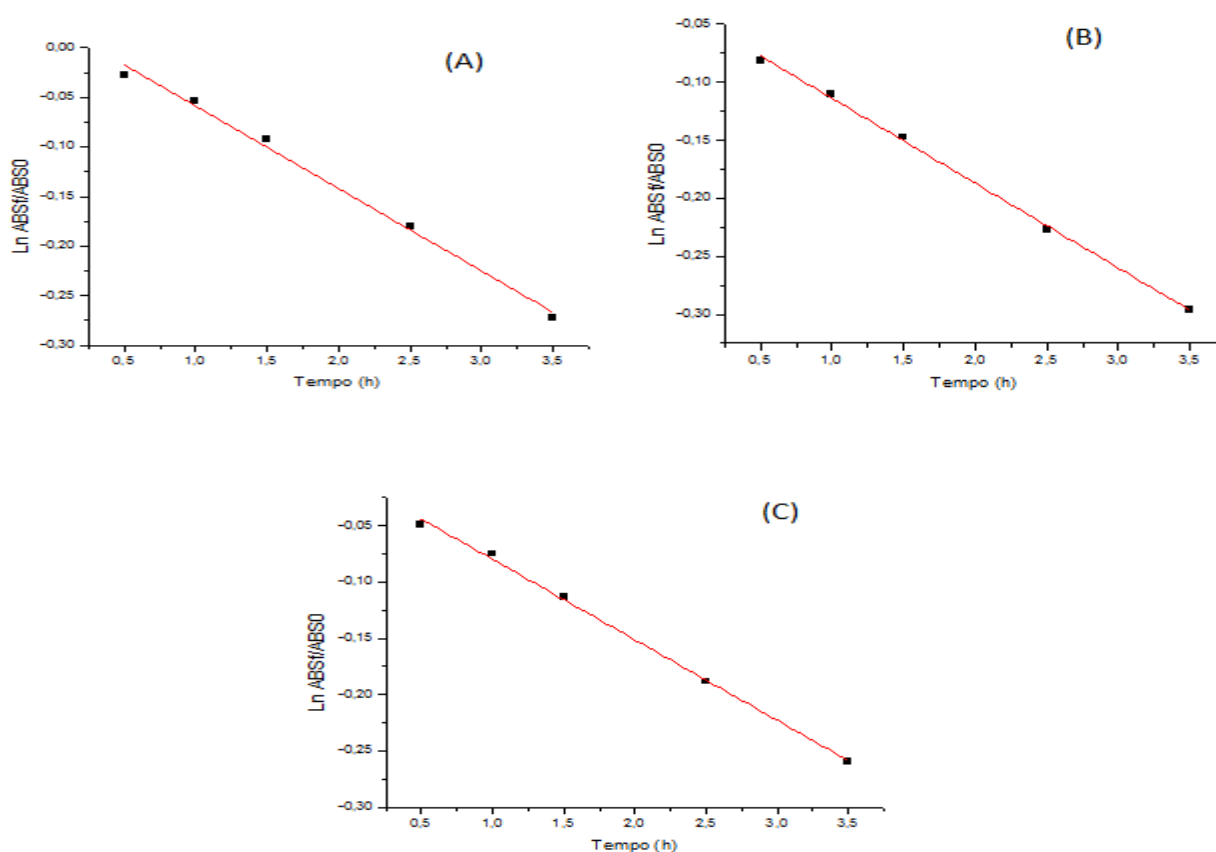


Figura 21. $\ln (\text{ABS}_t/\text{ABS}_0)$ versus tempo de exposição a luz (horas) do betacaroteno na presença de diferentes concentrações de BSA: 1×10^{-6} (A), equação: $0,02442 - 0,08322x$ ($R^2 = 0,99175$); 3×10^{-6} (B), equação: $y = -0,04062 - 0,073161x$ ($R^2 = 0,99764$); e 5×10^{-6} (C), equação: $-0,00823 - 0,07161x$ ($R^2 = 0,99748$).

Maiores concentrações de BSA estabilizaram mais o corante, resultando em menor degradação deste quando exposto à luz. Os valores para a constante de degradação e tempo de meia vida do corante na ausência e na presença de diferentes concentrações de BSA são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores da constante de degradação (K_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de soluções de betacaroteno na ausência e na presença de diferentes concentrações de BSA ao longo de 3,5 horas de exposição a luz.

Amostra	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Controle	$2,27 \times 10^{-1}$ ($\pm 0,009$)	3,05
BSA 1×10^{-6}	$8,32 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,004$)	8,33
BSA 3×10^{-6}	$7,32 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,002$)	9,47
BSA 5×10^{-6}	$7,16 \times 10^{-2}$ ($\pm 0,002$)	9,68

De acordo com os resultados obtidos a partir da espectroscopia de fluorescência (item 5.1), a β -caseína forma um complexo de estequiometria 1:2 com o betacaroteno. Dessa forma, o arranjo da β -caseína em agregados possibilita a esta proteína carrear mais moléculas de betacaroteno em relação à BSA. Os resultados obtidos para os parâmetros de cinética de degradação mostraram que o corante quando na presença de uma concentração na qual a β -CN está na forma monomérica (4×10^{-6} mol/L) degradou mais rapidamente do que quando na presença de micelas de β -CN (2×10^{-5} mol/L e 4×10^{-5} mol/L), indicando que micelas de β -CN conferem maior estabilidade química ao betacaroteno. Diante disso, provavelmente o complexo formado entre β -CN e betacaroteno confere a este corante maior estabilidade à luz em comparação ao complexo formado com a BSA.

Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008) estudaram a estabilidade à luz do betacaroteno extraído de cenoura em sistemas modelos de baixa umidade (simulando alimentos desidratados), sistema modelo aquoso (simulando sucos) e em goiaba liofilizada, e chegaram a encontrar um tempo de meia-vida máximo de 13,1 dias para este corante, tempo bastante superior em relação aos obtidos no presente trabalho.

Esta grande diferença pode ser devida ao fato de que, uma vez que o presente trabalho consistiu em um estudo fundamental, o corante utilizado foi um corante purificado, e não obtido a partir de um extrato bruto. Extratos vegetais brutos apresentam misturas de diferentes substâncias, as quais podem contribuir para aumentar a estabilidade dos pigmentos presentes em sua matriz (MARÇO *et al.*, 2008). Além disso, as soluções de corantes utilizadas nos experimentos foram inicialmente preparadas em dimetilsulfóxido e, segundo Kanasawud e Crouzet (1990), soluções aquosas de betacaroteno constituem modelos mais representativos das condições encontradas em produtos vegetais do que soluções orgânicas deste corante.

As constantes de interação entre o betacaroteno e as proteínas nos sistemas estudados, determinadas por meio de espectroscopia de fluorescência, também foram relativamente baixas, o que indica que nas condições estudadas, as moléculas deste corante que não foram envolvidas na formação de complexo com as proteínas, ficaram suscetíveis à degradação química promovida pela luz.

A luz é um fator que pode promover a degradação do betacaroteno a partir de vários mecanismos diferentes. De acordo com Lin e Chen (2005), a luz possui, por exemplo, grande influência na isomerização do betacaroteno. Estes autores identificaram seis isômeros para o betacaroteno presente em suco de tomate processado. Mortensen e Skibsted (1996) produziram resultados que sugerem que o betacaroteno pode sofrer rápida degradação em alguns solventes orgânicos devido à excitação das moléculas de betacaroteno quando estas absorvem a energia radiante e posterior reação destas moléculas com as moléculas do solvente para formar radicais livres carotenoide-solvente ou radicais betacaroteno. O mesmo trabalho mostrou ainda que as moléculas de betacaroteno no estado excitado podem retornar ao estado fundamental, onde podem ser atacadas por radicais formados durante a reação destas moléculas com as moléculas do solvente.

De acordo com os resultados obtidos, a interação entre o betacaroteno e ambas as proteínas aumentou a estabilidade à luz deste corante, uma vez que as constantes de degradação foram menores em relação ao controle, o que resultou ainda em um tempo de meia-vida do corante maior. Estes resultados indicam que a β -CN e a BSA apresentam potencial para veicular corantes

hidrofóbicos, como o betacaroteno, em matrizes alimentícias. Do ponto de vista tecnológico, outros fatores, que não somente a luz devem ser controlados para prevenir a degradação do betacaroteno e consequente perda de coloração dos produtos alimentícios durante o processamento e/ou armazenamento. A otimização do material de embalagem dos alimentos pode minimizar a degradação da cor à qual estes são suscetíveis, uma vez que a própria embalagem pode constituir uma barreira à penetração da luz. Além disso, a técnica de atmosfera modificada, também pode contribuir para minimizar esta degradação por meio da redução do teor de oxigênio em alimentos, que é um agente de degradação do betacaroteno. A temperatura de armazenamento é outro fator que deve ser controlado, uma vez que temperaturas maiores resultam em maior degradação deste corante. A fonte de iluminação utilizada em estabelecimentos que produzem ou comercializam alimentos também é uma fator que deve ser avaliado criteriosamente, considerando não somente o custo, durabilidade, eficiência de iluminação e fatores estéticos, por exemplo (LIMBO *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÃO

O processo termodinâmico de interação favoreceu a formação do complexo entre o corante e ambas as proteínas em pH 7,0 e foi dirigido pelo aumento da entropia do sistema. A interação do betacaroteno com a BSA nativa promoveu deslocamentos nas bandas máximas de emissão de fluorescência, principalmente em maiores concentrações do corante, as quais sugeriram mudanças na conformação da proteína em decorrência da interação com o corante, e as constantes de interação associadas ao complexo formado entre estas duas espécies foram maiores em relação àquelas associadas à interação do betacaroteno com a BSA desnaturada, provando que o sítio hidrofóbico da proteína é essencial para a interação. Os valores obtidos para os parâmetros termodinâmicos de interação demonstraram que o processo termodinâmico de interação entre betacaroteno e BSA nativa foi termodinamicamente mais favorável em relação à interação com a BSA desnaturada, embora tenha induzido a desnaturação da proteína, e também em relação à β -CN. Por outro lado, em pH 5,0, próximo ao ponto isoelétrico da BSA, nenhuma interação entre o betacaroteno e esta proteína foi observada. Os resultados de nano DSC provaram que a interação do betacaroteno com a BSA de fato promoveu mudanças em sua conformação. Os resultados de estabilidade demonstraram que a interação do betacaroteno com ambas as proteínas, BSA e β -CN, aumentou a estabilidade química do corante à luz, principalmente a maiores concentrações destas proteínas, uma vez que as constantes de degradação foram menores em relação ao controle, o que resultou ainda em um tempo de meia-vida do corante maior. Entretanto, considerando que a β -caseína forma um complexo de estequiometria 1:2 com o betacaroteno e que possui a propriedade de se auto-associar formando micelas de β -CN, esta proteína pode carrear mais moléculas do corante em relação à BSA. Diante disso, provavelmente o complexo formado entre β -CN e betacaroteno confere a este corante maior estabilidade à luz em comparação ao complexo formado com a BSA. De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a β -CN e a BSA apresentam potencial para veicular corantes hidrofóbicos, como o betacaroteno, em matrizes alimentícias

e que a interação pode ainda aumentar a estabilidade deste corante à luz, que é um grande fator de degradação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ZIED, O. K.; AL-SHIHI, O. I. K. Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes. **Journal of the American Chemical Society**, 130, 10793–10801, 2008.

AGUIAR, J. et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. **Journal of Colloid and Interface Science**, 258, 116–122, 2003.

AHERNE, S. A. et al. Bioavailability of beta-carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. **Food Research International**, 43, 1449–1454, 2010.

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, 19, 233-243, 2006.

ANEMA, S. G.; McKENNA, A. B. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44, 422-428, 1996.

AZEREDO, H. M. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, 16, 89-97, 2005.

BALDASSO, C.; KANAN, J. H. C.; TESSARO, I. C. An investigation of the fractionation of whey proteins by two microfiltration membranes with nominal pore size of 0.1 μm . **International Journal of Dairy Technology**, 64, 343-349, 2011.

BAPTISTA, M. S.; INDIG, G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. **Journal of Physical Chemistry B**, 102, 4678-4688, 1998.

BATISTA, A. P. et al. Colored food emulsions - Implications of Pigment Addition on the Rheological Behavior and Microstructure. **FOBI**, 1, 216-227, 2006.

BONNAIRE, L. et al. Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 3791–3797, 2008.

BONNIE, T. Y. P.; CHOO, Y. M. Oxidation and thermal degradation of carotenoids. **Journal of Oil Palm Research**, 2, 62-78, 1999.

BOON, C. S. et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 50, 515–532, 2010.

BOON, C. S. et al. Role of iron and hydroperoxides in the degradation of lycopene in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 2993–2998, 2009.

BOU, R. et al. Effect of different antioxidants on lycopene degradation in oil-in-water emulsions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 113, 724–729, 2011.

BRASIL. Portaria n° 540, de 27 de outubro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out, 1997. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso: em 25 jan. 2015.

BRASIL. Resolução n° 44, de 25 de novembro de 1977. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 Fev, 1978. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso: em 25 jan. 2015.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, 9, 1551-1558, 1995.

BRUYLANTS, G. et al. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Current Medicinal Chemistry**, 12, 2011-2020, 2005.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, 45, 153–203, 1994.

CHAIYASIT, W. et al. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47, 299–317, 2007.

CHEN, B.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 3779–3784, 2010.

CHEN, B.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of Continuous Phase Anionic Polysaccharides on the Oxidative Stability of Menhaden Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 3779–3784, 2010.

CHENG, Z. Studies on the interaction between copoletin and two serum albumins by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, 132, 2719–2729, 2012.

CHRISTENSEN, R. L. Energies of Low-Lying Excited States of Linear Polyenes. **Journal of Physical Chemistry A**, 112, 12629-12636, 2008.

CLARK, D. C. et al. The interaction of sucrose esters with β -lactoglobulin and b-casein from bovine milk. **Food Hydrocolloids**, 6, 173-186, 1992.

COGAN, U. et al. Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. **European Journal of Biochemistry**, 65, 71-78, 1976.

CONSIDINE, T. et al. Interaction of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8, 1-23, 2007.

COOPER, A. Thermodynamics of protein folding and stability. **Protein: A comprehensive treatise**, 2, 217-27, 1999. Disponível em: <<http://www.chem.gla.ac.uk/staff/alanc/Protfold.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Gp, 2008. 1158p.

DARIUSZ, M. N. et al. Ultrafast time-resolved absorption spectroscopy of geometric isomers of carotenoids. **Chemical Physics**, 357, 4–16, 2009.

de KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of b-casein. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 210, 183-190, 2002.

DOCKAL, M.; CARTER, D. C.; RUKER, F. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. **Journal of Biological Chemistry**, 275, 3042–3050, 2000.

ERNESTO, F.; MURPHY, K. P. Molecular Basis of co-operativity in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, 222, 687-698, 1991.

ESMAILI, M. et al. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. **Food Science and Technology**, 44, 2166-2172, 2011.

ESTEVEES, P. C. D.; ESTEVEES, A. C.; BARLETA, V. C. N. Extração de β -Caroteno por Cromoterapia em Coluna em Cenouras (*daucus carota l.*). **Cadernos UniFOA**, n. 1, 2006.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química** (Instrumental methods for chemical analysis). 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2013. 296p.

FARAJI, H.; McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 4558–4564, 2004.

FAULKS, R.; SOUTHON, S. Dietary carotenoids. **Nutrition & Food Science**, 6, 246-250, 1997.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of Lycopene and β -carotene in Model Systems and in Lyophilized Guava during Ambient Storage: Kinetics, Structure, and Matrix Effects. **Journal of Food Science**, 78, 589-594, 2008.

FOEGEDING, E. A. et al. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, 13, 151-159, 2002.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, 25, 1853-1864, 2011.

FORMOSIN, S. J. Tunnel effect model for radiationless transitions in aromatic-molecules. **Revista Portuguesa de Química**, 14, 201-207, 1972.

FORREST, S. A. et al. Interactions of vitamin D₃ with bovine β -lactoglobulin A and β -casein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 8003–8009, 2005.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry – Proteins**. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 1349p.

FREITAS, S. K. B. **Uma metodologia para screening analysis de sucos cítricos utilizando um analisador automático em fluxo-batelada,**

espectrometria UV-VIS e técnicas quimiométricas. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

GALANI, D.; APENTEN, R. K. O. Heat-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin: Kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. **International Journal of Food Science & Technology**, 34, 467-476, 1999.

Gelamo, E. L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594, 84–99, 2002.

GIANCOLA, C. et al. DSC studies on bovine serum albumin denaturation. Effects of ionic strength and SDS concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, 20, 193-204, 1997.

GILBERT, A.; BAGGOT, J. Essencial of Molecular Photochemistry. **Blackwell Scientific Publications**, 103, 1554-1555, 1991.

GOI, B. E. **Estudo da polimerização fotoiniciada por corantes em diferentes meios**. 2006. 191f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

GONÇALVES, M. de L. S. S. **Métodos Instrumentais para Análise de Soluções**. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1050p.

GUNASEELAN, K. et al. Determining alpha-tocopherol distributions between the oil, water, and interfacial regions of macroemulsions: Novel applications of electroanalytical chemistry and the pseudophase kinetic model. **Advances in Colloid and Interface Science**, 123, 303–311, 2006.

HALDAR, B.; MALLICK, A.; CHATTOPADHYAY, N. Interaction of pyrene-end-capped poly(ethylene oxide) with bovine serum albumin and human serum

albumin in aqueous buffer medium: A fluorometric study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 80, 217-224, 2005.

HARRY, A. F.; RONALD, L. C. Excited Electronic States, Photochemistry and Photophysics of Carotenoids. In: HARRY, A. F.; RONALD, L. C. **Carotenoids**. 4th ed. Basel: Birkhäuser Verlag, 2008. Cap. 9, p. 167-188. Disponível em: <<http://www.springer.com>>. Acesso em: 5 set. 2015.

HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of whey proteins: Comparison of cheese WPC with acid WPC and relevance of mineral composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4674-4681, 2012.

HE, L. et al. Study on the interaction between promethazine hydrochloride and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Luminescence**, 131, 285–290, 2011.

HOLDEN, J. M. et al. Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. **Journal of food composition and analysis**, 12, 169-196, 1999.

HU, Y. J.; LIU, Y.; XIAO, X. H. Investigation of the interaction between berberine and human serum albumin. **Biomacromolecules**, 10, 517–521, 2009.

HUSHCHA, T. O. et al. Conformation changes of albumin in its interaction with physiologically active compounds as studied by quasi-elastic light scattering spectroscopy and ultrasonic method. **Talanta**, 53, 29-34, 2000.

JOHANSON, K. O. et al. Refolding of bovine serum albumin and its proteolytic fragments: regain of disulfide bonds, secondary structure, and ligand-binding ability. **Journal of Biological Chemistry**, 256, 445-450, 1981.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in

studies of micellar systems. **Journal of the American Chemical Society**, 99, 2039-2044, 1977.

KANASAWUD, P.; CROUZET, J. C. Mechanism of Formation of Volatile Compounds by Thermal Degradation of Carotenoids in Aqueous Medium. 1. β -Carotene Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 38, 237-243, 1990.

KATSUDA, M. S. et al. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with beta-lactoglobulin and pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 5926–5931, 2008.

KHODARAHMI, R. et al. Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: Possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 89, 177– 186, 2012.

KISPERT, L. D.; POLYAKOV, N. E. Carotenoid radicals: Cryptochemistry of natural colorants. **Chemistry Letters**, 39, 148–155, 2010.

KLINKESORN, U. et al. Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 4561–4566, 2005.

KONOVALOVA, T. A. et al. Photooxidation of Carotenoids in Mesoporous MCM-41, Ni-MCM-41 and Al-MCM-41 Molecular Sieves. **Journal of Physical Chemistry B**, 105, 7459-7464, 2001.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacological Reviews**, 33, 17–53, 1981.

KUN, R.; SZEKERES, M.; DEKANY, I. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 96, 1009-1017, 2009.

LADBURY, J. E. Application of Isothermal Titration Calorimetry in the Biological Sciences: Things Are Heating Up! *BioTechniques*, 37, 885–887, 2004.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. Disponível em: <<http://www.springer.com>> Acesso em: 10 fev. 2015.

LARSERICSDOTTER, H.; OSCARSSON, S.; BUIJS, J. Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1, 26–35, 2005.

LEE, H.; KIM, I. H. Thioredoxin-linked lipid hydroperoxide peroxidase activity of human serum albumin in the presence of palmitoyl coenzyme A. **Free Radical Biology & Medicine**, 30, 327–333, 2001.

LEE, S.; MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science**, 57, 1210-1214, 1992.

LI, X. et al. β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. **Food Chemistry**, 179, 213–221, 2015.

LIETAER, E. et al. Interaction between casein and vitamin A. **Lebens Wissen Technology**, 24, 39-45, 1991.

LIMBO, S. et al. Light-Induced Changes in an Aqueous β -Carotene System Stored under Halogen and Fluorescent Lamps, Affected by Two Oxygen Partial Pressures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 5238-5245, 2007.

LIN, C. H.; CHEN, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. **Food Chemistry**, 90, 837-846, 2005.

LIVNEY, Y. D.; SCHWAN, A. L.; DALGLEISH, D. G. A study of β -casein tertiary structure by intramolecular cross-linking and mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, 87, 3638-3647, 2004.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, 15, 73–83, 2010.

LU, R. C. et al. Effect of anionic surfactant molecular structure on bovine serum albumin (BSA) fluorescence. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 278, 67–73, 2006.

MA, J. et al. Spectroscopic investigation on the interaction of 3,7 dihydroxyflavone with different isomers of human serum albumin. **Food Chemistry**, 132, 663-670, 2012.

MAO, L. et al. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. **Food Technology and Biotechnology**, 47, 336–342, 2009.

MEHRANFAR, F. et al. Binding analysis for interaction of diacetylcurcumin with β -casein nanoparticles by using fluorescence spectroscopy and molecular docking calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 115, 629-635, 2013a.

MEHRANFAR, F. et al. A combined spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation study on the interaction of quercetin with β -casein nanoparticles. **Journal of photochemistry and Photobiology B: Biology**, 127, 100-107, 2013b.

MIKEEVA, L. M. et al. Thermodynamics of micellization of bovine β -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, 19, 2913-2921, 2003.

MONAHAN, F. J.; McCLEMENTS, D. J.; KINSELLA, J. E. Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 1826-1829, 1993.

Morr, C. V., Ha, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates-processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 33, 431– 476, 1993.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of photobleaching of betacarotene in chloroform and formation of transient carotenoid species absorbing in the near infrared. **Free Radical Research**, 25, 355–368, 1996

O'CONNEL, J. E.; GRINBERG, V. Ya; de KRUIF, C. G. Association behavior of β -casein. **Journal of Colloid and Interface Science**, 258, 33–39, 2003.

OLIVEIRA, A. P. S. et al. Consumo de corantes artificiais em balas e chicletes por crianças de seis a nove anos. **Revista Analytica**, 8, 79-85, 2009.

OLIVEIRA, I. R. N. **Antocianinas extraídas de capim-gordura (*Melinis minutiflora*): atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. 2011. 130f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

PAGANO, B. et al. Differential scanning calorimetry to investigate G-quadruplexes structural stability. **Methods**, 64, 43–51, 2013.

PAN, X. et al. Characterizing the interaction between tartrazine and two serum albumins by a hybrid spectroscopic approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 6650-6656, 2011.

PAULSSON, M.; DEJMEK, P. Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Dairy Science**, 73, 590-600, 1990.

POLYAKOV, N. E. et al. Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotenoids with β -glycyrrhizic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, 40, 1804–1809, 2006.

PORTNAYA, I. et al. Micellization of bovine beta casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5555-5561, 2006.

POTHAKAMURY, U. R., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. **Trends in Food Science & Technology**, 6, 397-406, 1995.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, 14, 237-250, 2003.

QIN, C.; XIE, M. X.; LIU, Y. Characterization of the myricetin–human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches. **Biomacromolecules**, 8, 2182–2189, 2007.

RAJENDIRAN, N.; THULASIDHASAN, J. Study of the binding of thiazolyazoresorcinol and thiazolyazocresol dyes with BSA and adenine by spectral, electrochemical and molecular docking methods. **Canadian Chemical Transactions**, 3, 291-307, 2015.

RAO, A. V.; HONGLEI, S. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutrition Research**, 22, 1125–1131, 2002.

RAY, G. B.; CHAKRABORTY, I.; MOULIK, S. P. Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing

micellar polarity. **Journal of Colloid and Interface Science**, 294, 248–254, 2006.

RIBEIRO, H. S.; AX, K.; SCHUBERT, H. Stability of lycopene emulsions in food systems. **Journal of Food Science**, 68, 2730–2734, 2003.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, 20, 3096–3102, 1981.

SEMO, E. et al. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. **Food hydrocolloids**, 21, 936-942, 2007.

SETTER, O.; LIVNEY, Y. D. The effect of sugar stereochemistry on protein self-assembly: the case of b-casein micellization in different aldohexose solutions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 17, 3599-3606, 2015.

SHAHABADI, N. et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, 124, 1063–1068, 2011.

SHAPIRA, A. et al. Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 6, 119–126, 2010.

SOARES, J. H.; CRAFT, N. E. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and b-carotene in organic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 431–434, 1992.

TA INSTRUMENTS. **Microcalorimetry**. 2012. Disponível em: <<http://www.tainstruments.com/pdf/brochure/Nano-DSC.pdf>>. Acesso em 10junho. 2014.

THIPPERUDRAPPA, J. et al. Fluorescence quenching of BPBD by aniline in benzene-acetonitrile mix- tures. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 177, 89–93, 2006.

TOMPA P. Intrinsically unstructured proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, 27, 527-533, 2002.

VALSTAR, A. et al. Heat-set bovine serum albumin-sodium dodecyl sulfate gels studies by fluorescence probe methods, NMR, and light scattering. **Langmuir**, 17, 3208–3215, 2001.

VELIKOV, K. P.; PELAN, E. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. **The Royal Society of Chemistry**, 4, 1964-1980, 2008.

VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. **Biophysical Journal**, 80, 2093–2109, 2001.

VON LINTIG, J. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. **Annual Review of Nutrition**, 30, 35–56, 2010.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy Chemistry and Physics**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 467p.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 763p.

XIE, MENG-XIA. et al. Characterization of the interaction between human serum albumin amd morin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1760, 1184-1191.

XU, T. et al. Multiple spectroscopic studies on the interaction between olaquinox, a feed additive, and bovine serum albumin. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 2540–2546, 2012.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385, 20–27, 2001.

ZSILA, F.; BIKADI, Z.; SIMONYI, M. Unique, pH-dependent biphasic band shape of the visible circular dichroism of curcumin–serum albumin complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 301, 776-782, 2003.