

Comportamento da β -caseína na interface água-óleo de emulsões alimentares

Clarice Navarro Barros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título Mestre em Saúde Pública.

**Área de concentração: Nutrição
Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas**

**São Paulo
2004**



“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura, um encontro.”

(Fernando Pessoa)

“Há dois legados de valor que podemos transmitir a nossos filhos: um, raízes; outro, asas.”

(Hodding Carter)

**Dedico este trabalho aos meus filhos,
André e Bruno, ao meu esposo Francisco e à minha mãe.**

Agradecimentos

Ao meu orientador professor José Alfredo que acreditou e apoiou-me, prestando inestimável auxílio em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

À professora Elizabeth Gomes Arêas e sua aluna de Iniciação Científica, Eliane Figueiredo, que contribuíram de maneira muito valiosa na construção das emulsões utilizadas, sem as quais esse trabalho não poderia ser escrito.

Às colegas Ana Carolina C., Ana Carolina G., Andrea Guerra, Carla Corrales, Marta, Raquel C., Rosana, Rosanilda, Simone, Vanessa, Thaís, Oriana pelo carinho e amizade em todos os momentos difíceis, sempre incentivando-me a prosseguir.

Aos técnicos de laboratório José Pereira e Rosana pela colaboração de ordem prática.

À grande amiga Sandra, técnica do laboratório no início do meu trabalho prático, pela participação tão especial, por sua ajuda e solidariedade, principalmente nas determinações por eletroforese.

Às professoras Elizabeth Torres e Elizabeth Machado, do Depto. de Nutrição, por suas sugestões e orientações na fase inicial do projeto.

Aos funcionários do departamento de Nutrição.

Aos meus irmãos Mônica e Toninho pelo apoio moral e auxílio na edição do trabalho.

Ao meu eterno Pai, que todas as vezes que eu, desanimada, entendia que seria melhor desistir, me mostrava novas possibilidades que me impulsionavam a prosseguir. Muito obrigada meu Deus!

Resumo: COMPORTAMENTO DA β -CASEÍNA NA INTERFACE ÁGUA-ÓLEO DE EMULSÕES ALIMENTARES

Entende-se que, no futuro, a Tecnologia de Alimentos, no aperfeiçoamento de produtos alimentícios mais sofisticados, deverá orientar-se segundo duas direções: a elaboração de produtos mais atrativos e convenientes e ao mesmo tempo mais nutritivos e com apelo funcional. Assim, o desenvolvimento de processos tecnológicos deverá estar dirigido para a introdução de novas matérias-primas, para o aproveitamento de subprodutos e para a produção alimentos funcionais ou de alimentos mais nutritivos e atraentes, que possam ser utilizados por grande parte da população mundial e ter impacto na Saúde Pública. O conhecimento dos determinantes da estruturação de alimentos, da forma como ingredientes funcionais colaboram na formação da estrutura supramolecular e a relação entre percepção da textura e a estrutura do alimento é fundamental para que se produzam alimentos de texturas adequadas a programas de intervenção nutricional.

A β -caseína é um importante ingrediente funcional capaz de emulsionar grande volume de óleo e conferir estrutura estável a uma série de produtos alimentícios. Neste trabalho investigamos por RMN de ^1H a dinâmica da β -caseína na interface óleo-água de emulsões. Primeiramente a β -caseína foi purificada por FPLC (Fast Polymer Liquid Chromatography): a pureza da preparação foi

controlada por SDS-PAGE e a proteína purificada foi então usada para produzir emulsões. Um sistema modelo constituído por β -caseína, água e decano foi empregado, com substituição de cada componente por seu derivado deuterado. Desse modo, a principal fonte de próton poderia estar sempre identificada, permitindo estimar a contribuição de cada componente para os espectros obtidos. O tempo de relaxação (T_2) das emulsões e dos seus componentes puros foi determinado pela seqüência de pulsos CPMG e a análise dos dados mostrou um sistema multiexponencial. Foram detectadas três principais populações de prótons, representando mobilidades moleculares muito menores que as dos componentes puros isolados. Pode-se dizer, analisando os resultados obtidos, que as emulsões restringiram a mobilidade molecular da água, lipídeo e proteína. A água, decano e β -caseína livres foram detectados nos sistemas emulsificados em quantidades muito pequenas.

Summary: β -CASEIN BEHAVIOR AT THE WATER-OIL INTERFACE IN FOOD EMULSION

Food Technology in the future when dealing in designing more sophisticated foods will face two challenges: producing more attractive and convenient foods and preserving or enhancing their nutritive and functional values. Therefore, the development of new technological processes will be directed for introducing novel raw materials, thus resulting more nutritive and functional food that can be use by the population at large and impact Public Health. The knowledge of the way the supramolecular arrangements are built and structure is formed in the food processes, are of paramount importance for producing designed food with adequate structure and acceptability able to be used in malnutrition intervention programs.

In this work, we investigated, by ^1H NMR, the dynamics of β -casein emulsions. For preparing the emulsion in this study FPLC (Fast Polymer Liquid Chromatography) purified β -casein was used with the purity of the preparations was checked by SDS-PAGE. A model system constituted by β -casein, water and decane was employed with replacement of each component by its deuterated derivative. Therefore, the main proton source could always be assigned; and this approach allowed the estimation of the contribution of each component for the spectra recorded. Transverse relaxation times (T_2) of the emulsions were obtained by CPMG pulse sequence and the analysis has shown multicomponent spectra.

Three main proton populations were detected representing molecular motilities much lower than the individual pure component. It can be said from the results that the emulsions restrained the molecular mobility of water, lipid and protein. Free water, free decane and free β -casein were detected in the emulsified system in very low amounts.

ÍNDICE

Resumo.....
Summary.....
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Propriedades Funcionais.....	03
2.2 Emulsões.....	05
2.3 β -caseína.....	09
2.4 Ressonância Magnética Nuclear.....	14
3 OBJETIVOS GERAIS.....	25
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1 Separação e purificação da β -caseína por FPLC.....	27
5.2 Identificação das frações por eletroforese.....	28
5.3 Comportamento das emulsões por RMN.....	29
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1 Separação e purificação da β -caseína por FPLC.....	32
6.2 Identificação das frações por eletroforese.....	33
6.3 Comportamento das emulsões por RMN.....	36
7 CONCLUSÕES.....	62
8 BIBLIOGRAFIA BÁSICA.....	64
9 ANEXOS.....
9.1 Determinação de prótons contribuintes da β -caseína.....
9.2 Parâmetros de aquisição dos espectros.....

Índice de quadros, figuras e tabelas

Figura 1 - Seqüência de aminoácidos para β -caseína.....	11
Figura 2 - Estrutura tridimensional da β -caseína proposta por modelagem molecular.....	13
Tabela 1- Propriedades nucleares importantes em RMN para alguns nuclídeos	15
Figura 3 – Gráfico: Intensidade de sinal RMN x tempo de retardo τ_c	17
Figura 4 – Momento magnético nuclear no campo magnético B_0	18
Figura 5 – Experimentos para aquisição de T_1	19
Figura 6 – Experimentos para aquisição de T_2	20
Figura 7 – Uso de CPMG para aquisição de T_2	21
Figura 8 – Queda do eco com os sucessivos pulsos a 180°	22
Figura 9 – Decaimento da magnetização no tempo de relaxação T_2	23
Figura 10 – Dependência de T_1 e T_2 no tempo de correlação rotacional τ_c	23
Figura 11 – Perfil de eluição da β -caseína em Coluna Superdex 200 em FPLC.....	33
Figura 12 – Perfil eletroforético das frações de β -caseína.....	34
Figura 13 – Análise das bandas pelo software Gelscan 5.1.....	36
Tabela 2 – Amostras preparadas para Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	38
Figura 14 – Cálculo de T_2 utilizando uma exponencial.....	43
Figura 15 – Cálculo de T_2 utilizando duas exponenciais.....	44
Figura 16 – Cálculo de T_2 utilizando três exponenciais.....	45

Figura 17 – Distribuição de T_2 para decano, água e β -caseína corrigidos por NS e RG.....	46
Tabela 3– Tempo de relaxação em ms para água.....	46
Tabela 4 – Tempo de relaxação em ms para decano.....	47
Tabela 5 – Tempo de relaxação em ms para β -caseína em D_2O	48
Figura 18 – Distribuição de T_2 amostra 1 corrigidos por NS e RG.....	49
Tabela 6– Tempo de relaxação em ms para amostra 1.....	51
Figura 19 – Distribuição de T_2 amostra 2 corrigidos por NS e RG.....	52
Tabela 7– Tempo de relaxação em ms para amostra 2.....	54
Figura 20 – Distribuição de T_2 amostra 3 corrigidos por NS e RG.....	55
Tabela 8– Tempo de relaxação em ms para amostra 3.....	57
Figura 21 – Distribuição de T_2 amostra 4 corrigidos por NS e RG.....	57
Tabela 9– Tempo de relaxação em ms para amostra 4.....	58
Figura 22 – Distribuição de T_2 amostras 1, 2,3 e 4 corrigidos por NS, RG e prótons.....	59
Figura 23 – Distribuição de T_2 amostra 1, 2, 3 e 4 corrigidos por NS, RG e prótons.....	60

COMPORTAMENTO DA β -CASEÍNA NA INTERFACE ÁGUA-ÓLEO DE EMULSÕES

1 Introdução

A aceitação de produtos alimentares pelo consumidor está ligada de maneira bastante estreita à sua aparência e estrutura. Entender a relação entre percepção da textura e a estrutura do alimento é fundamental para que se produzam alimentos de texturas atrativas (WILKINSON e col. 2000).

Alguns autores defendem que a aceitabilidade no uso de uma substância como alimento depende de um conjunto de características detectadas pelos nossos órgãos do sentido como aparência, textura e “flavor”. Apesar do consumidor se influenciar muito por fatores nutricionais, há fortes determinantes no consumo de alimentos: o sabor, a aparência e o preço (GAVA 1999).

Entende-se que, no futuro, a Tecnologia de Alimentos, no aperfeiçoamento de produtos alimentícios mais sofisticados, deverá orientar-se segundo duas direções: a elaboração de produtos mais atrativos e convenientes e também mais nutritivos e com apelo funcional. Assim, o desenvolvimento de processos tecnológicos deverá estar dirigido para a introdução de novas matérias-primas, para aproveitamento de

subprodutos e produção de alimentos funcionais ou de alimentos mais nutritivos e atraentes, que possam ser utilizados por grande parte da população mundial (GAVA 1999).

Para isso é necessária uma abordagem multidisciplinar, combinando técnicas sensoriais, estudos de fisiologia e determinações físico-químicas de propriedades de alimentos (WILKINSON e col. 2000).

Neste contexto, o conhecimento das propriedades funcionais de ingredientes de alimentos é útil para obtenção de produtos de grande aceitação, já que elas influenciam o caráter sensorial do alimento, e serão determinantes de sua aceitabilidade (SGARBIERI 1998; BORDERÍAS e MONTEIRO 1988).

Nossa proposta foi analisar as propriedades da β -caseína, quando utilizada como emulsificante em sistemas alimentares, de modo a colaborar para o entendimento das mudanças que ocorrem durante o processamento de alimentos onde proteínas são utilizadas como emulsificantes, permitindo, assim, melhor controle da estrutura, manipulação e controle da textura (WILKINSON e col. 2000).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Propriedades Funcionais

Entende-se por propriedades funcionais aquelas não nutritivas, mas que conferem ao alimento melhoria na aparência de apresentação final e manuseio durante a fabricação (SGARBIERI 1998; BORDERÍAS e MONTEIRO 1988). As proteínas apresentam uma série de propriedades funcionais, que são bem conhecidas e relatadas, sendo por essa razão aproveitadas para aprimorar a produção de alimentos (FURTADO e col. 2001). Entre elas, destacam-se:

- **Solubilidade** – depende da estrutura da proteína, sua composição em aminoácidos, conformação e tamanho molecular (SGARBIERI 1998; LEHNINGER 1996);
- **Geleificação, viscosidade e textura** – dependem do balanço entre a afinidade das proteínas pela água e da capacidade de interação entre as macromoléculas (SGARBIERI 1998; REGENSTEIN 1984);

- **Formação de espuma e emulsificação** – são propriedades de superfície que dependem da formação de um filme de proteína contínuo, elástico, na interface água-óleo ou água-ar, para que o sistema bifásico e imiscível permaneça estável (SGARBIERI 1998).

Vários estudos têm sido conduzidos com diferentes tipos de proteínas, no sentido de melhorar ou ampliar seu uso como ingrediente, com a finalidade de conferir algum atributo funcional ao produto (HAQUE 1993).

Propriedades funcionais exercem importante papel na determinação das características principais do produto final, definindo seu uso. Dessa maneira, a proteína a ser utilizada deve ter suas características funcionais bem exploradas (FURTADO e col. 2001).

Tais propriedades podem ser estudadas em diferentes sistemas e, neste trabalho, será adotado um sistema modelo para análise das propriedades da β -caseína e seu comportamento em emulsões água-em-óleo.

2.2 Emulsões

Os alimentos industrializados, em grande parte, são produzidos de maneira que seus componentes formam em água sistemas aparentemente com uma única fase, que constituem dispersões coloidais.

Dentre essas, as dispersões do tipo líquido-líquido, as emulsões, são de grande importância e frequentemente observadas em alimentos de grande consumo. Os principais tipos de emulsões alimentares são chamadas óleo-em-água (ex.: leite, creme, massa de bolo, sorvete, mousse) e água-em-óleo (ex.: manteiga, margarina, maionese) (BOBBIO^a 1995).

Emulsões são misturas de aparência homogênea, onde os componentes, quase sempre dois líquidos, são imiscíveis. Um deles se encontra na forma de pequenas partículas que estão dispersas no segundo componente que está em uma fase contínua, o dispersante (CHEFTEL 1989).

Estas misturas tendem a se desestabilizar já que, na maior parte dos casos, é necessário um grande aporte de energia para dispersar as partículas. Para que isso não ocorra, prejudicando a aparência do produto ou alguma etapa de processamento, são empregados os emulsificantes, substâncias que apresentam propriedades interfaciais importantes, como a de manter agregadas as duas fases da

dispersão, impedindo o reagrupamento do material disperso (CHEFTEL 1989; ARÊAS e col. 1997).

Os emulsificantes possuem grupos lipofílicos e hidrofílicos, e quando adicionados à uma dispersão coloidal, provocam diminuição na tensão interfacial pela sua adsorção na interface da mistura, projetando seus grupos hidrofílicos e lipofílicos para a fase em que cada um apresenta maior afinidade. Com a diminuição da tensão superficial, pode ocorrer aumento da área de contato entre a fase aquosa e a lipídica, melhorando a agregação dos componentes do sistema (BOBBIO 1995).

A formação de agregados por moléculas anfifílicas, tais como tensoativos em meio aquoso é favorecida pelas interações hidrofóbicas, enquanto várias outras se opõem a isso, gerando o conceito de forças opostas que agem principalmente na região interfacial do agregado. A primeira força, o efeito hidrofóbico, tende a diminuir a área interfacial por molécula. A outra, o efeito hidrofílico, tende a aumentar essa área. No equilíbrio termodinâmico ocorre uma área superficial ótima onde a energia de interação por molécula anfifílica tende a zero (BRANDÃO 1999). As substâncias emulsificantes mais empregadas são compostas de moléculas consideradas anfifílicas, que consistem tipicamente de uma porção hidrofílica polar (iônica ou não iônica) chamada de cabeça polar, ligada a uma cauda hidrofóbica. Essas características opostas, presentes na mesma molécula, conduzem a um fenômeno de auto construção das moléculas em soluções aquosas diluídas, de

maneira a blindar a porção hidrofóbica do meio aquoso ao mesmo tempo que expõe a porção hidrofílica à água (BRANDÃO 1999).

As dispersões coloidais chamadas emulsões dependem da temperatura, pH, estrutura do agente emulsificante, diâmetro da gota da fase dispersa e da viscosidade da fase contínua. A estabilização estérica da camada emulsificante protege as finas gotas de emulsão contra coalescência imediata, conferindo estabilidade ao processamento e estocagem do produto (DICKINSON & STAINSBY 1982).

Ingredientes com características emulsificantes são de grande importância para obtenção de uma série de produtos industrializados, sendo destacada em nosso trabalho uma das proteínas mais importantes em emulsões alimentares.

Estudos de organização de moléculas com características emulsificantes são importantes tanto do ponto de vista teórico quanto prático, uma vez que seus mecanismos de atividade são influenciados pelo arranjo destas espécies químicas. O conhecimento e compreensão da dinâmica de substâncias tensoativas através de observações referentes ao comportamento de fase e estrutura destas substâncias tem sido de bastante interesse no meio científico (BRANDÃO 1999).

Emulsões são fluidos bastante complexos cuja estrutura não é rígida, mas bastante dinâmica, evoluindo com o tempo e influenciada por diversos fatores (BODEN 1994 e 1990). Os emulsificantes são ingredientes aplicados em diversos

tipos de formulações que interferem em propriedades físico-químicas relevantes do ponto de vista de armazenamento e utilização do produto (BRANDÃO 1999).

Existem duas classes de substâncias que apresentam forte tendência a serem adsorvidas na interface óleo/água em emulsões alimentares: proteínas e pequenas moléculas de surfactantes (DICKINSON & STAINSBY 1982).

A estabilidade das emulsões formadas depende:

- Da natureza química das moléculas estabilizadoras adsorvidas na superfície (FISHER & PARKER 1988);
- Do estado de agregação da proteína na fase aquosa (DICKINSON 1999);
- Da distribuição de proteínas e surfactantes entre as duas fases da emulsão (DICKINSON & COURTHAUDON 1991).

As proteínas, como a β -caseína, apresentam importante papel estabilizador, muito provavelmente por serem adsorvidas na interface (SRINIVASAN e col. 1999; FANG e DALGLEISH 1996).

Pelas razões apresentadas, o estudo do comportamento desse tipo de proteína é fundamental para que se possa entender e melhorar algumas interações ocorridas em processos de fabricação de alimentos, principalmente os que levam à formação e estabilização de emulsões.

2.3 β -caseína

As proteínas do leite, na forma solúvel e dispersa, apresentam excelentes propriedades emulsificantes (MORR 1982, FANG & DALGLEISH 1996).

As caseínas do grupo β apresentam a característica de associação-dissociação, cujo equilíbrio depende da concentração de proteína, da temperatura e do pH. Em temperaturas abaixo de 8°C ou a valores elevados de pH, a β -caseína se apresenta como monômero. A temperaturas mais elevadas e pH neutro a β -caseína forma micelas gigantes em forma de rosário (CHEFTEL 1989).

Diversos estudos mostram que a β -caseína é uma proteína que possui perfil bastante adequado para emulsionar ingredientes de polaridades diferentes com muita eficiência. Faz parte do grupo das caseínas, que são uma família de fosfoproteínas produzidas nas glândulas mamárias, em resposta aos hormônios lactogênicos e outros estímulos. São secretadas como grandes agregados coloidais com a estrutura de grandes micelas, que são responsáveis por muitas das propriedades físicas únicas do leite (GINGER e GRIGOR 1999).

As caseínas correspondem a cerca de 76% das proteínas do leite bovino, sendo divididas em α_{s1} , α_{s2} , β e κ - caseínas. São proteínas de baixa solubilidade em pH 4,6, e possuem resíduos de serina esterificados por grupos fosfato. Estes

grupos fosfatos são importantes para as propriedades interfaciais das caseínas e para a formação de micelas de caseína (SWAISGOOD 1993; MURPHY e FOX 1991).

Suas estruturas terciárias ainda não foram determinadas, uma vez que, devido suas características anfífilas, é impossível cristalizá-las para a difração de raios-X e seu peso molecular excede o limite de resolução das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear. Os modelos empregados até o presente são empíricos, baseados nas poucas informações estruturais disponíveis.

Das estruturas citadas, a β -caseína é muito anfífila e age como surfactante. Sabe-se que é menos sensível à precipitação com cálcio e, pura em solução, forma agregados extensos (SINGH e col. 1993; SRINIVASAN e col. 1999).

A α_{s1} caseína apresenta seqüência de aminoácidos bastante parecida com a β -caseína, mas a distribuição de cargas ao longo da cadeia é muito diferente (CASANOVA & DICKINSON 1998).

A altamente anfífila β -caseína é conhecida por formar agregados tipo micelas determinadas termodinamicamente e por força de interações hidrofóbicas em processo endotérmico reversível. Medidas reológicas, realizadas em emulsões preparadas em idênticas condições de homogeneização, indicam que há forte tendência da β -caseína acumular predominantemente na interface óleo/água quando em quantidades relativamente pequenas (CASANOVA & DICKINSON 1998).

A β -caseína é constituída de 209 resíduos de aminoácidos, com PM de 23980 daltons aproximadamente (Fig.1).

ARG GLU LEU GLU GLU LEU ASN VAL **PRO** GLY GLU ILE VAL
 GLU **SEP** LEU **SEP SEP SEP** GLU GLU SER ILE THR ARG ILE
 ASN LYS LYS ILE GLU LYS PHE GLN **SEP** GLU GLU GLN GLN
 GLN THR GLU ASP GLU LEU GLN ASP LYS ILE HIS **PRO** PHE
 ALA GLN THR GLN SER LEU VAL TYR **PRO** PHE **PRO** GLY **PRO**
 ILE **PRO** ASN SER LEU **PRO** GLN ASN ILE **PRO PRO** LEU THR
 GLN THR **PRO** VAL VAL VAL **PRO PRO** PHE LEU GLN **PRO** GLU
 VAL MET GLY VAL SER LYS VAL LYS GLU ALA MET ALA **PRO**
 LYS HIS LYS GLU MET **PRO** PHE **PRO** LIS TYR **PRO** VAL GLN
PRO PHE THR GLU SER GLN SER LEU THR LEU THR ASP VAL
 GLU ASN LEU HIS LEU **PRO PRO** LEU LEU LEU GLN SER TRP
 MET HIS GLN **PRO** HIS GLN **PRO** LEU **PRO PRO** THR VAL MET
 PHE **PRO PRO** GLN SER VAL LEU SER LEU SER GLN SER LYS
 VAL LEU **PRO** VAL **PRO** GLU LYS ALA VAL **PRO** TYR **PRO** GLN
 ARG ASP MET **PRO** ILE GLN ALA PHE LEU LEU TYR GLN GLN
PRO VAL LEU GLY **PRO** VAL ARG GLY **PRO** PHE **PRO** ILE ILE
 VAL

Figura 1 - Seqüência de aminoácidos para a β -caseína.

Fonte: Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. **Proteínas Alimentarias**. Acribia, 1989. pág. 192

A distribuição aleatória de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos faz a molécula substancialmente anfifílica. A β -caseína forma micelas em solução aquosa com concentração crítica de micela muito baixa (menor que 0,1% a 20°C) (CASANOVA & DICKINSON 1998).

A notável seqüência de aminoácidos revela um segmento N-terminal (1-42) com elevada densidade de carga e bastante hidrofílico com quatro radicais fosfato

esterificando resíduos de serina no segmento (15-19) e um quinto radical no resíduo 35 (CHEFTEL 1989, DICKINSON, ROLFE & DALGLEISH 1988).

O restante do polipeptídeo é fortemente hidrofóbico, contendo elevada concentração de prolinas, 35 resíduos ao longo da cadeia. Apesar destes resíduos de prolina potencialmente inibirem a formação de estrutura secundária (LEHNINGER 1996), foram detectadas de 6-14% de estruturas α -hélice e 20-23% de folhas β na β -caseína, determinadas por Espectroscopia Raman, Infravermelho e dicroísmo circular (KUMOSINSKI e col. 1993).

De maneira simplificada, vários autores sugerem que a conformação molecular predominante para β -caseína adsorvida na superfície simples é uma longa cauda com N-terminal estendendo-se através da solução aquosa. A interação potencial entre as camadas de β -caseína é intensa em qualquer situação de força iônica presente, consistente com a boa combinação estérica e eletrostática da β -caseína nas gotas de emulsão (DICKINSON 1999).

Uma estrutura distendida foi proposta por KUMOSINSKI e col. (1993), que combinava os teores de estrutura secundária, observados experimentalmente, com o modelo de um polímero distendido, usado para explicar as propriedades desta proteína. Em 2001, CASSIANO e ARÊAS mostraram por modelagem molecular que essa estrutura distendida era instável em meio aquoso, evoluindo em pouco

tempo para uma forma enovelada, que se compactava ainda mais quando a β -caseína entrava no meio lipídico (fig.2). Essa estrutura molecular, mesmo compacta, foi capaz de explicar a maioria dos dados experimentais descritos na literatura (MURPHY e FOX 1991; DICKINSON 1994) e respondia pelas propriedades anfífilas desta proteína. A presença dos resíduos serina fosforilados foi demonstrada como essencial para as propriedades interfaciais observadas, tanto em trabalhos experimentais (SOOD & SLATTERY 2000), como por modelagem molecular (CASSIANO e ARÊAS 2003).

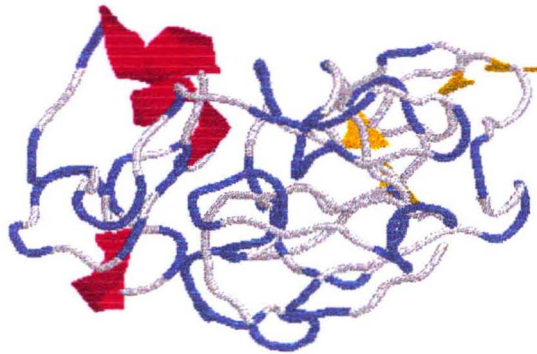


Figura 2 – Estrutura tridimensional da β -caseína proposta por modelagem molecular.

Fonte: Cassiano & Arêas, 2001.

Em trabalhos de DICKINSON (1989) foi verificado que o preparo de emulsões com caseínas puras promove formação de sistemas óleo-em-água bastante estáveis. Verificou-se que a existência de resíduos de fosfoserinas e a alta proporção de resíduos apolares disponíveis induz a alta adsorção da β -caseína em superfícies hidrofóbicas em associação com a região hidrofílica do sistema.

Durante a emulsificação, as moléculas de caseínas e agregados se encontram fortemente associados na superfície da emulsão. A β -caseína apresenta elevada tensão interfacial, o que faz com que, no equilíbrio, a energia livre seja significativamente pequena e induza à adsorção em sistemas de dupla polaridade (DICKINSON, ROLFE & DALGLEISH 1988).

2.4 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método rápido e eficaz para elucidação de estrutura molecular que não só define tipos de núcleos presentes na molécula orgânica como também descreve a sua mobilidade, o ambiente químico individual e a maneira como estão interligados (HORE 1996). Ressonância Magnética Nuclear é uma ferramenta analítica que tem longa história de uso em investigação de atividade de água em amostras de alimentos e em análise de óleos e

gorduras (BEEK e col. 1996). Por ser uma técnica não destrutiva, RMN é interessante para investigar a relação entre estrutura e aceitação porque permite que a mesma amostra seja utilizada para várias medidas em RMN e posterior análise sensorial (ROBERTSON e col. 1992).

A ressonância magnética acontece basicamente quando um núcleo que possui número quântico de spin I diferente de zero é submetido a um campo magnético externo e se orienta. Nem todos os núcleos apresentam essa propriedade chamada spin. Alguns desses núcleos que se orientam em campo magnético são apresentados na Tabela 1:

Tabela 1 – Propriedades nucleares importantes em RMN para alguns núclídeos

Núcleo	Prótons desemparelhados	Nêutrons desemparelhados	Spin líquido	γ (MHz/T)
^1H	1	0	1/2	42.58
^2H	1	1	1	6.54
^{31}P	1	0	1/2	17.24
^{14}N	1	1	1	3.08
^{13}C	0	1	1/2	10.71
^{19}F	1	0	1/2	40.06

Fonte: Adaptado de GÜNTHER 1998, pág.11.

Tais núcleos são capazes de absorver energia do espectro eletromagnético, na região de rádio frequência. A frequência (ν_0) que determinado núcleo absorve

depende do tipo de núcleo (razão giromagnética γ) e intensidade do campo magnético (B_0) no qual é colocado, descrito pela equação abaixo (HORE 1996):

$$\nu_0 = \gamma \cdot B_0 / 2\pi$$

ou

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

Quando irradiada por uma correta rádiofreqüência, uma pequena população de prótons tem sua absorção de energia líquida aumentada. A energia absorvida é subsequentemente perdida para o meio, após certo período de tempo. Esse processo é característico e o tempo necessário para essa perda de energia é denominado tempo de relaxação spin-rede T_1 , que é o tempo necessário para o sistema de rádio freqüência voltar ao estado de equilíbrio (zero) depois de aplicado um pulso de RF. Este tempo de relaxação está relacionado com a mobilidade molecular.

Os espectrômetros modernos permitem a elaboração de seqüências de pulsos tais que várias informações dinâmicas podem ser obtidas dos sistemas. Assim, o tempo de relaxação spin-rede (T_1) é obtido pela seqüência denominada "inversion recovery", que consiste na inversão e recuperação do sinal de RMN.

Essa seqüência de pulsos consiste num pulso de 180° , que inverte a magnetização de equilíbrio, seguido de um retardo variável e um pulso de leitura de 90° .

180° - Delay - 90° - leitura

Uma lista de tempos de retardo (delay = τ) é utilizada de modo a termos sinais negativos que se recuperam exponencialmente até o valor de equilíbrio, passando pelo zero (figs. 3 e 6).

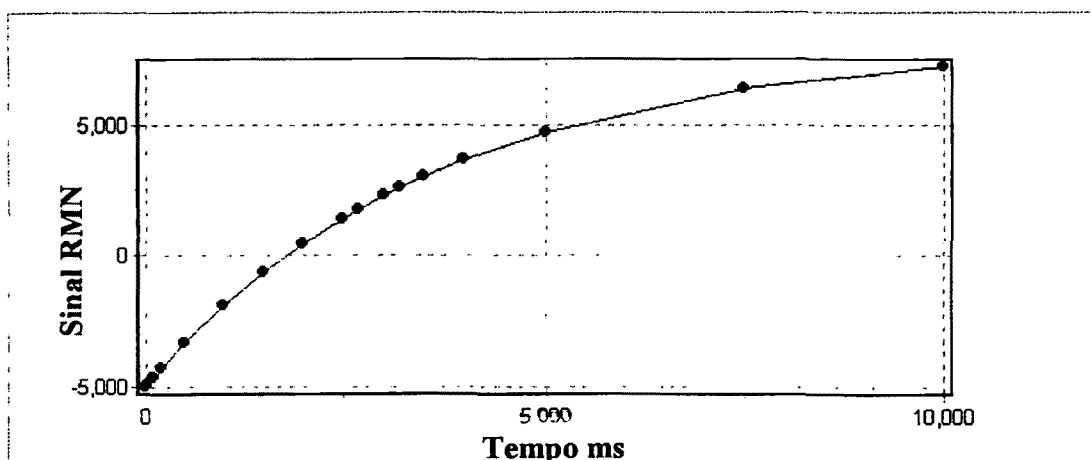


Figura 3. Gráfico: Intensidade de sinal RMN x tempo de retardo τ para água pura em espectrômetro Maran Ultra (Rinstruments, UK) a 23 MHz de frequência de prótons.

A equação que descreve essa recuperação pode ser escrita como:

$$M = M_0 - 2M_0 \cdot e^{-\tau/T_1}, \text{ onde:}$$

M = intensidade do sinal de magnetização a cada τ

M_0 = intensidade do sinal em equilíbrio

τ = retardo entre os pulsos de 180° e 90°

T_1 = constante de relaxação spin-rede

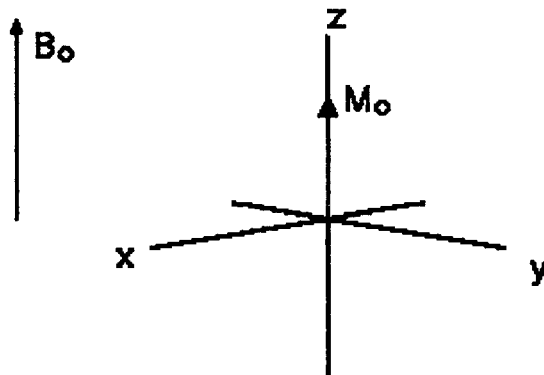


Figura 4. Momento magnético nuclear no campo magnético B_0 .

Fonte: Adaptado de GÜNTHER 1998, pág.03.

Assim, T_1 pode ser obtido com uma seqüência de pulsos e ajuste dos dados de intensidade de magnetização obtidos na equação (HORE 1996; GÜNTHER 1998).

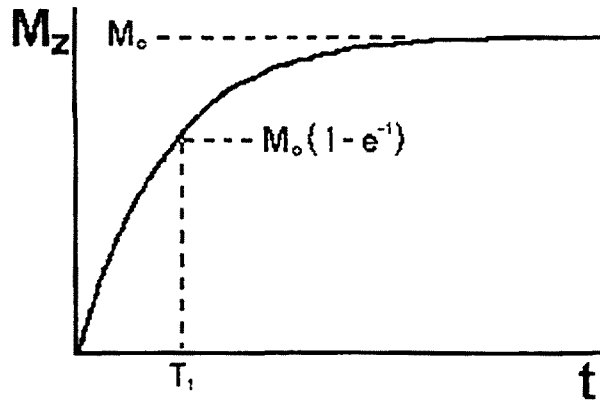


Figura 5. Experimentos para aquisição de T_1

Fonte: Adaptado de HORE 1996, pág.56.

O tempo de relaxação spin-rede T_1 é então definido como o tempo necessário para inverter a magnetização por um fator “e” (fig.5).

Se a magnetização líquida é distribuída ao longo do eixo -Z, haverá retorno gradual da magnetização para a posição de equilíbrio no eixo +Z (fig.4) na razão de T_1 . A equação que governa este comportamento como uma função de tempo t depois do deslocamento é:

$$M_z = M_o (1 - 2e^{-t/T_1})$$

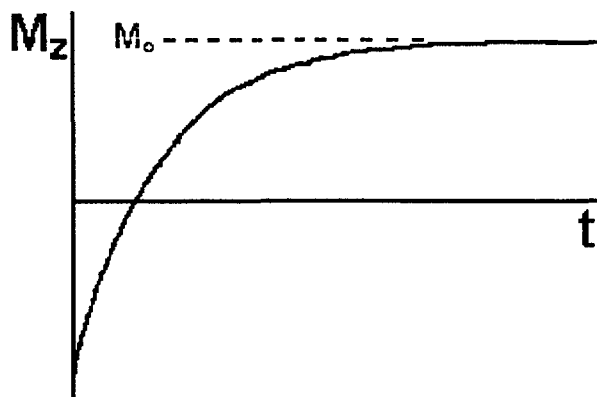


Figura 6. Experimentos para aquisição de T_2 .

Fonte: Adaptado de HORE 1996, pág.77.

Um segundo mecanismo de relaxação (T_2) envolve a troca de energia de spins nucleares e, assim como T_1 , está relacionado com o grau de mobilidade da molécula estudada. Depois do pulso, todos os spins alteram simultaneamente a rota e produzem um sinal de RMN, mas em razão das oscilações do campo magnético, cada próton tem uma experiência magnética diferente. Assim, embora todas as rotações iniciem ao mesmo tempo, depois de algum tempo se descompassam. O sinal detectado é a soma de voltagens induzidas de todos os spins. Como eles se agrupam em diferentes populações, começam a induzir voltagens em diferentes etapas. O descompasso continua, fazendo com que o sinal RMN diminua até os spins ficarem totalmente separados (HORE 1996).

Uma das formas de se determinar T_2 de uma amostra é através de sequência CPMG (CARL & PURCELL 1954; MEIBOOM & GILL 1958), que se baseia na aquisição de ecos e consiste em um pulso de 90° seguido de um retardo e uma sucessão de pulsos de 180° com o mesmo retardo conforme fig.7:

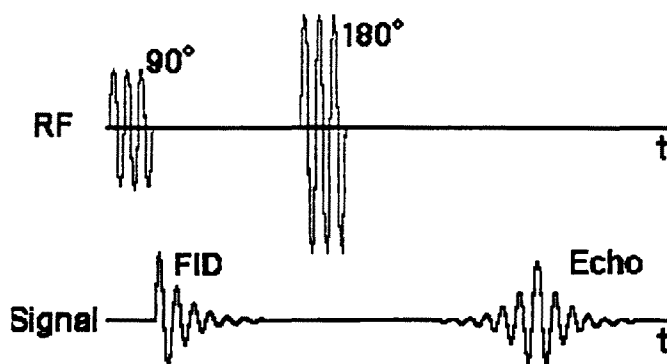


Figura 7. Uso de CPMG para aquisição de T_2 (spin-eco)

Fonte: Adaptado de HORE 1996, pág.80

90°.- Delay.-.180°.-.Delay.-.180°.-.Delay...

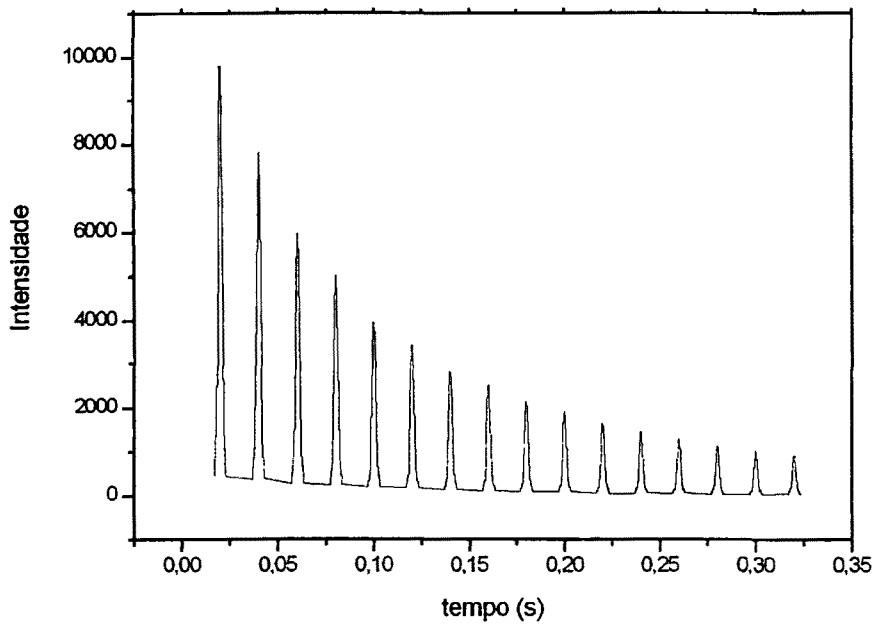


Figura 8. Queda do eco com os sucessivos pulsos a 180°

Neste caso, os ecos são obtidos após cada dois retardos e o progressivo decaimento (figs.8 e 9) observado segue a equação:

$$M = M_0 \cdot e^{-\tau/T_2}$$

onde:

M = intensidade do eco a cada τ

M_0 = intensidade do sinal em equilíbrio

τ = retardo entre os pulsos de 180° e 90°

T_2 = constante de relaxação spin-rede

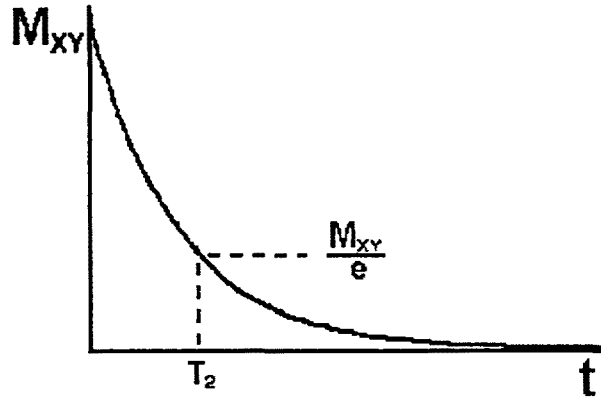


Figura 9. Decaimento da magnetização no tempo de relaxação T_2 .

Fonte: Adaptado de HORE 1996, pág.77.

Há uma relação entre as constantes de relaxação T_1 e T_2 e o tempo de correlação molecular rotacional, permitindo que sejam obtidas informações sobre a mobilidade molecular através de T_1 e T_2 .

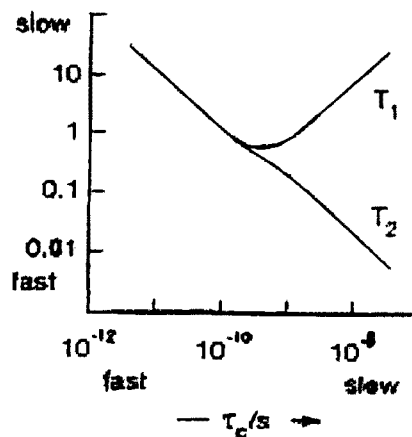


Figura 10 Dependência de T_1 e T_2 no tempo de correlação rotacional τ_c .

Fonte: HORE 1996

Pode-se observar que, para valores de tempos de correlação (τ_c) baixos, indicativos de movimentos moleculares rápidos, T_1 e T_2 são altos e diminuem com o

aumento do tempo de correlação. Em tempos de correlação altos e com diminuição do movimento molecular, T_2 continua diminuindo com o aumento do tempo de correlação, enquanto T_1 segue comportamento inverso (fig.10). Assim, T_2 sugere uma correlação com a mobilidade molecular em qualquer região do gráfico, constituindo-se de uma medida de interesse no estudo do comportamento dinâmico dos sistemas.

As mudanças associadas com a ligação de proteínas aos lipídeos em emulsões podem afetar, por exemplo, o relaxamento dos prótons. Desse modo, os tempos de relaxamento (T_2) podem ser correlacionados a modelos moleculares de inserção da proteína no meio lipídico (ARÊAS e col. 1997). Informações sobre o comportamento dinâmico das micelas de caseína e a formação de emulsões têm sido obtidas de experimentos de RMN, que demonstram ser o método útil para aquisição de dados sobre a estrutura e dinâmica de macromoléculas com regiões de mobilidade restrita (RASMUSSEN e col. 1999).

As emulsões normalmente são preparadas utilizando-se lipídeos e proteínas que apresentam comportamento similar ao das membranas biológicas. O método de RMN de ^2H de estado sólido também tem sido empregado para investigar tais sistemas alimentares com sucesso (ARÊAS e col. 1997, 2001; ARÊAS e WATTS 2003). Entretanto, tal metodologia não foi empregada neste trabalho.

3 Objetivos gerais

- Avaliar a dinâmica dos componentes de uma emulsão água/óleo tendo a β -caseína como único agente emulsificante.

4 Objetivos específicos

- Obtenção da β -caseína com elevado teor de pureza usando FPLC (Fast Polymer Liquid Chromathography) como método de separação e purificação;
- Identificação das frações pela técnica SDS-PAGE;
- Estudo das interações entre as macromoléculas de interesse, ocorridas nas emulsões produzidas com decano como componente lipídico (fase contínua oleosa), monitorando através de tempos de relaxação T_2 a mobilidade molecular das várias regiões da β -caseína.

5 Material e métodos

- A β -caseína foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA) e purificada em FPLC (Fast Polymer Liquid Chromathographic System) – Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden) usando uma coluna Superdex 200, que resultou em produto livre de outras proteínas (não detectadas por SDS-PAGE). Todas as soluções preparadas para FPLC foram filtradas em sistema Millipore 0,45 μ m, usando membranas de acetato de celulose. Na injeção, foi usada membrana de diâmetro menor e de porosidade 0,22 μ m. As soluções também foram degaseificadas antes da injeção, usando a técnica de ultrassonicação. A água utilizada para preparo das soluções e outros procedimentos necessários foi de alto grau de pureza, conseguido através da passagem da água destilada pelo sistema Milli-Q (Resistividade < 18m Ω .cm).
- A β -caseína deuterada foi obtida por tratamento da β -caseína com D₂O para troca dos prótons lábeis por deutério, em tubos de concentração de soluções de proteína (Amicon – Millipore) com membrana de corte de PM de 3000. Os tubos de concentração são formados por um compartimento cilíndrico cujo fundo é a membrana de corte, encaixado, até a metade de sua altura, em outro cilindro fechado ao fundo. Um mililitro de β -caseína em D₂O foi adicionado ao tubo com

membrana e o conjunto centrifugado a 800g por 2 h até redução de volume a cerca de 0,1mL. O conjunto foi então desmontado e o líquido do compartimento inferior descartado. O conjunto foi novamente montado, 1 mL de D₂O foi adicionado e a operação foi repetida por quatro vezes.

- O decano e o decano deuterado (99,5%) foram obtidos da Merck e utilizados sem purificação prévia.
- As primeiras emulsões foram preparadas utilizando-se o planejamento inicial de dispersões de proteína a 5% em água, com 30% de decano. Foram preparadas amostras com variações de componentes deuterados, conforme será descrito a seguir, para verificar qual a população de prótons era responsável pelos sinais de ressonância observados.

5.1 Separação e purificação da β -caseína por FPLC

Fast Polymer Liquid Chromatography (FPLC) é uma técnica de cromatografia líquida compatível com substâncias biológicas, já que executa rápidas separações com alta varredura da amostra, mantendo a integridade estrutural e atividade biológica. Tem sido usada para separar peptídeos de hidrolisados

protéicos (HARWALKER e col. 1993) e para investigar a influência da temperatura na clivagem enzimática de caseínas no leite bovino (LEAVER e THOMSON 1993), entre outras aplicações (SILVESTRE 1997).

5.2 Identificação da frações por eletroforese

Eletroforese é uma técnica experimental freqüentemente usada para caracterização estrutural de proteínas, sendo relativamente simples, rápida, barata e reprodutiva, mas deve ser utilizada com cautela. De maneira geral, os experimentos partem de frações parcialmente purificadas de proteínas, baseando-se nas diferenças de carga ou tamanho de cada proteína, efetuando a separação em um campo elétrico produzido entre dois eletrodos (REGEINSTEIN 1984; MICHALSKY e SHIELL 1999).

Um tipo particular de eletroforese, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis), tem sido utilizado para caracterizar frações de hidrolizados protéicos (SILVESTRE 1997). SHIMIDT e POLL (1991) mostraram a importância do método para diferenciar perfis de peptídeos obtidos de hidrolizados protéicos de soro de leite (SILVESTRE 1997). A técnica mais comum, que foi utilizada neste trabalho, baseia-se na separação pelo tamanho das moléculas, na presença de SDS. Este método foi descrito por LAEMMLI (1970).

5.3 Comportamento das emulsões água/óleo por RMN

Emulsões foram preparadas com β -caseína, água ultra pura (MilliQ) e decano. Tais emulsões modelo foram construídas com o objetivo de simular produtos alimentícios do tipo maioneses. As proporções típicas utilizadas foram 1% β -caseína, 24,5% água e 74,5% decano. Foi adotada metodologia descrita por FURTADO e col.(2001), com adaptações para adequá-la ao sistema escolhido. O procedimento consistiu de dispersão da β -caseína em água, em homogeneizador tipo Turrax (Marconi modelo TE-102 nº de série 892580) para pequenos volumes. Foi empregada a velocidade máxima do homogeneizador, em períodos de tempo variando entre 5 e 10 minutos, sob refrigeração, adicionando-se então, de modo constante o decano (25mL /min), até ser observada a inversão da emulsão, pela queda de corrente elétrica em voltímetro.

Essas emulsões foram então submetidas a RMN de prótons em equipamento Maran SFC (da Resonance Instruments – Inglaterra), utilizando-se de seqüência de pulsos CPMG (CARL & PURCELL 1954; MEIBOOM & GILL 1958) e parâmetros ajustados até o completo decaimento do sinal.

Para o estudo da contribuição de cada componente do sistema, várias amostras foram preparadas exatamente nas mesmas condições e utilizando-se a mesma proporção de cada componente:

- *Amostra 1* – β -caseína, água MilliQ e decano, totalmente protonados.
- *Amostra 2* – β -caseína (previamente tratada com D_2O até substituição isotópica dos prótons lábeis), D_2O e decano.
- *Amostra 3* – β -caseína , água MilliQ e decano deuterado.
- *Amostra 4* – β -caseína (previamente tratada com D_2O até substituição isotópica dos prótons lábeis), D_2O e decano deuterado.

Além destas amostras, experimentos de CPMG foram realizados com água pura (MilliQ), decano puro e β -caseína (previamente tratada com D_2O até substituição isotópica dos prótons lábeis) em D_2O .

Em todos os casos, o ganho do receptor (RG) foi ajustado em função da intensidade do sinal, bem como o n° de repetições acumuladas (NS) foi determinado para o melhor sinal possível. O n° de pulsos de 180° (NECH) foi também ajustado para o decaimento total do sinal do eco. O intervalo entre os pulsos τ (comando TAU no espectrômetro) foi mantido o menor possível para eliminar os efeitos de difusão (100 – 150 μ s).

Os espectros CPMG obtidos foram submetidos a uma rotação de eixos de referência (comando ROT), e os valores de magnitude dos ecos foram tomados a cada n° par de ecos comandos (comandos MAG e EVEN, respectivamente). Esses espectros foram então processados pelo programa WinFit (Resonance Instruments, Oxford, 2002), que avalia o n° de componentes exponenciais discretos existentes no espectro e pelo programa WinDXP (Resonance Instruments, Oxford, 2002) que avalia o n° de exponenciais existentes no espectro de maneira contínua, criando um mapa de distribuição de populações de T_2 existentes na amostras.

A temperatura das amostras foi controlada e fixada em 20°C.

6 Resultados e discussão

6.1 Separação e purificação da β -caseína por FPLC

O trabalho foi realizado numa faixa de pH muito próxima de 7,0, conseguida com o auxílio de tampão fosfato (0,1M, pH=7,0) como fase móvel. Esse valor de pH é bastante adequado para separação da β -caseína, como mostra a literatura consultada, já que neste valor a proteína pode ser solubilizada em fase aquosa (MURPHY e FOX 1991).

A coluna escolhida, SUPERDEX 200 (cujo empacotamento é feito com zeólitos de alto grau de porosidade, com todos os poros do mesmo tamanho), funciona no esquema de permeação em gel, ou peneira molecular. Seleciona substâncias com PM compreendido entre 10000 e 600000, segundo descrição do fabricante, sendo adequada a essa proteína, que apresenta PM na faixa de 23980 (CHEFTEL 1989), apresentando bons resultados no pH escolhido, além de grande estabilidade química.

O sistema de detecção, acoplado ao FPLC é um detector UV, sendo recomendado para proteínas o comprimento de onda 280nm como máxima absorção.

Foram obtidas nesse procedimento de purificação, quatro frações principais, conforme apresentado na fig. 11:

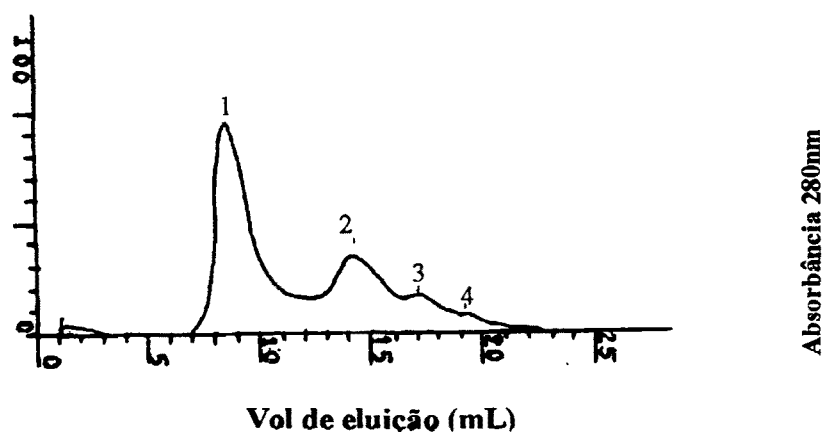


Figura 11 Perfil de eluição da β -caseína em coluna Superdex 200 em FPLC.

6.2 Identificação da frações por eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi efetuada com a proteína carregada negativamente pela ação do SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (REGENSTEIN 1984; SRINIVASAN 2002), sendo submetida à separação em gel de poliacrilamida de concentração adequada para seu PM, usando tampão de tris-glicina/HCl 0,1M, pH=8,3. Esse procedimento teve como objetivo obter caracterização das frações obtidas na purificação da dispersão de β -caseína por FPLC, determinando o PM das mesmas pela técnica SDS-PAGE. As bandas 3 e 4

foram reunidas numa só e a eletroforese das bandas 1,2 e 3/4, efetuada contra um padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos na faixa de 90 a 14 KDa (pista 1). Apesar dos vários picos observados na separação por FPLC mostrados na Figura 11, que indicariam várias frações com pesos moleculares diferentes, a eletroforese revelou a existência de uma única cadeia protéica de cerca de 24 KDa, conforme mostrado na fig.12 e analisado na fig.13.

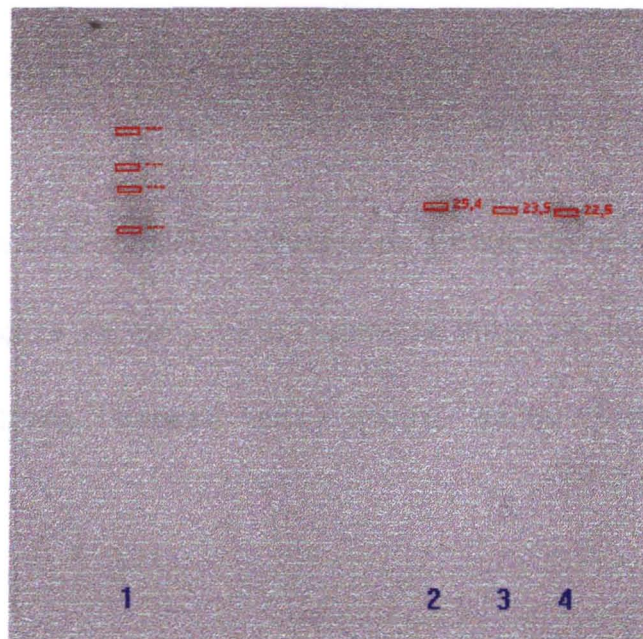


Figura 12. Perfil eletroforético das frações da β -caseína

Faixa 1 – Padrão de proteínas

Faixa 2 – Pico n°1 fig.11

Faixa 3 – Pico n°2 – fig.11

Faixa 4 – Picos 3 e 4 – fig.11

Isso indica que os vários picos observados na separação por FPLC (fig.11) provavelmente referem-se a estados de agregação diferentes de β -caseína, já que a maior parte das moléculas anfifílicas tende a formar uma grande variedade de agregados possíveis (LECLERC & CALMETTES 1997).

Para identificação do tamanho dos agregados, se faz necessária uma calibração da coluna Superdex 200 utilizada na separação por FPLC com padrões de PM conhecidos. Alguns estudos sugerem que sistemas micelares compostos com β -caseína, são estruturas dinâmicas nas quais monômeros estão em equilíbrio com agregados, contendo diferentes números de monômeros em torno de 40 unidades estruturais (LECLERC & CALMETTES 1997; CASANOVA & DICKINSON 1998).

Agregados com muitas moléculas de β -caseína tenderiam a se reestruturar devido às condições de preparo da amostra antes da injeção (sonicação por 5 minutos), resultando apenas nos quatro picos identificados na fig.11.

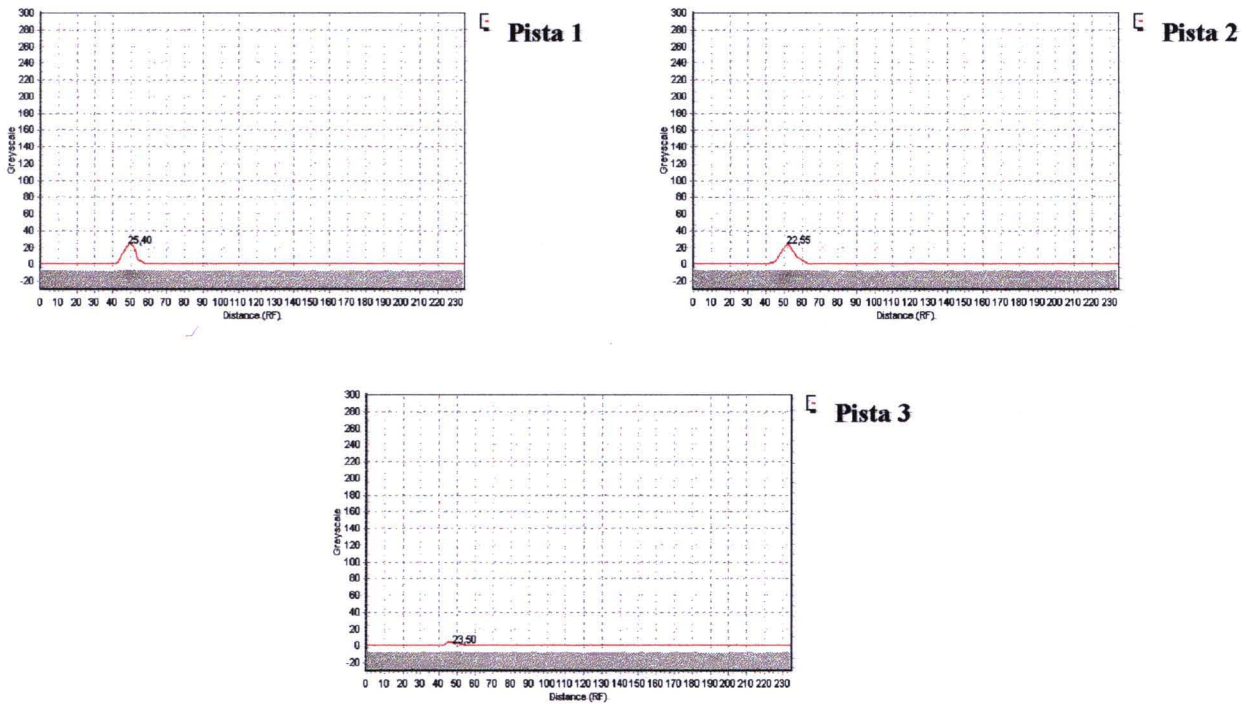


Figura 13 Análise das bandas pelo software Gelscan 5.1 (BioSciTec, Alemanha). Os pesos moleculares (indicados em cada pico) foram calculados baseados nas mobilidades de uma mistura padrão na pista (lane) 1.

Pista 1 – observada uma banda em 25,4KDa.

Pista 2 – observada uma banda em 23,5KDa.

Pista 3 – observada uma banda em 22,5KDa.

6.3 Comportamento das emulsões por RMN

Inicialmente foram preparadas emulsões utilizando concentração de proteína variando de 2 a 4×10^{-2} mM de β -caseína/100mL de dispersão em água em 30% de decano, conforme descrito anteriormente. A proteína utilizada para construir emulsões não foi purificada, uma vez que os vários picos observados na fig.11

mostraram ser constituídos apenas de β -caseína, como foi verificado na fig.12. Valores semelhantes de concentração desses componentes em emulsões, foram observados em trabalhos de SRINIVASAN e col.(2002), YE e col.(2000) e CASANOVA & DICKINSON(1998). Nosso sistema nestas concentrações apresentou-se bastante instável. Foram observadas duas fases distintas: uma superior cremosa de coloração branca e uma inferior turva e aparentemente aquosa. A fração cremosa consistia de uma emulsão que apresentava alguma estabilidade, mas também se dividia em duas fases após alguns dias. Não foi verificada floculação em nenhuma destas amostras iniciais. Foram então produzidas emulsões usando concentrações maiores de proteína. A concentração que apresentou uma emulsão estável foi a de 2×10^{-1} mM de β -caseína/100mL de dispersão e decano a 75-80%. Estes sistemas mostraram-se muito estáveis, apresentando-se na forma de um creme viscoso.

A partir destas condições foram preparadas emulsões água-em-óleo (Tab.2) que foram então analisadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

Tabela 2 Amostras preparadas para Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

	Amostra1(*)	Amostra2(**)	Amostra3(***)	Amostra4(****)
β -caseína (mg)	20,3	14,2	13,2	11,5
Água(g)	0,3888	0,3358	0,2467	0,2188
Decano(g)	1,1768	1,0201	0,8450	0,6760
M emulsão(g)	1,5859	1,3701	1,1049	0,9063
T _{agitação} (min)	9,5	8	8	5
Massa (g) utilizada em RMN	0,4841	0,5237	0,6259	0,1380
β -caseína(%na emulsão)	1,28	1,04	1,19	1,27
Prótons disponíveis na amostra (g)	0,0697	0,0610	0,0161	8×10^{-5}
Prótons do decano (g)	0,0560	0,0607	-	-
Prótons da água (g)	0,0133	-	0,0156	-
Prótons da β -caseína (g)	4×10^{-4}	3×10^{-4}	5×10^{-4}	8×10^{-5}

(*) todos os componentes protonados

(**) proteína deuterada em D₂O e decano protonado(***) proteína em H₂O e decano deuterado

(****) todos os componentes deuterados

Para calcular a quantidade de prótons contribuintes nas amostras verificadas por ressonância, usamos o seguinte procedimento:

- Prótons contribuintes na água pura – Determinamos o nº de H por mol de substância de acordo com sua fórmula molecular. Como na água (H_2O) todos os prótons produzem sinal de ressonância, temos 11,19% da massa de água correspondendo a prótons contribuintes. Foram pesados 2,3518g de água, o que representa 0,2632g de prótons contribuintes.
- Prótons contribuintes no decano ($C_{10}H_{22}$) puro – A massa de prótons no decano corresponde a 15,58% da massa de 1 mol da substância. Assim, para 1,4146g de decano pesados, 0,2205g corresponde aos prótons contribuintes para o sinal de ressonância).
- Prótons contribuintes na β -caseína pura – Determinamos inicialmente o PM da proteína, conforme seqüência de aminoácidos apresentada por CHEFTEL (1989). Após levantamento do nº de cada resíduo diferente na seqüência, calculou-se a massa molar total de cada resíduo através do produto: $MM_{res} \times$ frequência. Somando-se a massa molar total de todos os resíduos presentes e

descontando-se a massa de água referente às ligações peptídicas, chegamos ao valor de 23985,91 Da (tab. 9.1 – anexos), bastante coerente com a literatura que apresenta MM da β -caseína aproximadamente 23980 Da (SWAISGOOD 1993; KUMOSINSKY e col. 1993). Contando-se o n° de H totais por resíduo e descontando o n° de H lábeis (fortemente ligados a elementos muito eletronegativos – O e N), foram obtidos os seguintes valores: H_{totais} correspondem a 6,95% da massa molar da β -caseína. Dessa porcentagem, 2,17% representam prótons lábeis e 4,78% prótons não lábeis. Pesamos 0,2990g de dispersão de β -caseína em D_2O , que foi preparada utilizando-se a proporção 5% p/p. Desse modo, 0,0150g de β -caseína, sendo $7,5 \times 10^{-4}$ g de prótons contribuintes (não lábeis no preparo da dispersão em D_2O).

- Prótons contribuintes na amostra 1 (todos os componentes protonados) – Foi preparada uma quantidade de emulsão igual à 1,5859g, contendo: 0,0203g de β -caseína, 0,3888g de H_2O e 1,1768g de decano. Como a massa de prótons contribuintes neste caso refere-se aos prótons de todos os componentes da emulsão, temos: 0,0014g de H da caseína, 0,0435g de H da água e 0,1834g de H do decano. Sendo utilizada somente 0,4841g da emulsão preparada,

temos proporcionalmente $4,3 \times 10^{-4}$ g de prótons da caseína, 0,0133g de prótons da água e 0,0560g de prótons do decano responsáveis pelo sinal de ressonância.

- Prótons contribuintes na amostra 2 (β -caseína deuterada em D_2O com decano protonado)– Foi preparada uma quantidade de emulsão igual à 1,3701g, contendo: 0,0142g de β -caseína deuterada, 0,3358g de D_2O e 1,0201g de decano. Como a massa de prótons contribuintes neste caso refere-se aos prótons não lábeis da proteína e aos prótons do decano, temos: $6,8 \times 10^{-4}$ g de H da caseína e 0,1589g de H do decano. Sendo utilizada somente 0,5237g da emulsão preparada, temos proporcionalmente $2,6 \times 10^{-4}$ g de prótons da caseína e 0,0607g de prótons do decano responsáveis pelo sinal de ressonância.
- Prótons contribuintes na amostra 3 (β -caseína em H_2O com decano deuterado)– Foi preparada uma quantidade de emulsão igual à 1,1049g, contendo: 0,0132g de β -caseína, 0,2467g de H_2O e 0,8450g de decano. Como a massa de prótons contribuintes neste caso refere-se aos prótons não lábeis da caseína e prótons da água, temos: 9×10^{-4} g de H da caseína e

0,0276g de H da água. Sendo utilizada somente 0,6259g da emulsão preparada, temos proporcionalmente 5×10^{-4} g de prótons da caseína, 0,0156g de prótons da água responsáveis pelo sinal de ressonância.

- Prótons contribuintes na amostra 4 (todos os componentes deuterados) – Foi preparada uma quantidade de emulsão igual à 0,9063g, contendo: 0,0115g de β -caseína, 0,2188g de D_2O e 0,6760g de decano deuterado. Como a massa de prótons contribuintes neste caso refere-se somente aos prótons não lábeis da proteína, 4,78% da massa de caseína utilizada no preparo, ou seja, $5,0 \times 10^{-4}$ g. Sendo utilizada somente 0,1380g da emulsão preparada, temos proporcionalmente $7,6 \times 10^{-5}$ prótons responsáveis pelo sinal de ressonância.

Foram então realizados experimentos de CPGM a 20°C para as amostras. O cálculo de T_2 para a amostra 1, que tem todos os componentes protonados, mostrou as seguintes características (Fig 14):

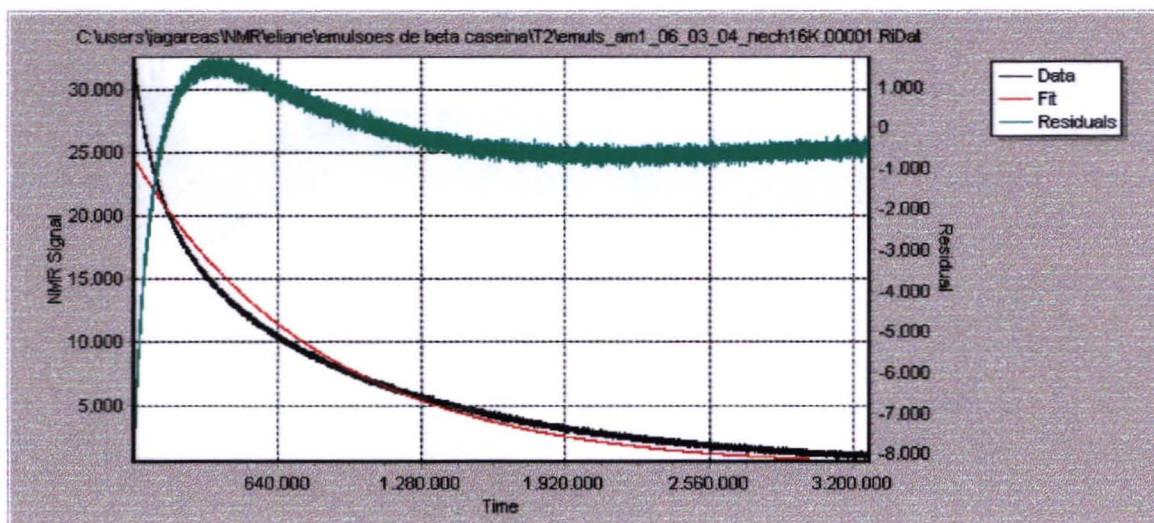


Figura 14 Cálculo de T_2 utilizando a equação $M = M_0 \cdot e^{-t/T_2}$

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μs

Como pode ser observado, o emprego de apenas uma exponencial resultou num ajuste pobre, observando-se um resíduo bastante estruturado e não aleatório.

Por essa razão, os dados foram tratados novamente com duas exponenciais, conforme mostra a Fig. 15.

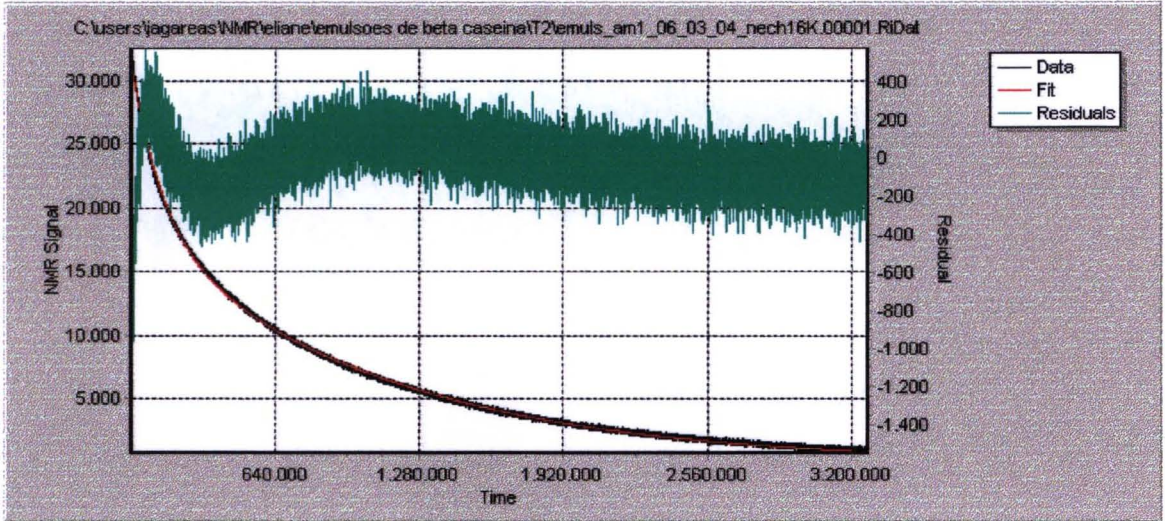


Figura 15 Cálculo de T_2 utilizando a equação $M = M_0 [K_1 e^{-\frac{t}{T_{2(1)}}} + K_2 e^{-\frac{t}{T_{2(2)}}}]$

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μs

O emprego de duas exponenciais melhorou o ajuste, mas estes registros ainda não se mostraram satisfatórios, razão pela qual foi adotado o procedimento de utilizar três exponenciais, onde houve melhor distribuição dos resíduos, assim como melhor correlação dos dados obtidos (Fig. 16).

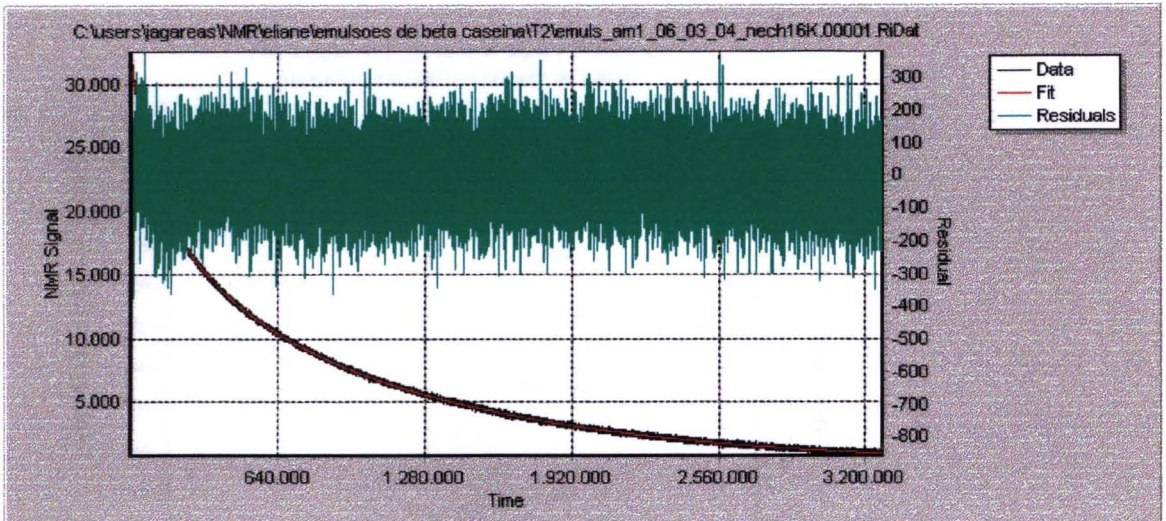


Figura 16 – Cálculo de T_2 utilizando a equação $M = M_0 [K_1 e^{-\tau/T_{2(1)}} + K_2 e^{-\tau/T_{2(2)}} + K_3 e^{-\tau/T_{2(3)}}]$

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μs

Estes resultados nos mostram a existência de três populações de prótons com T_2 distintos contribuindo para o espectro de CPMG observado. Uma abordagem mais adequada seria a verificação da contribuição de tantas exponenciais quantas necessárias para o perfeito ajuste dos dados de forma contínua e não discreta como a mostrada na Figura 16. Isso é obtido pelo Software WinDXP (RI-Oxford, 2002) que faz uma varredura de exponenciais num espectro CPMG.

Foram também efetuadas determinações de T_2 utilizando-se a seqüência CPMG para os componentes isolados, para então serem comparados aos sinais da emulsão. Submetendo-se alíquotas de componentes isolados da emulsão, foram obtidos os seguintes resultados, de acordo com a Distribuição de T_2 apresentada na figura 17, corrigida pelo ganho e n° de scans:

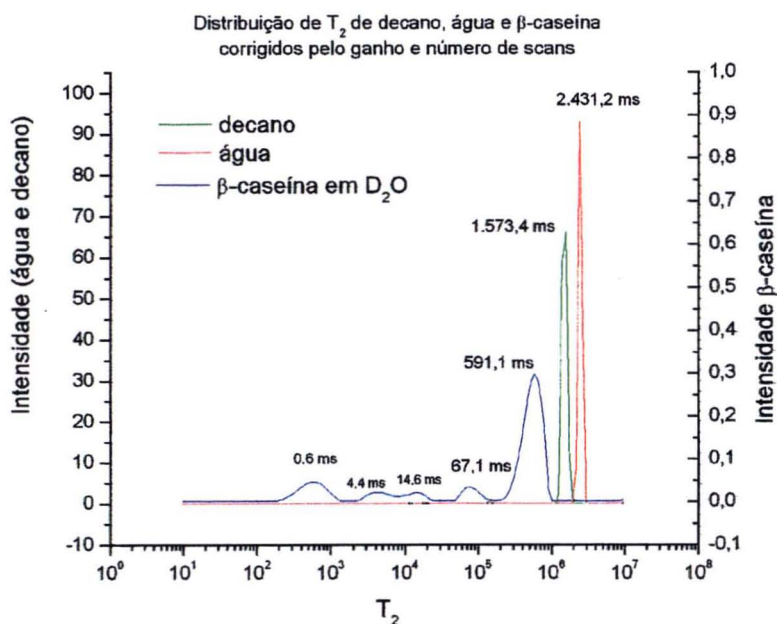


Figura 17 Distribuição de T_2 para decano, água e β -caseína corrigidos pelo n° de scans e ganho.

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

Água pura – como era esperado, apresentou praticamente uma única população de prótons, relaxando em média a 2431 ms, sendo observadas contribuições de populações variando de um mínimo de 2181 ms e um máximo pouco maior que T_2 médio = 2431ms. Para uma amostra utilizada de 2,3518g, a contribuição de prótons para os sinais de ressonância se deve a 0,2632g de prótons ou 11% em massa da alíquota utilizada (Tabela 3).

Tabela 3 – Tempo de relaxação em *ms* para água^{*1}

	T_2 médio	Máx	Mín
1	2431,23000	2431,6000	2180,6000
Total			

*1 uso de 2,3518g de água, correspondendo à 0,2632g de prótons.

Decano – apresentou também uma única população de prótons relaxando com T_2 médio de 1573 ms, onde foram observadas contribuições de populações variando entre um mínimo de 1266 ms e um máximo $T_2 = 1754$ ms. Foi utilizada massa de 1,4146g, sendo que 0,2205g corresponde aos prótons da amostra responsáveis pelos sinais de ressonância observados, representando 16% em massa da amostra utilizada (Tabela 4).

Tabela 4– Tempo de relaxação em ms para decano^{*2}

	T_2 médio	Máx	Min
1	1573,4000	1754,3000	1265,80000
			Total

*2 uso de 1,4146g de decano, correspondendo a 0,2205g de prótons.

β -caseína – apresentou uma combinação de populações relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo estes os valores encontrados respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 0,6ms com mínimo em 0,2ms e máximo em 1,2ms; $T_{2(2)}$ médio = 4,4ms com mínimo em 2,6ms e máximo em 7,6ms; $T_{2(3)}$ médio = 14,6ms com mínimo em 8,5ms e máximo em 22,6ms; $T_{2(4)}$ médio = 67,1ms com mínimo em 54ms e máximo em 128,9ms e população de prótons mais significativa, representando aproximadamente 69% do total com $T_{2(5)}$ médio = 591ms com mínimo em 247,6ms e máximo em 913,3ms. Esses dados indicam a presença de cinco populações, provavelmente em razão da proteína se apresentar em diferentes graus de

polimerização em solução preparada em pH neutro (SWAISGOOD 1993; LECLERC & CALMETTES 1997; CASANOVA & DICKINSON 1998; SRINIVASAN 2002;). Foi preparada uma dispersão de β -caseína 5% em D₂O para que fossem observados apenas sinais de ressonância para os prótons não lábeis da proteína. A massa de dispersão usada foi de 0,2990g, resultando em 0,015g de caseína e a contribuição de prótons para os sinais de RMN foi da ordem de $7,5 \times 10^{-4}$ g (Tabela 5). A pequena quantidade utilizada está em concordância com a intensidade do sinal obtido (por volta de 1% das intensidades verificadas nos espectros do decano e da água isolados).

Tabela 5 – Tempo de relaxação em *ms* para β -caseína em D₂O^{*3}

	T ₂ médio	Máx	mín.	Área	%
1	0,6000	1,2000	0,2000	39371	14,89
2	4,4200	7,6000	2,6000	14576	5,51
3	14,6300	22,6000	8,5000	12070	4,57
4	67,1000	128,9000	54,0000	17284	6,54
5	591,1000	913,3000	247,6000	181029	68,49
			Total	264329	100,00

^{*3} uso de 0,2990g de dispersão, correspondendo a $7,5 \times 10^{-4}$ g de prótons não lábeis da proteína.

Uma amostra de emulsão não deuterada (amostra 1) foi então submetida à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. Esta emulsão foi preparada utilizando-se 20,3mg de β -caseína em 0,3888g de água e 1,1768g de decano.

Desta, foi submetida à Espectroscopia (fig.18) uma alíquota contendo 0,4841g de emulsão, o que corresponde a um total de 4×10^{-4} g de prótons da caseína, 0,0560g de prótons provenientes do decano e 0,0133g de prótons da água, sendo esperada contribuição de prótons dos três componentes do sistema.

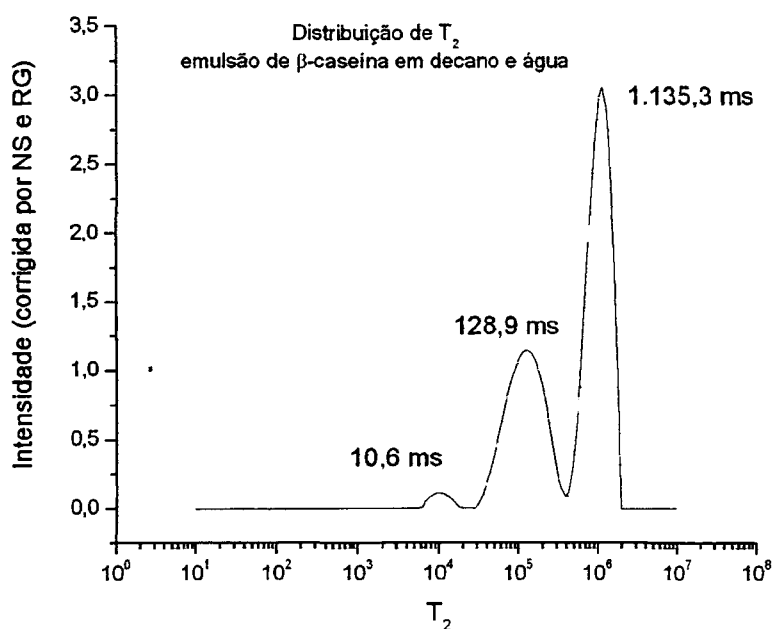


Figura 18 Distribuição de T_2 para amostra 1 corrigido pelo n° de scans e ganho.

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

Analisando-se os gráficos apresentados nas figs. 17 e 18 e comparando-se as populações de prótons em cada experimento, observa-se um comportamento diferente do verificado com os componentes isolados, sugerindo forte

comprometimento dos constituintes na interface, já que as intensidades dos sinais para os T_2 encontrados mostram pequena disponibilidade de prótons na emulsão quando comparados a cada componente puro. Em estudos de SRINIVASAN e col. (1999), foi observado que o comportamento da proteína após as condições turbulentas da homogeneização, se altera e a estrutura dos agregados e submicelas formados através das interações hidrofóbicas entre os resíduos apolares também. Provavelmente esse grande aporte de energia possa dissociar os agregados em monômeros antes de ocorrer adsorção, alterando o perfil da proteína após a formação da emulsão. Também é conhecido, que através de um mecanismo de hidratação, as caseínas demonstram ter grande capacidade de acomodação de água no espaço interior de suas estruturas (QI PX e col. 2001), o que pode contribuir para não serem observados registros de água livre no sistema estudado. Os registros dessa amostra apresentaram uma combinação de três principais populações relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 10,6ms, com mínimo em 6,1ms e máximo em 18,2ms correspondendo a menos de 2% da área do gráfico; $T_{2(2)}$ médio = 128,9ms, com mínimo em 31,3ms e máximo 382,5ms, representando 38% da área e $T_{2(3)}$ médio = 1135,5ms, com mínimo em 382,5ms e máximo em 1754,3ms, correspondendo a 60% da área do gráfico. As duas grandes contribuições, devidas às populações 2 e 3, representam por volta de 98% do total (tab. 6). Provavelmente, as três populações verificadas (fig.18) referem-se a

diferentes arranjos dos três constituintes na interface da emulsão. Não sendo possível identificar cada componente nos registros apresentados, em razão da não correspondência dos tempos de relaxação T_2 verificados nas determinações dos componentes puros, iniciou-se uma nova fase de determinações, com substituição um a um dos componentes da emulsão pelos seus derivados deuterados, para investigar mais profundamente o sistema.

Tabela 6 – Tempo de relaxação em *ms* para amostra 1 ^(*)

	T_2 médio	Máx	mín.	Área	%
1	10,6000	18,2000	6,1000	594	1,84
2	128,9000	382,5000	31,3000	12257	38,05
3	1135,5000	1754,3000	382,5000	19367	60,11
			Total	32217	100,00

^(*) uso de 0,4841g de dispersão, correspondendo a $4,3 \times 10^{-4}$ g de prótons da proteína, 0,0133g de água e 0,0560g de decano.

Deste modo, foi preparada uma nova emulsão (amostra 2) utilizando-se 14,2mg de β -caseína deuterada em 0,3358g de D_2O e 1,0201g de decano. Desta vez, foi submetida à Espectroscopia (fig.19) uma alíquota contendo 1,3701g de emulsão, o que corresponde a um total de $2,6 \times 10^{-4}$ g de prótons não lábeis da caseína e 0,0607g de prótons provenientes do decano, não se esperando contribuição de prótons da água, pelo uso de água deuterada e pelo fato dos prótons

lábéis da caseína terem sido trocados por deutério anteriormente à preparação da emulsão. Este experimento foi realizado com o objetivo de observar sinais de ressonância, somente dos prótons não lábeis da proteína e dos prótons provenientes do decano não deuterado.

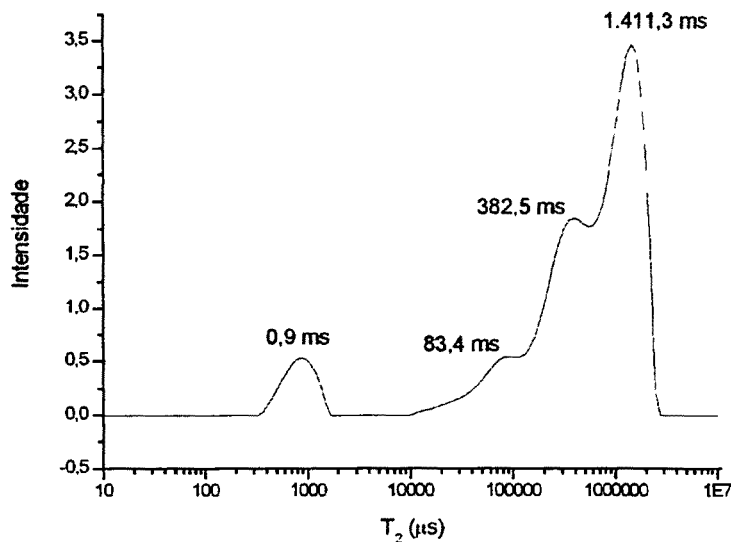


Figura 19 Distribuição de T_2 para amostra 2 corrigida pelo nº de scans e ganho.

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

A análise do espectro gerado para a amostra revelou quatro populações de prótons relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo, respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 0,9ms com mínimo em 0,4ms e máximo em 1,7ms correspondendo a 7% da área do gráfico; $T_{2(2)}$ médio = 83,4ms, com mínimo em 16,3ms e máximo em 115,6ms,

correspondente a 10% da área; $T_{2(3)}$ médio = 382,5ms com mínimo em 115,6ms e máximo em 591,1ms representando 32% da área; e $T_{2(4)}$ médio = 1411,3ms com mínimo em 591,1ms, e máximo em 2710,6ms representando 51% da área (tab. 7). As duas grandes contribuições se referem às populações detectadas nos picos 3 e 4 (fig.19) que somam quase 83% do total em área. Possivelmente o primeiro pico (fig.19) está relacionado com uma fração de β -caseína não adsorvida, já que no processo de homogeneização há quebra dos grandes agregados e há uma considerável preferência na adsorção de grandes partículas protéicas (SRINIVASAN e col. 1999). Os outros podem estar relacionados a uma combinação de populações de prótons provenientes de proteína e decano interagindo na interface da emulsão. Não é observado registro para prótons da água, em virtude de ter sido usado D_2O .

Tabela 7 – Tempo de relaxação em *ms* para amostra 2 ^(*5)

	T ₂ médio	Max	min.	Área	%
1	0,9000	1,7000	0,4000	2320	7,19
2	83,4200	115,6100	16,3000	3292	10,20
3	382,5400	591,0900	115,6100	10341	32,06
4	1411,2600	2710,6000	591,0900	16306	50,55
			Total	32259	100,00

*5 uso de 0,5237g de dispersão, correspondendo a 3×10^{-4} g de prótons não lábeis da proteína e 0,0607g de prótons do decano.

Uma terceira amostra foi preparada, utilizando-se 13,2mg de β -caseína em 0,2467g de H₂O e 0,8450g de decano deuterado, constituindo 1,1049g de emulsão. Desta foi submetida à Espectroscopia (fig.20) uma alíquota contendo 0,6259g de emulsão, o que corresponde a um total de 5×10^{-4} g de prótons não lábeis da caseína e 0,0156g de prótons provenientes da água, não sendo esperada a contribuição de prótons do decano neste experimento. Este experimento foi realizado com o objetivo de observar sinais de ressonância somente dos prótons da proteína e dos prótons provenientes da água.

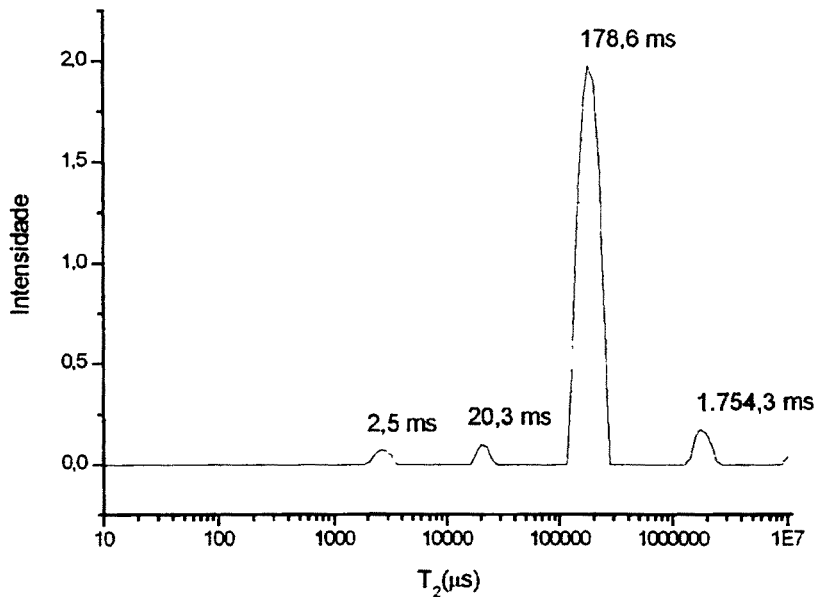


Figura 20 Distribuição de T_2 para amostra 3 corrigida pelo n° de scans e ganho.

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μs

O espectro gerado para a amostra apresentou quatro populações de prótons relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo, respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 2,6ms, com mínimo em 2,1ms e máximo em 3,6ms, correspondendo a 2,5% da área do gráfico; $T_{2(2)}$ médio = 20,3ms, com mínimo em 18,2ms e máximo em 25,2ms, correspondendo a 2,5% da área também; $T_{2(3)}$ médio = 178,6ms, com mínimo em 128,9ms e máximo em 247,6ms, sendo o grande contribuinte, com aproximadamente 89% da área e $T_{2(4)}$ médio = 1754,3ms com mínimo em 1411,3ms e máximo em 2431,2ms, correspondendo a quase 6% do total (tab. 8). Os dados

encontrados sugerem picos para um tipo de água, muito comprometida com os demais componentes e com a mobilidade muito mais restrita, já que os valores de T_2 encontrados são bem menores que os observados no espectro da água pura. Quanto maiores os valores de T_2 , as espécies apresentam-se mais livres, com movimento menos restrito (HORE 1996).

Tabela 8– Tempo de relaxação em ms para amostra 3⁽⁶⁾

	T ₂ médio	Máx	mín.	Área	%
1	2,6000	3,6000	2,0700	266	2,40
2	20,3000	25,2000	18,2000	274	2,48
3	178,6400	247,6000	128,9000	9883	89,41
4	1754,2600	2431,2000	1411,3000	631	5,71
				Total	100,00

*6 uso de 0,6259g de dispersão, correspondendo a 5×10^{-4} g de prótons não lábeis da proteína e 0,0156 g de prótons da água.

A quarta emulsão foi preparada, utilizando-se 11,5mg de β -caseína deuterada em 0,2188g de D₂O e 0,6760g de decano deuterado, constituindo 0,9063g de emulsão. Desta foi submetida à Espectroscopia (fig.21) uma alíquota contendo 0,1380g de emulsão, o que corresponde a um total de 8×10^{-5} g de prótons não lábeis da caseína, não se esperando contribuição de prótons para os outros componentes deuterados neste experimento.

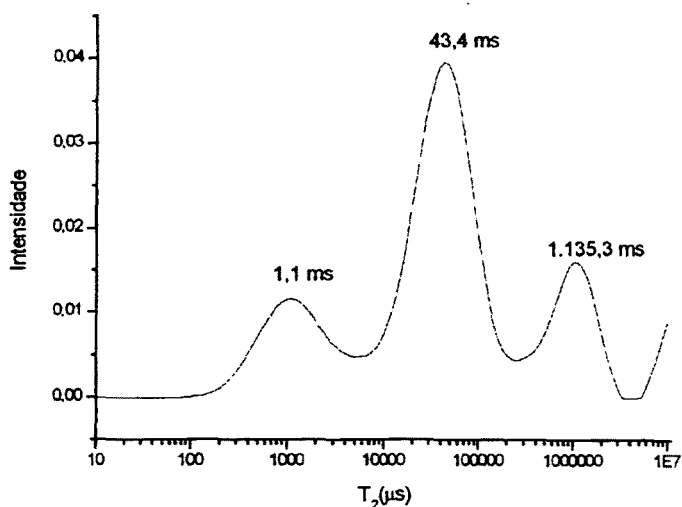


Figura 21 Distribuição de T₂ para amostra 4 corrigida pelo n° de scans e ganho.

(*) Intensidade de sinal RMN x Tempo em μ s

Este experimento foi realizado com o objetivo de observarem sinais de ressonância, somente dos prótons não lábeis da proteína e o espectro gerado para a amostra apresentou três populações de prótons relaxando a diferentes valores de T_2 , sendo estes os valores encontrados respectivamente: $T_{2(1)}$ médio = 1,1ms com mínimo em 0,15ms e máximo ao redor de 4mS correspondendo a 19,5% da área do gráfico; $T_{2(2)}$ médio = 43,4ms com mínimo em 8,5ms e máximo em 247,6ms, 60,2% da área; $T_{2(3)}$ médio = 1135,32ms com mínimo em 247,6ms e máximo em 3022,1ms com 20,3% em área. As duas grandes contribuições se referem às populações detectadas nos picos 2 e 3 correspondem a soma de 80,5% do total em área (tab. 9). Esses registros nos mostram três populações de prótons da proteína, sendo que a população do terceiro pico (fig.21), apresenta-se com mobilidade superior Quando comparada à proteína pura (fig.17). Em trabalhos de DICKINSON (1994), relata-se que o equilíbrio da composição interfacial é alcançado porque a flexibilidade e mobilidade de moléculas da proteína permitem rápido intercâmbio entre a solução e a interface.

Tabela 9 – Tempo de relaxação em ms para amostra 4⁽⁷⁾

	T_2 médio	Max	Min.	Área	%
1	1,1000	3,9700	0,1500	11247	19,49
2	43,4300	247,5700	8,4900	34768	60,24
3	1135,3200	3022,1000	247,5700	11700	20,27
			Total	57714	100,00

⁷ uso de 0,1380g de dispersão, correspondendo a 8×10^5 g de prótons não lábeis da proteína.

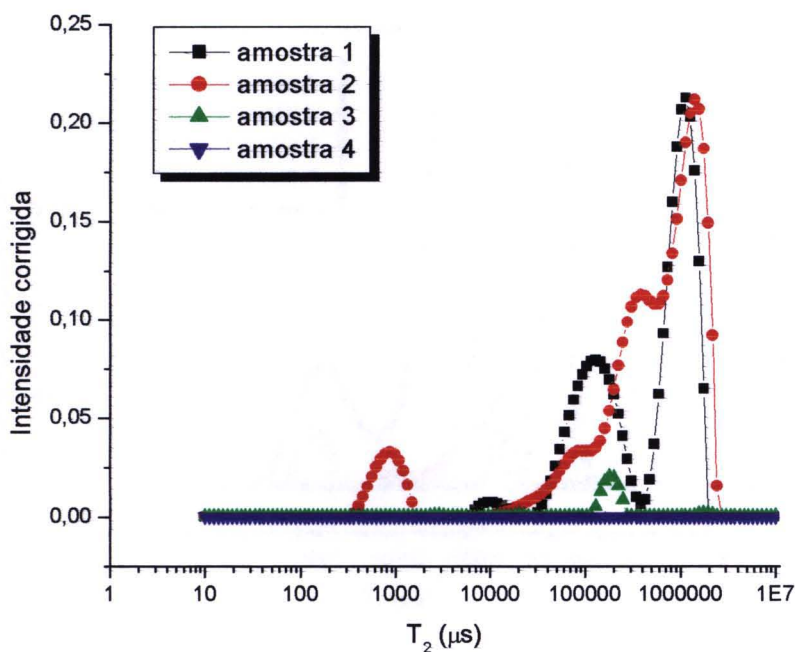


Figura 22 Distribuição de T_2 para as amostras 1, 2, 3 e 4 corrigidos pelo nº de scans, ganho e contribuição de prótons (todos os valores na mesma escala).

Os espectros das quatro amostras foram sobrepostos na mesma escala, para se avaliar o comportamento dos constituintes segundo outra ótica. Confrontando os dados, o último pico revela um T_2 da ordem de $1,5 \times 10^6 \mu\text{s}$, relacionado provavelmente a populações de prótons envolvidas na interface da emulsão. A última amostra, onde se observam somente sinais para prótons não lábeis da proteína, apresenta sinal de intensidade muito pequena em virtude da pequena concentração de proteína utilizada.

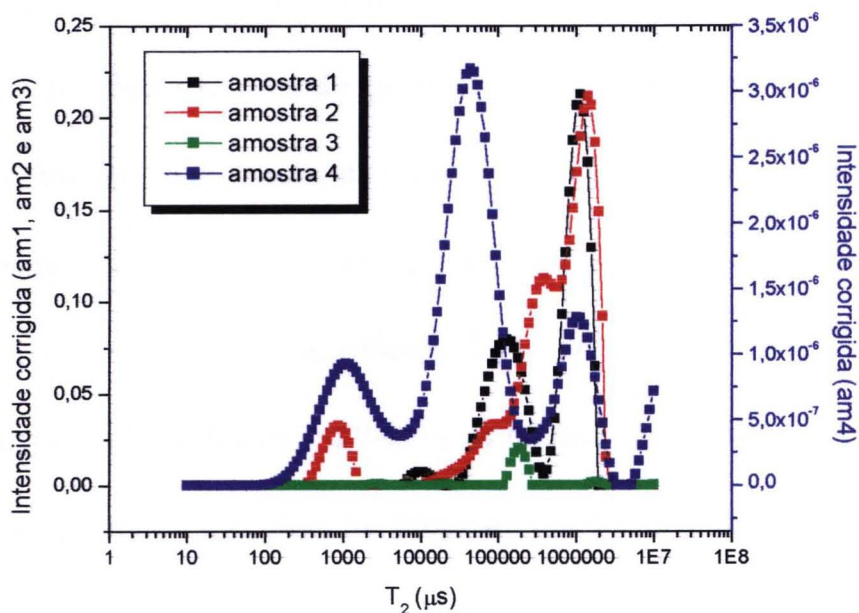


Figura 23 Distribuição de T_2 para as amostras 1, 2, 3 e 4 corrigidas pelo nº de scans, ganho e contribuição de prótons (com escala diferente para a amostra 4).

Os espectros das três primeiras amostras foram sobrepostos na mesma escala e da quarta amostra em escala diferente, para se observar os tempos de relaxação do último espectro e compará-lo aos demais. É interessante observar que, apesar de muito menor intensidade, o T_2 observado para o último pico também se localiza na mesma região das emulsões anteriores ($1,5 \times 10^6 \mu\text{s}$). Isso nos revela um perfil de comportamento semelhante para as emulsões produzidas, nos quatro casos apresentados. Comparando-se o comportamento dos constituintes isolados e após a

construção das emulsões (figs. 17 e 18), observa-se uma queda considerável nos tempos de relaxação(T_2) verificados, indicando que todos sofreram uma reacomodação no sistema, estando profundamente comprometidos. DICKINSON (1998), apresenta uma distribuição da β -caseína em emulsões semelhantes, na forma de monocamada altamente não uniforme composta de “trains” e “loops”(75/80% da molécula), com uma região hidrofóbica bem presa à interface e uma região altamente carregada bem distante (20-25% da cadeia) (LECLERC & CALMETTES 1997). Por modelagem molecular, foi proposto por CASSIANO & ARÊAS(2000 e 2003) que após entrada da proteína no meio lipídico, quatro dos cinco resíduos de fosfoserinas, localizados na região altamente carregada da molécula, permanecem presos à interface.

A análise dos espectros gerados para as amostras sugere que não deve existir quantidade apreciável de nenhum dos componentes envolvidos, na forma livre. Comparando-se cada espectro com os registros obtidos dos componentes isolados(fig. 17) não se verificam os tempos de relaxação correspondentes. Esses dados podem sugerir, que a pequena concentração de proteína utilizada para construir as emulsões é responsável pela agregação de todo o material lipídico e aquoso do meio. Isso porque a eficiente combinação entre estruturas rígidas e flexíveis dessa molécula favorece alta hidratação pela acomodação de grandes quantidades de água no interior das estruturas de caseína (QI PX 2001).

7 Conclusões

- A β -caseína em solução produziu agregados de diversos tamanhos moleculares constituídos apenas por uma proteína, verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições dissociantes (SDS e uréia).
- Foi observada importante redução da mobilidade molecular de todos os componentes da emulsão, β -caseína, água e decano, indicando a alta estruturação e comprometimento dos mesmos na estruturação formada neste processo.
- Pode-se concluir que nos sistemas emulsionados nas proporções estudadas não deve restar água, proteína ou componente apolar (decano) livres.
- Os valores de T_2 obtidos por Ressonância Magnética Nuclear de prótons foram úteis para a descrição das emulsões, permitindo uma avaliação da estruturação observada.
- A análise de multicomponentes realizada nos espectros de T_2 obtidos por CPMG permite uma determinação dos vários contribuintes na emulsão podendo se constituir numa ferramenta quantitativa de avaliação de emulsões.

- Essa restrição de mobilidade observada pode ser correlacionada com outras propriedades de emulsões obtidas por outros métodos (reologia, microscopia, turbidimetria) e aceitas como indicadores de qualidade para se ter uma avaliação alternativa da qualidade de emulsões de maneira não destrutiva.

8 Bibliografia básica

1. Arêas JAG, Gröbner GJ, Pellacani LB, Glaubitz C, Watts A. Use of solid state ^2H NMR for studying protein lipid interactions at emulsions interfaces. **Magn Reson Chem** 1997; 35: 119-24.
2. Bastoni L, Bianco A, Piccioni F and Uccella N. Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. **Food Chem** 2001; 73: 145-151.
3. Barfod NM, Krog N Larsen G, Buchheim W. **Fat Sci. Technol.** 1991; 93:24-9.
4. Beek LC ter, Ketelaars M, McCain DC, Smulders PEA, Walstra P and Hemminga MA. Nuclear Magnetic Resonance study of conformation and dynamics of β -casein at the oil/water interface in emulsions. **Biophys J** 1996 may; 70: 2396-402.
5. Bergenstahl BA, Claesson PM.. **In Food emulsions.** 2nd edition. Larsson K, Friberg SE, Eds.: Dekker: New York , 1990.

6. Bobbio PA, Bobbio FO^a . **Química do Processamento de Alimentos**. 2^a edição. São Paulo: Livraria Varela, 1995.
7. Bobbio PA, Bobbio FO^b . **Introdução à Química dos Alimentos**. 2^a edição. São Paulo: Livraria Varela, 1995.
8. Boden N. “Self-assembly and self-organization in fluids.” **Chemistry in Britain** 1990: 345-8.
9. Boden N. Micellar Liquid Crystals . “ **Micelles, Membranes, Microemulsions and Monolayers**”. Fst ed., Springer Verlag: Gelbart WM, Benshaul A, Roux D eds, 1994.
10. Borderías AJ, Monteiro P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Rev Agroq Technol Alim** 1988; 28: 158-69.
11. Brandão MSB. Substâncias Tensoativas. Os fenômenos de autoconstrução e auto-organização de substâncias tensoativas e sua importância na agricultura e biotecnologia. **Rev Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 1999; 8: 30- 4.

12. Byler DM, Farrel HM and Susi H. Raman spectroscopy study of casein structure. **J Dairy Sci** 1988; 71: 2622-9.
13. Cameron DR, Weber ME, Idziak ES, Neufeld RJ, Cooper DG. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. **J Agric Food Chem** 1991; 39: 655-9.
14. Carr HY & Purcell EM. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Phys Rev** 1954; 94: 630-8.
15. Casanova H and Dickinson E. Rheology and flocculation of oil-in-water emulsions made mixtures of α_{s1} -casein + β -casein. **J Colloid Interface Sci** 1998; 207: 82-9.
16. Cassiano MM, Arêas JAG. Study of β -casein at water-lipid interface by molecular modeling. **J mol structure [THEOCHEM]** 2000; 539: 279-88.

17. Cassiano MM, Arêas JAG. Dependence of the interfacial behavior of β -casein on phosphoserine residues. **J Dairy Sci** 2003; 86: 3876-80.
18. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. **Proteínas Alimentarias**. 1ª edição. Zaragoza: Editorial Acríbia, 1989.
19. Chobert JM, Bertrand-Harb C, Nicolas MG. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. **J Agric Food Chem** 1988 mai; 36: 883-92.
20. Coultate TP. **Manual de Química y Bioquímica de los alimentos**. 2ª edição. Zaragoza (Espanha): Editorial Acríbia, 1998.
21. Courthaudon JL and Dickinson E. Competitive adsorption of lecithin and β -casein in oil in water emulsions. **J Agric Food Chem** 1991; 39, 1365-8.
22. Curtis SA, Curini R, Delfini M, Brosio E, D'Ascenzo F AND Bocca B. Amino Acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: a NMR study. **Food Chem** 2000; 71: 495-502.

23. Dickinson E. Casein in emulsions: interfacial properties and interactions. **Int Dairy J** 1999; 9: 305-312.
24. Dickinson E. Surface and emulsifying properties of caseins. **J Dairy Res** 1989; 56: 471-477.
25. Dickinson E. Protein-stabilized emulsions. **J Food Eng** 1994; 22: 59-74.
26. Dickinson E, Rolfe SE & Dalgleish DG. Competitive adsorption of α S₁-casein and β -casein in oil-in-water emulsion. **Food Hydrocoll** 1988; 2: 397-405.
27. Dickinson E, Stainsby G. Colloids in food. **Applied Sci** London 1982.
28. Evers OA, Scheutjens JMHM & Fleer GJ. Statistical thermodynamics of block copolymer adsorption. 3. Interaction between adsorbed layers of block copolymers. **Macromol** 1991; 24: 5558-5566.
29. Fang Y & Dalgleish DG. Structures and properties of vesicles formed from phospholipids and caseins. **Food Res Int** 1996; 29: 201-6.

30. Fisher LR, Parker NS. **In advances in Food Emulsions and Foams**; Dickinson E, Stainsby G, Eds.; Elsevier Applied Sci: London, 1988; pp 45-90.
31. Furtado MAM, Gomes JC, Silva CAS, Ornellas CBD, Silvestre MPC. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciênc agrot(Lavras)**2001; 25: 625-39.
32. Gava AJ. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. 1ª edição. São Paulo: Nobel, 1999.
33. Ginger MR, Grigor MR. Review: Comparative aspects of milk caseins. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol** 1999 jan; 124(Pt B): 133-45.
34. Günther H. **NMR Spectroscopy. Basic principles, concepts, and applications in chemistry**. 2ª edição. Siegen (Germany): John Wiley & sons, 1998.
35. Haque ZU. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: A review 1. **J Dairy Sci** 1993; 76: 311-20.

36. Harwalker VR, Cholette RC, McKellar RC & Emmons DB. Relation between proteolysis and adstringent off-flavor in milk. **J Dairy Sci** 1993; 76: 2521-7.
37. Hinrichs R, Götz J and Weisser H. Water-holding capacity and structure of hydrocolloid-gels, WPC-gels and yogurts characterized by means of NMR. **Food Chem** 2003; 82: 155-160.
38. Hore PJ. **Nuclear Magnetic Resonance**. 1^a edição. Oxford (Great Britain): Oxford Science Publications, 1996.
39. Kahlon TS, Xu R and Chow FI. Comparison of lipoprotein fractionation by sequential density gradient ultracentrifugation with precipitation or fast phase liquid chromatography. **Food Chem** 2001; 75: 115-122.
40. Katsiari MC, Voutsinas LP and Kondyli E. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. **Food Chem** 2002; 77: 413-420.
41. Kumosinski TF, Brown EM, Farrel HM Jr. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized β -casein structure. **J Dairy Sci** 1993; 76: 931-45.

42. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature** 1970; 227: 680-5.
43. Leaver J & Thomson G. Influence of heating and cooling on the trypsinolysis of caseins in bovine milk. **Milchwiss** 1993; 48: 378-82.
44. Leclerc E & Calmettes P. Interactions in micellar solutions of β -casein. **Phys Rev Letters** 1997; 78: 150-153.
45. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Ed. São Paulo: Editora Savier, 1995.
46. Lucey JA, Srinivasan M, Singh H & Munro PA. Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size exclusion chromatography. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 1610-1616.
47. Meiboom S & Gill D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Rev Sci Instrum** 1958; 29: 688-91.

48. Michalsky WP, Shiell BJ. Review: Strategies for analysis of eletrophoretically separeted proteins and peptides. **Anal Chimica Acta** 1999; 383: 27-46.
49. Morr CV. **Functional properties of milk proteins and their use as food ingredients.** In P.F.Fox, **Dev Dairy Chem-1** 1982(pp.375-399) London: Applied Science.
50. Moughal KI, Munro PA & Singh H. Suspension Stability and size distribution of particles in reconstituted commercial calcium caseinates. **Int Dairy J** 2000; 10: 683-690.
51. Murphy JM & Fox PF. Functional properties of alfa, kappa or beta-rich casein fraction. **Food Chem** 1991; 39: 211-28.
52. Mulvihill DM & Fox PF. Physico-chemical and functional properties of milk proteins. In P.F.Fox, **Dev Dayry Chem-4**(pp.131-172) London: Elsevier Applied Science.

53. Murray BS, & Dickinson E. Interfacial rheology and the dynamic properties of adsorbed films of food proteins and surfactants. **Food Sci Technol Int(Japan)** 1996; 2: 131-145.
54. Osborn HT, Akoh CC. Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. **Food Chem** 2004; 84: 451-456.
55. Qi PX, Brown EM, Farrell Jr. HM. New views on structure-function relationships in milk proteins. **Trends Food Sci Technol** 2001; 12: 339-346.
56. Rasmussen LK, Johnsen LB, Tsiora A, Sorensen ES, Thomsen JK, Nielsen NC, Jakobsen HJ, Petersen TE. Disulfide-linked caseins and casein micelles. **Int Dairy J** 1999; 9: 215-18.
57. Regenstein JM, Regenstein CE. **Food protein chemistry. An introduction for food scientists**. 1^a edição. London: Academic Press Inc. Ltd, 1984.
58. Renou JP, Foucat L, Bonny JM. Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. **Food Chem** 2003; 82: 35-39.

59. Renou JP, Deponge C, Gachon P, Bonnefoy JC, Coulon JB, Gareil JP, Verité R and Ritz P. Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. **Food Chem** 2004; 85: 63-66.
60. Robertson T, Schmidt S, Klein B. Applications of NMR in sensory science. **Trends Food Sci Technol** 1992, 3: 236-40.
61. Schmidt DG & Poll JK. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of alfa-lactoalbumin and beta-lacto-globulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. **Neth Milk Dairy J** 1991; 45: 225-40.
62. Silvestre MPC. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Chem** 1997; 60(2): 263-71.
63. Sgarbieri VC. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol SBCTA** 1998 jan/ago; 32: 105-26.

64. Singh H, Fox PF & Cuddigan M. Emulsifying properties of protein fractions prepared from heated milk. **Food Chem** 1993; 47: 1-6.
65. Srinivasan M, Singh H, Munro PA. Adsorption behavior of sodium and calcium caseinates in oil-in-water emulsions. **Int Dairy J** 1999; 9: 337-41.
66. Srinivasan M, Singh H, Munro PA. Influence of retorting (121°C for 15 min), before or after emulsification, on the properties of calcium caseinate oil-in-water emulsions. **Food Chem** 2003; 80: 61-69.
67. Sood SM and Slattery CW. Association of the quadruply phosphorylated β -casein from human milk with the nonphosphorylated form. **J Dairy Sci** 2000; 83: 2766-2770.
68. Swaisgood HE. Symposium: Genetic perspectives on milk proteins. Comparative studies and nomenclature [Review and update of casein chemistry]. **J Dairy Sci** 1993; 10: 3054-61.
69. Wilkinson C, Dijksterhuis GB, Minekus M. From Food Structure to Texture. **Trends Food Sci Technol** 2000; 11: 442-50.

70. Ye A, Srinivasan M, Singh H. Influence of NaCl addition on the properties of emulsions formed commercial calcium caseinate. **Food Chem** 2000; 69: 237-244.
71. Zaia DAM, Zaia CTBV e Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim Nova** 1998; 21(6): 787-793.

9 Anexos

9.1 Determinação de prótons contribuintes da β -caseína

	C	H	N	O	S	P	MM	Nº resíduos	Mtotal	nº H total	nºH lábeis/mo l	nºH lábeis total	m H total	m H lábeis/mol	m H não lábeis/mol
Gly	2	5	1	2	0	0	75,0670	5	375,3350	25	3	15	25,1975	15,1185	10,0790
Ala	3	7	1	2	0	0	89,0941	5	445,4706	35	3	15	35,2765	15,1185	20,1580
Val	5	11	1	2	0	0	117,1479	19	2225,8097	209	3	57	210,6511	57,4503	153,2008
Leu	6	13	1	2	0	0	131,1748	22	2885,8447	286	3	66	288,2594	66,5214	221,7380
Ileu	6	13	1	2	0	0	131,1748	10	1311,7476	130	3	30	131,027	30,2370	100,7900
Pro	5	8	1	2	0	0	114,1241	35	3994,3421	280	2	70	282,212	70,5530	211,6590
Phe	9	11	1	2	0	0	165,1919	9	1486,7269	99	3	27	99,7821	27,2133	72,5688
Tyr	9	11	1	3	0	0	181,1913	4	724,7651	44	4	16	44,3476	16,1264	28,2212
Trp	11	12	2	2	0	0	204,2286	1	204,2286	12	4	4	12,0948	4,0316	8,0632
Ser	3	7	1	3	0	0	105,0935	11	1156,0287	77	4	44	77,6083	44,3476	33,2607
Thr	4	9	1	3	0	0	119,1204	9	1072,0836	81	4	36	81,6399	36,2844	45,3555
Cys	3	7	1	2	1	0	121,1601	0	0,0000	0	3	0	0	0,0000	0,0000
Met	5	11	1	2	1	0	149,2139	6	895,2833	66	3	18	66,5214	18,1422	48,3792
Asn	4	8	2	3	0	0	132,1192	5	660,5960	40	5	25	40,316	25,1975	15,1185
Gln	5	10	2	3	0	0	146,1461	21	3069,0677	210	5	105	211,659	105,8295	105,8295
Lys	6	14	2	2	0	0	146,1894	11	1608,0838	154	5	55	155,2166	55,4345	99,7821
Arg	6	14	4	2	0	0	174,2029	4	696,8117	56	4	16	56,4424	16,1264	40,3160
His	6	9	3	2	0	0	155,1565	5	775,7824	45	4	20	45,3555	20,1580	25,1975
Asp	4	7	1	4	0	0	133,1039	4	532,4157	28	4	16	28,2212	16,1264	12,0948
Glu	5	9	1	4	0	0	147,1308	18	2648,3544	162	4	72	163,2798	72,5688	90,7110
SerP	3	7	1	7	0	1	200,0649	5	1000,3244	35	4	20	35,2765	20,1580	15,1185
Total								209	27769,1020	2074	77	727	2090,3846	732,7433	1357,6413
Total descartando lig. Peptídicas							PM beta-caseína		23985,9100	1654			1667,0666	521,0843	1145,9823
												%	6,9502	2,1725	4,7777

9.2 Parâmetros de aquisição dos espectros

- T₂ água pura

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90° (μs)	P90	3,75
Pulso de 180° (μs)	P180	7,5
Tempo morto 1° sinal RMN (μs)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (μs)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro	SF	23,331800 (MHz)
Variação da frequência (Hz)	O1	-2650,11

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (μs)	DW	10,0
N° de pontos por eco	SI	1
Número de ecos	NECH	32768
Número de experimentos (scans)	NS	4
Ganho do receptor (%)	RG	8,00
Intervalo entre sucessivos experimentos	RD	15000000,00 (μs)
Intervalo entre sucessivos ecos (μs)	TAU	200,0
Pulso de 90° Lista de Fases	PH1	0213
Receptor Lista de Fases	PH2	0213
Pulso de 180° Lista de Fases	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- T₂ decano

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90 ^o (us)	P90	3,75
Pulso de 180 ^o (μs)	P180	7,5
Tempo morto 1 ^o sinal RMN (μs)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (μs)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Varição da frequência (Hz)	O1	-3788,18

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (μs)	DW	10,0
N ^o de pontos por eco	SI	1
Número de ecos	NECH	32768
Número de experimentos (scans)	NS	4
Ganho do receptor (%)	RG	8,00
Intervalo entre sucessivos experimentos	RD	15000000,00 (μs)
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	100,0
Pulso de 90 ^o Lista de Fases	PH1	0213
Receptor Lista de Fases	PH2	0213
Pulso de 180 ^o Lista de Fases	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- **β -caseína em D₂O**

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90° (us)	P90	3,75
Pulso de 180° (us)	P180	7,5
Tempo morto 1° sinal RMN (us)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (us)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Variação da frequência (Hz)	O1	-11062,90

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (us)	DW	10,0
N° de pontos por eco	SI	1
Número de ecos	NECH	16384
Número de experimentos (scans)	NS	844
Ganho do receptor (%)	RG	100,00
Intervalo entre sucessivos experimentos (scans)(us)	RD	10000000,00
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	100,0
Pulso de 90° Phase List (rec:0213)	PH1	0213
Receptor Phase List (rec:0213)	PH2	0213
Pulso de 180° Phase List (rec: 1122)	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- **T₂ amostra 1 - todos os componentes protonados**

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90 ^o (us)	P90	3,8
Pulso de 180 ^o (us)	P180	7,6
Tempo morto 1 ^o sinal RMN (us)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (us)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Variação da frequência (Hz)	O1	-5309,12

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (us)	DW	10,0
N ^o de pontos por eco	SI	4
Número de ecos	NECH	16384
Número de experimentos (scans)	NS	16
Ganho do receptor (%)	RG	50,00
Intervalo entre sucessivos experimentos (scans)(us)	RD	10000000,0
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	100,0
Pulso de 90 ^o Phase List (rec:0213)	PH1	0213
Receptor Phase List (rec:0213)	PH2	0213
Pulso de 180 ^o Phase List (rec: 1122)	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- T₂ amostra 2 – somente decano protonado

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90° (us)	P90	3,8
Pulso de 180° (us)	P180	7,6
Tempo morto 1° sinal RMN (us)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (us)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Varição da frequência (Hz)	O1	-8159,58

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (us)	DW	10,0
N° de pontos por eco	SI	1
Número de ecos	NECH	32768
Número de experimentos (scans)	NS	16
Ganho do receptor (%)	RG	32,00
Intervalo entre sucessivos experimentos (scans)(us)	RD	10000000,00
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	100,0
Pulso de 90° Phase List (rec:0213)	PH1	0213
Receptor Phase List (rec:0213)	PH2	0213
Pulso de 180° Phase List (rec: 1122)	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- **T₂ amostra 3 – somente decano deuterado (proteína em água)**

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90 ^o (us)	P90	3,8
Pulso de 180 ^o (us)	P180	7,6
Tempo morto 1 ^o sinal RMN (us)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (us)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Variação da frequência (Hz)	O1	-9136,77

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000,00
Intervalo entre pontos sucessivos (us)	DW	10,0
N ^o de pontos por eco	SI	2
Número de ecos	NECH	16384
Número de experimentos (scans)	NS	16
Ganho do receptor (%)	RG	100,00
Intervalo entre sucessivos experimentos (scans)(us)	RD	10000000,00
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	100,0
Pulso de 90 ^o Phase List (rec:0213)	PH1	0213
Receptor Phase List (rec:0213)	PH2	0213
Pulso de 180 ^o Phase List (rec: 1122)	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2

- **T₂ amostra 4 – Todos os componentes deuterados (somente prótons não lábeis da β-caseína)**

---SISTEMA---

Descrição	ID	Valor
Pulso de 90° (us)	P90	3,75
Pulso de 180° (us)	P180	7,5
Tempo morto 1° sinal RMN (us)	DEAD1	5,0
Tempo morto filtro (us)	DEAD2	20,0
Frequência do espectrômetro (MHz)	SF	23,331800
Varição da frequência (Hz)	O1	-5046,04

---APLICAÇÃO---

Descrição	ID	Valor
Largura do filtro (Hz)	FW	100000.00
Intervalo entre pontos sucessivos (us)	DW	10,0
Nº de pontos por eco	SI	2
Número de ecos	NECH	16384
Número de experimentos (scans)	NS	512
Ganho do receptor (%)	RG	100,00
Intervalo entre sucessivos experimentos (scans)(us)	RD	10000000,0
Intervalo entre sucessivos ecos (us)	TAU	150,0
Pulso de 90° Phase List (rec:0213)	PH1	0213
Receptor Phase List (rec:0213)	PH2	0213
Pulso de 180° Phase List (rec: 1122)	PH3	1122
Aquisições iniciais descartadas	DS	2