



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

RENATA SILVA DINIZ

ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  
GLICOMACROPEPTÍDEO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E CARREAMENTO DE VITAMINA B<sub>2</sub> E QUERCETINA

Belém  
2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

RENATA SILVA DINIZ

**ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  
GLICOMACROPEPTÍDEO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E CARREAMENTO DE VITAMINA B<sub>2</sub> E QUERCETINA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luiza Helena Meller da Silva

Belém  
2016

**ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E  
GLICOMACROPEPTÍDEO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E CARREAMENTO DE VITAMINA B<sub>2</sub> E QUERCETINA**

**Por**

**RENATA SILVA DINIZ**

DATA: \_\_\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Luiza Helena Meller da Silva (PPGCTA/ITEC/UFPA - Orientadora)

---

Profa. Dra. Alessandra Santos Lopes (PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

Profa. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço (PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

Profa. Dra. Jane Sélia dos Reis Coimbra (PPGCTA/UFV – Membro Externo)

---

Prof. Dr. Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira (PPGFIS/UFV – Membro Externo)

---

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos (DQBIO/UFV – Membro Externo)

Belém  
2016

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela graça da saúde e por mais esta vitória na minha vida.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade.

À minha orientadora Luiza Helena Meller da Silva, pela orientação, confiança, amizade e aprendizado.

À minha coorientadora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, incentivo, paciência, atenção e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) UFPA/UFV que proporcionou a interação entre as duas instituições e me permitiu ampliar meu projeto e conhecimentos, sendo possível a publicação de trabalhos importantes durante minha trajetória de doutorado.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESP) da UFPA pelos recursos financeiros, importantes para publicações dos trabalhos.

Ao Professor Antonio Manoel da Cruz Rodrigues pela amizade e apoio.

Ao Professor Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, pela paciência e aprendizado.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas do LAMEFI da UFPA pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Operações e Processos pela convivência e apoio.

Ao amigo Adenilson Abranches Monteiro, que compartilhou comigo todo o conhecimento adquirido e pela ajuda no laboratório.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pela ajuda e suporte nas análises de microscopia.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), em Campinas-SP, pelo auxílio nas análises de calorimetria, fluorimetria e dicroísmo circular.

Ao CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro da pesquisa.

À minha família pelo apoio e compreensão.

Aos meus pais, que sempre acreditam e apostam em mim e nos meus sonhos.

Ao meu marido William, pela paciência, amor e apoio.

Ao meu filho Rafael, que me transformou e me encheu ainda mais de vontade de realizar meus planos.

## RESUMO

DINIZ, Renata Silva. **Estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -lactoalbumina e glicomacropéptido: produção, caracterização, propriedades funcionais e carreamento de vitamina B<sub>2</sub> e quercetina**, 2016, 114p, Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará, Belém.

Este estudo teve como objetivo produzir, caracterizar estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e glicomacropéptido (GMP) e verificar suas propriedades técnico-funcionais, para seu potencial uso na indústria de alimentos. As estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP foram preparadas na razão molar de 1:0,689, respectivamente. Essa proporção foi definida por titulação calorimétrica isotérmica e as análises de calorimetria diferencial de varredura auxiliaram na determinação dos valores de temperatura empregados, uma vez que se verificou a formação das estruturas supramoleculares em valores maiores e menores que a temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -la. Para o GMP não foi possível estabelecer temperatura de desnaturação, pois esse macropéptido não apresenta estrutura terciária definida. As análises de dicroísmo circular e fluorimetria demonstraram que houve interação entre as moléculas de  $\alpha$ -la e GMP. As estruturas supramoleculares, de uma forma geral, mantiveram estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélice, porém a intensidade dessas estruturas secundárias variou nas diferentes condições testadas. As estruturas supramoleculares apresentaram núcleo hidrofóbico. Os tamanhos de partícula das estruturas supramoleculares variaram desde nano a micrômetros, demonstrando que podem ser controlados através das variáveis testadas: pH (3,5 a 6,5), temperatura de aquecimento (25 a 75 °C) e tempo de aquecimento. A estabilidade das estruturas supramoleculares foi avaliada pelo monitoramento do tamanho de partícula e pelo potencial  $\zeta$ , nas temperaturas de 4 e 25 °C, durante 60 dias. As estruturas supramoleculares formadas em pH 6,5 apresentaram maior estabilidade do sistema, com valores absolutos de potencial  $\zeta$  de aproximadamente -30 mV. A morfologia das estruturas supramoleculares foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão e observou-se que as proteínas se associaram formando estruturas esféricas. A capacidade de formação de espuma das estruturas supramoleculares foi avaliada pelo método de homogeneização, determinando-se o aumento do volume, a estabilidade e a expansão da espuma. Verificou-se que as estruturas formadas em pH 6,5 e temperatura de 75 °C apresentaram maior capacidade de formação de espuma. As propriedades emulsificantes das estruturas supramoleculares foram determinadas pelos índices de atividade e estabilidade de emulsão, pelo método turbidimétrico. Porém, as variáveis testadas (pH, temperatura e tempo) não apresentaram efeito nas propriedades emulsificantes. A tensão superficial das estruturas supramoleculares, determinada pelo método Wilhelmy, apresentou valor médio de 50.825 mN·m<sup>-1</sup>, demonstrando que as estruturas supramoleculares podem ser eficientes na estabilização de produtos com espuma e emulsões. As estruturas supramoleculares foram capazes de encapsular quercetina e vitamina B<sub>2</sub>, com eficiência de encapsulação máxima de 98,64% e 31,11%, respectivamente. A estabilidade dos sistemas carreadores foi avaliada pelo monitoramento do tamanho de partículas e potencial  $\zeta$  durante 60 dias. Para a quercetina, os sistemas preparados em pH 6,5 foram estáveis por 60 dias, enquanto que, para a vitamina B<sub>2</sub>, a estabilidade por 60 dias foi demonstrada pelos sistemas preparados em pH 3,5.

**Palavras-chave:** proteína; soro de leite; tamanho de partícula; potencial  $\zeta$ ; estabilidade; encapsulação.

## ABSTRACT

DINIZ, Renata Silva. **Supramolecular structures of  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide: production, characterization, functional properties and encapsulation of vitamin B<sub>2</sub> and quercetin**, 2016, 114p, Thesis (Doctoral) – Food Science and Technology Program. Federal University of Pará, Belém.

This study aimed to produce, characterize and verify the technical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) and glycomacropeptide (GMP) supramolecular structures, and their potential in the food industry. The  $\alpha$ -la/GMP supramolecular structures were prepared in a molar ratio of 1: 0.689, respectively. This proportion was defined by isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry aided in determining the temperature values used since the formation of supramolecular structures was verified at higher and lower values than the denaturation temperature of the  $\alpha$ -la. For GMP could not be established denaturation temperature, because it has no defined tertiary structure. The circular dichroism and fluorimetry analysis showed that there was interaction between  $\alpha$ -la and GMP molecules. The supramolecular structures, in general, kept the  $\alpha$ -helix secondary structures, but the intensity of these secondary structures may vary in the different conditions tested. The supramolecular structures have hydrophobic core. The particle size of supramolecular structures ranging from nano to micrometer, demonstrating that can be controlled through variables tested: pH (3.5 to 6.5) Heating temperature (25 to 75 °C) and heating time. The stability of supramolecular structures was evaluated by monitoring the particle size and the  $\zeta$  potential at temperatures of 4 and 25 °C for 60 days. The supramolecular structures formed at pH 6.5 have higher system stability with  $\zeta$  potential absolute values of approximately -30 mV. The morphology of supramolecular structures was determined by transmission electron microscopy and it was observed that proteins associated forming spherical structures. The foaming ability of supramolecular structures was evaluated by homogenization method, determining the increased volume, stability and expansion of the foam. It was found that the structures formed at pH 6.5 and 75 °C showed higher foaming ability. The emulsifying properties of the supramolecular structures were determined by the emulsifying activity index and emulsion stability index, using the turbidimetric method. However, the variables tested (pH, temperature and time) showed no effect on emulsifying properties. The surface tension of the supramolecular structures, determined by the Wilhelmy method showed a mean value of 50.825 mN·m<sup>-1</sup>, demonstrating that the supramolecular structures can be effective in stabilizing emulsions and foam products. The supramolecular structures were able to encapsulate quercetin and vitamin B<sub>2</sub>, with maximum encapsulation efficiency of 98.64% and 31.11%, respectively. The stability of carrier systems was evaluated by monitoring the particle size and  $\zeta$  potential for 60 days. For quercetin, systems prepared at pH 6.5 were stable for 60 days, while for vitamin B<sub>2</sub>, the stability of 60 days was demonstrated by the systems prepared at pH 3.5.

**Keywords:** Protein; whey; particle size;  $\zeta$  potential; stability; encapsulation.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

- Figure 1. Differential scanning calorimetry of proteins (a) GMP 80  $\mu$ M and (b)  $\alpha$ -la 80  $\mu$ M; red line represents curve fit.....28
- Figure 2. Isothermal titration calorimetry of GMP and  $\alpha$ -la protein.....30
- Figure 3. CD spectra of the native proteins  $\alpha$ -la (red) and GMP (black) and supramolecular structures in different systems.....33
- Figure 4. Emission spectra of chromophores of the native proteins  $\alpha$ -la (red) and GMP (black), and of the protein supramolecular structures in different systems.....35
- Figure 5. (a) Three-dimensional response surface for volume increase (VI) as a function of pH and temperature for supramolecular structures. (b) Three-dimensional response surface for foam stability (FS) as a function of pH and temperature for supramolecular structures.....40

### Capítulo III

- Figure 1. Surface tension for the systems of  $\alpha$ -la and GMP supramolecular structures formed under different conditions.....60
- Figure 2. Density behavior of systems of  $\alpha$ -la and GMP supramolecular structures formed under different conditions.....61
- Figure 3. Transmission electron microscopy of supramolecular structures formed at pH 3.5 and 25 °C/40 min, mag. 30000x (a); pH 3.5 and 75 °C/20 min, mag. 30000x (b); pH 3.5 and 75 °C/40 min, mag. 85000x (c); pH 5.0 and 50 °C/30 min, mag. 12000x (d).....63
- Figure 4. Transmission electron microscopy of supramolecular structures formed at pH 6.5 and 25 °C/20 min (a); pH 6.5 and 25 °C/40 min (b); pH 6.5 and 75 °C/20 min (c); pH 6.5 and 75 °C/40 min (d).....64

### Capítulo IV

- Figura 1. Estrutura química da quercetina.....69
- Figura 2. Estrutura química da vitamina B<sub>2</sub>.....70
- Figura 3. Curva de calibração da quercetina em etanol absoluto, absorvância determinada a 373 nm.....76



|   |    |
|---|----|
| Figura 4. Curva de calibração de vitamina B <sub>2</sub> em água, absorvância determinada a 440 nm..... | 77 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

|  |    |
|--|----|
| Table 1. 2 <sup>3</sup> factorial design to evaluate the influence of pH, time and temperature variables on the protein supramolecular structures formation..... | 24 |
| Table 2. Thermodynamic parameters of the $\alpha$ -la and GMP interaction, at 25 °C.....   | 31 |
| Table 3. Particle size distribution of protein supramolecular structures.....  | 37 |

### Capítulo III

|   |    |
|---|----|
| Table 1. 2 <sup>3</sup> factorial experimental design used to prepare supramolecular protein structures.....  | 50 |
| Table 2. Average size measurements (nm) of the formed supramolecular structures of $\alpha$ -la and GMP stored over the period of time at 25°C..... | 53 |
| Table 3. Average size measurements (nm) of the formed supramolecular structures of $\alpha$ -la and GMP stored over the period of time at 4 °C..... | 54 |
| Table 4. Average measurements of $\zeta$ potential (mV) of the supramolecular structures stored over the period of time at 25 °C.....               | 56 |
| Table 5. Average measurements of $\zeta$ potential (mV) of the supramolecular structures stored over the period of time at 4 °C.....                | 57 |

### Capítulo IV

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Delineamento fatorial 2 <sup>3</sup> seguido para preparação das estruturas supramoleculares proteicas.....   | 72 |
| Tabela 2. Tamanho médio, potencial $\zeta$ , eficiência de encapsulação (%) e capacidade de ligação (%) das estruturas supramoleculares de $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina, em diferentes concentrações.....               | 77 |
| Tabela 3. Tamanho médio, potencial $\zeta$ , eficiência de encapsulação (%) e capacidade de ligação (%) das estruturas supramoleculares de $\alpha$ -la e GMP carreadoras de vitamina B <sub>2</sub> , em diferentes concentrações..... | 82 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 4. Estabilidade das estruturas supramoleculares formadas por $\alpha$ -la e GMP com quercetina a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ avaliada por tamanho de partícula (nm) e potencial $\zeta$ (mV)..... | 87 |
| Table 5. Estabilidade das estruturas supramoleculares formadas por $\alpha$ -la e GMP com vitamina B a $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ avaliada por tamanho de partícula (nm) e potencial $\zeta$ (mV).....  | 89 |

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| RESUMO .....   | iv   |
| ABSTRACT .....   | v    |
| LISTA DE FIGURAS .....                                 | vi   |
| LITA DE TABELAS.....                                   | viii |
| INTRODUÇÃO.....  | 1    |
| OBJETIVO GERAL.....                                    | 3    |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                            | 3    |
| CAPÍTULO I. REFERENCIAL TEÓRICO .....                  | 5    |
| 1. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....                     | 6    |
| 2. AGREGAÇÃO PROTEICA .....                            | 7    |
| 3. ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....            | 8    |
| 4. NANOESTRUTURAS PROTEICAS .....                      | 9    |
| 5. GELIFICAÇÃO.....                                    | 11   |
| Referências.....                                       | 13   |
| CAPÍTULO II.....                                       | 19   |
| ABSTRACT.....  | 20   |
| 1. Introduction.....                                   | 21   |
| 2. Materials and Methods.....                          | 22   |
| 2.1. Materials.....                                    | 22   |
| 2.2. Differential scanning calorimetry .....           | 23   |
| 2.3. Isothermal titration calorimetry .....            | 23   |
| 2.4. Supramolecular protein structure preparation..... | 33   |
| 2.5. Circular dichroism.....                           | 25   |
| 2.6. Fluorescence spectroscopy.....                    | 25   |
| 2.7. Particle size distribution.....                   | 25   |
| 2.8. Foaming ability .....                             | 26   |
| 2.9. Emulsifying properties .....                      | 27   |
| 2.10. Statistical analysis .....                       | 27   |
| 3. Results and Discussion .....                        | 28   |
| 3.1. Differential scanning calorimetry .....           | 28   |
| 3.2. Isothermal titration calorimetry .....            | 29   |
| 3.3. Circular dichroism.....                           | 31   |

|   |    |
|---|----|
| 3.4. Fluorescence spectroscopy.....   | 34 |
| 3.5. Particle size distribution.....  | 36 |
| 3.6. Foaming ability .....  | 39 |
| 3.7. Emulsifying properties.....  | 41 |
| 4. Conclusion .....   | 41 |
| Acknowledgments .....   | 42 |
| References.....   | 42 |
| CAPÍTULO III.....   | 46 |
| ABSTRACT.....   | 47 |
| 1. Introduction.....  | 48 |
| 2. Materials and Methods.....   | 49 |
| 2.1. Materials.....   | 49 |
| 2.2. Supramolecular protein structure preparation .....                         | 49 |
| 2.3. Stability of supramolecular protein structures as a function of time ..... | 50 |
| 2.4. Surface tension .....  | 51 |
| 2.5. Density .....  | 51 |
| 2.6. Transmission Eletronic Microscopy .....                                    | 52 |
| 2.7. Statistical analysis .....   | 52 |
| 3. Results and Discussion .....   | 52 |
| 3.1. Stability of supramolecular protein structures as a function of time ..... | 52 |
| 3.2. Surface tension.....   | 59 |
| 3.3. Density .....  | 61 |
| 3.4. Transmission Eletronic Microscopy .....                                    | 61 |
| 4. Conclusion .....   | 64 |
| Acknowledgments .....   | 65 |
| References.....   | 65 |
| CAPÍTULO IV .....   | 67 |
| RESUMO.....   | 68 |
| 1. Introdução .....   | 69 |
| 2. Materiais e Métodos.....   | 71 |
| 2.1. Materiais.....   | 71 |
| 2.2. Preparação das estruturas supramoleculares proteicas .....                 | 71 |
| 2.3. Curva de calibração de quercetina .....                                    | 72 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4. Encapsulação de quercetina em estruturas supramoleculares proteicas .....              | 72 |
| 2.5. Curva de calibração de vitamina B <sub>2</sub> .....                                   | 73 |
| 2.6. Encapsulação de vitamina B <sub>2</sub> em estruturas supramoleculares proteicas ..... | 73 |
| 2.7. Eficiência de encapsulação (%) .....   | 73 |
| 2.8. Determinação da capacidade de ligação (CL).....  | 74 |
| 2.9. Distribuição do tamanho das partícula.....   | 74 |
| 2.10. Potencial $\zeta$ .....   | 75 |
| 2.11. Estabilidade durante a estocagem .....  | 75 |
| 2.12. Análise estatística.....  | 75 |
| 3. Resultados e Discussão .....   | 75 |
| 3.1. Curva de calibração de quercetina .....  | 75 |
| 3.2. Curva de calibração de vitamina B <sub>2</sub> .....                                   | 76 |
| 3.3. Encapsulação de quercetina .....   | 77 |
| 3.4. Encapsulação de de vitamina B <sub>2</sub> .....                                       | 81 |
| 3.5. Estabilidade durante a estocagem .....   | 85 |
| 4. Conclusão.....   | 90 |
| Agradecimentos .....  | 90 |
| Referências.....  | 91 |
| CONCLUSÃO GERAL .....   | 94 |
| APÊNDICE A – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO .....                             | 95 |

## INTRODUÇÃO

Proteínas do soro de leite são biopolímeros largamente estudados, devido às suas propriedades técnico-funcionais úteis na indústria de alimentos, como habilidade de formação de espuma, emulsificante, gelificante, capacidade de formação de nanoestruturas, nanoemulsões e carreadores de compostos bioativos, além do seu alto valor nutricional (Kimpel e Schmitt, 2015; Ramos et al. 2014).

Devido às suas características conformacionais, de superfície, tamanho e carga líquida, as proteínas do soro conseguem se auto ou co-associar, originando estruturas supramoleculares nano ou micrométricas. Essas novas estruturas formadas podem apresentar funcionalidades distintas ou melhoradas, quando comparadas às proteínas isoladas. O mecanismo de formação, assim como as propriedades das estruturas supramoleculares dependem principalmente do balanço das forças atrativas e repulsivas, e das condições físico-químicas do meio, como pH, temperatura, força iônica e concentração das proteínas (Kimpel e Schmitt, 2015; Salvatore et al., 2011; Nigen et al., 2010).

Agregados proteicos são formados através do processo de autoassociação entre as moléculas de proteínas. Esses agregados agem como blocos de construção na montagem de nano ou microestruturas organizadas em rede. Proteínas do soro de leite, quando desnaturadas, podem se agregar e formar gel. Uma vez desnaturadas, as proteínas expõem seus sítios hidrofóbicos, favorecendo as interações hidrofóbicas para formação dos agregados (Ramos et al., 2014; Livney, 2010).

A compreensão do mecanismo de associação proteica é essencial para aplicação das estruturas supramoleculares nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, etc. As estruturas supramoleculares apresentam grande potencial para melhorar características funcionais de alimentos, podendo ser utilizadas como estabilizadores de espuma e de emulsão. Além disso, podem agir como sistemas carreadores de compostos bioativos instáveis e de baixa solubilidade (Salvatore et al., 2011; Nigen et al., 2010).

A  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) é uma proteína do soro de leite globular, com 123 resíduos de aminoácidos (Barbana e Pérez, 2011). O glicomacropéptido (GMP) é um macropéptido do soro de leite, originado da hidrólise da  $\kappa$ -caseína (Farías e Pilosof, 2016). Tanto a  $\alpha$ -la quanto o GMP apresentam propriedades gelificantes e foram selecionadas neste estudo para formar estruturas supramoleculares funcionais, a partir de mecanismos de agregação e autoassociação.

Modificando-se variáveis do meio, como pH, temperatura e tempo de aquecimento, é possível obter estruturas supramoleculares proteicas com características distintas. O controle e a compreensão dos mecanismos de formação, assim como o conhecimento das características das estruturas supramoleculares, permite sua utilização em diferentes tipos de produtos. No intuito de compreender a associação entre as proteínas e suas aplicações, esta tese está organizada da seguinte maneira:

**Introdução** descreve a capacidade de associação de proteínas e seu potencial de utilização.

**Capítulo I** apresenta breve Referencial Teórico, para contextualização de conceitos importantes para o desenvolvimento da tese, assim como relata trabalhos já publicados sobre o tema.

**Capítulo II** traz o artigo “Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures”, publicado em *Food Research International* (v. 64, p. 157-165, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.079). Esse trabalho apresenta dados experimentais de calorimetria diferencial de varredura, utilizada para determinação de temperaturas de desnaturação das proteínas do soro de leite  $\alpha$ -la e GMP, e de calorimetria de titulação isotérmica, que definiu a razão molar entre essas proteínas. Além disso, apresenta a preparação de estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP em diferentes condições de pH, temperatura e tempo de aquecimento. As técnicas de caracterização de dicroísmo circular e fluorimetria confirmaram a associação entre as duas proteínas. Espalhamento dinâmico de luz foi utilizado para definição dos tamanhos de partícula das estruturas supramoleculares. As estruturas supramoleculares formadas foram testadas em relação a sua capacidade de formação de espuma e de emulsificação. As variáveis pH e temperatura influenciaram significativamente o volume e estabilidade de espuma, enquanto que sobre a propriedade de emulsificação não se observou efeito das variáveis.

**Capítulo III** traz o manuscrito “Supramolecular structures of  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide: stability, characterization, and technical-functional properties”. Esse trabalho apresenta o estudo da estabilidade durante o armazenamento a (25 e 4) °C das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP, avaliada por tamanho de partícula e potencial  $\zeta$ . De uma forma geral, as estruturas supramoleculares apresentaram estabilidade por 60 dias. A capacidade das estruturas supramoleculares em adsorverem nas interfaces água/ar foi comprovada determinando-se a tensão superficial. Microscopia de transmissão eletrônica foi utili-



zada para caracterização da morfologia das estruturas supramoleculares, e verificou-se que são organizadas na forma de *clusters*.

**Capítulo IV** traz o manuscrito “Estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -lactoalbumina e glicomacropéptido como matrizes carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub>”. Esse trabalho apresenta a encapsulação de quercetina (lipossolúvel) e vitamina B<sub>2</sub> (hidrossolúvel) em estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP, para avaliação da sua capacidade em encapsularem esses compostos bioativos. As estruturas supramoleculares apresentaram maior eficiência de encapsulação para a quercetina, demonstrando que apresentam mais sítios hidrofóbicos do que hidrofílicos. Além disso, foi feita a caracterização e monitoramento da estabilidade dessas estruturas carreadoras por determinação de tamanho de partícula e potencial  $\zeta$ . Os sistemas carreadores apresentaram estabilidade por até 60 dias.

**Conclusão geral** apresenta um resumo dos resultados e considerações importantes sobre o trabalho.

## **OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a capacidade de formação de estruturas supramoleculares entre  $\alpha$ -la e GMP, através de metodologia simples e de baixo custo, variando-se as condições do meio, para relacionar as características dessas novas estruturas com suas propriedades técnico-funcionais.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estabelecer, por calorimetria de titulação isotérmica, a razão molar de interação entre as proteínas estudadas, para utilização dessa proporção nos sistemas de estruturas supramoleculares; e determinar as grandezas termodinâmicas envolvidas nas interações água/proteína.
- Determinar a temperatura de desnaturação da  $\alpha$ -la e GMP por calorimetria diferencial de varredura para determinação das temperaturas de trabalho. O objetivo foi preparar estruturas supramoleculares a 25 °C, e em temperaturas superior e inferior às temperaturas de desnaturação, para se avaliar o comportamento das proteínas em diferentes condições.
- Preparar as estruturas supramoleculares proteicas em diferentes condições de pH (3,5; 5,0 e 6,5), de temperatura (25, 50 e 75 °C) e de tempos de aquecimento (20, 30 e 40 minutos).

- Caracterizar a conformação das estruturas supramoleculares, avaliando-se as estruturas secundárias presentes através de dicroísmo circular (DC) e a hidrofobicidade do meio dos cromóforos por fluorimetria.
- Determinar o tamanho de partículas por espalhamento de luz e a estabilidade do sistema pelo potencial  $\zeta$ .
- Avaliar a morfologia das estruturas supramoleculares por microscopia eletrônica de transmissão.
- Verificar a estabilidade dos sistemas de estruturas supramoleculares ao longo do tempo de armazenamento, analisando-se o tamanho de partícula e o potencial  $\zeta$ .
- Avaliar a capacidade de formação de espuma pelo método de homogeneização, analisando-se o aumento de volume, a estabilidade e a expansão da espuma formada pelas estruturas supramoleculares.
- Avaliar as propriedades emulsificantes das estruturas supramoleculares pela determinação dos índices de atividade e de estabilidade emulsificantes.
- Determinar a densidade das estruturas supramoleculares formadas.
- Determinar a tensão superficial das estruturas supramoleculares para avaliação do seu potencial como agentes estabilizadores de espuma e de emulsões.
- Estudar a utilização das estruturas supramoleculares como matrizes carreadoras de compostos bioativos lipó e hidrossolúveis utilizando como exemplos a quercetina e a vitamina B<sub>2</sub>, respectivamente.
- Verificar a estabilidade ao longo do tempo de armazenamento dos sistemas de estruturas supramoleculares com os compostos bioativos, avaliando-se tamanhos de partícula e potencial  $\zeta$ .

## **CAPÍTULO I. REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Proteínas, açúcares, gorduras e sais são constituintes do leite bovino que o tornam um alimento de características únicas na dieta dos seres humanos. As proteínas lácteas são classificadas em caseínas e proteínas do soro e contêm aminoácidos essenciais em suas estruturas, o que lhes confere a característica de elevado valor nutricional. As proteínas do soro de leite, além de funcionalidades biológicas, como atuação na modulação do sono e na inibição da enzima conversora de angiotensina, exibem também propriedades técnico-funcionais que as qualificam para o emprego como agentes emulsificantes, espumantes e gelificantes, com capacidade de retenção de água e solubilidade em diversos solventes. As soroproteínas não são retidas na massa do queijo durante a fabricação do mesmo, permanecendo em sua quase totalidade no soro de leite. Portanto, podem ser usadas para a fabricação de uma diversidade de produtos na indústria de alimentos, como na confecção de pães, bolos, sorvetes, barras de cereal, complementos alimentares; na formulação de alimentos infantis e de produtos para atletas de alto desempenho, dentre outros; bem como na indústria farmacêutica ou cosmética, pela capacidade de se comportarem como carreadores de compostos bioativos (Ramos et al., 2014; Saglam et al., 2013; Wang et al., 2013; Abdel-Salam e El-Shibiny, 2012; Livney, 2010; Gunasekaran et al., 2007; Sgarbieri, 2005).

As soroproteínas presentes em maior quantidade no leite são a alfa-lactoalbumina e a beta-lactoglobulina. O soro de leite doce contém também as proteínas lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, e o glicomacropéptido. Dentre estas, neste trabalho serão estudadas a alfa-lactoalbumina e o glicomacropéptido.

A  $\alpha$ -lactoalbumina bovina ( $\alpha$ -la) exibe alta digestibilidade e é semelhante à  $\alpha$ -lactoalbumina do leite materno, o que possibilita o seu uso em fórmulas alimentares infantis (Liu et al., 2011; Tolkach e Kulozik, 2005). Em adição, a literatura relata sua atividade bactericida (Pellegrini et al., 1999) e sua capacidade de atuar nos mecanismos de indução de apoptose (Svensson et al., 2003), de inibição da proliferação de células carcinogênicas (Sternhagen e Allen, 2001; Thompson et al., 1992), de ligação com compostos hidrofóbicos (Kamau et al., 2010) e de indução da sensação de saciedade em humanos (Nongonierma e Fitzgerald, 2015), dentre outras. Contém 123 resíduos de aminoácidos (mas não apresenta grupos tióis livres), um sítio de ligação do cátion cálcio, quatro pontes dissulfeto, massa molar de 14,2 kDa e concentração aproximada de 1,2 g/L no soro de leite (Barbana e Pérez, 2011; Kamau et al., 2010).

O glicomacropéptido (GMP) está presente somente no soro de leite doce. Tem massa molar de 6,6 kDa e é o resíduo 106-169 obtido pela clivagem da  $\kappa$ -caseína do leite pela ação

da enzima quimosina durante a fabricação do queijo (Farías e Pilosof, 2016; Mollé e Léonil, 2005). É solúvel em uma larga faixa de pH (Neelima et al., 2013), atua como agente de auto-associação (Farías e Pilosof, 2016), emulsificação e formação de espuma (Kreuz et al., 2008), bem como de gelificação (Burgardt et al., 2015). Quanto à sua capacidade biológica, destacam-se a sua atuação na inibição de adesão bacteriana e viral, supressão de secreção gástrica, modulação do sistema imunológico, inibição de agregação plaquetária, como prebiótico, e a sua utilização em dietas de pacientes com fenilcetonúria, pois o GMP não possui o aminoácido fenilalanina em sua estrutura (Neelima et al., 2013; Kreuz et al., 2008; Mollé e Léonil, 2005).

## **2. AGREGAÇÃO PROTEICA**

Agregados proteicos podem ser usados como ingredientes alimentícios em função do apelo nutricional decorrente da presença de diferentes aminoácidos essenciais. Os agregados proteicos estão aptos a participar de diferentes tipos de interações moleculares, como a interação hidrofóbica, a covalente, a eletrostática e a ligação de hidrogênio. A natureza da interação molecular depende das propriedades físico-químicas das moléculas que são influenciadas pelo tipo de tratamento aplicado às proteínas. A adição de reagentes químicos, a elevação da pressão hidrostática, a proteólise, a presença de campos elétricos e os tratamentos térmicos podem ser utilizados para promoção da agregação proteica e formação de géis. No entanto, sabe-se que a principal interação entre os agregados proteicos é do tipo hidrofóbica, que é dependente da temperatura (Lam, e Nickerson, 2015; Kehoe e Foegeding, 2014; Ramos et al., 2014). O aquecimento desestabiliza as proteínas, eleva a difusão e o número de colisões moleculares, além de aumentar a extensão das interações hidrofóbicas (Bryant e McClements, 1998).

Nesse contexto, observa-se que as proteínas do soro de leite bovino formam agregados quando submetidas ao tratamento térmico até a desnaturação. Nesse caso, elas também formam géis que podem ser usados como ingredientes alimentícios em função do apelo nutricional elevado; e poderão formar agregados do tipo esférico ou em filamento, pois são proteínas globulares. No entanto, para bem caracterizá-los se faz necessário determinar seu tamanho, forma e densidade. Enfatiza-se que essas características podem ser controladas pelas condições de processamento, variando-se também o tempo e o pH, por exemplo, que por sua vez podem levar a alterações na aparência, estabilidade e viscosidade dos produtos. Isso permite que as estruturas proteicas sejam otimizadas para atender determinados tipos de produtos

(Ryan e Foegeding, 2015; Ramos et al., 2014; Nicolai e Durand, 2013; Saglam et al., 2013; van der Linden e Venema, 2007).

Ressalta-se que a maior parte das proteínas do soro estão aptas a se agregar, seja pela autoassociação ou co-associação (Livney, 2010), o que resulta em sua habilidade de aplicação no desenvolvimento de produtos funcionais adicionados de compostos bioativos encapsulados e com propriedades intensificadas de gelificação e emulsificação, entre outras.

### **3. ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

A capacidade de formação de gel e microcápsulas das proteínas do soro de leite, em condições de tratamento térmico brando e somente com variações no pH, sem a adição de reagentes químicos, acrescidas pela sua classificação GRAS (Generally Recognised As Safe) e diferentes propriedades técnico-funcionais que exibem, faz com que elas sejam consideradas aptas à atuação como carreadores em sistemas de liberação controlada de bioativos. Adicionalmente, os géis derivados de proteínas do soro são biodegradáveis, permeáveis e sensíveis a alterações no pH, qualificando-os ao trabalho com compostos bioativos (Wichchukit et al., 2013).

Posto que substâncias bioativas, quando adicionadas a certos produtos, chamados de alimentos funcionais, podem causar alterações indesejadas no sabor e odor ou ter a biodisponibilidade diminuída durante processamento ou armazenamento do produto, é de interesse comercial aumentar a biodisponibilidade dos compostos bioativos sem comprometimento da aceitação do produto final pelos consumidores. Tem-se como exemplos as vitaminas e os antioxidantes, que são geralmente sensíveis e pouco solúveis em meio aquoso. Nesse sentido, o uso de nanopartículas proteicas para encapsulamento de bioativos é uma alternativa, considerando que seu tamanho não interfere na percepção do alimento na boca, adentram facilmente em circulação e alcançam com facilidade os sítios-alvo para liberação dos compostos. A nanocapsulação é útil para o desenvolvimento de produtos, sem comprometer a funcionalidade dos seus componentes durante o processamento ou armazenamento dos mesmos (Hasanvanda et al., 2015; Abdel-Salam e El-Shibiny, 2012; Gunasekaran et al., 2007; Fogliano e Vitaglione, 2005).

Alguns estudos foram realizados abordando a capacidade das proteínas do leite de encapsular e carrear compostos bioativos. Wichchukit et al. (2013) encapsularam vitamina B<sub>2</sub> em gel formado por proteínas do soro e alginato e o incorporaram em uma bebida modelo. O'Neill et al. (2014) encapsularam vitamina B<sub>2</sub> em microesferas de proteínas do soro e verifi-

caram que o processo de encapsulação foi regido principalmente por interações hidrofóbicas. Houve aumento da eficiência de encapsulação com o aumento da hidrofobicidade das moléculas. Liu et al. (2016) encapsularam curcumina em micropartículas de proteínas do soro utilizando a secagem por atomização, verificaram que a interação entre a curcumina e as proteínas foi do tipo hidrofóbica e relataram a atividade antioxidante do sistema curcumina-proteínas do soro; o tamanho de partícula obtido foi de aproximadamente 110  $\mu\text{m}$ . Rao e Khanum (2016) encapsularam, por atomização, curcumina em nanoemulsões contendo gordura de leite e caseinato de sódio. O tamanho de partícula variou de 40 a 250 nm e a eficiência de encapsulação chegou a 91%. Ha et al. (2013) produziram nanopartículas de  $\beta$ -lactoglobulina/quitosana/ácido linoleico, em diferentes condições de concentrações de ácido linoleico e de temperatura, para encapsular quercetina. As nanopartículas apresentaram forma esférica e tamanho entre 170 e 350 nm. A encapsulação da quercetina foi bem-sucedida, com eficiência média de 60%.

#### **4. NANOESTRUTURAS PROTEICAS**

O projeto, a manipulação e a aplicação de estruturas e materiais, em tamanho reduzido e grande área superficial, de modo que esses materiais apresentem propriedades e usos diferenciados em relação àqueles que os originaram, em tamanho macro, é da alçada da nanotecnologia. Essas características levam à produção de materiais diferenciados (nanomateriais) com novas funcionalidades, como melhoramento de estabilidade, reatividade e capacidade para formação de sistemas de liberação controlada de compostos bioativos (Ramos et al., 2014; Gruère, 2012; Buzby, 2010; Bouwmeester et al., 2009; Chen et al., 2006).

A nanotecnologia encontra uso, por exemplo, no desenvolvimento de nanossensores, micelas, nanoemulsões e lipossomas. Entre as vantagens do emprego da nanotecnologia na área de alimentos, pode-se citar a possibilidade de redução no uso de gordura, conservantes e sal nos produtos alimentícios; da melhoria da absorção e liberação de compostos bioativos; da detecção e controle de microrganismos contaminantes em embalagens dos alimentos (sensores); da melhoria da textura, da capacidade gelificante, da impermeabilidade de embalagens; de maior proteção UV e desenvolvimento de nutracêuticos mais estáveis (Magnuson et al., 2011; Chaudhry e Castle, 2011; Duncan, 2011; Liu et al., 2008; Yih e Al-Fandi, 2006; Ligler et al., 2003).

As duas abordagens segundo as quais nanomaterias são produzidos são a teoria “top down”, fundamentada na redução física dos materiais até o tamanho nanométrico; e a teoria

“bottom up”, que se baseia na formação de nanoestruturas a partir de átomos ou moléculas individuais, por meio de sua capacidade de autoassociação ou automontagem (Quintanilla-Carvajal et al., 2010; Sozer e Kokini, 2009).

A capacidade de automontagem e autoassociação apresentadas por proteínas auxilia no projeto de nanoestruturas alimentares. Na autoassociação as moléculas são polimerizadas originando agregados ordenados (Hu et al., 2007; Graveland-Bikker e Kruif, 2006). Para Kentsis e Borden (2004), a agregação gera material floculante e amorfo, com interações covalentes. Guilmineau e Kulozi (2006) relatam que agregados proteicos em tamanho nano auxiliam na estabilização de espumas e emulsões.

Segundo Kimpel e Schmitt (2015) e Chen et al. (2006), as proteínas do soro e seus agregados são capazes de formar nanopartículas com redes poliméricas para dispersão de moléculas bioativas em decorrência, principalmente, de sua capacidade de formação de gel; são de fácil preparo, fácil acompanhamento da evolução do tamanho e da forma e são capazes de se ligar a íons.

Alguns estudos realizados com nanoestruturas formadas com proteínas alimentares podem ser citados. Gunasekaran et al. (2007) produziram nanopartículas de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) com diâmetro menor de 100 nm pelo método de dessolvatação. Os autores adicionaram a uma solução de 2% de  $\beta$ -lg em NaCl 10 mM, pH 9, acetona a uma taxa de 1 mL.min<sup>-1</sup> até que a solução proteica se tornasse turva. Posteriormente à adição de acetona, 0,01 mL de solução de 4% de glutaraldeído-etanol foi incorporada ao sistema para induzir ligações cruzadas entre as partículas.

Gülseren et al. (2012) prepararam nanopartículas de isolados proteicos do soro de leite pelo método de dessolvatação com etanol. O método de dessolvatação pode ser utilizado para obtenção de nanopartículas, pela adição de acetona ou etanol, sob agitação contínua e gotejamento, a uma solução de proteína, até que ocorra separação de fases. Observa-se a turvação ou a sedimentação resultantes da perda de estrutura proteica terciária (Gulseren et al., 2012). Após a dessolvatação, as suspensões foram diluídas (1:100) em tampão citrato de sódio, pH 3, ou em tampão fosfato de sódio, pH 7. As dispersões foram mantidas sob agitação por 30 min e sonicadas por 30 s. Como as nanopartículas não se mostraram estáveis quando diluídas em pH 7, os testes de caracterização foram efetuados somente para as amostras em pH 3. O tamanho de partículas observado foi menor que 100 nm. O aumento da proporção de etanol e da temperatura levou ao aumento do tamanho de partícula.



Hu et al. (2007) formaram nanogéis de ovotransferina (OT) e ovoalbumina (OVA). Os autores prepararam, separadamente, soluções de cada proteína na faixa de concentração de 0,1 a 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi adicionada sobre a solução de OVA, a uma determinada concentração, a solução de OT na mesma concentração e mesmo volume para se obter uma proporção de 1:1 (OVA:OT). Após agitação branda por 15 min, o pH da mistura foi ajustado para 7 (ou 7,5) com NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O sistema foi aquecido a 80 °C por 30 min e obteve-se uma solução de nanogel, com tamanho de partícula entre 100 a 220 nm.

Giroux et al. (2010) prepararam nanopartículas de proteínas do soro, desnaturadas por alteração de pH, na presença de cloreto de cálcio. A acidificação das soluções proteicas induziu a formação das nanopartículas, que posteriormente foram neutralizadas. O diâmetro das nanoestruturas oscilou entre 100 e 300 nm, nas diferentes condições de pH, concentração do sal e tempo de reação.

Pan et al. (2007) avaliaram a formação de micelas de lisozima e  $\beta$ -caseína por titulação. As nanopartículas de forma esférica exibiram diâmetro entre 79 e 344 nm, dependendo do pH, do tratamento térmico e da razão molar de lisozima e de  $\beta$ -caseína.

## 5. GELIFICAÇÃO

A gelificação de proteínas pode ser entendida como um fenômeno de desnaturação proteica seguida de uma agregação entre as moléculas (Totosaus et al., 2002). A gelificação pode ser usada para formar agregados de proteínas, em tamanho nano ou micrométrico, e pode ser conduzida por processos físicos, químicos ou biológicos (Donato et al., 2011; Totosaus et al., 2002).

A gelificação pelo calor, a frio e por alta pressão é a que ocorre com o uso de métodos físicos. A gelificação proteica pelo calor pode ser seguida em duas etapas: 1) desnaturação provocada por calor que gera a dissociação de ligações e o desdobramento da estrutura terciária; 2) associação e agregação entre as moléculas gerando um gel macroscópico. A velocidade da etapa 2 deve ser menor que a da etapa 1, para que a agregação seja ordenada e para que ocorra a formação do gel. O aquecimento provoca a desnaturação, os resíduos hidrofóbicos na superfície são expostos na superfície da proteína e ocorre a troca das ligações dissulfeto, o que leva às interações hidrofóbicas e facilita a agregação entre as proteínas (Andrade e Nasser, 2005; Totosaus et al., 2002; Mine, 1995).

O valor do pH afeta a cinética de agregação e a estrutura dos agregados, influencia a carga líquida das proteínas, as forças repulsivas e atrativas entre as moléculas e a força iônica,

que determinam as interações eletrostáticas (Andrade e Nasser, 2005; Totosaus et al., 2002). Geralmente, o gel obtido é transparente e as partículas são nanométricas quando há repulsão eletrostática entre as moléculas. Já quando a repulsão eletrostática é baixa, os géis são opacos ou brancos e o tamanho de partícula é do tamanho micrométrico. A gelificação produz nanoestruturas proteicas biodegradáveis, de grau alimentício e cujas superfícies podem ser modificadas permitindo que haja sítios de ligação para compostos bioativos (Schmitt et al., 2010; Liu et al., 2008; Andrade e Nasser, 2005).

Géis e microcápsulas proteicos também podem ser formados pelo processo denominado gelificação a frio, em que ocorre desnaturação térmica das proteínas, com formação de agregados solúveis, e consequente gelificação pela alteração da força iônica, com adição de sais ao meio. Íons como  $\text{Ca}^{2+}$  auxiliam as interações entre os agregados (Chen e Subirade, 2007).

Apesar de o aquecimento ser a forma mais comum, alta pressão também pode causar desnaturação proteica. A desnaturação provocada pelo calor origina géis com interações hidrofóbicas, principalmente, enquanto os géis formados por desnaturação por alta pressão são caracterizados por ligações dissulfídicas e de hidrogênio (Totosaus et al., 2002).

Processos químicos também podem ser utilizados para formação de géis proteicos. A alteração do meio, para provocar atração eletrostática e agregação das proteínas, pode ser conseguida pela adição de íons, que reduz a repulsão eletrostática, ou de ácido, que causa desnaturação e aproxima o pH do meio do ponto isoelétrico das proteínas (Totosaus et al., 2002).

A gelificação biológica pode ser induzida por enzimas. A enzima transglutaminase é largamente utilizada para formação de gel reticulado. Essa enzima catalisa reação de transferência de grupamentos acila entre as proteínas (Totosaus et al., 2002). Wang et al. (2013) produziram nanoestruturas de isolado proteico do soro com transglutaminase microbiana. Soluções proteicas, em pH 7,5, foram pré-aquecidas por 15 min a 80 °C. Depois do resfriamento da solução proteica à temperatura ambiente, adicionou-se a transglutaminase e o sistema foi incubado a 50 °C. Após o término da reação e resfriamento, ajustou-se o pH para 7,0 e adicionou-se cloreto de sódio em diferentes concentrações. Os autores verificaram formação de nanoestruturas estáveis com tamanho de partícula de 36 nm, aproximadamente.

A hidrólise de  $\alpha$ -la através da ação de protease serina de *Bacillus licheniformes* na presença de diferentes íons divalentes permitiu que os peptídeos formados se autoassociassem, originando nanotubos. Os nanotubos de  $\alpha$ -la apresentaram potencial para ser utilizados como agentes viscosantes e espessantes. Além disso, por possuírem cavidade com diâmetro de 20

nm, podem ser utilizados como encapsuladores de compostos bioativos (Ipsen e Otte, 2007; Graveland-Bikker e Kruijff, 2006).

A formação de nanoestruturas, nanopartículas, nanotubos, agregados, fibras e macromoléculas faz parte do estudo da química supramolecular. Esses materiais podem ser produzidos a partir de processos de automontagem e auto-organização, que se baseiam na capacidade das proteínas em se agregar e dar origem a estruturas maiores (Tischer e Tischer, 2012; Nigen et al., 2010).

A compreensão do mecanismo de associação entre as proteínas e o controle das forças envolvidas na formação das estruturas supramoleculares é fundamental para adequação das características dessas estruturas às funcionalidades de interesse. As estruturas supramoleculares apresentam características melhoradas quando comparadas às proteínas in natura. Entre os potenciais de utilização, a capacidade de carrear compostos bioativos é importante para desenvolvimento de produtos funcionais (Kurukji et al., 2016, Nigen et al., 2010).

Nigen et al. (2007) estudaram a associação entre proteínas de cargas opostas,  $\alpha$ -la e lisozima, e verificaram a formação de heterodímeros via interações eletrostáticas. Esses heterodímeros funcionaram como pontos de partida na formação de estruturas supramoleculares, caracterizadas por partículas esféricas. Nigen et al. (2010) caracterizaram essas estruturas supramoleculares e observaram que os agregados esféricos se associam até formar microesferas maiores, formando as estruturas supramoleculares.

## Referências

ABDEL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: **A review. International Journal of Dairy Technology**, v. 65, 13-21, 2012.

ANDRADE, C.T.; NASSER, R.O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.25, 315-321, 2005.

BARBANA, C.; PÉREZ, M. D. Interaction of  $\alpha$ -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties - A review. **International Dairy Journal**, v. 21, 727-741, 2011.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; DE HEER, C. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, 52-62, 2009.

BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, 143–151, 1998.

BURGARDT, V. C. F.; ZÜGE, L. C. B.; DE BONNA SARTOR, G.; WASZCZYNSKYJ, N.; SILVEIRA, J. L. M.; HAMINIUK, C. W. I. The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: rheological, optical and microstructural characteristics. **Food Hydrocolloids**, 49, 11-17, 2015.

BUZBY, J. C. Nanotechnology for Food Applications: More Questions Than Answers. **The Journal of Consumer Affairs**, v. 44, 528-545, 2010

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, 595-603, 2011.

CHEN, L. Y.; SUBIRADE, M. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, 354-362, 2007.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, 272–283, 2006.

DONATO, L.; KOLODZIEJCZYK, E.; ROUVET, M. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 734-742, 2011.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, 1-24, 2011.

FARÍAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. The influence of acid type on self-assembly, rheological and textural properties of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v. 55, 17-25, 2016.

FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P. Functional foods: planning and development. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, 327–340, 2005.

GIROUX, H. J.; HOUDE, J.; BRITTEN, M. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 24, 341–346, 2010.

GRUÈRE, G. P. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. **Food Policy**, v.37, 191–198, 2012.

GUILMINEAU, F.; KULOZIK, U. Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 1: Effect of the heating time. **Food Hydrocolloids**, v. 20, 1105–1113, 2006.

GULSEREN, I.; FANG, Y.; CORREDIG, M. Whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol: Characterization, thermal stability and interfacial behavior. **Journal Food Hydrocolloids**, v.29, 258-264, 2012.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, v. 83, 31–40, 2007.

GRAVELAND-BIKKER J. F.; DE KRUIF C. G. Unique milk protein based nanotubes: food and nanotechnology meet. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, 196–203, 2006.

HA, H-K.; KIM, J. W.; LEE, M-R.; LEE, W-J. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ $\beta$ -lactoglobulin nanoparticle. **Food Research International**, v. 52, 82–90, 2013.

HASANVANDA, E.; FATHIB, M.; BASSIRIC, A.; JAVANMARDA, M.; ABBASZADEH, R. Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, 264–277, 2015.

HU, J.; YU, S.; YAO, P. Stable Amphoteric Nanogels Made of Ovalbumin and Ovotransferrin via Self-Assembly. **Langmuir**, v. 23, 6358-6364, 2007.

IPSEN R.; OTTE J. Self-assembly of partially hydrolysed alpha-lactalbumin. **Biotechnology Advances**, v. 25, 602–605, 2007.

KAMAU, S. M.; CHEISON, S. C.; CHEN, W.; LIU, X-M.; LU, R-R. Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, 197-212, 2010.

KEHOE, J. J.; FOEGEDING, E. A. The characteristics of heat-induced aggregates formed by mixtures of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein. **Food Hydrocolloids**, v. 39, 264-271, 2014.

KENTSIS, A.; BORDEN, K. L. B. Physical mechanisms and biological significance of supramolecular protein self-assembly. **Current Protein & Peptide Science**, v. 5, 125-134, 2004.

KIMPEL, F.; SCHMITT, J. J. Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. **Journal of Food Science**, v. 80, R2361-R2366, 2015.

KREUß, M.; KRAUSE, I.; KULOZIK, U. Separation of a glycosylated and nonglycosylated fraction of caseinomacropptide using different anion-exchange stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, 126-132, 2008.

KURUKJI, D.; NORTON, I.; SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 53, 249-260, 2016.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, 427-434, 2015.

- LIGLER, F. S.; TAITT, C. R.; L.C. SHRIVER-LAKE; SAPSFORD, K.E.; SHUBIN, Y.; GOLDEN, J. P. Array biosensor for detection of toxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, 469–477, 2003.
- LIU, W.; CHEN, X. D.; CHENG, Z.; SELOMULYA, C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 169, 189-195, 2016.
- LIU, D. S.; ZHOU, P.; LIU, X. M.; LABUZA, T. P. Moisture-induced aggregation of alpha-lactalbumin: Effects of temperature, cations, and pH. **Journal of Food Science**, v. 76, 817–823, 2011.
- LIU, Z., JIAO, Y., WANG, Y., ZHOU, C., ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1650–1662, 2008.
- LIVNEY, Y., D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, 73–83, 2010.
- MAGNUSON, B. A.; JONAITIS, T. S.; CARD, J. W. A Brief Review of the Occurrence, Use, and Safety of Food-Related Nanomaterials. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 126-133, 2011.
- MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionally. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, 225-232, 1995.
- MOLLÉ, D.; LÉONIL, J. Quantitative determination of bovine  $\kappa$ -casein macropeptide in dairy products by Liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v. 15, 419-428, 2005.
- NEELIMA; R. S.; RAJPUT, Y. S.; MANN, B. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: A review. **Dairy Science & Technology**, v. 93, 21–43, 2013.
- NICOLAI, T.; DURAND, D. Controlled food protein aggregation for new functionality. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 18, 249-256, 2013.
- NIGEN, M.; GAILLARD, C.; CROGUENNEC, T.; MADEC, M.-N.; BOUHALLAB, S. Dynamic and supramolecular organisation of  $\alpha$ -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. **Biophysical Chemistry**, v. 146, 30-35, 2010.
- NIGEN, M.; CROGUENNEC, T.; RENARD, D.; BOUHALLAB, S. Temperature affects the supramolecular structures resulting from  $\alpha$ -lactalbumin–lysozyme interaction. **Biochemistry**, v. 46, 1248–1255, 2007.
- NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. **Peptides**, v. 73, 20-34, 2015.
- O'NEILL, G. J.; EGAN, T.; JACQUIER, J. C.; L O'SULLIVAN, M.; O'RIORDAN, E. D. Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. **Food Chemistry**, v. 160, 46–52, 2014.

PAN, X.; YU, S.; YAO, P.; SHAO, Z. Self-assembly of  $\beta$ -casein and lysozyme. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 316, 405–412, 2007.

PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; VON FELLEBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, p. 439-448, 1999.

QUINTANILLA-CARVAJAL, M. X.; CAMACHO-DÍAZ, B. H.; MERAZ-TORRES, L. S.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; JIMENÉZ-APARICIO, A.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing. **Food Engineering Reviews**, v. 2, 39–50, 2010.

RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; RODRIGUES, R.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; MALCATA, F. X. Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. **Food Research International**, v. 66, 344–355, 2014.

RAO, P. J.; KHANUM, H. A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound - Curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, 695-702, 2016.

RYAN, K. N.; FOEGEDING, A. Formation of soluble whey protein aggregates and their stability in beverages. *Food Hydrocolloids*, v. 43, 265-274, 2015.

SAGLAM, D.; VENEMA, P.; DE VRIES, R.; SHI, J.; VAN DER LINDEN, E. Concentrated whey protein particle dispersions: Heat stability and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, v. 30, 100-109, 2013.

SCHMITT, C.; MOITZI, C.; BOVAY, C.; ROUVET, M.; BOVETTO, L.; DONATO, L. Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. **Soft Matter**, v. 6, 4676 - 4884, 2010.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. Brazilian. **Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43-56, 2005.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, 2009.

STERNHAGEN, L. G.; ALLEN, J. C. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein  $\alpha$ -lactalbumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 501, 115-120, 2001.

SVENSSON, M., FAST, J., MOSSBERG, A., DURINGER, C., GUSTAFSSON, L., HALLGREN, O., BROOKS, C.L., BERLINER, L., LINSE, S., SVANBORG, C.  $\alpha$ -lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells). **Protein Science**, v.12, p. 2794-2804, 2003.

THOMPSON, M. P.; FARRELL, H. M.; MOHANAM, S.; LIU, S.; KIDWELL, W. R.; BANSAL, M. P. Identification of human milk  $\alpha$ -lactalbumin as a cell growth inhibitor. **Protoplasma**, v. 167, 134-144, 1992.

TISCHER, P. C. S. F.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, 35-53, 2012.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 67, 13-20, 2005.

TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, 589-601, 2002.

VAN DER LINDEN, E.; VENEMA, P. Self-assembly and aggregation of proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, 158-165, 2007.

WANG, W.; ZHONG, Q.; HU, Z. Nanoscale understanding of thermal aggregation of whey protein pretreated by transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 435-446, 2013.

WICHCHUKIT, S.; OZTOP, M. H.; MCCARTHY, M. J.; MCCARTHY, K. L. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33, 66-73, 2013.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, 1184-1190, 2006.



## **CAPÍTULO II. Production, characterization and foamability of $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures**

Renata Silva Diniz<sup>a</sup>, Jane Sélia dos Reis Coimbra<sup>b\*</sup>, Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira<sup>c</sup>, Angélica Ribeiro da Costa<sup>b</sup>, Igor José Boggione Santos<sup>b</sup>, Gustavo Costa Bressan<sup>d</sup>, Antonio Manuel da Cruz Rodrigues<sup>a</sup>, Luiza Helena Meller da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá 66000-000, Belém-PA, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Centro, 36570-000, Viçosa-MG, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Centro, 36570-000, Viçosa-MG, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário s/n, Centro, 36570-000, Viçosa-MG, Brazil.

\* Corresponding author:

Tel.: +55-31-3899-1618

Fax: +55-31-3899-2208.

E-mail address: jcoimbra@ufv.br

*Food Research International* 64, 157-165, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.079

ISSN: 0963-9969

## ABSTRACT

The study of protein interactions has generated great interest in the food industry. Therefore, research on new supramolecular structures shows promise. Supramolecular structures of the whey proteins  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide were produced under varying heat treatments (25 to 75 °C) and acidic conditions (pH 3.5 to 6.5). Isothermal titration calorimetry experiments showed protein interactions and demonstrated that this is an enthalpically driven process. Supramolecular protein structures in aqueous solutions were characterized by circular dichroism and intrinsic fluorescence spectroscopy. Additional photon correlation spectroscopy experiments showed that the size distribution of the structures ranged from 4 to 3,545 nm among the different conditions. At higher temperatures, lower pH increased particle size. The foamability of the supramolecular protein structures was evaluated. Analysis of variance and analysis of regression for foaming properties indicated that the two-factor interactions between pH and temperature exhibited a significant effect on the volume and stability of the foam.

**Keywords:** Self-assembly; Heating; Acidification; Techno-functional properties; Calorimetry.

**Abbreviations:**  $\alpha$ -la,  $\alpha$ -lactalbumin; GMP, glycomacropeptide; HCl, hydrochloric acid; DSC, differential scanning calorimeter; ITC, isothermal titration calorimeter; CD, circular dichroism; VI, volume increase; FS, foam stability, FE, foam expansion; EAI, emulsifying activity index; SDS, sodium dodecyl sulfate; EAI, emulsifying activity index; ESI, emulsion stability index.

## 1. Introduction

Supramolecular structures are stable and well-defined chemical systems formed by molecules held together by non-covalent bonding interactions, such as electrostatic interactions, metal-ligand bonds, dispersion forces/induced, dipole-induced dipole forces, hydrophobic effects and topological bonds. The supramolecular structures are able to act in molecular recognition, catalysis and transport processes and respond to external solicitations through changes in their composition by displacing or shifting the chemical components of the solution (Lenh, 2007). This process provides materials with new functionalities with applications in different areas, especially food science.

Systems able to produce spontaneously defined and functional self-assembled architectures, such as proteins, are in the domain of supramolecular chemistry. Proteins are considered model biomaterials to produce new supramolecular structures. Therefore, controlling the protein self-assembly process can generate a wide variety of particles, such as aggregates, fibers, nanotubes and spherulites (Desfougères et al., 2010).

In food systems, protein self-assembly is generally induced by heating and/or acidification. Heating usually causes partial protein unfolding, exposing hydrophobic sites hidden in the native protein. Under certain conditions, this exposure initiates self-assembly. Thus, the final products can be used in food agents for encapsulating, gelling, thickening, etc. Supramolecular structure formation is dependent on both the conformation of the proteins and the physicochemical conditions of the system (Nigen et al., 2010; Semenova, 2007; Van der Linden & Venema, 2007).

Among the physicochemical conditions, we emphasize: *i*) the pH value, which is dependent upon other physicochemical variables, e.g., ionic strength (Erabit, Flick, & Alvarez, 2014; Nicolai et al., 2011); *ii*) the protein concentration, which enables interactions among proteins and consequently the formation of gels (Erabit, Flick, & Alvarez, 2014); and *iii*) the presence of other molecules that may affect protein aggregation (Erabit, Flick, & Alvarez, 2014). Therefore, understanding protein behavior as well as their structural properties in multicomponent protein systems are prerequisites for developing new sets of proteins with specific features (Nigen et al., 2010). In addition, studying the behavior of the supramolecular structure formed by different proteins can also help control the final quality of different industrial foodstuffs (Erabit, Flick, & Alvarez, 2014).

Therefore, better knowledge of protein behavior in solutions and their interactions with food components, including other proteins, is required when proteins are used as food

ingredients at the industrial scale. In particular, heat treatment, which is widely used in the food industry, can cause protein aggregation and chemical modifications, consequently modifying the properties and behavior of components in the final product (Pinto et al., 2014; Liu & Zhong, 2013; Li et al., 2005).

Whey proteins are a class of proteins that can form aggregates during processing. The conditions used to form these aggregates may produce soluble materials with defined chemical and physical properties, such as surface charge, hydrophobicity, size and shape. On the other hand, these properties can act on the macroscopic properties of the final product, such as viscosity, emulsification and stability (Ryan et al., 2013).

Macroscopic and microscopic properties of materials containing protein assemblies are dependent on the size, structure and interactions of assemblies with the matrix material (Van der Linden & Venema, 2007). Therefore, knowing the properties, particularly the size of the aggregates, is paramount for food science research (Erabit, Flick, & Alvarez, 2014), as the structure of the proteins will define their application in industry.

This study aimed to investigate the formation of supramolecular structures among the whey proteins  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide using heating and acidification techniques. The effect of the different experimental conditions on the conformations of the new structures was examined by applying circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The size distribution was evaluated by photon correlation spectroscopy. Finally, we investigated the foam-forming ability of the supramolecular structures and evaluated emulsion.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

The reagents and proteins were used without further purification. The proteins  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) (94.9% purity) and glycomacropeptide (GMP) (95.6% purity) were provided by Davisco Foods (USA). Hydrochloric acid (HCl) was obtained from Merck (Germany). Deionized water (Milli Q, Millipore, USA;  $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) was used to prepare all aqueous solutions.

The individual aqueous dispersions of  $\alpha$ -la (0.141  $\mu\text{M}$ ) and GMP (0.286  $\mu\text{M}$ ) were prepared, taking into consideration the purity of the proteins. The supramolecular structures were prepared from these suspensions by mixing defined volumes to achieve the same molar ratio defined by stoichiometric coefficient measured by isothermal titration calorimetry.

## 2.2. Differential scanning calorimetry

The thermal behavior of the proteins  $\alpha$ -la and GMP was determined by differential scanning calorimetry (DSC) measurements (MicroCal VP-DSC, England). Aliquots of 500  $\mu$ L of protein aqueous solutions at 80  $\mu$ M were placed in hermetically sealed aluminum capsules. The cells were heated from 10 to 100  $^{\circ}$ C at a rate of 1  $^{\circ}$ C $\cdot$ min $^{-1}$ . An empty capsule was used as a reference. Denaturation temperature ( $T_d$ ) and enthalpy change ( $\Delta H$ ) were obtained from the thermograms.

DSC was important for determining the denaturation temperature of the proteins and thus defining the heating temperatures, as the objective was to evaluate the formation of supramolecular structures at higher and lower denaturation temperatures.

## 2.3. Isothermal titration calorimetry

Electrical and chemical equipment were calibrated. The change in enthalpy of the association of GMP and  $\alpha$ -la was monitored by an isothermal titration calorimeter (ITC) VP-ITC (MicroCal, England) at 25  $^{\circ}$ C with the aim of characterizing the interactions between these proteins.

In these experiments, a stainless steel cell filled with a 2 mL  $\alpha$ -la aqueous solution (28  $\mu$ M) was titrated with a GMP aqueous solution (250  $\mu$ M). This titration was carried out by sequential injections of 300  $\mu$ L of GMP titrant solution at 300 second intervals for a total of 50 injections. In addition, GMP was titrated in water and these results were subtracted from the protein titration data.

A mathematical model was used to make a nonlinear fit of the corrected heat data, resulting in a titration curve from which values of the stoichiometry ( $N$ ), association constant ( $K_a$ ), standard enthalpy change of interaction ( $\Delta H^{\circ}$ ) and standard Gibbs free energy of interaction ( $\Delta G^{\circ}$ ) were determined by Equation 1. The standard entropy change ( $\Delta S^{\circ}$ ) was obtained from the relationship described by Equation 2:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} \quad (2)$$

## 2.4. Supramolecular protein structure preparation

In order to verify the influence of pH, time, and temperature on the formation of the supramolecular protein structures, a 2<sup>3</sup> factorial experimental design with three center points was used (Table 1). pH values lower and higher than the isoelectric points of the proteins

were selected to study the behavior of supramolecular structures in environments with positive and negative net charges. The temperatures used were higher and lower than the denaturation temperature of  $\alpha$ -la to examine the effect of the denatured protein on the formation of the supramolecular structures.

**Table 1.**  $2^3$  factorial design to evaluate the influence of pH, time and temperature variables on the protein supramolecular structures formation.

| System | pH  | Time (minutes) | Temperature ( $^{\circ}$ C) |
|--------|-----|----------------|-----------------------------|
| 1      | 3.5 | 20             | 25                          |
| 2      | 6.5 | 20             | 25                          |
| 3      | 3.5 | 40             | 25                          |
| 4      | 6.5 | 40             | 25                          |
| 5      | 3.5 | 20             | 75                          |
| 6      | 6.5 | 20             | 75                          |
| 7      | 3.5 | 40             | 75                          |
| 8      | 6.5 | 40             | 75                          |
| 9      | 5.0 | 30             | 50                          |
| 10     | 5.0 | 30             | 50                          |
| 11     | 5.0 | 30             | 50                          |

Aqueous dispersions of  $\alpha$ -la (0.141  $\mu$ M) and GMP (0.286  $\mu$ M) were prepared separately and homogenized under moderate agitation at room temperature for 15 minutes in a magnetic stirrer (TE 0851, Tecnal, Brazil). Exact volumes of each solution were mixed to reach the stoichiometric ratio ( $N$ ) established by ITC analysis. To prepare 1 mL of aqueous dispersion of supramolecular structures, 254  $\mu$ L of GMP dispersion (0.286  $\mu$ M) was mixed with 746  $\mu$ L of  $\alpha$ -la dispersion (0.141  $\mu$ M). Thus, the final concentration of GMP was 0.0726  $\mu$ M and the final concentration of  $\alpha$ -la was 0.105  $\mu$ M. The protein dispersion mixture was kept under gentle agitation (TE 0851, Tecnal, Brazil) for 24 hours at 4  $^{\circ}$ C (SP-500 BOD, SP Labor, Brazil).

Afterward, the pH value of each system (HI 2221, Hanna, USA) was adjusted with HCl 0.1 mol $\cdot$ L $^{-1}$  and underwent its respective heat treatment. The systems were placed in an ice bath and stored at 4  $^{\circ}$ C.

## 2.5. Circular dichroism

The secondary structures of the supramolecular structures were evaluated by circular dichroism (CD). CD spectra were obtained with a JascoJ-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Japan) equipped with a Peltier temperature controller (PFD 425S, Jasco, Japan) coupled to a thermostatic bath (AWC 100, Julabo, Germany). The spectra were obtained at 25 °C using a 10 mm quartz cuvette (Hellma Analytics, Germany) at a wavelength range of 190 to 260 nm. Deionized water was used as a blank.

Each spectrum was obtained by averaging ten consecutive readings. Individual dispersions of  $\alpha$ -la (0.105  $\mu$ M) and GMP (0.0726  $\mu$ M) without the heat treatment and acidification were used as control. The mean residual ellipticity (MRE) was calculated using Equation 3,

$$MRE = \frac{\Theta_{obs}}{10nlC_p} \quad (3)$$

where  $\Theta_{obs}$  is the CD in milli-degrees,  $n$  the number of amino acid residues,  $l$  the cell path length in centimeters and  $C_p$  the mole fraction.

## 2.6. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence analyses were performed using a K2 spectrofluorometer (ISS, USA) to evaluate conformational changes in the protein supramolecular structures. Samples were analyzed in 10 mm quartz cuvettes (Hellma Analytics, Germany) at 25 °C (9001, PolyScience, USA). Fluorescence spectra were registered in the range of 290 to 450 nm. The excitation wavelength was 280 nm, which can excite the tryptophan and tyrosine residues (Lakowicz, 2006). Individual dispersions of  $\alpha$ -la (0.105  $\mu$ M) and GMP (0.0726  $\mu$ M) without heat treatment and acidification were used as control.

## 2.7. Particle size distribution

The particle size of the protein supramolecular structures was determined by Photon Correlation Spectroscopy using a Zetasizer Nano S (Malvern Instrument, England) device. The instrument is equipped with an He/Ne 4 mW laser that emits a 632.8 nm wavelength, a measuring cell, avalanche photodiode detector and correlator. The samples were analyzed without dilution at  $(25.0 \pm 0.1)$  °C in a rectangular polystyrene cuvette. The scattered intensity was measured under a detection angle of 173° relative to the source. Intensity autocorrelation functions were analyzed by the CONTIN algorithm (integrated in the equipment software) to

determine the size distribution. Each measurement represents an average obtained from at least ten readings and lasted approximately 60 seconds. Readings hindered by intensity fluctuations due to impure particles were discarded. Individual dispersions of  $\alpha$ -la (0.105  $\mu$ M) and GMP (0.0726  $\mu$ M) without heat treatment and acidification were used as control.

## 2.8. Foaming ability

To evaluate the foamability of protein supramolecular structures, 20 mL of the protein suspension, in a molar ratio of 0.689:1 comprised of GMP (0.0726  $\mu$ M): $\alpha$ -la (0.105  $\mu$ M), was placed in a 50 mL beaker and homogenized (IKA Ultra Turrax T25 digital, IKA, Germany) for 72 seconds at 13,500 rpm. The total volume and foam volume were measured immediately after homogenization. The percentage of volume increase was calculated by the expression:

$$VI(\%) = \frac{(B - A)}{A} \times 100\% \quad (4)$$

Where:  $VI$  = volume increase,  $A$  = protein suspension volume before agitation (mL),  $B$  = protein suspension volume after agitation (mL).

After stirring, the samples were left to stand at room temperature to assess the foam stability of the protein supramolecular structures. The variation in foam volume was measured immediately after agitation and at 5 minute intervals up to 30, 60 and 120 minutes. The foam stability percentage ( $FS$ ) was evaluated by Equation 5:

$$FS(\%) = \frac{V_{ft}}{V_{f0}} \times 100\% \quad (5)$$

Where  $V_{f0}$  = foam volume formed at time 0;  $V_{ft}$  = foam volume after time t (30, 60, and 120 minutes).

The foam expansion ability ( $FE$ ) was determined and calculated according to Equation 6:

$$FE(\%) = \frac{V_{f0}}{V_{il}} \times 100\% \quad (6)$$

Where  $V_{f0}$  = foam volume formed;  $V_{il}$  = liquid initial volume.

Individual dispersions of  $\alpha$ -la (0.105  $\mu$ M) and GMP (0.0726  $\mu$ M) without the heat treatment and acidification were used as controls.



## 2.9. Emulsifying properties

To determine the emulsifying properties of the supramolecular protein structures, the emulsifying activity index (*EAI*) and emulsion stability index (*ESI*) were determined according to Pearce and Kinsella (1978) and Guo and Mu (2011), with some modifications.

The mixture containing 30 mL of protein dispersions, in a molar ratio of 0.689:1 comprised of GMP (0.0726  $\mu\text{M}$ ): $\alpha$ -la (0.105  $\mu\text{M}$ ) and 10 mL of soy oil was kept under agitation (IKA Ultra Turrax T25 digital, IKA, Germany) for 1 min at 24,000 rpm. Aliquots of the emulsion (50  $\mu\text{L}$ ) were pipetted from the bottom of the container at 0 and 10 min after homogenization and diluted 100-fold using 0.1% sodium dodecyl sulfate aqueous solution (SDS). The absorbance of the diluted solution was measured at 500 nm (Cary 50, Varian, Australia). Absorbance values, measured immediately after agitation stopped ( $A_0$ ) and 10 min ( $A_{10}$ ) after emulsion formation, were used to calculate *EAI* and *ESI* properties.

The emulsifying activity index ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) and emulsion stability index (min) were calculated according to Guo and Mu (2011), with Equations 7 and 8.

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times D}{c \times l \times (1 - \varphi) \times 1000} \quad (7)$$

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times t \quad (8)$$

Where  $c$  is the initial protein concentration ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $\varphi$  is the volume fraction of oil used in the emulsion (0.25),  $D$  is the dilution factor used (100),  $t$  is 10 min and  $A_0$  and  $A_{10}$  are the diluted emulsion absorbances at times (0 and 10) min.

Individual dispersions of  $\alpha$ -la (0.105  $\mu\text{M}$ ) and GMP (0.0726  $\mu\text{M}$ ) without heat treatment and acidification were used as control.

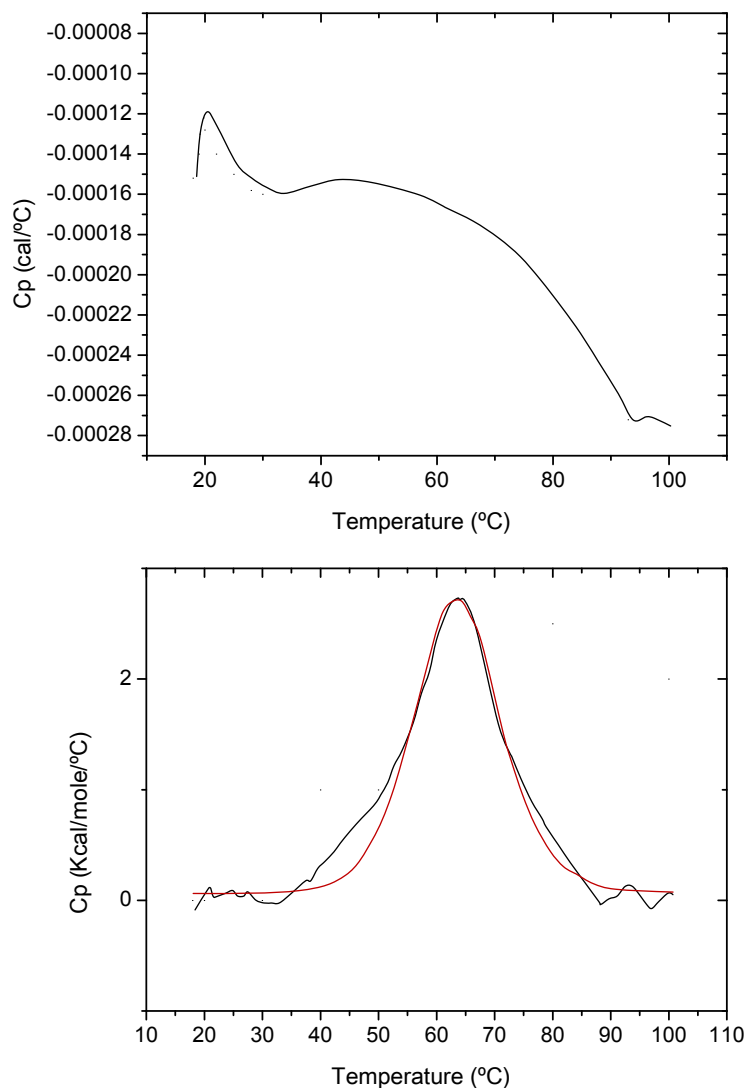
## 2.10. Statistical analysis

The experimental data obtained for the techno-functional properties for all supramolecular structures formed (Table 1) were statistically analyzed using regression analysis (5% probability).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Differential scanning calorimetry

Figure 1 shows the thermal behavior of the proteins with the objective of evaluating the formation of supramolecular structures at higher and lower denaturation temperatures.



**Figure 1.** Differential scanning calorimetry of proteins (a) GMP 80  $\mu$ M and (b)  $\alpha$ -la 80  $\mu$ M; red line represents curve fit.

There was no well-defined curve for GMP because it has no defined tertiary structure, being characterized as an intrinsically unstructured peptide with no sulfide bonds (Neelima et al., 2013; Martinez et al., 2009). The small peak observed at the beginning of the graph is due probably to impurities in the sample presents.

The thermogram obtained for  $\alpha$ -la is characterized by an endothermic process where the peak curve for  $C_p$  vs. temperature was 62.71 °C, corresponding to the denaturation tem-

perature of this protein. De Souza et al. (2009) found a higher value for  $\alpha$ -la denaturation temperature (65.04 °C) in a calorimetric study on whey protein isolate. In a study of thermal properties of protein aggregates, Ju et al. (1999) observed that  $\alpha$ -la denaturation occurs at a temperature range of 59 to 71 °C and the endothermic peak occurs at 67.1 °C. These differences, although small, may result from changes in factors such as protein source, pH and ionic strength. The value of the enthalpy change ( $\Delta H$ ) of the process was  $46.18 \pm 0.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 3.2. Isothermal titration calorimetry

The effect of associating GMP with  $\alpha$ -la was assessed by isothermal titration calorimetry. The values of  $\Delta H$  represent the enthalpy energy absorbed or released when GMP interacts with  $\alpha$ -la. The magnitude of  $\Delta H$  reflects the contributions of four other processes:

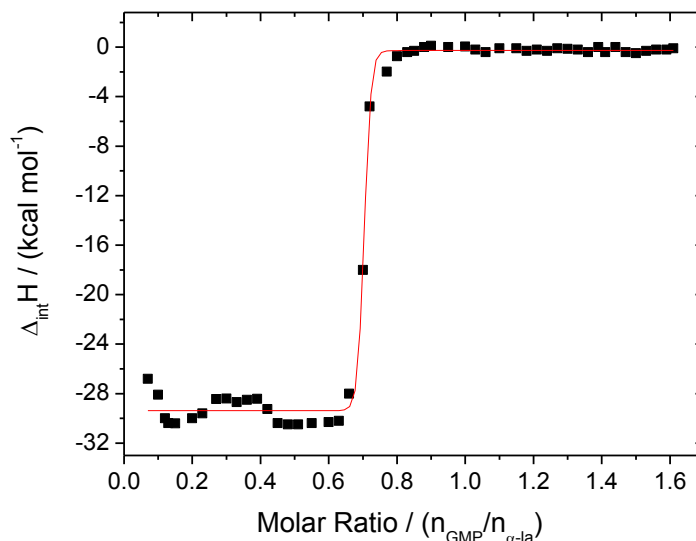
- (i) association/dissociation of ions with charged groups on the proteins ( $\Delta_{\text{int}}H_i$ );
- (ii) association of GMP with  $\alpha$ -la ( $\Delta_{\text{int}}H_{\text{GMP}-\alpha\text{-la}}$ );
- (iii) changes in the solvation of the proteins ( $\Delta_{\text{int}}H_{\text{sol}}$ );
- (iv) rearrangement of the protein molecular structure ( $\Delta_{\text{int}}H_{\text{conf.rear.}}$ ).

Thus:

$$\Delta H^\circ = \Delta_{\text{int}}H_i + \Delta_{\text{int}}H_{\text{GMP}-\alpha\text{-la}} + \Delta_{\text{int}}H_{\text{sol}} + \Delta_{\text{int}}H_{\text{conf.rear.}} \quad (9)$$

The first contribution,  $\Delta_{\text{int}}H_i$ , is associated with the interaction of ions in solution with charged groups in the protein molecules, which is an exothermic process. The second contribution,  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{GMP}-\alpha\text{-la}}$ , refers to the interaction between GMP- $\alpha$ -la. These interactions release energy, contributing to an exothermic  $\Delta H^\circ$ . The third contribution,  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{sol}}$ , refers to the desolvation of the proteins, which is an endothermic process since it requires the interactions of the water-GMP, GMP-ion, ion- $\alpha$ -la, and water- $\alpha$ -la to be broken. The fourth contribution,  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{conf.rear.}}$ , is associated with protein conformational change, which is endothermic as the intramolecular interactions are broken.

The titration of GMP solution in  $\alpha$ -la solution, already subtracted from the blank, produced the curve shown in Figure. 2.



**Figure 2.** Isothermal titration calorimetry of GMP and  $\alpha$ -la protein.

Values of  $\Delta_{\text{int}}H$  are initially exothermic and become increasingly less negative due to the contributions of endothermic processes in accordance to Equation 9:  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{sol}}$  and  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{conf.rear.}}$ . In addition to the disruption of the interactions in the process  $\Delta_{\text{int}}H_{\text{sol}}$  above, the protein-water and protein-ion interactions are also broken. These interactions are quite intense, as they are characterized by hydrogen bonds and electrostatic attractions, respectively. Furthermore, in the interaction between proteins GMP- $\alpha$ -la, the proteins changes their conformation in such a way that the hydrophilic groups are exposed and free to interact with the solution, as seen in the fluorimetry results. Increasing the GMP- $\alpha$ -la molar ratio increases the contribution of the endothermic processes until these values are similar to those of the enthalpy of the exothermic processes. The change in enthalpy then becomes approximately zero, as shown in Figure 2.

As the population of  $\alpha$ -la molecules becomes saturated with GMP, the thermal signal gradually decreases. The curve of the heat integration according to the molar ratio between the reactants was adjusted and the thermodynamic interaction parameters, such as stoichiometric coefficient ( $N$ ), the equilibrium constant ( $K$ ), the standard enthalpy change of interaction ( $\Delta H^\circ$ ), standard free energy change of interaction ( $\Delta G^\circ$ ) and the standard entropic change ( $\Delta S^\circ$ ) were determined using the MicroCal VP-DSC software. Data are shown in Table 2. The stoichiometric coefficient obtained was 0.689, thus the supramolecular structures were produced by mixing dispersions of GMP (0.286  $\mu\text{M}$ ) and  $\alpha$ -la (0.141  $\mu\text{M}$ ) in a molar

ratio of 0.689:1 (GMP: $\alpha$ -la). Under these conditions, we observed that  $\alpha$ -la and GMP have strong interaction due to the value of  $\Delta H^\circ$  being  $-2.963 \cdot 10^4$  cal $\cdot$ mol $^{-1}$ .

**Table 2.** Thermodynamic parameters of the  $\alpha$ -la and GMP interaction, at 25 °C.

|                                      |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
| N                                    | 0.689              |
| K (M $^{-1}$ )                       | $2.03 \times 10^8$ |
| $\Delta H^\circ$ (kcal/mol)          | - 29.63            |
| $\Delta S^\circ$ (cal/mol $\cdot$ K) | - 61.40            |
| T $\Delta S$ (kcal/mol)              | - 18.31            |
| $\Delta G^\circ$ (kcal/mol)          | - 11.32            |

Entropic contribution balancing occurs by two processes. The first is the conformational change of the proteins. This conformation change reduces the degree of translational freedom of the species charged and therefore decreases the entropy of the system. The second process is related to the GMP- $\alpha$ -la interaction. For GMP to interact with  $\alpha$ -la, both proteins need to release the solvation molecules (H<sub>2</sub>O and ions). This process releases the molecules into the solution, increasing the configurational entropy of the system. In this case, the entropy is lower than zero (-61.40 cal/mol $\cdot$ K), thus the first factor prevails over the second factor. Therefore, we conclude that interaction occurs between the proteins  $\alpha$ -la and GMP and the process is enthalpically driven.

### 3.3. Circular dichroism

Figure 3 shows the CD spectra of the native forms of  $\alpha$ -la and GMP and the protein supramolecular structures. The CD spectrum of native  $\alpha$ -la is typical of well-defined  $\alpha$ -helix-rich proteins because of its negative peaks at approximately 222 nm and 208 nm (Figure 3a-c). Native GMP, on the other hand, shows a minimum peak around 198 nm, thus characterizing its secondary structure as a typical random coil.

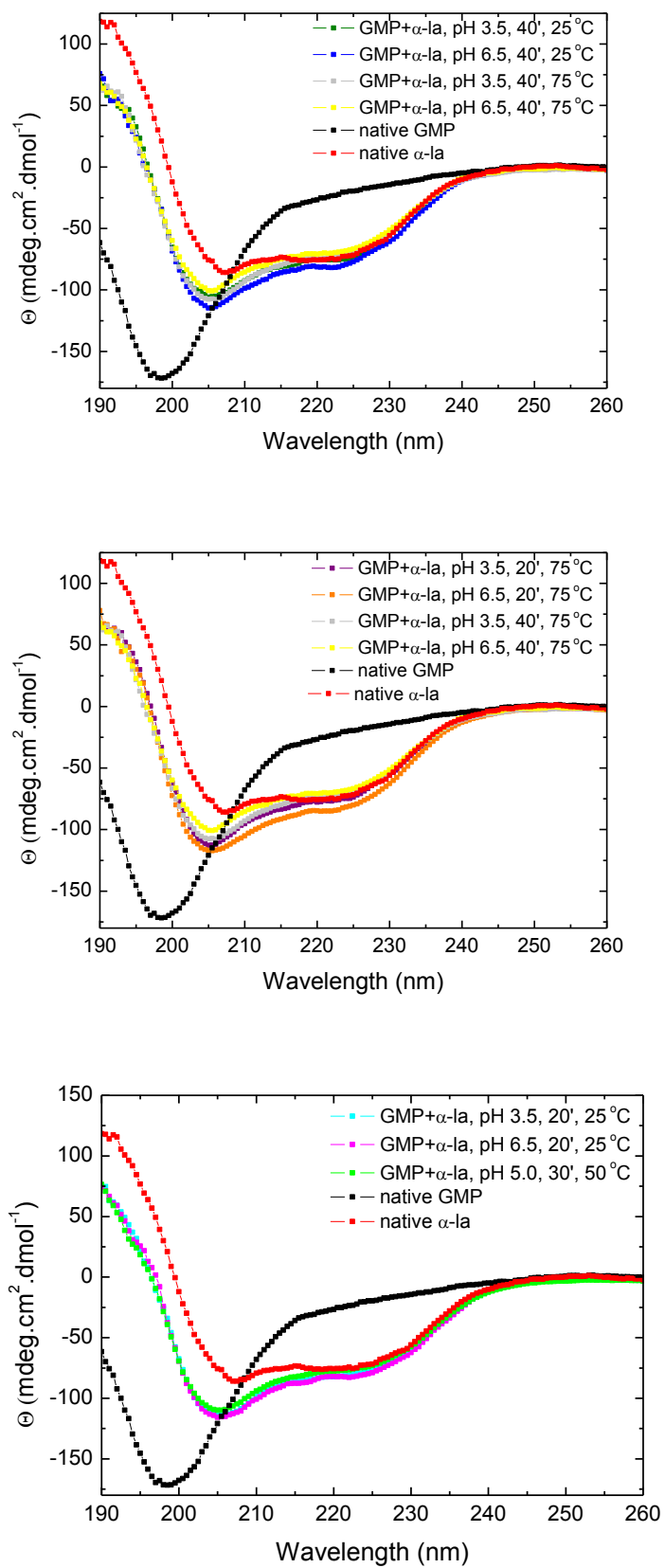
Along with the calorimetry results, these CD spectra obtained here show that the supramolecular structures are indeed formed in solution. The CD spectra obtained for all supramolecular complexes maintained the overall characteristics expected for an  $\alpha$ -helix-rich protein structure, although the negative peak around 208 nm observed for native  $\alpha$ -la was shifted to around 205 nm, possibly due to the contribution of GMP in the system. We noted an increased negative signal intensity around 205-208 nm in all supramolecular structures

analyzed, suggesting that new regular secondary structures may have formed during supramolecular structure assembly.

The treatments confirmed that increased temperature did not cause substantial changes in the overall secondary structure pattern of the supramolecular complexes at pH 3.5. On the other hand, this increase in temperature led to a decrease in the negative molar ellipticity at pH 6.5 (Figure 3a). This same behavior was observed by Faizullin et al. (2013), studying  $\beta$ -casein at similar increasing temperature conditions. At 75 °C, the system at pH 3.5 had more intense negative peaks than the system at pH 6.5, similar to results observed by Naqvi et al. (2013) studying  $\beta$ -lactoglobulin, which displayed higher negative molar ellipticity at pH 2.0 compared to pH 7.0 and 9.0. These findings indicate that in the systems analyzed, lower pH might favor the formation of secondary structures at increased temperatures.

Regarding time exposed to heat, we observed no prominent differences in the CD spectra obtained for supramolecular structures at pH 3.5. However, at pH 6.5, longer heat exposure at 75 °C decreased the negative molar ellipticity of the system, indicating possible loss of regular secondary structures. These results differed from those of Moro et al. (2011), who studied  $\beta$ -lactoglobulin at 85 °C. They observed that the negative CD spectra peaks increased in intensity with longer heating times. Bobály et al. (2014), on the other hand, observed increased molar ellipticity values in CD spectra for lysozymes in acidic conditions, similar to what we observed in our systems at pH 3.5 and 6.5, heated to 75 °C for 40 minutes (Figure 3b). Together, these data show that the acidic condition tested here seems to contribute to maintain the overall content of the secondary structures with longer heat exposure.

For the supramolecular structure prepared at pH 5.0 at 50 °C for 30 minutes there was a short decrease in the intensity of the negative band compared to the systems at 25 °C, indicating the secondary structure of this system was altered with the change in pH and increased temperature. Zhang and Zhong (2012) heated bovine serum albumin and verified that increased temperature reduced the intensity of the negative peaks in CD spectra.



**Figure 3.** CD spectra of the native proteins  $\alpha$ -la (red) and GMP (black) and supramolecular structures in different systems.

### 3.4. Fluorescence spectroscopy

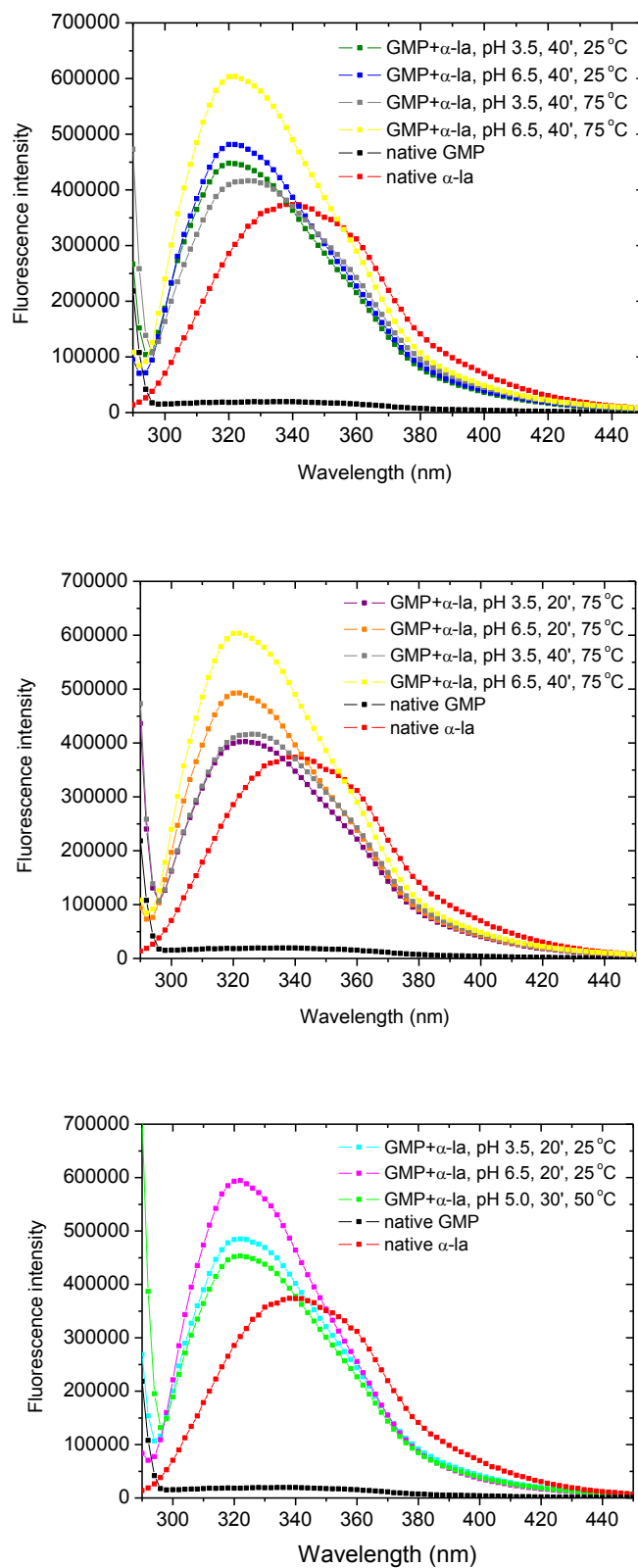
GMP does not present intrinsic fluorescence emission, as its primary sequence does not contain fluorescent amino acid residues such as tyrosine, phenylalanine, and tryptophan (Neelima et al., 2013). On the other hand,  $\alpha$ -la has four tryptophan residues in its primary structure at positions 26, 60, 104 and 118 and four tyrosine residues at positions 18, 36, 50 and 103 (Sgarbieri, 2005). Thus, possible changes in the chromophore environment during the supramolecular structure formation could be monitored through intrinsic fluorescence spectroscopy.

While GMP did not exhibit the expected intrinsic fluorescence, the emission spectrum of native  $\alpha$ -la was characterized by a maximum emission at 338 nm, similar to Zhang et al. 2014. Intrinsic fluorescence spectra of the native proteins  $\alpha$ -la and GMP and of the supramolecular structures excited at 280 nm are shown in Figure 4.

In general, compared to the emission spectrum of native  $\alpha$ -la, the maximum emission peak of all systems analyzed shifted to shorter wavelengths (approximately 322 nm). In addition, an increase in peak emission intensity was observed. These findings indicate the surrounding chemical environment of the chromophores became more apolar (Jindal & Naeem, 2013; Taheri-Kafrani et al., 2010; Zhang et al., 2009; Kafrani-Taheri et al., 2008), suggesting that during the interaction between  $\alpha$ -la and GMP molecules, the chromophores remain buried deeper in the core structures composed of these molecules (Figures 4a and 4b). Furthermore, we found that the systems formed at pH 6.5 presented higher fluorescence intensity (Figures 4a, 4b and 4c), indicating this pH favors the interaction between the proteins  $\alpha$ -la and GMP, since the decrease in polarity may result from the chromophores being further hidden inside the supramolecular structures. These results, together with those obtained by calorimetry and circular dichroism, confirmed that the association between these proteins occurs in the conditions analyzed.

Comparing the systems at pH 3.5 with to those at pH 6.5, increased temperature reduced fluorescence intensity and slightly shifted the maximum fluorescence emission intensity to higher wavelengths, indicating the chromophores neighborhood became more polar and more exposed to the solvent. Zhang and Zhong (2012) also observed that heat decreased bovine serum albumin fluorescence intensity. These findings show the tridimensional features of the supramolecular structures formed might be different among the temperatures analyzed, even though the overall content of secondary structures remained constant (Figures 3a and 4a).





**Figure 4.** Emission spectra of chromophores of the native proteins  $\alpha$ -la (red) and GMP (black), and of the protein supramolecular structures in different systems.

Regarding the heat exposure time, the supramolecular structures maintained at pH 6.5 presented higher fluorescence intensity when incubated for 40 minutes at 75 °C, although no significant difference was observed among exposure times for the systems at pH 3.5 (Figure 4b). Moreover, the supramolecular structures formed at pH 6.5 showed more intense fluorescence emission peak than those formed at pH 3.5 (Figures 4a and 4b). This observation suggests that the less acidic pH solution provides a more suitable environment for the structures when they are exposed to higher temperatures for a longer time. Naqvi et al. (2013) studied the intrinsic fluorescence of  $\beta$ -lactoglobulin and observed that at pH 9.0, the protein showed higher fluorescence intensity than at pH 7.0, in accordance with our results.

Figure 4c shows that systems treated at 50 °C for 30 minutes with pH 5.0 showed less intense emission spectra than systems with pH 6.5 and 3.5 treated at 25 °C for 20 minutes. This indicated that the protein underwent conformational changes around the chromophores due to heating, turning its neighborhood more polar when compared to 25 °C (Zhang et al., 2014).

### **3.5. Particle size distribution**

The size of the protein supramolecular structures was determined by analysis in a Zetasizer device. The results of samples and controls (individual preparations of  $\alpha$ -la and GMP without acidification and without heat treatment) are shown in Table 3. The main populations defined here refer to those with the highest percentage in the particle volume distribution.

**Table 3.** Particle size distribution of protein supramolecular structures

|              | Mean size diameter (nm) |        | % volume distribution |
|--------------|-------------------------|--------|-----------------------|
|              | Peak 1                  | Peak 2 |                       |
| $\alpha$ -la | Peak 1                  | 2      | 100                   |
| GMP          | Peak 1                  | 350    | 77.4                  |
|              | Peak 2                  | 64     | 14.2                  |
|              | Peak 3                  | 5227   | 8.4                   |
| System 1     | Peak 1                  | 4      | 98.9                  |
|              | Peak 2                  | 13     | 0.6                   |
|              | Peak 3                  | 27     | 0.1                   |
| System 2     | Peak 1                  | 265    | 83.8                  |
|              | Peak 2                  | 5151   | 8.6                   |
|              | Peak 3                  | 60     | 7.6                   |
| System 3     | Peak 1                  | 4      | 97.9                  |
|              | Peak 2                  | 11     | 1.9                   |
| System 4     | Peak 1                  | 266    | 82.2                  |
|              | Peak 2                  | 4871   | 10.7                  |
|              | Peak 3                  | 54     | 7.1                   |
| System 5     | Peak 1                  | 1311   | 98.9                  |
|              | Peak 2                  | 5581   | 1.0                   |
|              | Peak 3                  | 205    | 0.1                   |
| System 6     | Peak 1                  | 270    | 88.6                  |
|              | Peak 2                  | 60     | 11.4                  |
| System 7     | Peak 1                  | 3545   | 80.6                  |
|              | Peak 2                  | 1178   | 18.8                  |
|              | Peak 3                  | 439    | 0.7                   |
| System 8     | Peak 1                  | 238    | 77.3                  |
|              | Peak 2                  | 5262   | 11.9                  |
|              | Peak 3                  | 70     | 10.8                  |
| System 9     | Peak 1                  | 1397   | 65.1                  |
|              | Peak 2                  | 5300   | 34.9                  |
| System 10    | Peak 1                  | 1597   | 99.8                  |
|              | Peak 2                  | 5536   | 0.2                   |
| System 11    | Peak 1                  | 1124   | 100.0                 |

$\alpha$ -la is a compact globular protein, which has the dimensions of 2.5 x 3.7 x 3.2 nm in solution (Fox & McSweeney, 1998). After particle size analysis, we found that  $\alpha$ -la had a particle population of 2 nm in diameter, indicating no change in structure during homogenization. On the other hand, the GMP solution had three different populations with sizes larger than the protein particle. The value observed for the GMP main population (350 nm) may be caused by the aggregate formation of these proteins, indicating that the aqueous medium (where the solution has been prepared) is not the ideal vehicle for this protein. Furthermore, it is difficult to analyze size distributions for pure proteins, since larger impurities, although fewer in number, mask the true size of the protein. In systems 2, 4, 5, 7, 8 and 10, particle populations with larger sizes (1,178-5,581 nm) were observed. However, these populations were less common, which suggests these values may be related to the presence of impurities in the samples.

The protein supramolecular structures formed at 25 °C for 20 and 40 minutes at pH 6.5 had a main population with a size of about 265 nm. On the other hand, the structures formed at 25 °C for 20 and 40 minutes at pH 3.5 had approximate sizes of 4 nm for the main population, indicating that the more acidic pH (3.5) at 25 °C does not cause the association between the proteins.

The heat treatment at 75 °C in samples with pH 3.5 originated a main population with particle sizes of 1311 and 3545 nm for the 20 and 40 minute treatment times. This result suggests that a longer heating time induces the formation of larger aggregates, as reported by Ryan et al. (2013). The main populations of systems at pH 6.5 formed by heating at 75 °C for 20 and 40 minutes had sizes of 270 and 238 nm. These values are similar to those observed for systems with the same pH at 25 °C, indicating that at pH 6.5 the heat treatment does not influence the size of supramolecular structures. For structures formed at 75 °C, more acidic pH (3.5) causes the formation of larger particles than those formed by pH 6.5. Phan-Xuan et al. (2011) obtained similar results for  $\beta$ -lactoglobulin microgels. They observed that when pH increased,  $\beta$ -lactoglobulin microgel particle size decreased.

Furthermore, we observed that for systems at pH 3.5, heat treatment at 25 °C did not cause protein aggregation, while heat treatment at 75 °C formed aggregates micrometers in size. This result is in accordance with Le et al. (2008), who verified the larger size of casein and whey protein aggregates with higher temperature. Dybowska (2011) also observed larger whey protein concentrate particles after heat treatment. The systems formed by heat treatment at 50 °C for 30 minutes and pH 5.0 had aggregates with main population particle sizes be-

tween 1124 and 1597 nm. This indicates higher temperatures enable larger aggregates to form, since the structures formed at 25 °C originated particles of at most 266 nm.

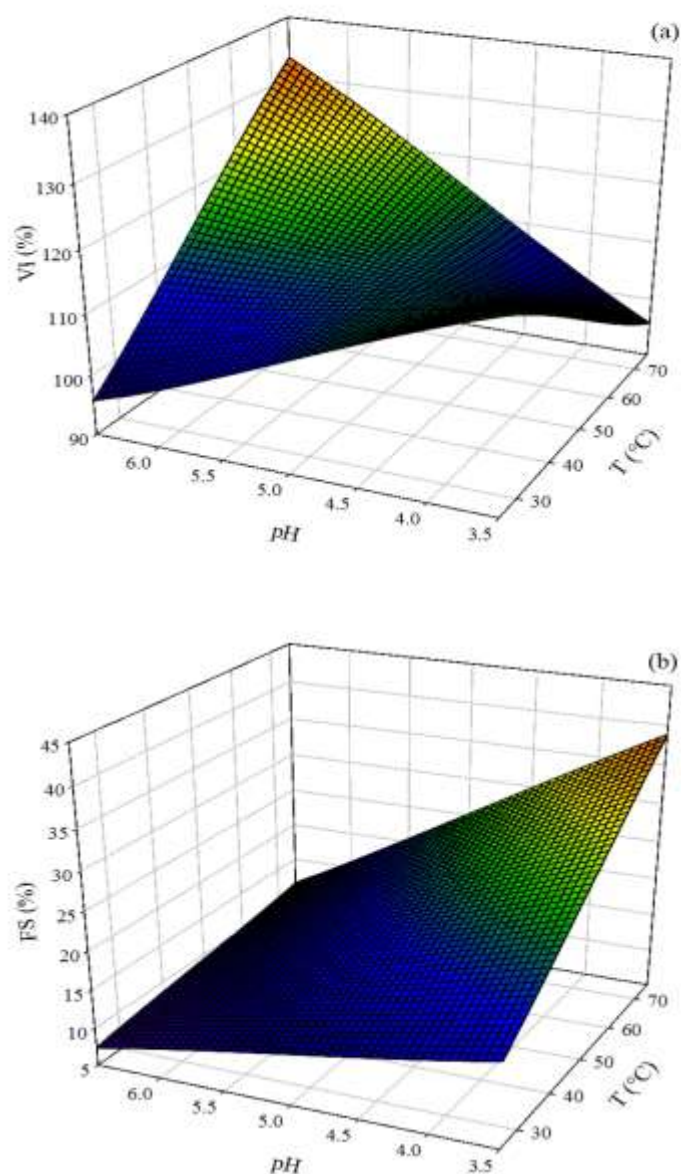
### 3.6. Foaming ability

To evaluate possible improvements in functional properties of supramolecular structures, foam ability was tested at 30, 60 and 120 minutes. Some systems did not remain stable at 60 and 120 minutes, therefore only results for foam ability (VI, FS, FE) at 30 minutes were examined by analysis of variance (ANOVA) and regression analysis. The individual effect of each factor is measured by the mean coefficient of the main effect. The effect of two or more factors is expressed as the coefficient in two-factor or three-factor interactions. ANOVA showed that pH, time and temperature levels had no significant ( $p > 0.05$ ) effect on the properties studied. Only two-factor interactions (pH and temperature) exhibited a significant effect on VI and FS properties, however, indicating that such factors do not work independently and the effect of each factor depends on the level of other factors (Table 4, Figure 5). On the other hand, for FE, the main effects or interactions were not significant.

**Table 4.** Summary of factory analysis of pH, time and, temperature on volume increase (VI) and foam stability (FS)

| Term               | Coefficient ( $\beta_i$ ) for VI | <i>P</i> | Coefficient ( $\beta_i$ ) for FS | <i>P</i> |
|--------------------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
| Constant           | 198.864                          | 0.000    | 368.864                          | 0.000    |
| Main effect        |                                  |          |                                  |          |
| A - pH             | -18.75                           | 0.514    | -39.375                          | 0.428    |
| B - time           | **                               | **       | **                               | **       |
| C - temperature    | -1.958                           | 0.514    | -2.920                           | 0.16     |
| 2-Way Interactions |                                  |          |                                  |          |
| AB                 | **                               | **       | **                               | **       |
| AC                 | 0.417                            | 0.011    | 0.692                            | 0.019    |
| BC                 | **                               | **       | **                               | **       |

\*\*Not statistically significant ( $p > 0.05$ ).



**Figure 5. (a)** Three-dimensional response surface for volume increase (VI) as a function of pH and temperature for supramolecular structures. **(b)** Three-dimensional response surface for foam stability (FS) as a function of pH and temperature for supramolecular structures.

The supramolecular structure system that had the highest ability to increase foam volume was formed at high temperature and high pH (pH 6.5, 75 °C), as noted by Kuropatw et al. (2009). These authors studied the impact of pH on the foam ability of whey protein-egg proteins complex at high temperature found that increased pH leads to an increase in foam volume. CD spectra of these supramolecular structures show that this treatment induced changes in the secondary structure of proteins with a lower ellipticity value compared to other treatments. Furthermore, these supramolecular structures had higher fluorescence intensity,

suggesting the neighborhood of the chromophores became more apolar and foam ability was enhanced by increased protein hydrophobicity. These conformational changes lead to surface-particles capable of strongly packing at the air/water interface and forming a viscoelastic network. These results are in agreement with those reported by Kim et al. (2005), who studied the functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin at different pH and heated to 80 °C. They found that the protein heated at pH 5.5 for 15 min showed the best foam ability. FS properties improved when temperature increased and pH decreased. This may be explained by pH 3.5 being close to the isoelectric point of the proteins, which have low electrostatic interactions as well as hydrophobic interactions at the air-water interface may be responsible for foam stabilization (Kuropatwa et al., 2009). Furthermore, higher temperature positively influenced foam stability due to partial protein unfolding, which in turn increases hydrophobicity, resulting in increased protein-protein interactions (Nicolai et al., 2011; Moro et al. 2011; Nicorescu et al., 2010). Although pH 3.5 is closer to the isoelectric point, the supramolecular structures formed at pH 6.5 were better able to increase foam volume at 75 °C, because the structures formed at a higher pH presented smaller particle size. One of the most important factors for foam formation is the protein adsorption rate, which depends on protein concentration, protein size, protein structure and solution conditions (Moro et al., 2011; Martin et al., 2002). Thus, disordered, smaller and more flexible proteins are better surface agents than ordered, larger and rigid ones (Moro et al., 2011). The GMP solution slightly influenced volume increase and foam expansion, suggesting that  $\alpha$ -la is the protein responsible for foam ability (data not shown).

### **3.7. Emulsifying properties**

To evaluate the emulsifying properties of the protein supramolecular structures, the emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) were calculated by the turbidimetric method. The results for EAI and ESI were examined by analysis of variance (ANOVA) and regression analysis. ANOVA showed that pH, time and temperature levels had no significant ( $p>0.05$ ) effect on the properties studied.

## **4. Conclusions**

Supramolecular structures can be formed by heating and acidifying aqueous solutions of  $\alpha$ -la and GMP. CD results showed changes in the secondary structure of protein supramolecular structures compared to the native proteins. The fluorescence analysis

indicated that the supramolecular structures have a more hydrophobic core to their chromophores. The results of the particle size distribution show that the proteins are associated in different ways, depending on the heat treatment condition and association. Particle diameter ranged from nanometers to micrometers. At high temperature and high pH, the foam volume of the supramolecular structures increased. Furthermore, pH, time and temperature levels had no significant effect on emulsifying properties. The formation of supramolecular structures offers new opportunities to modify the functional properties of food. Heating and acidifying conditions can be optimized to control the properties of the proteins and to improve their performance in an increasing number of applications. In addition, the results allowed better knowledge of the factors that can help predict the behavior of protein associations in complex systems.

## **Acknowledgments**

This study was supported by CAPES, CNPq, and FAPEMIG. The authors thank the Brazilian Biosciences National Laboratory - Spectroscopy and Calorimetry Laboratory - and Núcleo de Microscopia e Microanálise (Universidade Federal de Viçosa). The authors thank prof. Dr. Nilda de Fátima Ferreira Soares and MSc. Éverton de Almeida Alves Barbosa for their support of this work.

## **References**

- Bensaude-Vincent, B. (2009). Self-Assembly, Self-Organization: Nanotechnology and Vitalism. *Nanoethics*, 3, 31–42.
- Bobály, B., Tótha, E., Drahos, L., Zsila, F., Visya, J., Fekete, J., & Vékey, K. (2014). Influence of acid-induced conformational variability on protein separation in reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1325, 155–162
- Desfougères, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S., & Nau, F. (2010). Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres. *The Journal of Physical Chemistry*, 114, 4138–4144.
- De Souza, H. K. S., Bai, G., Gonçalves, M. P., & Bastos, M. (2009). Whey protein isolate–chitosan interactions: A calorimetric and spectroscopy study. *Thermochimica Acta*, 495, 108–114.
- Dybowska, B. E. (2011). Whey protein-stabilized emulsion properties in relation to thermal modification of the continuous phase. *Journal of Food Engineering*, 104, 81–88.



- Erabit, N., Flick, D., & Alvarez, G. (2014). Formation of  $\beta$ -lactoglobulin aggregates during thermomechanical treatments under controlled shear and temperature conditions. *Journal of Food Engineering*, 120, 57–68.
- Faizullin, D. A., Konnova, T. A., Haertle, T., & Zuev, Y. F. (2013). Self-Assembly and Secondary Structure of Beta-Casein. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39, 366-372.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Ireland: Blackie Academic & Professional.
- Guo, Q., & Mu, T. H. (2011). Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction. *Food Hydrocolloids*, 25, 98-106.
- Jindal, S., & Naeem, A. (2013). Consequential secondary structure alterations and aggregation during prolonged casein glycation. *Journal of Fluorescence*, 23, 367–374.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N., & Kilara, A. (1999). Thermal Properties of Whey Protein Aggregates. *Journal of Dairy Science*, 82, 1882-1889.
- Kim, D. A., Cornec, M., & Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285, 100–109.
- Kuropatwa, M., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2009). Impact of pH on the interactions between whey and egg white proteins as assessed by the foamability of their mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 2174–2181.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. USA: Springer.
- Le, T. T., Saveyn, P., Hoa, H. D., & der Meeren, P. V. (2008). Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. *International Dairy Journal*, 18, 1090–1096.
- Lehn, J-M. (2007). From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36, 151-160.
- Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H., & Aoki, T. (2005). Improvement of functional properties of whey protein isolate through glycation and phosphorylation by dry heating. *Journal of Dairy Science*, 88, 4137–4145.
- Liu, G., Zhong, Q. (2013). Thermal aggregation properties of whey protein glycosylated with various saccharides. *Food Hydrocolloids*, 32, 87–96.
- Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Cohen Stuart, M. A., & van Vliet, T. (2002). Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254, 175-183.
- Martinez, M.J.; Sanchez, C.C.; Patino, J.M.R.; Piloso, A.M.R. Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air–water interface of caseinoglycomacropeptide (GMP) and  $\beta$ -lactoglobulin mixed systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68, 39–47, 2009.

- Moro, A., Báez, G. D., Busti, P. A., Ballerini, G. A., Delorenzi, N. J. (2011). Effects of heat-treated  $\beta$ -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1009-1015.
- Naqvi, Z., Ahmad, E., Khan, R. H., & Saleemuddin, M. (2013). Non-native states of bovine  $\beta$ -lactoglobulin induced by acetonitrile: pH-dependent unfolding of the two genetic variants A and B. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *66*, 175–185.
- Neelima, Sharma, R., Rajput, Y. S., & Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science and Technology*, *93*, 21–43.
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011).  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1945–1962.
- Nicorescu, I., Vial, C., Loisel, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2010). Influence of protein heat treatment on the continuous production of food foams. *Food Research International*, *43*, 1585–1593.
- Nigen, M., Gaillard, C., Croguennec, T., Madec, M-N., & Bouhallab, S. (2010). Dynamic and supramolecular organisation of  $\alpha$ -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry*, *146*, 30–35.
- Phan-Xuan, T., Durand D., Nicolai T., Donato L., Schmitt C., & Bovetto L. (2011). On the crucial importance of the pH for the formation and self-stabilization of protein microgels and strands. *Langmuir*, *27*, 15092–1510.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*, 716-723.
- Pinto, M., S., Léonil, J., Henry, G., Cauty, C., Carvalho, A. F., & Bouhallab, S. (2014). Heating and glycation of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein: Aggregation and in vitro digestion. *Food Research International*, *55*, 70–76.
- Ryan, K. N., Zhong, Q., & Foegeding, E. A. (2013). Use of Whey Protein Soluble Aggregates for Thermal Stability - A Hypothesis Paper. *Journal of Food Science*, *78*, R1105-R1115.
- Semenova, M. G. (2007). Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. *Food Hydrocolloids*, *21*, 23–45.
- Sgarbieri, V. C. (2005). Review: structural and physicochemical properties of milk proteins. *Brazilian Journal of Food Technology*, *8*, 43-56.
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1938-1944.
- Taheri-Kafrani, A., Asgari-Mobarakeh, E., Bordba, A-K., & Haertlé, T. (2010). Structure–function relationship of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of dodecyltrimethyl ammonium bromide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*, 268–274.

Taheri-Kafrani, A., Bordbar, A-K., Mousavi, S., H-A., & Haertlé, T. (2008).  $\beta$ -lactoglobulin structure and retinol binding changes in presence of anionic and neutral detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7528–7534.

Van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 158–165.

Zhang, M., Zheng, J., Ge, K., Zhang, H., Fang, B., Jiang, L. Guo, H., Ding, Q., & Ren, F. (2014). Glycation of  $\alpha$ -lactalbumin with different size saccharides: Effect on protein structure and antigenicity. *International Dairy Journal*, 34, 220-228.

Zhang, Y., & Zhong, Q. (2012). Effects of Thermal Denaturation on Binding between Bixin and Whey Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7526–7531.

Zhang, Y., Qi, Z. D., Zheng, D., Li, C. H., & Liu, Y. (2009). Interactions of chromium (III) and chromium (VI) with bovine serum albumin studied by UV spectroscopy, circular dichroism, and fluorimetry. *Biological Trace Element Research*, 130, 172–184.

**CAPÍTULO III. Supramolecular structures of  $\alpha$ -lactalbumin and glycomacropeptide: stability, characterization, and technical-functional properties**

Renata Silva Diniz<sup>a</sup>, Jane Sélia dos Reis Coimbra<sup>b\*</sup>, Adenilson Abranches Monteiro<sup>b</sup>,  
Angélica Ribeiro da Costa<sup>b</sup>, Antonio Manuel da Cruz Rodrigues<sup>a</sup>, Luiza Helena Meller da  
Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do  
Pará, Campus do Guamá 66000-000, Belém-PA, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Campus Uni-  
versitário s/n, Centro, 36570-000, Viçosa-MG, Brazil.

\* Corresponding author:

Tel.: +55-31-3899-1618

Fax: +55-31-3899-2208

E-mail address: jcoimbra@ufv.br

*Submetido ao Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*  
*ISSN: 0928-4931*

## ABSTRACT

Supramolecular structures of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) and glycomacropeptide (GMP) were formed under heat conditions (25 to 75 °C) and modification of pH level (3.5 to 6.5). The protein structures stability was evaluated for 60 days based on the particle size and  $\zeta$  potential at 25°C and 4°C. Generally, only the supramolecular structures formed at pH 3.5 and different thermal treatments did not present stability of particle size and zeta potential by 60 days. Systems of supramolecular structures represented the average value of surface tension of 50.825 mN/m indicating absorbing efficiency of these systems in interface air solution. Images provided by the transmission electronic microscopy in general indicated that the supramolecular structures are spherical in their morphology and are formed in clusters. The chosen methodology without chemical reagents was productive in formation of the supramolecular structures. Characterization of these structures showed its potential applicability in pharmaceutical and food industries.

**Key-words:** particle size; zeta potential; whey protein; surface tension; transmission electronic microscopy.

## 1. Introduction

Cheese whey protein constitutes approximately 20% of all milk proteins and is of high nutritional value as well as technological importance due to its high solubility, foam ability, gelling and emulsification properties.  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -la) is a globular protein that constitutes 3.7% of all milk proteins (Lam & Nickerson, 2014). Glycomacropeptide (GMP) is an intrinsically disorganized/unstructured peptide with high content of Pro, Glu, Ser and Cys amino acids and low content of Trp, Tyr, Phe and Cys amino acids compared to other globular proteins.

The amphiphilic property of the proteins assists in their self-association to form supramolecular structures which could be further used to produce new materials (Nigen et al., 2010). Protein aggregation as well as cheese whey aggregation depends on environment conditions (pH, temperature and ionic force), which can determine its characteristics, such as shape and size, and modify its functions compared to native proteins (Erabit et al., 2014). The pH value of a system determines distribution of protein surface charge enabling intra and intermolecular interactions and influences geometric configuration of the formed aggregate (Kehoe and Foegeding, 2014). An increase in temperature can destabilize proteins thermodynamically. As a result, reduction of activation energy, an increase in protein diffusion and collision between them may occur (Ramos et al., 2014).

Development of aggregated proteins with well defined forms and physical and chemical properties (charge and hydrophobicity) can assist in improvement of technical functionality of proteins. Knowledge of the mechanisms of association between proteins is fundamental to control properties in the formation of new supramolecular structures (Nigen et al., 2010). Properties of the materials containing protein self-association depend on the structure, size and type/kind of interaction between these proteins. Thus, understanding protein association process will enable production of materials with new functions (van der Linden & Venema, 2007).

Furthermore, understanding the mechanism of association between proteins and more complex systems, i.e. formed with more than one protein, is necessary to elaborate protein structures with new functionalities (Nigen et al., 2010). Ingredients containing cheese whey protein are widely used in food industry. They are byproducts of cheese industry and are available in large quantities at low cost. These ingredients are also generally recognized as safe (GRAS) and are of high nutritional value (Ramos et al., 2014).

Development of technologies to produce supramolecular structures without using chemical reagents can facilitate consumer acceptance of the products containing these protein structures. This study addresses synthesis of supramolecular structures formed of  $\alpha$ -la and GMP (non-toxic biodegradable materials of nutritional quality) using dispersion of these proteins in water. This research aimed to verify the stability of supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP by particle size and  $\zeta$  potential, and determine their morphology by transmission electron microscopy. Furthermore, the ability of the structures to absorb air and oil at the interface was characterized. These results are important to evaluate what kinds of formulations (solution, emulsion, foamed products) and which conditions these structures may be used.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

The proteins  $\alpha$ -la and GMP were kindly provided by Davisco Foods (USA). Chloride acid (HCl, Merck, Germany) was used without additional purification. Deionized water (Milli Q, Millipore, USA;  $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) was used to prepare all the aqueous solutions. Soy oil was purchased from a local supermarket.

### **2.2 Supramolecular protein structure preparation**

First, aqueous dispersions of  $\alpha$ -la and GMP of  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  were prepared separately followed by moderate agitation at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 minutes. After, defined volumes of each dispersion were mixed to reach stoichiometric molar proportion of 1:0.689 ( $\alpha$ -la:GMP), previously established through the analysis of isothermal titration calorimetry (Diniz et al., 2014). 0.02% of sodium azide was added to the mixture of dispersed proteins to avoid microbial contamination and was further maintained under moderate agitation (TE 0851, Tecnal, Brasil) for 24 hours at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (SP-500 B.O.D., SP Labor, Brazil).

The formed supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP were prepared according to the  $2^3$  factorial experimental design with three repetitions of central point (Table 1). The heating and acidification conditions were selected to verify pH values lower and higher than the isoelectric points of the proteins and temperatures values lower and higher than the denaturation temperature of  $\alpha$ -la. The values of pH for each of the two systems were adjusted with the solution of HCl  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (HI 2221, Hanna, USA) and later they underwent thermal treatment. After the thermal treatment, the systems were placed in an ice bath and stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Table 1.** 2<sup>3</sup> factorial experimental design used to prepare supramolecular protein structures.

| System | pH  | Time (min) | Temperature (°C) |
|--------|-----|------------|------------------|
| 1      | 3,5 | 20         | 25               |
| 2      | 6,5 | 20         | 25               |
| 3      | 3,5 | 40         | 25               |
| 4      | 6,5 | 40         | 25               |
| 5      | 3,5 | 20         | 75               |
| 6      | 6,5 | 20         | 75               |
| 7      | 3,5 | 40         | 75               |
| 8      | 6,5 | 40         | 75               |
| 9      | 5,0 | 30         | 50               |
| 10     | 5,0 | 30         | 50               |
| 11     | 5,0 | 30         | 50               |

### 2.3 Stability of supramolecular protein structure as a function of time

The supramolecular protein structures of  $\alpha$ -la and GMP under various conditions (pH, temperature and heating time) were stored at 4 °C and 25 °C to determine their stability over a period of time (60 days) followed by evaluation of particle size and  $\zeta$  potential. The particle size was analyzed through the photon correlation spectroscopy using Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, England) equipped with a laser of He/Ne 4 mW and wave length of 632.8 nm, a measuring cell, a detector of avalanche photodiode and a correlator. The measurements were realized without dilution at  $(25.0 \pm 0.1)$  °C. Spreading intensity was measured at the detection angle of 173° in relation to the source. The algorithm CONTIN (integrated equipment software) was used to determine the size distribution and analyze the functions of intensity autocorrelation. The analysis were realized in a polystyrene cuvette. Each measurement represents the average result after 10 readings (readings compromised by fluctuations of intensity were not used).

The Doppler micro-electrophoresis laser was used to measure  $\zeta$  potential applying an alternate electrical field and a disposable capillary cell (DTS 1060, Malvern Instruments, England). Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, England) was also implemented.  $\zeta$  potential was calculated using the Smoluchoski equation. All the measurements were realized in triplicate.



## 2.4 Surface tension

The surface tension of the systems containing supramolecular structures was measured at 25°C using a tensiometer and the Wilhelmy plate method with a platinum plate (Dataphysics, DCAT 11 EC, Germany). The tensiometer balance was internally calibrated by the SCAT program, version 3.2.0.84. Each measurement represents the average result of successive readings with the standard deviation of less or equal to 0.02 adjusted by the appropriate software.

The readings of the surface tension implementing this method occur as a process of verification of the plate's weight variations at the time of the plate's contact with the surface of the liquid. The measurements are taken in the following steps: a liquid sample is added to a washed and sterilized glass cube; the cube is later placed close to the plate suspended on the arm of the balance; the cube is slowly moved resulting in a contact between the liquid and the plate with 0 level of depth detected; after this, the cube is raised so that the plate immerses in the liquid at the depth necessary to cover the plate completely; then the recipient plate is gradually lowered to reach a position of 0 depth; at this moment the forces of surface tension occur making it difficult to remove the plate and causing variations in the plate's weight; this becomes the variable measurement of this experiment. This way, the surface tension can be determined using the following equation:

$$\sigma = \frac{F}{l \times \cos\theta}$$

where  $\sigma$  is the surface tension ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ),  $F$  the Wilhelmy force (N),  $l$  the length of the plate's wetted surface (m) and  $\theta$  the angle of contact.

## 2.5 Density

The density of the systems of the protein supramolecular structures was determined at 25°C using an oscillating density meter (DMA 4500, Anton Paar, Austria) controlled thermostatically at  $\pm 0.001$  K. The instrument was connected to an automatic sampler (Xsample 122, Anton Paar, Austria). Double distilled and deionized water and dry air were the referential substances used to calibrate the instrument at the atmospheric pressure. The precision of the density meter was  $\pm 1.0\cdot 10^{-5}$   $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

## **2.6 Transmission electronic microscopy**

The morphology of the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP was observed through the transmission electronic microscopy (TEM) using the microscope EM 109 (Zeiss, Germany). The samples were prepared by dropping small volumes of the protein supramolecular structures dispersions on a 300 mesh grid (Koch, EUA) coated with formvar film followed by natural drying.

## **2.7 Statistical analysis**

The data obtained from the experiments was statistically analyzed by MiniTab 16 software and using ANOVA, regression analysis ( $p < 0.05$ ), and Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

## **3. Results and Discussion**

### **3.1 Stability of the protein supramolecular structures as a function of time**

The stability of the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP obtained under different conditions was evaluated by the size distribution and  $\zeta$  potential using the Zetasizer equipment. Tables 2 and 4 demonstrate the average size of the supramolecular structures stored for 60 days under the temperatures of 25 °C and 4 °C, respectively. The size distribution was used to evaluate whether the protein supramolecular structures would be broken by sedimentation or aggregation over the storage time. The represented particle sizes were obtained as main population distributed in the volume.

As observed on day 0 (Tables 2 and 4), smaller particle sizes (about 200 nm) of supramolecular structures were obtained at pH 6.5 conditions (systems 2, 4, 6 and 8). At this pH value,  $\alpha$ -la (isoelectric point equal to 4.8, according with Ramos et al., 2014) and GMP (isoelectric point equal to 3.3) are negatively charged, which favors the repulsion between the protein molecules. Furthermore, at pH 6.5, the proteins are further away from their isoelectric points, and this causes the formation of lower soluble aggregates (Kehoe and Foegeding, 2014).

At pH 3.5,  $\alpha$ -la is positively charged and GMP is negatively charged. These conditions (systems 1, 3, 5, and 7) favors the electrostatic attraction between the proteins, causing a higher aggregation between them and the consequent increase in the average particle size, which remained between 500-600 nm.

The supramolecular structures with higher particle sizes (approximately 1200 nm) were obtained at pH 5.0. The systems produced in this pH (systems 9, 10, and 11) were turbid

even before the heating. The increased particle size and decreased solubility of supramolecular structures characterized these conditions as gelation process. The pH of 5.0 is very close to the isoelectric point of the  $\alpha$ -la it and this may have caused the aggregation between the molecules of this protein, which is much larger compared to the GMP. Values of pH close to the isoelectric point favor the formation of large amorphous aggregates (Phan-Xuan et al., 2011). The electrostatic repulsion and a decrease charges in the system may have favored the weakening of the binding of the structures with water, causing the turbidity of the systems, with the formation of large aggregates.

Schmitt et al. (2014) studied the particle size of microgel using whey protein isolates and verified that at the pH values of 5.5-8.0 the particle sizes varied between roughly 200 and 220 nm. This is similar to our results presented by the supramolecular structures formed at pH 6.5. However, these authors observed that at pH values of 4.0-5.5 the microgel particle size was nearly of 2500 to 5500 nm.

**Table 2.** Average size measurements (nm) of the formed supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP stored over the period of time at 25 °C.

| Storage time<br>(days) | Average size (nm)         |                           |                            |                           |                            |                            |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 0                         | 3                         | 10                         | 20                        | 30                         | 60                         |
| System 1               | 624.6 <sup>a</sup> ± 20.8 | 616.4 <sup>a</sup> ± 27.3 | 679.8 <sup>a</sup> ± 29.4  | 655.7 <sup>a</sup> ± 29.7 | 636.2 <sup>a</sup> ± 32.8  | 36.0 <sup>b</sup> ± 1.9    |
| System 2               | 263.9 <sup>a</sup> ± 9.3  | 286.3 <sup>b</sup> ± 7.3  | 290.4 <sup>b</sup> ± 6.8   | 217.8 <sup>c</sup> ± 8.5  | 2108 <sup>c</sup> ± 7.4    | 212.0 <sup>c</sup> ± 9.2   |
| System 3               | 637.6 <sup>a</sup> ± 33.0 | 642.3 <sup>a</sup> ± 68.4 | 656.5 <sup>a</sup> ± 50.9  | 654.4 <sup>a</sup> ± 42.2 | 42.5 <sup>b</sup> ± 2.9    | 46.8 <sup>b</sup> ± 2.1    |
| System 4               | 277.2 <sup>a</sup> ± 11.2 | 254.1 <sup>a</sup> ± 6.9  | 260.9 <sup>a</sup> ± 9.4   | 253.7 <sup>a</sup> ± 7.0  | 196.0 <sup>b</sup> ± 9.5   | 215.4 <sup>b</sup> ± 7.9   |
| System 5               | 554.7 <sup>a</sup> ± 64.3 | 572.9 <sup>a</sup> ± 24.5 | 518.4 <sup>ab</sup> ± 28.0 | 549.2 <sup>a</sup> ± 34.8 | 415.6 <sup>c</sup> ± 25.0  | 444.7 <sup>bc</sup> ± 27.0 |
| System 6               | 246.3 <sup>a</sup> ± 11.6 | 251.9 <sup>a</sup> ± 8.6  | 249.4 <sup>a</sup> ± 4.3   | 245.2 <sup>a</sup> ± 10.0 | 219.1 <sup>a</sup> ± 7.3   | 200.4 <sup>b</sup> ± 12.5  |
| System 7               | 526.1 <sup>a</sup> ± 26.8 | 536.9 <sup>a</sup> ± 16.9 | 529.0 <sup>a</sup> ± 18.1  | 515.2 <sup>a</sup> ± 26.6 | 502.3 <sup>ab</sup> ± 28.9 | 441.3 <sup>b</sup> ± 26.0  |
| System 8               | 261.9 <sup>ab</sup> ± 9.8 | 248.3 <sup>a</sup> ± 4.6  | 285.2 <sup>b</sup> ± 10.2  | 280.2 <sup>b</sup> ± 11.6 | 241.2 <sup>a</sup> ± 7.4   | 283.4 <sup>b</sup> ± 8.6   |
| System 9               | 1254 <sup>a</sup> ± 129.1 | 1225 <sup>a</sup> ± 90.6  | 1211 <sup>a</sup> ± 136.3  | 1357 <sup>a</sup> ± 119.0 | 1379 <sup>a</sup> ± 122.6  | 1540 <sup>a</sup> ± 152.4  |
| System 10              | 1207 <sup>a</sup> ± 118.1 | 1210 <sup>a</sup> ± 129.0 | 1228 <sup>a</sup> ± 139.1  | 1502 <sup>a</sup> ± 58.1  | 1562 <sup>a</sup> ± 124.9  | 1511 <sup>a</sup> ± 183.2  |
| System 11              | 1296 <sup>a</sup> ± 105.4 | 1290 <sup>a</sup> ± 135.7 | 1250 <sup>a</sup> ± 145.2  | 1526 <sup>a</sup> ± 145.5 | 1560 <sup>a</sup> ± 174.9  | 1578 <sup>a</sup> ± 175.0  |

Averages indicated by the same letter do not differ at 5% probability through Tukey test, in the same system.

**Table 3.** Average measurements of  $\zeta$  potential (mV) of the supramolecular structures stored over the period of time at 25 °C.

| Storage time (days) | $\zeta$ potential (mV)      |                             |                             |                             |                             |                             |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                     | 0                           | 3                           | 10                          | 20                          | 30                          | 60                          |
| System 1            | 9.88 <sup>a</sup> ± 0.55    | 11.40 <sup>ab</sup> ± 1.04  | 12.90 <sup>bc</sup> ± 0.52  | 13.50 <sup>bc</sup> ± 0.11  | 14.40 <sup>cd</sup> ± 1.00  | 16.10 <sup>d</sup> ± 0.93   |
| System 2            | -29.00 <sup>a</sup> ± 2.85  | -29.70 <sup>a</sup> ± 1.44  | -30.90 <sup>a</sup> ± 1.73  | -31.00 <sup>a</sup> ± 1.83  | -25.30 <sup>a</sup> ± 1.63  | -29.30 <sup>a</sup> ± 1.48  |
| System 3            | 10.30 <sup>a</sup> ± 0.0.75 | 11.80 <sup>ab</sup> ± 0.66  | 13.20 <sup>bc</sup> ± 0.85  | 13.50 <sup>bc</sup> ± 0.29  | 14.60 <sup>cd</sup> ± 1.01  | 15.90 <sup>d</sup> ± 0.97   |
| System 4            | -29.30 <sup>ab</sup> ± 1.28 | -30.40 <sup>a</sup> ± 2.36  | -29.40 <sup>ab</sup> ± 2.91 | -25.00 <sup>b</sup> ± 1.47  | -27.30 <sup>ab</sup> ± 0.21 | -26.70 <sup>ab</sup> ± 1.33 |
| System 5            | 10.50 <sup>a</sup> ± 0.50   | 11.20 <sup>ab</sup> ± 0.81  | 13.30 <sup>abc</sup> ± 0.70 | 13.30 <sup>abc</sup> ± 0.90 | 14.00 <sup>bc</sup> ± 0.78  | 14.60 <sup>c</sup> ± 2.06   |
| System 6            | -30.80 <sup>ab</sup> ± 2.00 | -31.40 <sup>a</sup> ± 2.98  | -31.90 <sup>a</sup> ± 1.42  | -26.20 <sup>ab</sup> ± 2.60 | -27.60 <sup>ab</sup> ± 2.06 | -25.00 <sup>b</sup> ± 1.84  |
| System 7            | 12.00 <sup>a</sup> ± 0.34   | 12.60 <sup>a</sup> ± 0.26   | 12.60 <sup>a</sup> ± 0.15   | 12.60 <sup>a</sup> ± 1.31   | 13.20 <sup>a</sup> ± 0.82   | 15.50 <sup>b</sup> ± 1.05   |
| System 8            | -28.40 <sup>a</sup> ± 1.25  | -29.50 <sup>a</sup> ± 0.53  | -30.40 <sup>a</sup> ± 1.30  | -30.20 <sup>a</sup> ± 2.99  | -28.80 <sup>a</sup> ± 1.96  | -27.60 <sup>a</sup> ± 1.97  |
| System 9            | -15.10 <sup>a</sup> ± 0.55  | -14.80 <sup>a</sup> ± 0.31  | -14.80 <sup>a</sup> ± 0.64  | -15.10 <sup>a</sup> ± 0.50  | -15.20 <sup>a</sup> ± 1.07  | 16.20 <sup>a</sup> ± 0.60   |
| System 10           | -14.30 <sup>a</sup> ± 0.66  | -14.90 <sup>a</sup> ± 1.17  | -15.30 <sup>a</sup> ± 0.35  | -14.90 <sup>a</sup> ± 0.31  | -15.10 <sup>a</sup> ± 0.40  | -14.70 <sup>a</sup> ± 0.87  |
| System 11           | -14.90 <sup>a</sup> ± 0.40  | -15.30 <sup>ab</sup> ± 0.31 | -15.00 <sup>b</sup> ± 0.29  | -15.60 <sup>ab</sup> ± 0.20 | -16.10 <sup>b</sup> ± 0.15  | -15.50 <sup>ab</sup> ± 0.68 |

Averages indicated by the same letter do not differ at 5% probability through Tukey test, in the same system.

Alterations of  $\zeta$  potential can be used to evaluate the stability of protein systems. The  $\zeta$  potential values of the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP stored at 25 °C and 4 °C were compared for 60 days (Tables 3 and 5). It was observed that the supramolecular structures in systems 2, 4, 6, 8 (pH = 6.5), 9, 10 and 11 (pH = 5.0) had negative  $\zeta$  potential values since the proteins were in an acid medium with pH higher than their isoelectric points. The systems with pH 3.5 (1, 3, 5, and 7) showed positive  $\zeta$  potential values, demonstrating that  $\alpha$ -la is larger quantity on the surface of supramolecular structures, since the pH 3.5 is lower than the isoelectric point of this protein.

The supramolecular structures formed at pH 6.5 presented absolute  $\zeta$  potential values higher than -25 mV (Tables 3 and 5), which are similar to the ones verified by Ryan and Foegeding (2015) for aggregated solubles of thermally treated whey protein isolates. The supramolecular structures obtained at pH 3.5 and 5.0 presented  $\zeta$  potential values close to 10 mV and -15 mV, respectively (Tables 3 and 5). Schmitt et al. (2014) characterized microgel formations of whey proteins at pH 4.5 and verified  $\zeta$  potential values of approximately 10 mV

similar to the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP formed at pH 3.5. The same authors also observed that at pH 5.5 the whey protein microgels showed  $\zeta$  potential of approximately -15 mV, which is similar to the ones presented by the supramolecular structures formed at pH 5.0. Comparing the systems prepared at pH 5.0 and 6.5, it found that decreasing pH became less negative  $\zeta$  potential. A similar result was verified by Kehoe and Foegeding (2014) who studied aggregates formed by  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein at different pH values.

The higher absolute values of  $\zeta$  potential presented by the supramolecular structures formed at pH 6.5 (systems 2, 4, 6, and 8) suggest that these systems are more stable when compared to the ones formed at pH 3.5 and 5.0. This can be explained by the fact that the supramolecular structures at pH level of 6.5 are further away in pH values of the isoelectric points of  $\alpha$ -la and GMP. The mediums with pH close to the values of isoelectric points lead to higher neutralization of the supramolecular structures' charge (Schmitt et al., 2014). Besides, the systems formed at pH 3.5 and 5.0 present less charges, which may favor the proteins aggregation. Decrease of charges may be indicative that the protein aggregates were formed through hydrophobic interactions, mainly.

**Table 4.** Average size measurements (nm) of the formed supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP stored over the period of time at 4 °C.

| Storage time<br>(days) | Average size (nm)          |                            |                            |                            |                            |                            |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 0                          | 3                          | 10                         | 20                         | 30                         | 60                         |
| System 1               | 643.3 <sup>a</sup> ± 37.3  | 900.1 <sup>b</sup> ± 30.8  | 1045 <sup>cd</sup> ± 60.8  | 1092 <sup>d</sup> ± 64.5   | 936.6 <sup>bc</sup> ± 62.1 | 4.6 <sup>e</sup> ± 0.9     |
| System 2               | 276.3 <sup>a</sup> ± 19.3  | 252.8 <sup>a</sup> ± 18.9  | 227.2 <sup>a</sup> ± 8.3   | 222.7 <sup>a</sup> ± 15.3  | 253.5 <sup>a</sup> ± 23.7  | 228.6 <sup>a</sup> ± 28.5  |
| System 3               | 686.7 <sup>a</sup> ± 51.6  | 674.9 <sup>a</sup> ± 68.4  | 4.5 <sup>b</sup> ± 0.5     | 5.6 <sup>b</sup> ± 0.8     | 5.6 <sup>b</sup> ± 0.6     | 5.2 <sup>b</sup> ± 0.5     |
| System 4               | 261.2 <sup>a</sup> ± 21.7  | 241.1 <sup>a</sup> ± 18.6  | 243.6 <sup>a</sup> ± 21.3  | 246.1 <sup>a</sup> ± 8.4   | 231.4 <sup>a</sup> ± 10.8  | 240.1 <sup>a</sup> ± 13.2  |
| System 5               | 556.6 <sup>a</sup> ± 46.9  | 534.8 <sup>a</sup> ± 37.9  | 540.2 <sup>a</sup> ± 44.4  | 536.9 <sup>a</sup> ± 38.9  | 491.6 <sup>a</sup> ± 36.0  | 464.1 <sup>a</sup> ± 39.2  |
| System 6               | 256.8 <sup>ab</sup> ± 29.6 | 266.0 <sup>b</sup> ± 14.5  | 242.0 <sup>ab</sup> ± 6.7  | 265.4 <sup>b</sup> ± 11.8  | 221.1 <sup>a</sup> ± 7.7   | 224.9 <sup>ab</sup> ± 14.9 |
| System 7               | 544.2 <sup>a</sup> ± 28.5  | 565.4 <sup>ab</sup> ± 22.7 | 7072 <sup>c</sup> ± 347    | 678.7 <sup>cd</sup> ± 24.6 | 626.3 <sup>bd</sup> ± 27.2 | 400.3 <sup>e</sup> ± 32.0  |
| System 8               | 286.8 <sup>a</sup> ± 13.1  | 261.9 <sup>ab</sup> ± 8.3  | 239.0 <sup>bc</sup> ± 13.6 | 211.5 <sup>c</sup> ± 16.1  | 223.4 <sup>c</sup> ± 10.4  | 228.8 <sup>bc</sup> ± 12.2 |
| System 9               | 1234 <sup>a</sup> ± 116.5  | 1375 <sup>a</sup> ± 107.9  | 1343 <sup>a</sup> ± 61.2   | 1388 <sup>a</sup> ± 95.7   | 1196 <sup>a</sup> ± 104.5  | 1141 <sup>a</sup> ± 80.0   |
| System 10              | 1268 <sup>a</sup> ± 125.3  | 1407 <sup>a</sup> ± 107.6  | 1406 <sup>a</sup> ± 112.1  | 1294 <sup>a</sup> ± 84.8   | 1254 <sup>a</sup> ± 92.7   | 1256 <sup>a</sup> ± 117.4  |
| System 11              | 1285 <sup>a</sup> ± 88.7   | 1427 <sup>a</sup> ± 80.5   | 1334 <sup>a</sup> ± 131.5  | 1357 <sup>a</sup> ± 69.7   | 1203 <sup>a</sup> ± 101.0  | 1158 <sup>a</sup> ± 115.2  |

Averages indicated by the same letter do not differ at 5% probability through Tukey test, in the same system.

**Table 5.** Average measurements of  $\zeta$  potential (mV) of the supramolecular structures stored over the period of time at 4 °C.

| Storage time<br>(days) | $\zeta$ potential (mV)      |                            |                            |                            |                            |                            |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 0                           | 3                          | 10                         | 20                         | 30                         | 60                         |
| System 1               | 9.95 <sup>ab</sup> ± 0.73   | 9.87 <sup>ab</sup> ± 0.32  | 7.92 <sup>a</sup> ± 0.31   | 9.27 <sup>ab</sup> ± 0.41  | 9.37 <sup>ab</sup> ± 0.29  | 10.30 <sup>b</sup> ± 1.62  |
| System 2               | -28.20 <sup>a</sup> ± 0.45  | -26.10 <sup>a</sup> ± 2.10 | -28.70 <sup>a</sup> ± 1.86 | -26.80 <sup>a</sup> ± 1.64 | -25.20 <sup>a</sup> ± 2.00 | -25.00 <sup>a</sup> ± 1.18 |
| System 3               | 9.97 <sup>a</sup> ± 0.39    | 10.10 <sup>a</sup> ± 0.46  | 8.87 <sup>a</sup> ± 0.22   | 14.40 <sup>b</sup> ± 1.08  | 9.54 <sup>a</sup> ± 0.52   | 9.07 <sup>a</sup> ± 0.37   |
| System 4               | -29.00 <sup>a</sup> ± 1.65  | -28.90 <sup>a</sup> ± 0.87 | -28.60 <sup>a</sup> ± 0.91 | -28.20 <sup>a</sup> ± 0.90 | -27.30 <sup>a</sup> ± 1.21 | -29.30 <sup>a</sup> ± 1.78 |
| System 5               | 10.20 <sup>a</sup> ± 0.11   | 10.50 <sup>a</sup> ± 0.68  | 9.53 <sup>a</sup> ± 1.23   | 9.10 <sup>a</sup> ± 0.78   | 9.97 <sup>a</sup> ± 0.63   | 10.00 <sup>a</sup> ± 0.37  |
| System 6               | -26.70 <sup>a</sup> ± 1.71  | -29.50 <sup>a</sup> ± 0.76 | -29.00 <sup>a</sup> ± 1.46 | -25.00 <sup>a</sup> ± 1.60 | -28.60 <sup>a</sup> ± 1.06 | -26.50 <sup>a</sup> ± 1.10 |
| System 7               | 11.00 <sup>a</sup> ± 0.76   | 11.60 <sup>a</sup> ± 1.32  | 10.70 <sup>a</sup> ± 0.94  | 15.30 <sup>b</sup> ± 0.53  | 12.30 <sup>a</sup> ± 0.70  | 12.10 <sup>a</sup> ± 1.03  |
| System 8               | -29.60 <sup>ab</sup> ± 0.64 | -33.1 <sup>d</sup> ± 0.55  | -29.00 <sup>b</sup> ± 0.52 | -30.90 <sup>a</sup> ± 0.75 | -26.60 <sup>c</sup> ± 0.67 | -26.50 <sup>c</sup> ± 0.86 |
| System 9               | -13.90 <sup>a</sup> ± 0.62  | -14.30 <sup>a</sup> ± 0.92 | -14.40 <sup>a</sup> ± 0.55 | -14.00 <sup>a</sup> ± 0.17 | -14.10 <sup>a</sup> ± 0.25 | 13.90 <sup>a</sup> ± 0.40  |
| System 10              | -14.00 <sup>a</sup> ± 0.49  | -14.50 <sup>a</sup> ± 0.78 | -14.40 <sup>a</sup> ± 0.50 | -14.20 <sup>a</sup> ± 0.06 | -13.50 <sup>a</sup> ± 0.36 | -13.60 <sup>a</sup> ± 0.87 |
| System 11              | -13.80 <sup>a</sup> ± 0.61  | -14.20 <sup>a</sup> ± 0.21 | -14.30 <sup>a</sup> ± 0.46 | -15.10 <sup>a</sup> ± 0.26 | -15.10 <sup>a</sup> ± 0.65 | -14.90 <sup>a</sup> ± 0.92 |

Averages indicated by the same letter do not differ at 5% probability through Tukey test, in the same system.

The stability during 60 days of storage at 25 °C and 4 °C was evaluated using the average size measurements and  $\zeta$  potential by the Tukey test with 5% probability (Tables 2-5).

Under the storage temperature of 25 °C, it was observed that the supramolecular structures formed at pH 3.5 and thermal treatment at 25 °C for 20 min (system 1) and 40 min (system 3) showed stable particle size for 30 and 20 days, respectively (Table 2). On the other hand, the supramolecular structures formed at pH 3.5 heated at 75 °C for 20 min (system 5) demonstrated size stability for 20 days, whereas the ones heated for 40 min (system 7) exhibited significantly smaller sizes over 30 days of storage (Table 2). The systems 1 and 3 showed marked decrease particle size (approximately 40 nm), while the systems 5 and 7 decreased to about 400 nm. This indicates that heating at 75 °C helps in stability of the particle size, exposing amino acid and favoring hydrophobic interactions present in the supramolecular structures formed at pH 3.5.

In relation to  $\zeta$  potential measurements at storage temperature of 25 °C (Table 3), it was verified that the systems formed at pH 3.5 (systems 1, 3, 5, and 7) showed a significant increase in the magnitude of  $\zeta$  potential over 60 days as well as an increase in surface charges of the proteins during storage. The dissociation of supramolecular structures and the consequent decrease of the particle size over time may have caused the increase in the  $\zeta$  potential, exposing the charged amino acids.

At the storage temperature of 4 °C, the supramolecular structures formed at pH 3.5 and with thermal treatment of 25 °C for 20 min (system 1) did not represent stability of the particle sizes since there was a significant increase in size in 30 days with a rapid reduction to 4.6 nm after 60 days (Table 4). On the other hand, the supramolecular structures formed at pH 3.5 and the thermal treatment of 25 °C for 40 min (system 3) exhibited stable particle sizes for at least 3 days with a later reduction of the size to approximately 5 nm after 10 days of storage (Table 4). This reduction in particle size of the systems 1 and 3 is due to the dissociation of supramolecular structures, which could be observed visually by protein precipitation. At the pH level of 3.5 and with thermal treatment of 75 °C when the system was heated for 20 min (system 5), the particle sizes were stable for 60 days; when the system was heated for 40 min (system 7), the particle sizes were stable for 3 days with a significant reduction in size after 60 days (Table 4). The systems formed under heat treatment at 75 °C (system 5 and 7), unlike the systems 1 and 3 did not show complete dissociation of supramolecular structures. This demonstrates that the highest temperature in the synthesis of structures favors the binding between proteins, contributing to their stability. The systems at pH 3.5 prepared at both thermal treatments represent stable  $\zeta$  potential values during 60 days of storage at 4 °C (Table 5). The fact that the  $\zeta$  potential values remained stable despite complete dissociation of the proteins indicates that the supramolecular structures are formed on its surface by individual proteins without significant change of their structures. The proteins  $\alpha$ -la and GMP are associated, but maintains its surface charge characteristics.

At the storage temperature of 25 °C (Table 2), the supramolecular structures formed at pH 6.5 with the thermal treatment of 25 °C/20 min (system 2) did not present stable particle sizes; however, those formed at pH 6.5 and the thermal treatment of 25 °C/40 min (system 4) exhibited stable particle sizes for 20 days. On the other hand, the supramolecular structures formed at pH 6.5 and the thermal treatment of 75 °C (systems 6 and 8) maintained stable particle sizes at least 30 days. This indicates that higher temperatures favor exposure charged amino acids and/or hydrophobic interaction sites, facilitating the bond between the proteins



and become these structures more stable. Besides, the supramolecular structures formed at pH 6.5 exhibited  $\zeta$  potential stability for 60 days at 25 °C (Table 3), demonstrating that the change in the particle size of these structures did not affect the amount of charge of proteins.

Stored at 4°C, the supramolecular structures formed at pH 6.5 and with thermal treatment of 25 °C (systems 2 and 4) demonstrate stability of the particle size (Table 4) and  $\zeta$  potential (Table 5) during 60 days similar to the systems formed at pH 6.5 and the thermal treatment of 75 °C for 20 min (system 6). Yet the supramolecular structures formed at pH 6.5 and the thermal treatment of 75 °C for 40 min (system 8) showed stable particle sizes for 3 days. For this system, there was a diminishing in  $\zeta$  potential values in relation to the initial value after 60 days of storage at 4 °C (Table 5).

The systems formed at pH 5.0 and with thermal treatment of 50 °C for 30 min (systems 9, 10, and 11) showed stable particle sizes and  $\zeta$  potential values for 60 days when stored at 25 °C and 4 °C (Tables 2-5). The structures formed under these conditions remained stable since they are already in the form of protein aggregates. Giroux, Houde & Britten (2010), who studied the stability of whey protein nanoparticles formed at pH values of 5.0-6.0, also observed that the nanoparticles maintained particle sizes for 20 days.

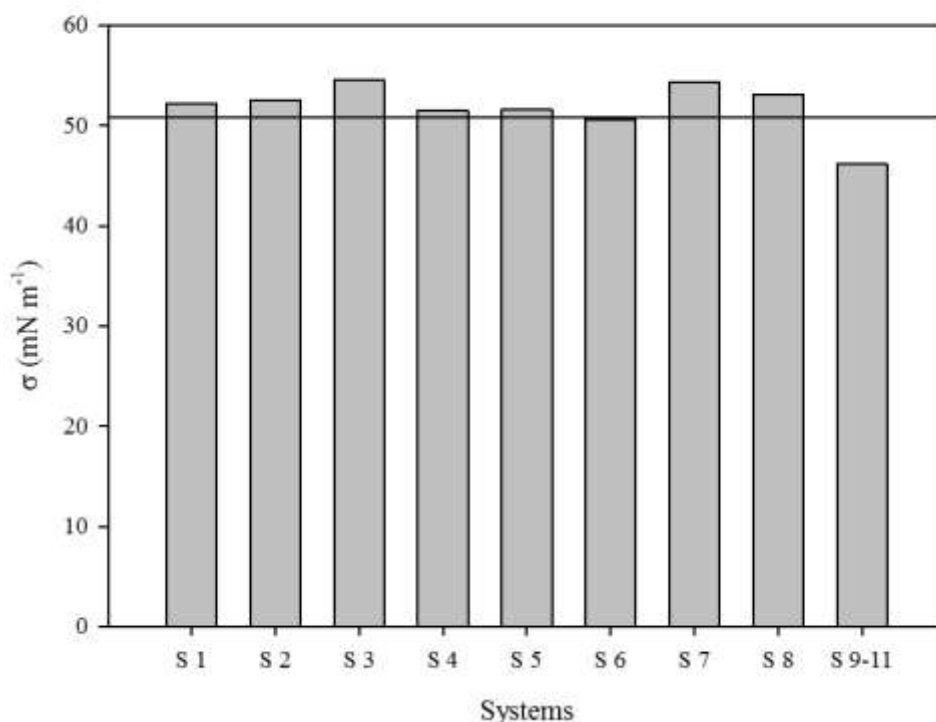
### 3.2 Surface tension

Surface tension between the formed supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP was determined by the Wilhelmy plate method and is presented in Figure 1. The factors (pH, time, and temperature) used to form the supramolecular structures did not influence the values of the surface tension ( $p > 0.05$ ), and the average value was  $50.825 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  represented by the straight line in the graph. When compared to water ( $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) at room temperature, the systems present lower values of the surface tension. Typically, when added, most proteins decrease the interfacial tension in air-water and oil-water at roughly 15 to 20  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  of saturated monolayer coverage (Damadoram, 2005). The supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP are able to reduce the interfacial tension air/water. Thus, they can be used to stabilize foams in various formulations.

Adsorption of proteins in interface reduces free energy of a system thus decreasing the interfacial tension. A decrease in the surface tension by proteins is due to the fact that they are adsorbed in air-solution interface. Protein adsorption process in gas-liquid interface involves first spreading the protein solution to the interface and its further adsorption. Then, the adsorbed proteins undergo conformational changes that expose their hydrophobic groups into

the gas phase. The kinetics of deployment is controlled by activation energy necessary to break the intermolecular interactions. Finally, the aggregates at the interface form a lattice controlled by a chemical reaction and physico-chemical activity of the sidechains (Germain & Aguilera, 2014).

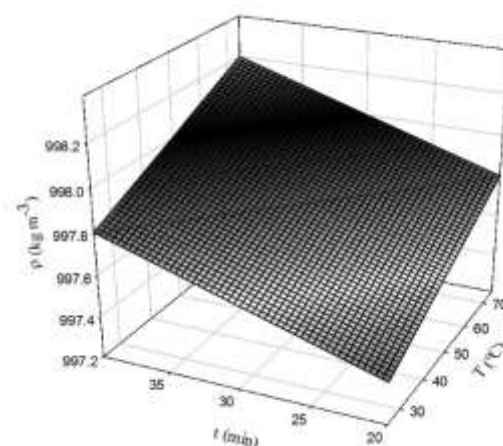
The solutions of the supramolecular structures formed at pH 3.5 and 6.5 with different thermal treatments (systems 1 to 8) present the surface tension of 50.600 a 54.546  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . It was observed that the supramolecular structures formed at pH 5.0 with the thermal treatment of 50 °C for 30 min showed less surface tension when compared to other systems with the average value of 46.177  $\text{mN}/\text{m}$ . This decrease can be explained by the exposure of hydrophobic groups of these supramolecular structures according to the results published earlier (Diniz et al., 2014). The higher the exposure of hydrophobic patches on the protein surface, the greater the probability of adsorbing and retaining the air-solution interface (Damadoram, 2005; Foegeding et al., 2006). Tomczyńska-Mleko et al. (2014) reviewed the surface tension of whey protein isolates after being heated to 80 °C and treated under different pH conditions. These authors found that at pH 2.0 to 4.0, the whey protein isolates showed lower surface tension of approximately 43  $\text{mN}/\text{m}$ . The increase in pH caused the increase in the value of surface tension, and at pH 7.0, the surface tension was 51  $\text{mN}/\text{m}$ .



**Figure 1.** Surface tension for the systems of  $\alpha$ -la and GMP supramolecular structures formed under different conditions.

### 3.4. Density

The density values for the systems of the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP were analyzed and only the time and temperature factors influenced this property significantly ( $p < 0.05$ ). Figure 2 represents this behavior. The density values vary between 997.53 and 997.80  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ . These values were between the density of the  $\alpha$ -la (997.65  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and GMP (1000.34  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ), demonstrating that  $\alpha$ -la and GMP molecules are indeed associated with each other.



**Figure 2.** Density behavior of systems of  $\alpha$ -la and GMP supramolecular structures formed under different conditions.

### 3.5 Transmission electronic microscopy

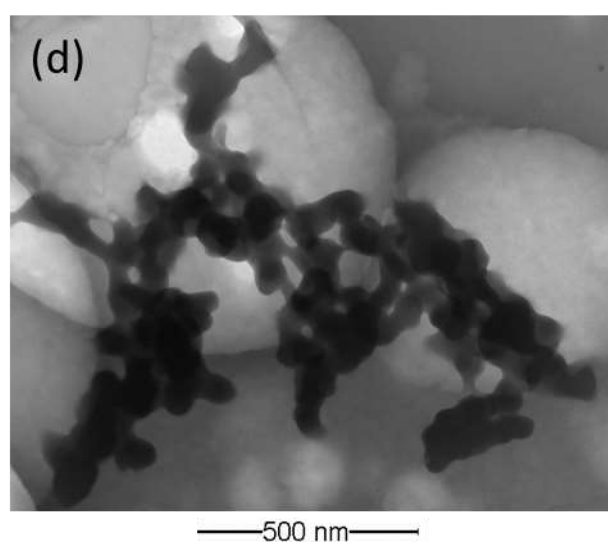
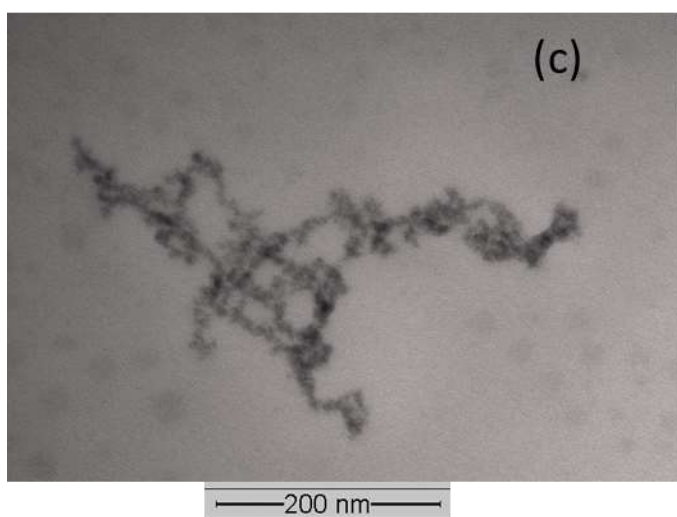
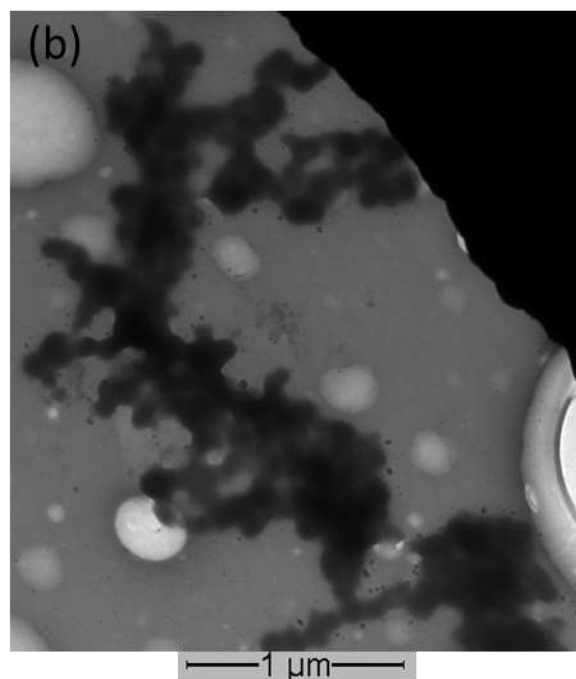
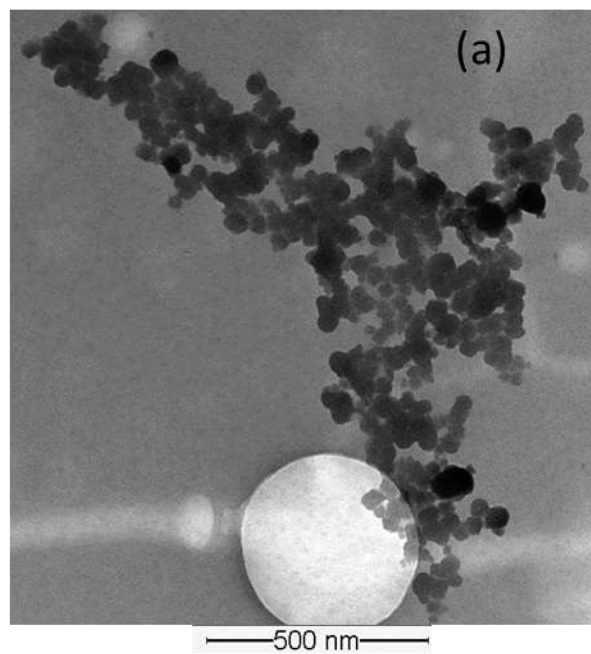
The supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP formed under different conditions were characterized by transmission electronic microscopy (Figures 4 and 5). The images showed the association of proteins and their organization into spherical structures forming clusters (bunches). These clusters are made up of spherical protein nanoparticles (Nigen et al., 2010). Schmitt et al. (2014) observed that whey proteins have also taken spherical shapes to form microgels. The larger supramolecular structures shown by the micrographs, as compared to the average particle size obtained by the analysis in Zetasizer, may be due to increased agglomeration which occurs when they are placed on a support, such as a grid, and dried. In aqueous medium, wherein the measure is the Zetasizer, the protein particles are more dispersed favoring their movement and preventing the assembly of the proteins. Anyway, it is believed that the size rated by Zetasizer is clusters size.

The supramolecular structures formed at pH 3.5 compared to pH 6.5 are presented in more well-defined clusters of juxtaposed protein nanospheres. This indicates that the more

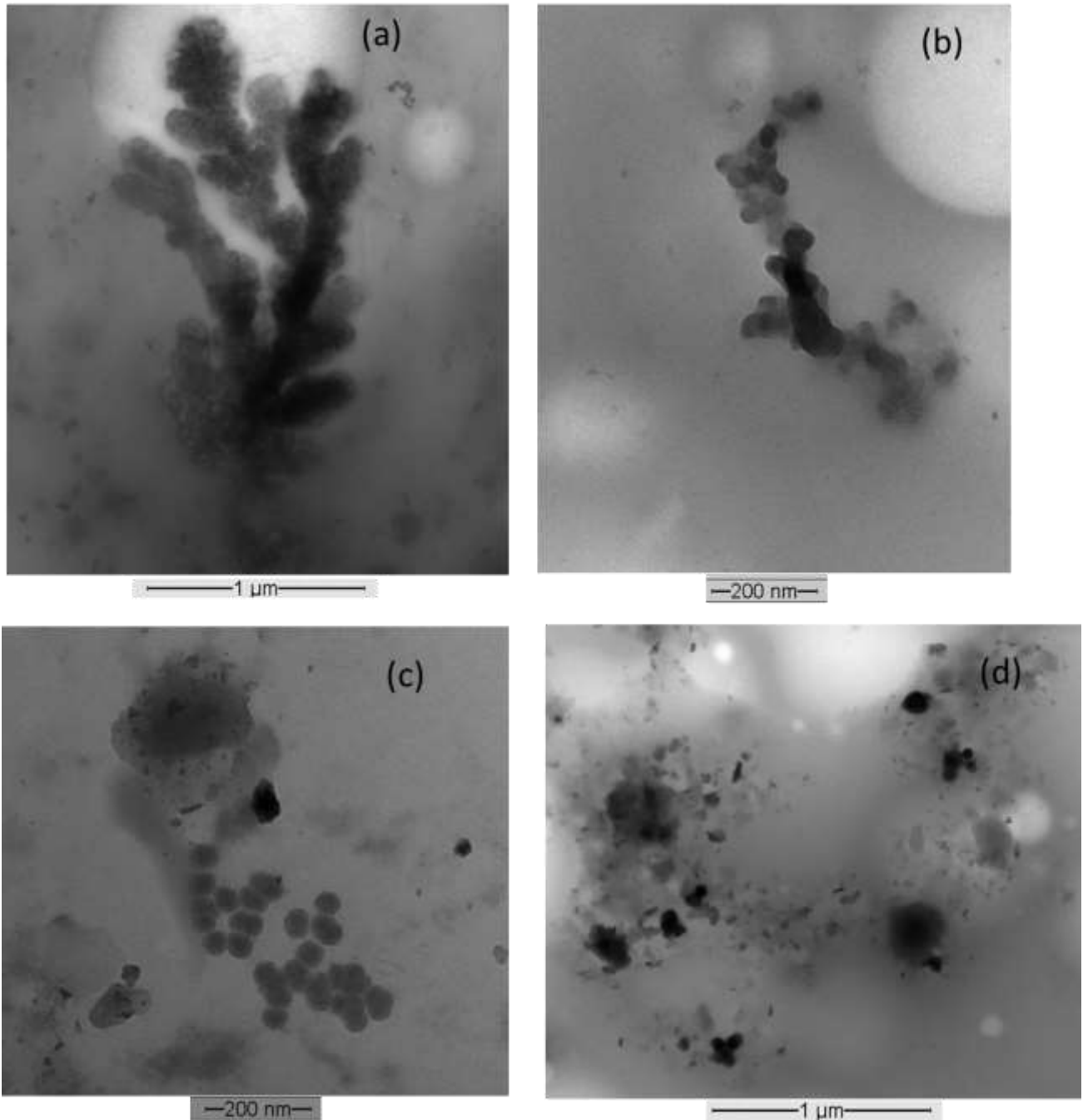
basic pH not favors self-organization of  $\alpha$ -la and GMP proteins in clusters. Furthermore, it was found that the supramolecular structures formed at pH 5.0 and thermally treated at 50°C for 30 min showed higher agglomeration and denser clusters, which explains the micrometer range of the average size of its particles, evaluated by the distribution size in Zetasizer. The supramolecular structures formed at pH 6.5 and thermally treated at 75°C for 40 minutes showed distinct morphology as amorphous and irregular aggregates similar to those observed by Kehoe and Foegeding (2014) who characterized the  $\beta$ -lactoglobulin when heated at 80°C for 20 min at pH 6.0. pH values closer to the isoelectric point of the protein, 3.5 and 5.0 in this case, led to the formation of spherical structures (van der Linden & Venema, 2007).

Nigen et al. (2010) characterized the microspheres formed by  $\alpha$ -la and lysozyme and also verified that these proteins joined in clusters. However, they observed that the nanospheres formed clusters with the average size of 10 nm, while in this study, it was found that the nanospheres were between 50 and 100 nm. Schmitt et al. (2010) produced whey protein microgels under different conditions of pH and observed similar morphology to the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP where the proteins were associated into clusters forming a hierarchically structured complex.

The cluster formation observed in Figures 3 and 4 can be explained by the mechanism of aggregation and organization as was proposed by Nigen et al. (2010). According to these authors, initially, the proteins form heterodimers by electrostatic forces, and these heterodimers self-assembly to form clusters consisting of nanospheres.



**Figure 3.** Transmission electron microscopy of supramolecular structures formed at pH 3.5 and 25 °C/40 min, mag. 30000x (a); pH 5.0 and 50 °C/30 min, mag. 12000x (b); pH 3.5 and 75 °C/40 min, mag. 85000x (c); pH 3.5 and 75 °C/20 min, mag. 30000x (d).



**Figure 4.** Transmission electron microscopy of supramolecular structures formed at pH 6.5 and 25 °C/20 min, mag. 20000x (a); pH 6.5 and 25 °C/40 min mag. 85000x (b); pH 6.5 and 75 °C/20 min mag. 50000x (c); pH 6.5 and 75 °C/40 min mag. 20000x (d).

#### 4. Conclusion

This work characterized the supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP under different thermal conditions and pH level. Characterization studies can be useful for analysis of viability of supramolecular structures in food and pharmaceutical formulations. For example, the data can be used to determine the type of product and shelf-life. Particle sizes obtained were 200 nm (systems at pH 6.5), 500-600 nm (systems at pH 3.5), and 1200 nm

(systems at pH 5.0). Generally, the protein structures presented appropriate stability during the storage time for 60 days.

The supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP obtained at pH 6.5 presented higher charge density with zeta potential greater than -25 mV. The supramolecular structures of  $\alpha$ -la and GMP were capable of decreasing superficial, proving their possible use in foamed food products. The proteins are associated into spherical structures forming clusters and those produced at pH 5.0 and 50 °C /30 min presented denser clusters.

The applied methodology, without use of chemical reagents, it is therefore possible and promising application in the synthesis of supramolecular structures in food and pharmaceutical industry.

### **Acknowledgement**

This study was supported by CAPES, CNPq, and FAPEMIG. The authors are grateful to Núcleo de Microscopia e Microanálise of the Federal University of Viçosa for using the transmission electronic microscope and Laboratório de Embalagens of the Federal University of Viçosa and prof. Dr. Nilda de Fátima Ferreira Soares for using Zetasizer Nano ZS.

### **References**

- Damadoran, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70, 2005.
- Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 40–49.
- Diniz, R. S., Coimbra, J. S. R., Teixeira, A. V. N., da Costa, A. R., Santos, I. J. B., Bressan, G. C., Rodrigues, A. M. C., & da Silva, L. H. M. (2014). Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. *Food Research International*, 64, 157-165.
- Erabit, N., Flick, D., & Alvarez, G. (2014). Formation of  $\beta$ -lactoglobulin aggregates during thermomechanical treatments under controlled shear and temperature conditions. *Journal of Food Engineering*, 120, 57–68.
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20, 284–292.
- Giroux, H. J., Houde, J., & Britten, M. (2010). Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. *Food Hydrocolloids*, 24, 341–346.

- Kehoe, J. J., & Foegeding, E. A. (2014). The characteristics of heat-induced aggregates formed by mixtures of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein. *Food Hydrocolloids*, *39*, 264-271.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, *60*, 427-434.
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2014). The effect of pH and heat pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Biophysics*, *9*, 20–28.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., & Nicolai, T. (2011). On the Crucial importance of the pH for the formation and self stabilization of protein microgels and strands. *Langmuir*, *v. 27*, 15092-15101.
- Nigen, M., Gaillard, C., Croguennec, T., Madec, M.-N., & Bouhallab, S. (2010). Dynamic and supramolecular organisation of  $\alpha$ -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry*, *146*, 30-35.
- Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2014). Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. *Food Research International*, *66*, 344–355.
- Schmitt, C., Bovay, C., & Rouvet, M. (2014). Bulk self-aggregation drives foam stabilization properties of whey protein microgels. *Food Hydrocolloids*, *42*, 139-148.
- Schmitt, C., Moitzi, C., Bovay, C., Rouvet, M., Bovetto, L., & Donato, L. (2010). Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. *Soft Matter*, *6*, 4676 - 4884.
- Ryan, K., N.; Foegeding, E., A. Formation of soluble whey protein aggregates and their stability in beverages. *Food Hydrocolloids* *43* (2015) 265-274.
- Tomczyńska-Mleko, M., Kamysz, E., Sikorska, E., Puchalski, C., Mleko, S., Ozimek, L., Kowaluk, G., Gustaw, W., & Wesółowska-Trojanowska, M. (2014). Changes of secondary structure and surface tension of whey protein isolate dispersions upon pH and temperature. *Czech Journal of Food Sci.*, *32*, 82-89.
- van der Linden, E., & Venema, P. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*, 158–165.
- Vonnegut, B. (1942). Rotating bubble method for the determination of surface and interfacial tension. *Review of Scientific Instruments*, *13*, 06–09.



**CAPÍTULO IV. Estructuras supramoleculares de  $\alpha$ -lactoalbumina e glicomacropéptido como matrizes carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub>**

## RESUMO

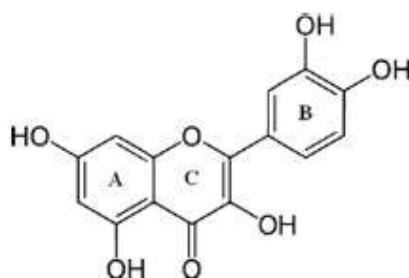
Este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e glicomacropetídeo (GMP) carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub>. O método de preparação utilizado se baseou em submeter dispersões das proteínas a diferentes condições de pH, aquecimento e tempo de aquecimento. A caracterização das estruturas carreadoras foi realizada por meio do tamanho de partícula, do potencial  $\zeta$ , da eficiência de encapsulação (EE) e da capacidade de ligação (CL). Para as estruturas supramoleculares contendo quercetina, o tamanho de partícula variou entre  $465,9 \pm 68,2$  e  $5596 \pm 269$  nm, com EE máxima de  $98,64 \pm 4,56$  % e CL máxima de  $70,17 \pm 3,67$  %. Para aquelas contendo vitamina B<sub>2</sub>, os tamanhos de partícula obtidos variaram entre  $230,7 \pm 8,08$  e  $2064 \pm 316,9$  nm, e os valores de EE e de CL máximos foram  $31,11 \pm 1,69$  % e  $4,97 \pm 0,34$  %, respectivamente. Os testes de estabilidade dos sistemas carreadores foram realizados armazenando-os sob temperatura de 4 °C e avaliando-se o tamanho de partículas e potencial  $\zeta$ . Verificou-se que as estruturas supramoleculares carreadoras de quercetina preparadas em pH 6,5 e tratamento térmico de 25 e 75 °C apresentaram estabilidade por 60 dias. Por outro lado, em relação à vitamina B<sub>2</sub>, os sistemas que apresentaram estabilidade por 60 dias foram aqueles preparados em pH 3,5 e tratamento térmico de 25 e 75 °C.

**Palavras-chave:** encapsulação; proteínas do soro de leite; estabilidade; tamanho de partícula, potencial  $\zeta$ .

## 1. Introdução

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (Simões et al., 2004). Geralmente, a estrutura química dos flavonoides é derivada de fenilbenzopirona e sua propriedade farmacológica está relacionada à sua estrutura química (Kumar et al., 2015). Quercetina, 3, 5, 5', 3', 4'-pentahidroxiflavona (Figura 1), um dos principais flavonoides presentes na natureza e o mais presente na dieta humana, é constituída por dois anéis aromáticos ligados a um heterocíclico de oxigênio (Wang e Wang, 2015; Zhang et al., 2008). A quercetina apresenta diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antiviral (Kumar et al., 2015; Wang e Wang, 2015; Patel et al., 2012; Zhang et al., 2008).

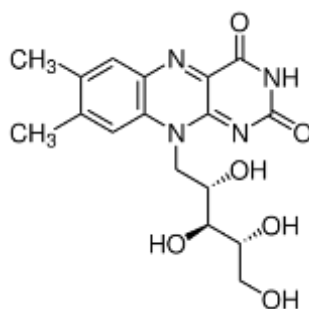
No entanto, a utilização de quercetina, que é um composto lipossolúvel, em formulações alimentícias ou farmacêuticas, é limitada devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso e instabilidade nas condições de processamento e armazenamento dos produtos, o que interfere na sua biodisponibilidade (Wang e Wang, 2015; Ha et al., 2013; Zhang et al., 2008).



**Figura 1.** Estrutura química da quercetina (Fonte: Patel et al., 2012).

As vitaminas são micronutrientes essenciais à vida de todos os seres vivos. A vitamina B<sub>2</sub> (Figura 2), também conhecida como riboflavina, é uma vitamina hidrossolúvel que o ser humano não consegue sintetizar e, portanto, deve ser consumida na dieta. É essencial para o metabolismo celular porque atua como precursor de coenzimas carregadoras de elétrons em reações de oxirredução (de Souza et al., 2005; Burgess et al., 2004).

A utilização de vitamina B<sub>2</sub> em produtos alimentícios apresenta limitações por se tratar de um composto sensível e de baixa estabilidade em condições adversas de temperatura, oxigênio, umidade e luz (Azevedo et al., 2014).



**Figura 2.** Estrutura química da vitamina B<sub>2</sub> (Adaptado de de Souza et al., 2005).

Dessa maneira, é importante o desenvolvimento de estratégias para a utilização desses compostos bioativos em formulações alimentícias e farmacêuticas. Diversos autores têm desenvolvido sistemas carreadores para melhorar a solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e liberação dos compostos bioativos (Kumar et al., 2015). Algumas matrizes proteicas carreadoras de quercetina já foram estudadas, como albumina de soro bovino (Kurukji et al., 2016), isolado proteico de soja (Wang e Wang, 2015),  $\beta$ -lactoglobulina (Ha et al., 2013) e zeína (Patel et al., 2012), com o objetivo de controlar a degradação e liberação desse composto bioativo.

Azevedo et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de alginato e quitosana para encapsulação e liberação controlada de vitamina B<sub>2</sub>. O'Neill et al. (2014) encapsularam eficientemente vitamina B<sub>2</sub> em microesferas de proteínas do soro de leite. Chen et al. (2010) realizaram estudo *in vitro* de liberação de vitamina B<sub>2</sub> e comprovaram a eficiência de microesferas de proteínas da soja e zeína em encapsular esse composto bioativo.

A auto-organização de moléculas, como as proteínas, de forma a montar estruturas supramoleculares ou nanopartículas para carrear substâncias bioativas, tem representado tópico importante de pesquisas nos últimos anos (Li et al., 2015). Micro e nanopartículas de liberação de compostos bioativos incorporadas aos alimentos representam uma importante maneira de melhorar a saúde através da alimentação (Wichchukit et al., 2013). Sistemas encapsuladores e de liberação baseados em proteínas oferecem vantagens como melhoria de solubilidade e de estabilidade dos compostos bioativos (Chen et al., 2015).

As proteínas do leite, por serem gelificantes, apresentarem alta solubilidade e propriedade de auto-associação e de se ligar a íons e pequenas moléculas, são consideradas veículos naturais de compostos bioativos. Além disso, são biocompatíveis, biodegradáveis e capazes de interagir com outras moléculas e formar estruturas supramoleculares que permitem a encapsulação e aumento da biodisponibilidade de biocompostos (Liu et al., 2016; Livney, 2010).

Proteínas do soro do leite, como  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e glicomacropéptido (GMP), podem se autoassociar por procedimento simples e livre de reagentes tóxicos, baseado em aquecimento e mudança de pH, e dar origem a estruturas supramoleculares (Diniz e et al., 2014). Essas estruturas são apropriadas para proteção de compostos bioativos de baixa estabilidade (Abaee e Madadlou, 2016; Salvatore et al., 2011). A grande vantagem da utilização de proteínas do soro como carreadores de compostos bioativos é que esse tipo de material é de grau alimentício, seguro e de alto valor nutricional (Ramos et al., 2014).

Este trabalho estudou a interação de quercetina e vitamina B<sub>2</sub> com estruturas supramoleculares formadas pelas proteínas do soro de leite  $\alpha$ -la e GMP. O objetivo foi verificar a utilização dessas estruturas supramoleculares como sistemas carreadores dos compostos bioativos, ao se determinar a eficiência de encapsulação, capacidade de ligação, tamanho de partícula e potencial  $\zeta$ . Além disso, investigou-se a estabilidade dos sistemas de estruturas supramoleculares pelo monitoramento do tamanho de partículas e potencial  $\zeta$  por 60 dias.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais**

As proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -la) e glicomacropéptido (GMP) foram gentilmente cedidas pela Davisco Foods (USA). O ácido clorídrico (HCl, Merck, Alemanha), quercetina (Sigma Aldrich, EUA) e vitamina B<sub>2</sub> (Vetec, Brasil) foram usados sem qualquer purificação adicional. Água deionizada (Milli Q, Millipore, USA;  $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ) foi utilizada para a preparação de todas as soluções aquosas.

### **2.2. Preparação das estruturas supramoleculares proteicas**

Para formação das estruturas supramoleculares, foram preparadas soluções aquosas individuais de  $\alpha$ -la e de GMP na concentração de  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Essas soluções ficaram sob agitação moderada, à temperatura ambiente, por 15 minutos, em agitador magnético (TE 0851, Tecnal, Brasil). Em seguida, misturaram-se volumes determinados de cada solução para que atingissem a razão molar estequiométrica de 1:0,689 de  $\alpha$ -la e de GMP, respectivamente, previamente estabelecida por análise de calorimetria por titulação isotérmica (Diniz et al., 2014). Adicionou-se 0,02% de azida de sódio à mistura das dispersões de proteínas, para evitar contaminação microbiana, e, posteriormente, a mistura foi mantida sob agitação (TE 0851, Tecnal, Brasil) por 24 horas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa incubadora para B.O.D. (SP-500 B.O.D., SP Labor, Brasil).

As estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP foram preparadas seguindo um planejamento experimental fatorial  $2^3$ , com três repetições no ponto central (Tabela 1). Os valores de pH de cada um dos sistemas foram ajustados com solução de HCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup> (HI 2221, Hanna, USA) e, em seguida, os mesmos foram submetidos aos respectivos tratamentos térmicos.

**Tabela 1.** Delineamento fatorial  $2^3$  seguido para preparação das estruturas supramoleculares proteicas.

| Sistema | pH  | Tempo (minutos) | Temperatura (°C) |
|---------|-----|-----------------|------------------|
| 1       | 3,5 | 20              | 25               |
| 2       | 6,5 | 20              | 25               |
| 3       | 3,5 | 40              | 25               |
| 4       | 6,5 | 40              | 25               |
| 5       | 3,5 | 20              | 75               |
| 6       | 6,5 | 20              | 75               |
| 7       | 3,5 | 40              | 75               |
| 8       | 6,5 | 40              | 75               |
| 9       | 5,0 | 30              | 50               |
| 10      | 5,0 | 30              | 50               |
| 11      | 5,0 | 30              | 50               |

### 2.3. Curva de calibração de quercetina

A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de quercetina com concentração inicial de 8 mg·mL<sup>-1</sup> em etanol absoluto 98%, nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg·mL<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas em triplicata em espectrofotômetro (Cary 50, Varian, Australia), utilizando-se 373 nm como comprimento de onda (Souza et al., 2014).

### 2.4. Encapsulação de quercetina em estruturas supramoleculares proteicas

Para encapsulação de quercetina, as estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP foram preparadas como descrito no item 2.2, e, ao final do tratamento térmico, foram adicionados diferentes volumes da solução estoque de quercetina, de modo que cada sistema de estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP apresentasse as concentrações de 50, 100 e 200 µg·mL<sup>-1</sup> de

quercetina. Esperou-se 5 min para que a interação ocorresse, e então as amostras foram colocadas em banho de gelo para que a reação terminasse. As amostras foram preparadas em triplicata.

## **2.5. Curva de calibração de vitamina B<sub>2</sub>**

A curva de calibração de vitamina B<sub>2</sub> foi realizada a partir de uma solução estoque com concentração inicial de 0,06 mg·mL<sup>-1</sup> em água (Azevedo et al., 2014). As concentrações utilizadas para elaboração da curva de calibração foram 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 3; 6; 12; 15; 20; 22; 27 e 35 µg·mL<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas em triplicata em espectrofotômetro (Cary 50, Varian, Australia), em comprimento de onda de 440 nm.

## **2.6. Encapsulação de vitamina B<sub>2</sub> em estruturas supramoleculares proteicas**

Para encapsular a vitamina B<sub>2</sub>, as estruturas supramoleculares de α-la e GMP foram preparadas como descrito no item 2.2, e antes de serem submetidas ao tratamento térmico, adicionou-se diferentes volumes da solução estoque de vitamina B<sub>2</sub>, de modo que cada sistema de estruturas supramoleculares apresentasse as concentrações de 20, 25 e 30 µg·mL<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas em triplicata. Após o tratamento térmico, as estruturas supramoleculares com vitamina B<sub>2</sub> foram colocadas em banho de gelo para interromper a reação.

## **2.7. Eficiência de encapsulação (%)**

Para a determinação da eficiência de encapsulação (EE) da quercetina e vitamina B<sub>2</sub>, 1500 µL de cada amostra foram retirados e colocados em tubos *ependorf*, com massas previamente determinadas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 g a 4 °C por 30 min. em uma centrífuga refrigerada (Mikro 200R, Hettich, Alemanha). Após a centrifugação, retirou-se 1000 µL de cada amostra, que foram diluídos e analisados em espectrofotômetro (Cary 50, Varian, Australia). A quantificação da quercetina foi conduzida em comprimento de onda de 373 nm e a da vitamina B<sub>2</sub> em comprimento de onda de 440 nm. Ambas as análises espectrofotométricas foram realizadas em triplicatas. A partir dos valores de absorvância determinados para cada amostra, foram calculadas as concentrações de quercetina e vitamina B<sub>2</sub> dos sobrenadantes, utilizando-se a equação da reta da curva de calibração de cada substância. Posteriormente, calculou-se a eficiência de encapsulação EE (%) utilizando a equação (1), conforme Azevedo et al. (2014).

$$EE(\%) = (W_{total} - W_{livre}) 100/W_{total} \quad (1)$$

em que EE (%) é a eficiência de encapsulação,  $W_{total}$  é o total de quercetina ou vitamina B<sub>2</sub> adicionado às estruturas supramoleculares proteicas e  $W_{livre}$  é o total de quercetina ou vitamina B<sub>2</sub> livre determinado no sobrenadante.

## 2.8. Determinação da capacidade de ligação (CL)

A maior parte do sobrenadante do *eppendorf* foi retirada cuidadosamente com auxílio de micropipeta e o decantado foi levado à estufa de secagem (Th- 501-100, Thoth, Brasil) a 50 °C até a evaporação total do sobrenadante restante no *eppendorf*. Calculou-se a capacidade ligação (CL) para a quercetina e para a vitamina B<sub>2</sub>, utilizando-se a equação (2), de acordo com Azevedo et al. (2014):

$$CL(\%) = (W_{total} - W_{livre}) 100/W_s \quad (2)$$

em que  $W_{total}$  é o total de quercetina ou vitamina B<sub>2</sub> adicionado às estruturas supramoleculares,  $W_{livre}$  é o total de quercetina ou vitamina B<sub>2</sub> livre encontrado no sobrenadante e  $W_s$  é a massa total das estruturas supramoleculares, obtida subtraindo-se o peso final do peso inicial do *eppendorf*.

## 2.9. Distribuição do tamanho das partículas

O tamanho médio das partículas das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub> foi investigado por espectroscopia de correlação de fótons, através do Zetasizer Nano (ZS, Malvern Instrument, Inglaterra). O aparelho é equipado com um laser de He/Ne 4 mW, que emite em comprimento de onda de 632,8 nm; uma célula medidora; um detector do tipo fotodiodo de avalanche; e um correlacionador. As amostras foram analisadas, sem diluição, a  $(25,0 \pm 0,1)$  °C e em cubeta retangular de poliestireno. A intensidade espalhada foi medida sob um ângulo de detecção de 173° em relação à fonte. Funções de autocorrelação de intensidade foram analisadas por algoritmo CONTIN (integrado ao software do equipamento) para determinação da distribuição de tamanhos. Cada medida obtida representa uma média de pelo menos dez leituras.



## 2.10. Potencial $\zeta$

As determinações de potencial  $\zeta$  das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub> foram realizadas a 25 °C em um Zetasizer Nano (ZS Malvern Instrument, Inglaterra), equipado com um laser de He/Ne 4 mW, utilizando a técnica microeletroforese laser Doppler.

## 2.11. Estabilidade durante a estocagem

A estabilidade ao longo do tempo (1, 3, 10, 20, 30 e 60 dias) das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub> foi avaliada verificando-se o tamanho e o potencial  $\zeta$ , utilizando-se Zetasizer Nano (ZS Malvern Instrument, Inglaterra). Por se tratar de uma substância fotossensível, as amostras com vitamina B<sub>2</sub> foram protegidas com papel alumínio.

## 2.12. Análise estatística

Os dados experimentais de estabilidade das estruturas supramoleculares foram avaliados estatisticamente pelo software Statistical Analysis System (SAS<sup>®</sup>), versão 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa, utilizando ANOVA e teste de média de Tukey (5% de probabilidade).

# 3. Resultados e Discussão

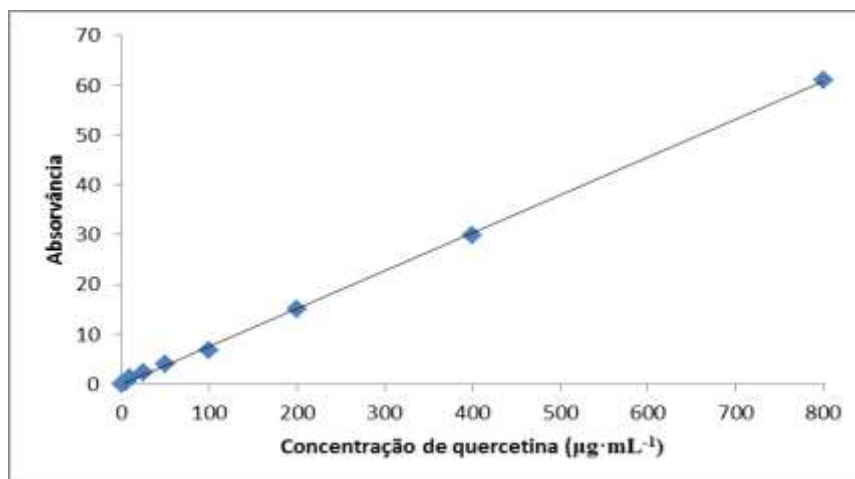
## 3.1. Curva de calibração de quercetina

A curva de calibração de quercetina foi determinada a partir de uma solução estoque com concentração de 8 mg·mL<sup>-1</sup> em etanol absoluto. As amostras foram analisadas por espectrofotometria (Cary 50, Varian, Australia), utilizando o comprimento de onda de 373 nm.

Verificou-se a linearidade da curva (Figura 3), com coeficiente de correlação de 0,9996, e a equação de reta obtida (3) relaciona o valor da absorvância com a concentração de quercetina:

$$Y = 0,0759 \cdot X + 0,0012 \quad (3)$$

em que Y é a absorvância a 373 nm e X é a concentração de quercetina ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Curva de calibração da quercetina em etanol absoluto, absorvância determinada a 373 nm.

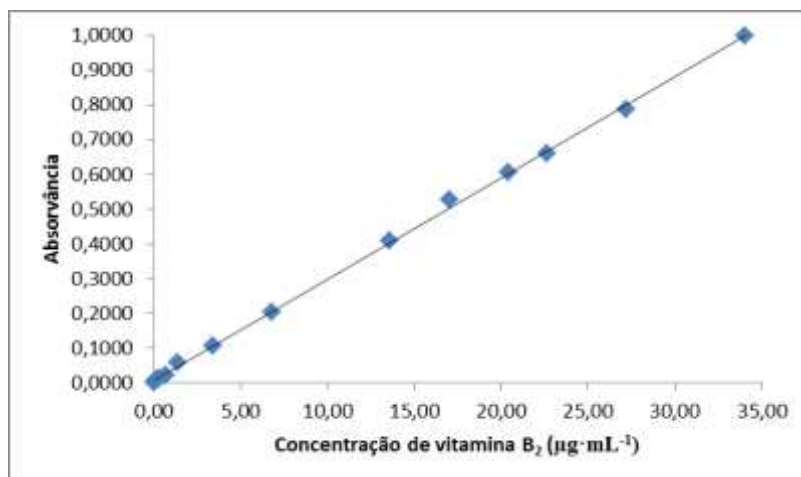
### 3.2. Curva de calibração da vitamina B<sub>2</sub>

A curva de calibração da vitamina B<sub>2</sub> foi determinada a partir de uma solução estoque com concentração de 0,06 mg·mL<sup>-1</sup> em água, utilizando-se espectrofotômetro (Cary 50, Varian, Australia), e comprimento de onda de 440 nm.

A curva obtida apresentou linearidade (Figura 4), com coeficiente de correlação de 0,9993, e a equação da reta obtida (4) relaciona o valor da absorvância com a concentração de vitamina B<sub>2</sub>:

$$Y = 0,0291 \cdot X + 0,0072 \quad (4)$$

em que Y é a absorvância a 440 nm e X é a concentração de vitamina B<sub>2</sub> (µg·mL<sup>-1</sup>).



**Figura 4.** Curva de calibração de vitamina B<sub>2</sub> em água, absorvância determinada a 440 nm.

### 3.3. Encapsulação de quercetina

A eficiência de encapsulação (EE) corresponde à quantidade (%) do composto presente no sistema de estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP. A capacidade de ligação (CL) é a capacidade em % do composto ativo em ser ligado às partículas do sistema. A Tabela 2 apresenta os resultados da análise de tamanho, de potencial  $\zeta$ , dos valores da EE (%) e da CL (%) das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina, em diferentes concentrações. A distribuição de tamanho de partícula foi representada como a população com a maior porcentagem em distribuição de volume.

**Tabela 2.** Diâmetro, potencial  $\zeta$ , eficiência de encapsulação (%) e capacidade de ligação (%) das estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina, em diferentes concentrações.

| Sistema | Concentração de quercetina ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | Diâmetro (nm)                 | Potencial $\zeta$ (mV)       | Eficiência de encapsulação (%) | Capacidade de ligação (%)    |
|---------|---|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 1       | 50  | 1126 <sup>a</sup> $\pm$ 37,3  | 19,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,3 | 88,50 <sup>a</sup> $\pm$ 3,7   | 66,16 <sup>a</sup> $\pm$ 2,9 |
| 1       | 100   | 1414 <sup>b</sup> $\pm$ 58,0  | 18,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,7  | 93,85 <sup>a</sup> $\pm$ 3,3   | 58,65 <sup>b</sup> $\pm$ 2,0 |
| 1       | 200   | 1508 <sup>b</sup> $\pm$ 148,9 | 20,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4  | 95,92 <sup>a</sup> $\pm$ 3,0   | 33,64 <sup>c</sup> $\pm$ 2,0 |
| 2       | 50  | 1116 <sup>a</sup> $\pm$ 125,5 | -23,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5 | 91,65 <sup>a</sup> $\pm$ 3,4   | 22,84 <sup>a</sup> $\pm$ 0,9 |
| 2       | 100   | 2306 <sup>b</sup> $\pm$ 201,8 | -23,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3 | 93,86 <sup>a</sup> $\pm$ 1,7   | 25,81 <sup>b</sup> $\pm$ 1,0 |
| 2       | 200   | 2084 <sup>b</sup> $\pm$ 169,0 | -19,8 <sup>b</sup> $\pm$ 0,8 | 95,93 <sup>a</sup> $\pm$ 3,7   | 57,56 <sup>b</sup> $\pm$ 1,7 |
| 3       | 50  | 1105 <sup>a</sup> $\pm$ 109,0 | 18,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4  | 90,97 <sup>a</sup> $\pm$ 2,9   | 15,35 <sup>a</sup> $\pm$ 1,0 |

|    |     |                            |                           |                            |                          |
|----|-----|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 3  | 100 | 1549 <sup>b</sup> ± 137,5  | 20,5 <sup>ab</sup> ± 0,7  | 93,90 <sup>a</sup> ± 3,89  | 32,70 <sup>b</sup> ± 1,8 |
| 3  | 200 | 1437 <sup>b</sup> ± 80,5   | 22,4 <sup>b</sup> ± 1,5   | 96,22 <sup>a</sup> ± 2,34  | 57,72 <sup>c</sup> ± 2,5 |
| 4  | 50  | 566,7 <sup>a</sup> ± 65,9  | -26,7 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 93,11 <sup>a</sup> ± 1,76  | 70,17 <sup>a</sup> ± 3,7 |
| 4  | 100 | 821,3 <sup>a</sup> ± 97,4  | -24,9 <sup>a</sup> ± 0,7  | 97,16 <sup>a</sup> ± 3,47  | 32,80 <sup>a</sup> ± 2,3 |
| 4  | 200 | 2582 <sup>b</sup> ± 146,8  | -26,9 <sup>b</sup> ± 0,9  | 96,82 <sup>a</sup> ± 4,59  | 60,50 <sup>a</sup> ± 4,3 |
| 5  | 50  | 465,9 <sup>a</sup> ± 68,2  | 17,8 <sup>a</sup> ± 0,9   | 85,83 <sup>a</sup> ± 3,79  | 8,16 <sup>a</sup> ± 1,0  |
| 5  | 100 | 528,0 <sup>a</sup> ± 55,7  | 16,8 <sup>a</sup> ± 0,7   | 92,65 <sup>ab</sup> ± 4,02 | 17,38 <sup>b</sup> ± 1,0 |
| 5  | 200 | 1539 <sup>b</sup> ± 106,6  | 18,0 <sup>a</sup> ± 0,6   | 97,88 <sup>b</sup> ± 4,25  | 51,36 <sup>c</sup> ± 2,6 |
| 6  | 50  | 748,4 <sup>a</sup> ± 84,9  | -28,9 <sup>a</sup> ± 1,0  | 94,02 <sup>a</sup> ± 3,21  | 14,10 <sup>a</sup> ± 0,9 |
| 6  | 100 | 1487 <sup>b</sup> ± 141,2  | -29,9 <sup>a</sup> ± 0,9  | 93,18 <sup>a</sup> ± 2,96  | 19,95 <sup>b</sup> ± 1,6 |
| 6  | 200 | 1478 <sup>b</sup> ± 70,5   | -29,6 <sup>a</sup> ± 0,7  | 95,42 <sup>a</sup> ± 4,56  | 44,31 <sup>c</sup> ± 2,1 |
| 7  | 50  | 790,2 <sup>a</sup> ± 49,1  | 18,0 <sup>a</sup> ± 0,4   | 81,75 <sup>a</sup> ± 3,9   | 13,76 <sup>a</sup> ± 1,1 |
| 7  | 100 | 1202 <sup>b</sup> ± 40,6   | 21,2 <sup>b</sup> ± 0,6   | 93,21 <sup>b</sup> ± 3,8   | 31,47 <sup>b</sup> ± 1,9 |
| 7  | 200 | 2553 <sup>c</sup> ± 108,9  | 20,2 <sup>b</sup> ± 0,5   | 94,38 <sup>b</sup> ± 4,6   | 33,42 <sup>b</sup> ± 2,3 |
| 8  | 50  | 802,0 <sup>a</sup> ± 152,9 | -32,3 <sup>a</sup> ± 1,1  | 94,92 <sup>a</sup> ± 3,5   | 7,78 <sup>a</sup> ± 0,6  |
| 8  | 100 | 1228 <sup>b</sup> ± 99,5   | -30,9 <sup>a</sup> ± 0,7  | 93,73 <sup>a</sup> ± 3,9   | 17,38 <sup>a</sup> ± 1,6 |
| 8  | 200 | 1197 <sup>b</sup> ± 114,4  | -31,0 <sup>a</sup> ± 0,4  | 96,23 <sup>a</sup> ± 2,8   | 64,97 <sup>a</sup> ± 2,7 |
| 9  | 50  | 5230 <sup>a</sup> ± 208,1  | -12,2 <sup>a</sup> ± 0,3  | 94,64 <sup>a</sup> ± 3,7   | 6,68 <sup>a</sup> ± 0,7  |
| 9  | 100 | 4674 <sup>b</sup> ± 258,7  | -11,0 <sup>b</sup> ± 0,3  | 97,18 <sup>a</sup> ± 4,9   | 11,28 <sup>b</sup> ± 0,7 |
| 9  | 200 | 5259 <sup>a</sup> ± 44,5   | -9,3 <sup>c</sup> ± 0,3   | 98,40 <sup>a</sup> ± 5,0   | 15,97 <sup>c</sup> ± 1,5 |
| 10 | 50  | 4575 <sup>a</sup> ± 115,7  | -10,4 <sup>a</sup> ± 0,5  | 96,27 <sup>a</sup> ± 4,8   | 7,53 <sup>a</sup> ± 0,8  |
| 10 | 100 | 4861 <sup>a</sup> ± 243,2  | -9,7 <sup>a</sup> ± 0,2   | 96,94 <sup>a</sup> ± 3,8   | 9,87 <sup>a</sup> ± 1,0  |
| 10 | 200 | 5596 <sup>b</sup> ± 269,0  | -8,4 <sup>b</sup> ± 0,3   | 98,64 <sup>a</sup> ± 4,6   | 16,65 <sup>b</sup> ± 1,3 |
| 11 | 50  | 5181 <sup>a</sup> ± 285,5  | -10,4 <sup>a</sup> ± 0,3  | 93,49 <sup>a</sup> ± 3,9   | 6,70 <sup>a</sup> ± 0,8  |
| 11 | 100 | 4976 <sup>a</sup> ± 288,7  | -9,0 <sup>b</sup> ± 0,4   | 96,82 <sup>a</sup> ± 4,7   | 13,19 <sup>b</sup> ± 1,5 |
| 11 | 200 | 5358 <sup>a</sup> ± 226,9  | -10,1 <sup>a</sup> ± 0,2  | 98,52 <sup>a</sup> ± 4,3   | 15,73 <sup>b</sup> ± 2,0 |

---

Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey, no mesmo sistema.

As estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -Ia e GMP apresentaram eficiência de encapsulação mínima de 81,75% (sistema 8) e máxima de 98,52% (sistema 11). Esses valores

de EE foram similares aos encontrados por Pool et al. (2012), que verificaram EE de 79,84 % de quercetina em nanopartículas de PLGA - *poly (lactic-co-glycolic acid)*, com tamanhos de 399,67 nm; e por Souza et al. (2014), que encontraram EE maior que 95% de quercetina em nanopartículas de lecitina/quitosana, cujos tamanhos variaram entre 117,7 e 172,06 nm. Ha et al. (2013) verificaram a eficiência de encapsulação de quercetina em nanopartículas de quitosana-ácido linoleico/ $\beta$ -lactoglobulina, com tamanhos médios entre 250 e 350 nm, e obtiveram valores menores que 60%. As estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP podem ser consideradas moléculas carreadoras eficientes de quercetina, apesar de os seus tamanhos de partícula serem maiores (Tabela 2), quando comparados aos trabalhos citados anteriormente.

A elevada eficiência de encapsulação obtida foi possível porque a maior parte da quercetina se associou às moléculas proteicas por interações hidrofóbicas, enquanto o restante permaneceu na fase aquosa. As interações hidrofóbicas ocorreram entre os componentes hidrofóbicos das moléculas carreadoras, como resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das proteínas  $\alpha$ -la e GMP, e os componentes hidrofóbicos da substância bioativa, como os anéis de polifenóis da quercetina. Porém, a ocorrência de ligações de hidrogênio entre as estruturas supramoleculares e a quercetina não deve ser descartada (Wang e Wang, 2015; Ha et al., 2013; Pool et al., 2012)

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de EE entre as diferentes concentrações de quercetina, exceto para os sistemas 5 e 7, preparados em pH 3,5 e com tratamento térmico de 75 °C/40 min. Para estes sistemas, verificou-se maior EE para a concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de quercetina. O pH 3,5 está entre os pontos isoelétricos da  $\alpha$ -la (4,8, segundo Ramos et al., 2014) e GMP (3,3). Essa condição causa a atração eletrostática entre as proteínas, enquanto o aquecimento a 75 °C promove abertura das estruturas proteicas, com exposição de sítios hidrofóbicos. Isso pode ter favorecido o aparecimento de novos sítios para ligação de quercetina, e conseqüentemente, maior eficiência de encapsulação.

Os valores de capacidade de ligação variaram entre 6,68 e 70,17%. Não foi observado um padrão na capacidade de ligação da quercetina. Apesar disso, as estruturas supramoleculares são consideradas sistemas carreadores de quercetina eficientes. Souza et al. (2014) verificaram capacidade de ligação menor que 3% da quercetina em nanopartículas de lecitina/quitosano.

Os tamanhos dos sistemas de estruturas supramoleculares formados por  $\alpha$ -la e GMP foram demonstrados em estudo anterior (capítulo III). Verificou-se que os tamanhos de partí-

culas de todos os sistemas aumentaram quando adicionados de quercetina, indicando que houve interação entre as moléculas de quercetina e as estruturas supramoleculares. Pool et al. (2012) também verificaram um aumento do tamanho de partículas de nanoestruturas de PLGA ao encapsular os flavonoides quercetina e catequina.

Entre os sistemas de estruturas supramoleculares obtidos em pH 3,5, aqueles preparados sob 25 °C (sistemas 1 e 3) apresentaram tamanhos de partícula entre  $1105 \pm 109,0$  e  $1549 \pm 137,5$  nm. Por outro lado, os tamanhos de partícula para os sistemas 5 e 7, preparados sob aquecimento térmico de 75 °C, variaram entre  $465,9 \pm 68,2$  e  $2553 \pm 108,9$  nm. A maior temperatura de aquecimento pode ter sido responsável pela modificação das estruturas terciárias das proteínas e consequente exposição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, contribuindo com uma maior interação da quercetina com as proteínas e com o aumento do tamanho de partícula do sistema. Os sistemas de estruturas supramoleculares obtidos em pH 3,5 (sistemas 1, 3, 5 e 7) apresentaram valores positivos de potencial  $\zeta$ , que variaram entre  $16,8 \pm 0,7$  e  $22,4 \pm 1,5$ . Os valores positivos do potencial  $\zeta$  indicam que a  $\alpha$ -la está em maior quantidade na superfície das estruturas supramoleculares, uma vez que o pH 3,5 encontra-se abaixo do seu ponto isoelétrico.

Entre as estruturas supramoleculares formadas em pH 6,5, aquelas formadas com aquecimento térmico de 25 °C apresentaram tamanhos de partícula entre  $566,7 \pm 65,9$  e  $2582 \pm 146,8$  nm, e aquelas formadas sob 75 °C apresentaram tamanhos de partícula entre  $748,4 \pm 84,9$  e  $1487 \pm 141,2$  nm. Diferentemente do que ocorreu para os sistemas em pH 3,5, as estruturas supramoleculares preparadas em pH 6,5 tiveram maior exposição dos sítios hidrofóbicos em temperatura menor, de 25 °C. Isso explica o maior tamanho de partícula para essa temperatura. Ha et al. (2013) obtiveram resultado similar ao estudar a encapsulação de quercetina em nanopartículas de quitosana/ácido linoleico/ $\beta$ -lactoglobulina. Esses autores verificaram que a diminuição de temperatura de preparo das nanopartículas de 20 para 5 °C promoveu um aumento da hidrofobicidade da superfície da  $\beta$ -lactoglobulina.

As estruturas supramoleculares de pH 6,5 apresentaram valores negativos para potencial  $\zeta$ , uma vez que esse pH é maior que o ponto isoelétrico da  $\alpha$ -la e do GMP. Entre as condições testadas, o pH 6,5 resultou em sistemas de estruturas supramoleculares mais estáveis, uma vez que nesse pH os valores de potencial  $\zeta$  foram maiores. Os sistemas de estruturas supramoleculares preparados com tratamento térmico de 75 °C (sistemas 6 e 8) apresentaram boa estabilidade, com valores de potencial  $\zeta$  de -30 mV aproximadamente (Silva et al., 2011;

Liu et al., 2007). O alto valor de potencial  $\zeta$  garante a repulsão eletrostática entre as moléculas, promovendo a estabilidade do sistema.

É importante lembrar que a variação existente entre os tamanhos de partícula e potencial  $\zeta$  em sistemas preparados com o mesmo pH e mesma temperatura pode ser devida à diferença de tempo de tratamento. Os sistemas proteicos possuem moléculas dinâmicas, que sob determinadas condições podem apresentar diferentes características estruturais, como por exemplo a exposição de grupamentos hidrofóbicos ou a ionização de grupos químicos.

Os sistemas preparados em pH 5,0 sob aquecimento de 50 °C/30 min (sistemas 9 a 11) apresentaram tamanhos de partícula entre  $4575 \pm 115,7$  e  $5596 \pm 269,0$  nm. Nessas condições de tratamento, o processo de gelificação, em que há diminuição da solubilidade das moléculas, além da adição de quercetina, que interage com as proteínas, são os responsáveis pelos altos valores de tamanho de partícula observados.

O potencial  $\zeta$  desses sistemas variaram entre  $-8,4 \pm 0,3$  e  $-12,2 \pm 0,3$  mV. Os valores foram negativos porque as proteínas em pH 5,0 estão acima de seus pontos isoelétricos. A baixa repulsão eletrostática entre as moléculas, representada por valores baixos de potencial  $\zeta$ , é resultado da agregação e diminuição da solubilidade das estruturas supramoleculares. Kumar et al. (2015) encontraram valores similares de potencial  $\zeta$  ( $-11,8 \pm 0,42$  a  $-12,9 \pm 0,35$  mV) para nanopartículas formadas por Poly  $\epsilon$  caprolactone encapsuladoras de quercetina.

### **3.4. Encapsulação de vitamina B<sub>2</sub>**

A Tabela 3 mostra os valores de tamanho de partícula, de potencial  $\zeta$ , da EE (%) e da CL (%) das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP, com diferentes concentrações de vitamina B<sub>2</sub>. A distribuição de tamanho de partícula foi representada como a população com a maior porcentagem em distribuição de volume.

**Tabela 3.** Diâmetro, potencial  $\zeta$ , eficiência de encapsulação (%) e capacidade de ligação (%) das estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de vitamina B<sub>2</sub>, em diferentes concentrações.

| Sistema | Concentração de vitamina B ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | Diâmetro (nm)               | Potencial $\zeta$ (mV)   | Eficiência de encapsulação (%) | Capacidade de ligação (%) |
|---------|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 1       | 20  | 1264 <sup>a</sup> ± 167,2   | 11,8 <sup>a</sup> ± 0,3  | 2,58 <sup>a</sup> ± 0,23       | 0,28 <sup>a</sup> ± 0,05  |
| 1       | 25  | 2064 <sup>b</sup> ± 316,9   | 9,89 <sup>b</sup> ± 0,6  | 2,70 <sup>a</sup> ± 0,21       | 0,38 <sup>a</sup> ± 0,06  |
| 1       | 30  | 1756 <sup>ab</sup> ± 241,4  | 9,75 <sup>b</sup> ± 0,3  | 5,40 <sup>b</sup> ± 0,60       | 2,15 <sup>b</sup> ± 0,21  |
| 2       | 20  | 371,8 <sup>a</sup> ± 17,26  | -39,3 <sup>a</sup> ± 1,4 | 1,47 <sup>a</sup> ± 0,09       | 0,24 <sup>a</sup> ± 0,08  |
| 2       | 25  | 392,4 <sup>a</sup> ± 44,74  | -37,8 <sup>a</sup> ± 2,6 | 2,59 <sup>b</sup> ± 0,15       | 1,09 <sup>b</sup> ± 0,23  |
| 2       | 30  | 292,5 <sup>b</sup> ± 23,47  | -34,6 <sup>a</sup> ± 3,3 | 3,35 <sup>c</sup> ± 0,13       | 0,83 <sup>b</sup> ± 0,09  |
| 3       | 20  | 1041 <sup>a</sup> ± 108,8   | 11,2 <sup>a</sup> ± 0,7  | 2,79 <sup>a</sup> ± 0,11       | 0,38 <sup>a</sup> ± 0,04  |
| 3       | 25  | 964,7 <sup>a</sup> ± 269,9  | 10,9 <sup>a</sup> ± 1,1  | 3,89 <sup>b</sup> ± 0,16       | 0,41 <sup>a</sup> ± 0,04  |
| 3       | 30  | 1205 <sup>a</sup> ± 242,6   | 9,34 <sup>a</sup> ± 0,3  | 8,88 <sup>c</sup> ± 0,54       | 1,79 <sup>b</sup> ± 0,12  |
| 4       | 20  | 285,3 <sup>a</sup> ± 34,73  | -41,8 <sup>a</sup> ± 0,3 | 2,41 <sup>a</sup> ± 0,10       | 0,22 <sup>a</sup> ± 0,04  |
| 4       | 25  | 376,8 <sup>b</sup> ± 38,03  | -35,8 <sup>b</sup> ± 0,5 | 2,70 <sup>a</sup> ± 0,32       | 1,13 <sup>b</sup> ± 0,13  |
| 4       | 30  | 311,5 <sup>ab</sup> ± 17,71 | -35,6 <sup>b</sup> ± 0,6 | 7,20 <sup>b</sup> ± 0,37       | 0,19 <sup>a</sup> ± 0,02  |
| 5       | 20  | 998,9 <sup>a</sup> ± 95,84  | 12,9 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 7,67 <sup>a</sup> ± 0,45       | 0,56 <sup>a</sup> ± 0,04  |
| 5       | 25  | 1234 <sup>ab</sup> ± 105,9  | 13,6 <sup>a</sup> ± 0,07 | 9,25 <sup>b</sup> ± 0,54       | 0,95 <sup>b</sup> ± 0,07  |
| 5       | 30  | 1305 <sup>b</sup> ± 125,4   | 12,8 <sup>b</sup> ± 0,2  | 3,75 <sup>c</sup> ± 0,26       | 0,76 <sup>c</sup> ± 0,06  |
| 6       | 20  | 276,4 <sup>a</sup> ± 12,92  | -32,1 <sup>a</sup> ± 0,7 | 3,31 <sup>a</sup> ± 0,29       | 0,26 <sup>a</sup> ± 0,02  |
| 6       | 25  | 435,0 <sup>b</sup> ± 56,92  | -32,5 <sup>a</sup> ± 1,1 | 11,93 <sup>b</sup> ± 0,64      | 1,00 <sup>b</sup> ± 0,08  |
| 6       | 30  | 335,7 <sup>a</sup> ± 28,77  | -37,5 <sup>b</sup> ± 1,2 | 20,09 <sup>c</sup> ± 1,03      | 4,97 <sup>c</sup> ± 0,34  |
| 7       | 20  | 1219 <sup>a</sup> ± 109,4   | 14,3 <sup>a</sup> ± 0,07 | 2,18 <sup>a</sup> ± 0,11       | 0,17 <sup>a</sup> ± 0,02  |
| 7       | 25  | 1064 <sup>a</sup> ± 144,0   | 14,1 <sup>a</sup> ± 0,5  | 12,41 <sup>b</sup> ± 0,78      | 1,16 <sup>b</sup> ± 0,09  |
| 7       | 30  | 1208 <sup>a</sup> ± 116,1   | 12,5 <sup>b</sup> ± 0,8  | 7,10 <sup>c</sup> ± 0,45       | 1,14 <sup>b</sup> ± 0,10  |
| 8       | 20  | 230,7 <sup>a</sup> ± 8,08   | -34,8 <sup>a</sup> ± 0,9 | 18,81 <sup>a</sup> ± 1,10      | 2,14 <sup>a</sup> ± 0,13  |
| 8       | 25  | 252,3 <sup>a</sup> ± 16,27  | -30,5 <sup>b</sup> ± 1,0 | 25,51 <sup>b</sup> ± 1,21      | 0,64 <sup>b</sup> ± 0,05  |
| 8       | 30  | 359,1 <sup>b</sup> ± 30,08  | -34,3 <sup>a</sup> ± 1,1 | 31,11 <sup>c</sup> ± 1,69      | 0,83 <sup>b</sup> ± 0,05  |



|    |    |                            |                           |                           |                          |
|----|----|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 9  | 20 | 740,2 <sup>a</sup> ± 34,31 | -12,9 <sup>a</sup> ± 0,7  | 6,14 <sup>a</sup> ± 0,41  | 0,35 <sup>a</sup> ± 0,01 |
| 9  | 25 | 800,2 <sup>b</sup> ± 18,93 | -12,9 <sup>a</sup> ± 0,3  | 9,07 <sup>b</sup> ± 0,57  | 0,68 <sup>b</sup> ± 0,03 |
| 9  | 30 | 547,3 <sup>c</sup> ± 10,91 | -13,1 <sup>a</sup> ± 0,2  | 10,50 <sup>c</sup> ± 0,07 | 0,28 <sup>c</sup> ± 0,02 |
| 10 | 20 | 847,5 <sup>a</sup> ± 20,48 | -11,8 <sup>a</sup> ± 0,3  | 4,67 <sup>a</sup> ± 0,23  | 0,24 <sup>a</sup> ± 0,01 |
| 10 | 25 | 762,3 <sup>b</sup> ± 33,56 | -12,1 <sup>ab</sup> ± 0,2 | 5,92 <sup>b</sup> ± 0,43  | 0,59 <sup>b</sup> ± 0,04 |
| 10 | 30 | 520,4 <sup>c</sup> ± 23,91 | -12,4 <sup>b</sup> ± 0,2  | 9,12 <sup>c</sup> ± 0,38  | 0,85 <sup>c</sup> ± 0,06 |
| 11 | 20 | 878,6 <sup>a</sup> ± 34,78 | -12,1 <sup>a</sup> ± 0,5  | 4,03 <sup>a</sup> ± 0,36  | 0,36 <sup>a</sup> ± 0,02 |
| 11 | 25 | 703,4 <sup>b</sup> ± 18,25 | -12,7 <sup>a</sup> ± 0,5  | 9,92 <sup>b</sup> ± 0,44  | 0,59 <sup>a</sup> ± 0,04 |
| 11 | 30 | 616,4 <sup>c</sup> ± 15,99 | -12,9 <sup>a</sup> ± 0,4  | 11,05 <sup>b</sup> ± 0,75 | 1,23 <sup>b</sup> ± 0,19 |

Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey, no mesmo sistema.

As estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP apresentaram, para a vitamina B<sub>2</sub>, EE entre 1,47 e 31,11% e CL entre 0,17 e 4,97%. Da mesma forma que a quercetina, as estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP não apresentaram um padrão de comportamento para a CL de vitamina B<sub>2</sub>. Apesar disso, os resultados podem ser considerados satisfatórios ao se comparar com outros estudos. Hasanvand et al. (2015) produziram nanopartículas de amido, com tamanhos de partícula entre  $14,2 \pm 2,88$  e  $34,1 \pm 6,35$  nm, e verificaram valores de CL menores que  $1,55 \pm 0,08$  % para vitamina D<sub>3</sub>. Azevedo et al. (2014) encapsularam vitamina B<sub>2</sub> em nanopartículas de alginato e quitosana, com tamanho de partícula de  $104,0 \pm 67,2$  nm, e obtiveram EE de 55 % e CL de 2 %, aproximadamente. O'Neill et al. (2014) produziram microesferas de proteínas do soro de leite encapsuladoras de vitamina B<sub>2</sub> e verificaram EE máxima de 65 %, aproximadamente.

Os sistemas carreadores de vitamina B<sub>2</sub> preparados em pH 3,5 e 6,5 (sistemas 1 a 8) apresentaram aumento de tamanho de partícula, quando comparados aos mesmos sistemas sem vitamina B<sub>2</sub> (Capítulo 3). Por outro lado, realizando a mesma comparação, os sistemas de estruturas supramoleculares formados em pH 5,0 (sistemas 9 a 11) com vitamina B<sub>2</sub> apresentaram diminuição do tamanho de partículas. Isso indica que a vitamina B<sub>2</sub> se associa às moléculas proteicas, contribuindo com carga eletrostática positiva, impedindo a agregação e diminuição de solubilidade das estruturas supramoleculares que ocorre nesse pH. Os sistemas 9, 10 e 11 apresentaram valores negativos de potencial  $\zeta$ , uma vez que em pH 5,0 tanto o  $\alpha$ -la quanto o GMP estão carregados negativamente, por estarem acima dos seus pontos isoelétricos.

As estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de vitamina B<sub>2</sub> formadas em pH 3,5 apresentaram tamanhos de partícula maiores que 1000 nm e potencial  $\zeta$  positivo, indicando que a  $\alpha$ -la, cujo ponto isoelétrico é maior que 3,5, contribui mais fortemente para a carga na superfície das estruturas supramoleculares.

Os sistemas de estruturas supramoleculares carreadores de vitamina B<sub>2</sub> preparados em pH 6,5 (sistemas 2, 4, 6 e 8) apresentaram valores negativos de potencial  $\zeta$ , uma vez que as proteínas  $\alpha$ -la e GMP, nesse pH, estão acima de seus pontos isoelétricos. Com valores absolutos de potencial  $\zeta$  acima de -30 mV, esses sistemas apresentaram cargas elétricas responsáveis por manter a repulsão entre as moléculas, garantindo a estabilidade do sistema (Liu et al., 2007) e o menor tamanho de partícula ( $230,7 \pm 8,08$  a  $435,0 \pm 56,92$  nm). Além disso, altos valores de potencial  $\zeta$  indicam que existem cargas disponíveis para ligação com as moléculas de vitamina B<sub>2</sub>, promovendo boa eficiência de encapsulação. As estruturas supramoleculares dos sistemas 6 e 8 (tratamento térmico de 75 °C) apresentaram maiores valores de EE%, entre  $3,31 \pm 0,29$  e  $31,11 \pm 1,69$ . Nesse pH, a vitamina B<sub>2</sub>, catiônica, se liga às estruturas supramoleculares carregadas negativamente (Kurukji et al., 2016; Azevedo et al., 2014). A principal interação da vitamina B<sub>2</sub> com as moléculas proteicas é do tipo eletrostática, porém acredita-se que existam também interações do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio (Azevedo et al., 2014). O'Neill et al. (2014), ao encapsular vitamina B<sub>2</sub> em microesferas de proteínas do soro de leite, verificaram que a vitamina B<sub>2</sub> também pode se ligar às proteínas através de interações hidrofóbicas. Dessa maneira, a maior EE da vitamina B<sub>2</sub> nas estruturas supramoleculares dos sistemas 6 e 8 pode ser devida à exposição de sítios hidrofóbicos das proteínas após o aquecimento de 75 °C, contribuindo para a interação hidrofóbica com o anel hidrofóbico da estrutura da vitamina B<sub>2</sub>, além das interações eletrostáticas. Além disso, a força das interações hidrofóbicas aumenta com o aumento da temperatura, contribuindo para a EE na temperatura de 75 °C.

Comparando-se os valores de EE e CL para a quercetina e para a vitamina B<sub>2</sub>, pode-se afirmar que as estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP são melhores carreadoras de quercetina. Isso indica que essas estruturas supramoleculares interagem melhor com compostos hidrofóbicos, provavelmente porque os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão em maior quantidade ou estão mais expostos, de forma a encapsular mais eficientemente compostos bioativos lipossolúveis.

### 3.5 Estabilidade durante a estocagem

A estabilidade das estruturas pode ser avaliada pela distribuição do tamanho das partículas, pelo estado de agregação e pelo arranjo espacial durante um período de tempo (Dickinson, 2003). O potencial  $\zeta$  representa a carga na superfície das partículas e indica a estabilidade das estruturas através da repulsão eletrostática entre as partículas suspensas. Dessa forma, a estabilidade das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP com quercetina e vitamina B<sub>2</sub> foi avaliada medindo-se a alteração do tamanho de partícula e o potencial  $\zeta$  desses sistemas.

Os sistemas com estruturas supramoleculares com quercetina a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e com 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de vitamina B foram os sistemas selecionados para verificação da estabilidade durante a estocagem. Essas concentrações foram escolhidas por apresentarem melhor homogeneidade (avaliada macroscopicamente) após o primeiro dia.

A Tabela 4 apresenta os valores medidos de tamanho e potencial  $\zeta$  para as estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de quercetina a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , durante o armazenamento por 60 dias, sob 4 °C. A distribuição de tamanho de partícula foi representada como a população com a maior porcentagem em distribuição de volume.

Os tamanhos de partícula dos sistemas de estruturas supramoleculares carreadoras de quercetina preparados em pH 3,5 (sistemas 1, 3, 5 e 7) apresentaram estabilidade por no máximo 30 dias. Houve agregação entre as partículas durante o tempo de armazenamento, provocando o aumento do tamanho médio das partículas. Esses sistemas apresentaram estabilidade dos valores de potencial  $\zeta$  durante os 60 dias de armazenamento, exceto o sistema 7. Isso demonstra que apesar da agregação entre as moléculas, as proteínas mantiveram a natureza da associação entre elas, conservando a carga total nas superfícies das estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP.

Entre as estruturas supramoleculares carreadoras de quercetina formadas em pH 6,5, apenas os sistemas 2 (tratamento térmico de 25 °C/20 min) e 8 (tratamento térmico de 75 °C/40 min) apresentaram estabilidade de tamanho de partícula por 60 dias. Os sistemas 4 (tratamento térmico de 25 °C/40 min) e 6 (tratamento térmico de 75 °C/20 min) apresentaram oscilações de seus tamanhos de partícula durante os 60 dias de armazenamento, ou seja, observou-se tanto aumento quanto diminuição dos tamanhos de partícula. Em relação aos valores de potencial  $\zeta$ , verificou-se que apenas o sistema 6 não manteve estabilidade por 60 dias, sugerindo que as proteínas, ao se agregarem ( $4343 \pm 336,0$  nm), se organizaram de forma

distinta, modificando as características de carga eletrostática nas superfícies das estruturas supramoleculares.

As estruturas supramoleculares carreadoras de quercetina preparadas em pH 5,0, após 3 dias, apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do tamanho de partículas. Dessa maneira, observou-se que os agregados de estruturas supramoleculares formados durante o processo de gelificação são desfeitos. Os valores de potencial  $\zeta$  destes sistemas se mantiveram estáveis por apenas 20 dias, indicando que a carga eletrostática das superfícies das estruturas supramoleculares foi alterada ao longo dos 60 dias de armazenamento. Isso ocorreu possivelmente devido à mudança na organização das proteínas  $\alpha$ -la e GMP ao formar as estruturas supramoleculares de menor tamanho.

Souza et al. (2014) também estudaram quercetina encapsulada em nanopartículas de lecitina e quitosana através de análise de tamanho de partícula e observaram que houve estabilidade de tamanho por 90 dias a 4 °C. Wang e Wang (2015) investigaram a capacidade de nanopartículas de isolado proteico de soja em encapsular a quercetina, assim como de manter a estabilidade de sua atividade antioxidante. Esses autores comprovaram que as nanopartículas são mais eficientes em manter a atividade antioxidante da quercetina, quando comparadas ao isolado proteico de soja in natura. Patel et al. (2012) verificaram que a quercetina teve sua estabilidade frente à luz e pH alcalino aumentada quando encapsulada em sistema coloidal de zeína.

A Tabela 5 apresenta os valores medidos de tamanho e potencial  $\zeta$  para as estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP carreadoras de vitamina B<sub>2</sub> a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , durante o armazenamento por 60 dias, sob 4 °C. A distribuição de tamanho de partícula foi representada como a população com a maior porcentagem em distribuição de volume.

Entre as estruturas supramoleculares carreadoras de vitamina B<sub>2</sub> formadas em pH 3,5 (sistemas 1, 3, 5 e 7), apenas o sistema 3 (tratamento térmico de 25 °C/40 min) não apresentou estabilidade de tamanho de partícula por 60 dias. Os valores de potencial  $\zeta$  desses sistemas se mantiveram estáveis por 60 dias, mostrando que a organização entre as proteínas manteve as características de carga na superfície das estruturas supramoleculares.

**Tabela 4.** Estabilidade das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP com quercetina a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  avaliada por diâmetro de partícula (nm) e potencial  $\zeta$  (mV).

| Tempo de armazenamento (dias) | 0                          |                           | 3                            |                          | 10                         |                          | 20                          |                           | 30                          |                           | 60                         |                           |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                               | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)                | Potencial $\zeta$ (mV)   | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)   | Diâmetro (nm)               | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)               | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)    |
| Sistema 1                     | 1126 <sup>a</sup> ± 37,3   | 19,3 <sup>a</sup> ± 0,3   | 1219 <sup>a</sup> ± 260,1    | 17,6 <sup>b</sup> ± 0,3  | 1291 <sup>ab</sup> ± 256,1 | 18,5 <sup>ab</sup> ± 0,4 | 1319 <sup>abc</sup> ± 100,9 | 18,4 <sup>ab</sup> ± 0,8  | 1584 <sup>bc</sup> ± 141,3  | 18,6 <sup>ab</sup> ± 0,6  | 1713 <sup>c</sup> ± 105,9  | 18,3 <sup>ab</sup> ± 0,6  |
| Sistema 2                     | 1116 <sup>a</sup> ± 125,5  | -23,0 <sup>a</sup> ± 0,5  | 1228 <sup>a</sup> ± 252,4    | -26,4 <sup>b</sup> ± 1,2 | 1316 <sup>a</sup> ± 189,5  | -26,3 <sup>b</sup> ± 1,7 | 1213 <sup>a</sup> ± 151,7   | -24,8 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 1171 <sup>a</sup> ± 162,0   | -25,6 <sup>ab</sup> ± 0,9 | 1356 <sup>a</sup> ± 136,0  | -23,5 <sup>ab</sup> ± 1,3 |
| Sistema 3                     | 1105 <sup>a</sup> ± 109,0  | 18,5 <sup>a</sup> ± 0,4   | 1268 <sup>ab</sup> ± 84,4    | 18,9 <sup>ab</sup> ± 0,2 | 1636 <sup>c</sup> ± 114,4  | 19,1 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 2102 <sup>d</sup> ± 178,6   | 19,7 <sup>b</sup> ± 0,3   | 1395 <sup>abc</sup> ± 110,5 | 19,0 <sup>ab</sup> ± 0,4  | 1545 <sup>bc</sup> ± 134,6 | 19,1 <sup>ab</sup> ± 0,4  |
| Sistema 4                     | 566,7 <sup>a</sup> ± 65,9  | -26,7 <sup>a</sup> ± 0,5  | 1013 <sup>b</sup> ± 80,8     | -26,2 <sup>a</sup> ± 0,7 | 333,5 <sup>c</sup> ± 58,9  | -25,7 <sup>a</sup> ± 1,0 | 557,5 <sup>a</sup> ± 60,1   | -27,6 <sup>a</sup> ± 1,3  | 1314 <sup>d</sup> ± 117,9   | -27,9 <sup>a</sup> ± 1,6  | 215,3 <sup>c</sup> ± 30,6  | -26,2 <sup>a</sup> ± 1,5  |
| Sistema 5                     | 465,9 <sup>a</sup> ± 68,2  | 17,8 <sup>a</sup> ± 0,9   | 446,9 <sup>a</sup> ± 64,7    | 18,0 <sup>a</sup> ± 1,6  | 162,7 <sup>b</sup> ± 38,1  | 17,9 <sup>a</sup> ± 1,9  | 172,3 <sup>b</sup> ± 25,0   | 20,1 <sup>a</sup> ± 0,4   | 1411 <sup>c</sup> ± 120,5   | 19,0 <sup>a</sup> ± 2,0   | 855,8 <sup>d</sup> ± 78,3  | 18,8 <sup>a</sup> ± 0,8   |
| Sistema 6                     | 748,4 <sup>a</sup> ± 184,9 | -28,9 <sup>a</sup> ± 1,0  | 598,70 <sup>ab</sup> ± 81,20 | -29,7 <sup>a</sup> ± 1,1 | 208,5 <sup>b</sup> ± 49,35 | -30,8 <sup>a</sup> ± 1,5 | 347,6 <sup>b</sup> ± 25,3   | -30,3 <sup>a</sup> ± 0,8  | 435,1 <sup>ab</sup> ± 21,4  | -29,3 <sup>a</sup> ± 2,1  | 4343 <sup>c</sup> ± 336,0  | -8,36 <sup>b</sup> ± 0,6  |
| Sistema 7                     | 790,2 <sup>a</sup> ± 49,07 | 18,0 <sup>a</sup> ± 0,4   | 570,0 <sup>a</sup> ± 65,1    | 19,5 <sup>ab</sup> ± 0,6 | 850,6 <sup>a</sup> ± 89,0  | 19,8 <sup>ab</sup> ± 0,8 | 842,3 <sup>a</sup> ± 103,1  | 20,2 <sup>ab</sup> ± 0,5  | 1360 <sup>b</sup> ± 132,5   | 19,6 <sup>ab</sup> ± 1,4  | 1587 <sup>b</sup> ± 190,7  | 20,8 <sup>b</sup> ± 1,1   |
| Sistema 8                     | 1228 <sup>a</sup> ± 99,5   | -30,9 <sup>a</sup> ± 0,7  | 1688 <sup>b</sup> ± 98,3     | -31,6 <sup>a</sup> ± 2,2 | 1494 <sup>ab</sup> ± 103,3 | -30,4 <sup>a</sup> ± 0,4 | 1434 <sup>ab</sup> ± 108,8  | -30,5 <sup>a</sup> ± 0,6  | 1434 <sup>ab</sup> ± 152,8  | -31,5 <sup>a</sup> ± 0,4  | 1459 <sup>ab</sup> ± 131,6 | -32,8 <sup>a</sup> ± 0,8  |
| Sistema 9                     | 5230 <sup>a</sup> ± 208,1  | -11,2 <sup>a</sup> ± 0,3  | 968,1 <sup>b</sup> ± 133,3   | -10,6 <sup>a</sup> ± 0,4 | 1191 <sup>bc</sup> ± 139,6 | -10,3 <sup>a</sup> ± 0,3 | 1487 <sup>c</sup> ± 121,8   | -10,7 <sup>a</sup> ± 0,3  | 1037 <sup>b</sup> ± 99,5    | -9,5 <sup>b</sup> ± 0,6   | 1284 <sup>bc</sup> ± 126,7 | -13,1 <sup>c</sup> ± 0,3  |
| Sistema 10                    | 4575 <sup>a</sup> ± 115,7  | -10,4 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 5455 <sup>b</sup> ± 538,6    | -9,7 <sup>bc</sup> ± 0,2 | 1239 <sup>c</sup> ± 119,4  | -10,8 <sup>a</sup> ± 0,4 | 1235 <sup>c</sup> ± 108,9   | -10,2 <sup>ab</sup> ± 0,2 | 1080 <sup>c</sup> ± 158,6   | -9,8 <sup>bc</sup> ± 0,2  | 1201 <sup>c</sup> ± 192,7  | -9,3 <sup>c</sup> ± 0,3   |
| Sistema 11                    | 5181 <sup>a</sup> ± 285,5  | -10,4 <sup>a</sup> ± 0,3  | 4789 <sup>a</sup> ± 450,9    | -10,4 <sup>a</sup> ± 0,1 | 978,7 <sup>b</sup> ± 59,0  | -9,6 <sup>ab</sup> ± 0,3 | 1296 <sup>b</sup> ± 148,7   | -9,6 <sup>ab</sup> ± 0,5  | 1382 <sup>b</sup> ± 98,1    | -9,4 <sup>b</sup> ± 0,3   | 1590 <sup>b</sup> ± 119,8  | -9,3 <sup>b</sup> ± 0,1   |

Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade, no mesmo sistema.

O sistema 2, preparado em pH 6,5 e aquecimento térmico de 25 °C/20 min, apresentou estabilidade de partícula por 30 dias. Aos 60 dias, observou-se aumento do tamanho de partícula, indicando maior agregação entre as moléculas proteicas. Os outros sistemas preparados em pH 6,5 (sistemas 4, 6 e 8) apresentaram tamanhos de partícula estáveis por 60 dias. Por outro lado, esses sistemas mantiveram os valores de potencial  $\zeta$  estáveis por no máximo 20 dias. Isso indica que apesar de os sistemas conseguirem manter os tamanhos de partícula, as proteínas se associaram de maneira distinta ao longo do tempo, interferindo na carga eletrostática das estruturas supramoleculares. A capacidade que as estruturas supramoleculares apresentaram de modificar suas cargas eletrostáticas é especialmente importante para encapsulação de vitamina B<sub>2</sub>, que se liga às proteínas principalmente por interações eletrostáticas.

Os sistemas formados em pH 5,0 e tratamento térmico de 50 °C por 30 min (sistemas 9 a 11) não apresentaram estabilidade de tamanho de partícula. Nessas condições, as estruturas supramoleculares sofreram aumento do tamanho de partícula, mas mantiveram os valores do potencial  $\zeta$  estáveis por 60 dias.

Azevedo et al. (2014) também estudaram a encapsulação de vitamina B<sub>2</sub> em nanopartículas de alginato e quitosana e verificaram que esse sistema apresentou estabilidade de tamanho de partícula por cinco meses.

Na indústria de alimentos e farmacêutica existem restrições de utilização de compostos lipossolúveis, como a quercetina em formulações aquosas (Zhang et al., 2008), e de vitaminas, por serem pouco estáveis sob condições adversas de temperatura, oxigênio, luz e umidade (Azevedo et al., 2014). As estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP mostraram-se eficientes como sistemas carreadores desses compostos bioativos. As condições de síntese desses sistemas podem ser otimizadas para melhoria da encapsulação e estabilidade dessas estruturas, assim como para adequabilidade a cada tipo de produto.

**Tabela 5.** Estabilidade das estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP com vitamina B a  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  avaliada por diâmetro de partícula (nm) e potencial  $\zeta$  (mV).

| Tempo de armazenamento (dias) | 0                         |                           | 3                          |                           | 10                         |                           | 20                         |                            | 30                         |                          | 60                         |                          |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                               | Diâmetro (nm)             | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)    | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)     | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)   | Diâmetro (nm)              | Potencial $\zeta$ (mV)   |
| Sistema 1                     | 1264 <sup>a</sup> ± 167,2 | 11,8 <sup>a</sup> ± 0,3   | 1290 <sup>a</sup> ± 117,4  | 11,4 <sup>a</sup> ± 0,3   | 1191 <sup>a</sup> ± 69,4   | 11,5 <sup>a</sup> ± 0,5   | 1284 <sup>a</sup> ± 107,9  | 12,0 <sup>a</sup> ± 0,2    | 1212 <sup>a</sup> ± 124,4  | 11,1 <sup>a</sup> ± 0,2  | 1236 <sup>a</sup> ± 118,0  | 11,3 <sup>a</sup> ± 1,0  |
| Sistema 2                     | 371,8 <sup>a</sup> ± 17,3 | -39,3 <sup>a</sup> ± 1,4  | 331,7 <sup>a</sup> ± 22,0  | -38,9 <sup>a</sup> ± 2,2  | 308,9 <sup>a</sup> ± 20,8  | -35,4 <sup>ab</sup> ± 0,5 | 305,6 <sup>a</sup> ± 39,4  | -32,2 <sup>b</sup> ± 2,8   | 352,6 <sup>a</sup> ± 16,8  | -26,2 <sup>c</sup> ± 2,1 | 883,5 <sup>b</sup> ± 74,1  | -8,0 <sup>d</sup> ± 0,1  |
| Sistema 3                     | 1041 <sup>a</sup> ± 108,8 | 11,2 <sup>a</sup> ± 0,7   | 1172 <sup>ab</sup> ± 96,8  | 11,4 <sup>a</sup> ± 0,9   | 1208 <sup>ab</sup> ± 93,1  | 10,7 <sup>a</sup> ± 0,5   | 1331 <sup>bc</sup> ± 41,4  | 10,9 <sup>a</sup> ± 0,6    | 1595 <sup>c</sup> ± 139,1  | 10,2 <sup>a</sup> ± 1,0  | 1402 <sup>bc</sup> ± 99,1  | 10,4 <sup>a</sup> ± 0,4  |
| Sistema 4                     | 285,3 <sup>a</sup> ± 34,7 | -41,8 <sup>a</sup> ± 0,3  | 305,0 <sup>ab</sup> ± 16,8 | -39,1 <sup>ab</sup> ± 2,8 | 386,8 <sup>b</sup> ± 39,2  | -34,0 <sup>bc</sup> ± 2,2 | 295,7 <sup>a</sup> ± 34,8  | -38,0 <sup>abc</sup> ± 2,1 | 372,1 <sup>ab</sup> ± 38,2 | -32,4 <sup>c</sup> ± 2,4 | 286,8 <sup>a</sup> ± 23,1  | -20,9 <sup>d</sup> ± 3,0 |
| Sistema 5                     | 998,9 <sup>a</sup> ± 95,8 | 12,9 <sup>a</sup> ± 0,5   | 974,4 <sup>ab</sup> ± 34,6 | 13,1 <sup>a</sup> ± 0,4   | 1126 <sup>b</sup> ± 124,8  | 13,3 <sup>a</sup> ± 0,1   | 881,8 <sup>ab</sup> ± 87,0 | 13,1 <sup>a</sup> ± 0,3    | 1072 <sup>ab</sup> ± 92,1  | 12,8 <sup>a</sup> ± 0,0  | 939,7 <sup>ab</sup> ± 50,2 | 13,1 <sup>a</sup> ± 0,2  |
| Sistema 6                     | 276,4 <sup>a</sup> ± 12,9 | -32,1 <sup>ac</sup> ± 0,7 | 238,3 <sup>a</sup> ± 76,2  | -39,3 <sup>b</sup> ± 1,3  | 373,3 <sup>a</sup> ± 48,3  | -36,2 <sup>ab</sup> ± 2,2 | 262,4 <sup>a</sup> ± 27,2  | -33,1 <sup>ac</sup> ± 1,9  | 355,6 <sup>a</sup> ± 21,1  | -23,4 <sup>d</sup> ± 2,1 | 366,2 <sup>a</sup> ± 78,2  | -29,9 <sup>c</sup> ± 1,6 |
| Sistema 7                     | 1219 <sup>a</sup> ± 109,4 | 14,3 <sup>a</sup> ± 0,1   | 1038 <sup>a</sup> ± 46,3   | 14,5 <sup>a</sup> ± 0,3   | 1124 <sup>a</sup> ± 81,5   | 14,6 <sup>a</sup> ± 0,1   | 1226 <sup>a</sup> ± 106,6  | 14,4 <sup>a</sup> ± 0,4    | 1105 <sup>a</sup> ± 98,7   | 15,2 <sup>b</sup> ± 0,0  | 1113 <sup>a</sup> ± 94,4   | 14,8 <sup>ab</sup> ± 0,1 |
| Sistema 8                     | 230,7 <sup>a</sup> ± 80,8 | -34,8 <sup>a</sup> ± 0,9  | 190,9 <sup>a</sup> ± 15,7  | -37,4 <sup>a</sup> ± 1,5  | 250,3 <sup>a</sup> ± 21,3  | -37,9 <sup>a</sup> ± 2,5  | 208,0 <sup>a</sup> ± 32,6  | -29,3 <sup>b</sup> ± 2,8   | 222,6 <sup>a</sup> ± 28,2  | -23,7 <sup>c</sup> ± 0,7 | 245,0 <sup>a</sup> ± 27,6  | -16,1 <sup>c</sup> ± 0,6 |
| Sistema 9                     | 740,2 <sup>a</sup> ± 34,3 | -12,9 <sup>a</sup> ± 0,7  | 1083 <sup>b</sup> ± 67,5   | -12,1 <sup>a</sup> ± 0,3  | 1297 <sup>bc</sup> ± 109,2 | -12,2 <sup>a</sup> ± 0,2  | 1431 <sup>c</sup> ± 118,6  | -12,4 <sup>a</sup> ± 0,1   | 1203 <sup>b</sup> ± 70,6   | -12,8 <sup>a</sup> ± 0,5 | 1371 <sup>c</sup> ± 72,4   | -12,1 <sup>a</sup> ± 0,3 |
| Sistema 10                    | 847,5 <sup>a</sup> ± 20,5 | -11,8 <sup>a</sup> ± 0,3  | 1121 <sup>b</sup> ± 102,1  | -12,6 <sup>a</sup> ± 0,1  | 1149 <sup>bc</sup> ± 81,6  | -12,2 <sup>a</sup> ± 0,3  | 1322 <sup>bc</sup> ± 59,8  | -12,4 <sup>a</sup> ± 0,2   | 1230 <sup>bc</sup> ± 70,6  | -12,6 <sup>a</sup> ± 0,3 | 1331 <sup>c</sup> ± 70,4   | -12,9 <sup>a</sup> ± 0,9 |
| Sistema 11                    | 878,6 <sup>a</sup> ± 34,8 | -12,1 <sup>a</sup> ± 0,5  | 670 <sup>b</sup> ± 58,8    | -12,4 <sup>a</sup> ± 0,1  | 1316 <sup>c</sup> ± 97,6   | -12,6 <sup>a</sup> ± 0,6  | 1339 <sup>c</sup> ± 96,4   | -12,7 <sup>a</sup> ± 0,2   | 1309 <sup>c</sup> ± 70,6   | -12,6 <sup>a</sup> ± 0,3 | 1352 <sup>c</sup> ± 70,4   | -12,8 <sup>a</sup> ± 0,2 |

Médias indicadas pela mesma letra não diferem entre si a 5 % de probabilidade, no mesmo sistema.

#### **4. Conclusão**

Neste trabalho, estruturas supramoleculares formadas por  $\alpha$ -la e GMP, carreadoras de quercetina e vitamina B<sub>2</sub>, foram preparadas pelo método de autoassociação proteica, variando-se pH, temperatura e tempo de aquecimento. A interação entre os componentes bioativos, quercetina e vitamina B<sub>2</sub>, e as estruturas supramoleculares ocorreu com sucesso.

A quercetina, composto lipossolúvel, apresentou altos valores para eficiência de encapsulação e capacidade de ligação, comprovando que o carregamento dessa substância ocorre eficientemente em todas as condições de tratamento testadas. As estruturas supramoleculares também apresentaram capacidade em carrear a vitamina B<sub>2</sub>, composto hidrossolúvel, porém com valores de eficiência de encapsulação e capacidade de ligação menores. Isso indica que, nas estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP, existem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em maior quantidade do que resíduos de aminoácidos carregados, uma vez que a principal interação da quercetina é do tipo hidrofóbica e da vitamina B<sub>2</sub> é do tipo eletrostática. Os sistemas de estruturas supramoleculares carreadores de quercetina ou vitamina B<sub>2</sub> podem ser estáveis por 60 dias, em relação aos valores de tamanho de partícula e potencial  $\zeta$ .

Os resultados obtidos neste estudo podem ser úteis para desenvolvimento de sistemas efetivos na encapsulação de substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis em formulações alimentícias ou farmacêuticas, contribuindo para sua disponibilidade. Esse tipo de produto é importante porque geralmente os compostos bioativos, como flavonoides e vitaminas, são muito sensíveis a condições adversas de temperatura, luz e oxigênio. Além disso, as estruturas supramoleculares carreadoras foram desenvolvidas a partir de proteínas de grau alimentício, com alto valor nutricional, e utilizando método de preparação simples, sem reagentes químicos tóxicos. Dessa maneira, as estruturas supramoleculares de  $\alpha$ -la e GMP podem ser utilizadas para carrear e proteger compostos bioativos, aumentando a funcionalidade e o valor nutricional, sem adicionar altos custos ao produto.

#### **Agradecimentos**

Este estudo teve o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPEMIG. Os autores agradecem a Professora Dra. Nilda de Fátima Ferreira Soares e o Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa pelo uso do equipamento Zetasizer Nano ZS.



## Referências

- ABAE, A.; MADADLOU, A. Niosome-loaded cold-set whey protein hydrogels. **Food Chemistry**, v. 196, 106–113, 2016.
- AZEVEDO, M. A.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; CERQUEIRA, M. C. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B<sub>2</sub>. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, 141-146, 2014.
- BURGESS, C.; O'CONNELL-MOTHERWAY, M.; SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J.; VAN SINDEREN, D. Riboflavin Production in *Lactococcus lactis*: Potential for In Situ Production of Vitamin-Enriched Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, 5769-5777, 2004.
- CHEN, F-P.; LI, B-S.; TANG, C-H. Nanocomplexation of soy protein isolate with curcumin: Influence of ultrasonic treatment. **Food Research International**, v. 75, 157–165, 2015.
- CHEN, L.; HÉBRARD, G.; BEYSSAC, E.; DENIS, S.; SUBIRADE, M. In vitro study of the release properties of soy–zein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 9861–9867, 2010.
- DE BRITTO, D.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; ASSIS, O. B. G. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, 487–493, 2012.
- DE SOUZA, A. C. S.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavin: a multifunctional vitamin. **Química Nova**, v. 28, 887-891, 2005.
- DE WIT, J.N. Thermal-stability and functionality of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 73, 3602–3612, 1990.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25–39, 2003.
- DINIZ, R. S.; COIMBRA, J. S. R.; DE CARVALHO TEIXEIRA, A. V. N.; DA COSTA, A. R.; SANTOS, I. J. B.; BRESSAN, G. C.; DA CRUZ RODRIGUES, A. M.; DA SILVA, L. H. M. Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures. **Food Research International**, v. 64, 157-165, 2014.
- HA, H-K.; KIM, J. W.; LEE, M-R.; LEE, W-J. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/ $\beta$ -lactoglobulin nanoparticle. **Food Research International**, v. 52, 82–90, 2013.
- HAFNER, A.; LOVRIC, J.; VOINOVICH, D.; FILIPOVIC-GRCICA, J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, 205–213, 2009.

HASANVANDA, E.; FATHIB, M.; BASSIRIC, A.; JAVANMARDA, M.; ABBASZADEH, R. Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, 264–277, 2015.

KUMAR, V. D.; VERMA, P. R. P.; SINGH, S. K. Development and evaluation of biodegradable polymeric nanoparticles for the effective delivery of quercetin using a quality by design approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, 330-338, 2015.

KURUKJI, D.; NORTON, I.; SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 53, 249-260, 2016.

LI, W.; LI, S.; WYMAN, I. W.; MACARTNEY, D. H.; ZHANG, Q.; ZHENG, Y.; WANG, R. Supramolecular Encapsulation of Vitamin B6 by Macrocyclic Nanocontainer Cucurbit[7]uril. **Journal of Nanomaterials**. v. 2015, Article ID 574013.

LI, H.; ZHAO, X.; MA, Y.; ZHAI, G.; LI, L.; LOU, H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, 238–244, 2009.

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

LIU, W.; CHEN, X. D.; CHENG, Z.; SELOMULY, C. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. **Journal of Food Engineering**, v.169, 189-195, 2016.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, 836–843, 2012.

NATARAJAN, V.; KRITHICA, N.; MADHAN, B.; SEHGAL, P. K. Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, 195–205, 2011.

O'NEILL, G. J.; EGAN, T.; JACQUIER, J. C.; L O'SULLIVAN, M.; O'RIORDAN, E. D. Whey microbeads as a matrix for the encapsulation and immobilisation of riboflavin and peptides. **Food Chemistry**, v. 160, 46–52, 2014.

POOL, H., QUINTANAR, D., FIGUEROA, J. D., MANO, C. M., BECHARA, J. E. H., GODINEZ, L. A. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 124580.

RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; RODRIGUES, R.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; MALCATA, F. X. Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. **Food Research International**, v. 66, 344–355, 2014.

SALVATORE, D.; CROGUENNEC, T.; BOUHALLAB, S.; FORGE, V.; NICOLAI, T. Kinetics and Structure during Self-Assembly of Oppositely Charged Proteins in Aqueous Solution. **Bio-macromolecules**, v. 12, 1920–1926, 2011.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

SILVA, M. S.; COCENZA, D. S.; GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; TONELLO, P. S.; DE OLIVEIRA, L. C.; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, 366–374, 2011.

SOUZA, M. P.; VAZ A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G. Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, 1149–1159, 2014.

WANG, Y.; WANG, X. Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles. **Food Chemistry**, v. 188, 24–29, 2015.

WICHCHUKIT, S.; OZTOP, M. H.; MCCARTHY, M. J.; MCCARTHY, K. L. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. **Food Hydrocolloids**, v. 33, 66-73, 2013.

ZHANG, Y.; YANG, Y.; TANG, K.; HU, X.; ZOU, G. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, 891–897, 2008.

## CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho avaliou a formação e caracterização de estruturas supramoleculares das proteínas do soro de leite  $\alpha$ -la e GMP, nas escalas nano e micrométricas, e suas propriedades técnico-funcionais como agentes de formação e estabilizantes de espuma e emulsões, assim como sua capacidade em carrear os compostos bioativos. O desenvolvimento de estruturas supramoleculares de proteínas do soro de leite é vantajoso por utilizar matéria-prima de baixo custo e de fácil acesso, já que é derivada da produção de queijo. Além disso, as proteínas do soro, por possuírem alto valor nutricional e serem reconhecidas como GRAS, auxiliam na utilização e aceitação dessas estruturas supramoleculares em produtos alimentícios ou farmacêuticos. O método de preparação utilizado é um método simples, de baixo custo, livre de toxicidade, e que exige apenas a modificação das variáveis pH, temperatura e tempo de aquecimento, não sendo necessária a utilização de reagentes e equipamentos sofisticados. Os resultados mostraram que as estruturas supramoleculares apresentaram características distintas nas diferentes condições testadas. Isso demonstra que é possível controlar as propriedades das estruturas ao se modificar as variáveis pH, temperatura e tempo de aquecimento. Dessa forma, pode-se ajustar esses materiais às aplicações de interesse. As estruturas supramoleculares foram eficientes em diminuir a tensão superficial, demonstrando ser úteis na estabilização de emulsões e produtos com espuma. Materiais que sejam capazes de encapsular e realizar liberação controlada de compostos bioativos têm sido alvo de interesse das indústrias de alimentos e farmacêutica. Muitas vezes esses componentes bioativos são instáveis nas condições de processamento e armazenamento dos produtos. As estruturas supramoleculares foram capazes de carrear a quercetina, composto bioativo lipossolúvel, e a vitamina B<sub>2</sub>, composto bioativo hidrossolúvel. A eficiência de encapsulação da quercetina teve como valor máximo 98,64%, e a vitamina B<sub>2</sub>, 31,11%. Isso demonstra que as estruturas supramoleculares formadas apresentam sítios de ligação hidrofóbicos em maior quantidade ou mais acessíveis. A capacidade de carrear compostos bioativos faz com que as estruturas supramoleculares sejam de grande utilidade para a indústria de alimentos, que acompanha nos últimos anos o interesse crescente dos consumidores por alimentos funcionais, que promovam ou melhorem a saúde.

## **APÊNDICE A – Atividades desenvolvidas durante o doutorado**

O doutorado teve início no primeiro semestre de 2012. Durante esse tempo, a Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) participaram do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD). Esse programa promoveu a interação científica entre as duas instituições, sendo possível o aprendizado de metodologias e protocolos importantes para o desenvolvimento das atividades do projeto de doutorado.

Pelo PROCAD, um estudo sobre dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos foi desenvolvido. Esse tipo de sistema é importante por fornecer alternativa para separação de biocompostos sensíveis, aplicando-se uma técnica de baixo custo, em que o componente principal é a água. Este trabalho deu origem à publicação “Measurements and Modeling of Liquid–Liquid Equilibrium of Polyethylene Glycol 400, Sodium Phosphate, or Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems at (298.2, 308.2, and 318.2) K” ([dx.doi.org/10.1021/je400190f](https://doi.org/10.1021/je400190f)) no *Journal of Chemical & Engineering Data*.

Foi implantada metodologia para quantificação de terc butil hidroquinona (TBHQ), que é um antioxidante utilizado em óleos vegetais. Essa metodologia utiliza Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e foi desenvolvida no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI) da UFPA, coordenado pelos professores Luiza Helena Meller da Silva e Antonio Manuel da Cruz Rodrigues.

Pelas atividades do projeto de doutorado, publicou-se o artigo “Production, characterization and foamability of  $\alpha$ -lactalbumin/glycomacropeptide supramolecular structures” (doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.079) no *Food Research International*. As análises realizadas no doutorado deram origem a mais dois manuscritos, submetidos no ano de 2016.