

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

ESTUDO ESTRUTURAL DA GLIADINA

Andresa da Costa Ribeiro

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, julho de 2012.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

ESTUDO ESTRUTURAL DA GLIADINA

Andresa da Costa Ribeiro

Dissertação realizada sob a orientação da Prof^a Dr^a Nádyá Pesce da Silveira e co-orientação da Prof^a Dr^a Rosane Michele Duarte Soares, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais.

Porto Alegre
2012.

**À minha família,
Ao meu esposo, pelo amor, dedicação, companheirismo e compreensão sempre.**

AGRADECIMENTOS

À Nádyá pela orientação, amizade, apoio e confiança durante o desenvolvimento desta dissertação;

À Rosane pela co-orientação, amizade, apoio e disponibilidade sempre;

À Jóice, pela dedicação e ajuda na realização dos experimentos como aluna de iniciação científica;

Aos demais ICs, em especial, à Bibi Chagas, Daiani Schimtz, Renan e José Daniel, que também auxiliaram a realização de experimentos;

Aos colegas de laboratório Joelson, Maria, Noor, Simone, Mariana, Doyle, Miriam e Quélen pela amizade em todos os momentos;

Ao colega Felipe Kessler e a bolsista de iniciação científica Gabriela Lando, pela ajuda nas análises de FTIR-ATR;

Aos colegas das disciplinas cursadas, Cíntia, Melissa, Angeloni e Nataly pelo companheirismo;

À Gisele, pela amizade, pelos conselhos, companheirismo e ensinamentos de Espalhamento de Luz, Viscosidade e demais técnicas do LINDIM. Foste essencial para o meu crescimento tanto pessoal como profissional;

À Yasmine, pela amizade e por todos os ensinamentos com o programa ORIGIN, com o REPES e Espalhamento de Luz;

À Daiani Leite, pela amizade, apoio e aprendizado com gráficos no Excel;

Aos meus pais, pelo amor incondicional, em especial à minha mãe, minha melhor amiga, que esteve presente em todos os momentos bons e ruins;

Às minhas irmãs, sobrinhos, sogra, sogro e cunhada pelo apoio;

Aos meus amigos fiéis e inseparáveis Leci, Diego e Felipe, pela presença constante e amizade sincera;

À Moisés, meu amor, por tudo...

À UFRGS pelo conhecimento e oportunidade de minha formação intelectual e a todos os professores que tive, principalmente os do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais;

À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA DISSERTAÇÃO

- ✓ Preliminary studies of interaction between gliadin and starch biomacromolecules in solution
3rd French Brazilian Meeting on Polymers – Florianópolis – SC – 2011.
- ✓ Análise da conformação da gliadina por espalhamento de luz dinâmico
11º Congresso Brasileiro de Polímeros – Campos do Jordão – SP – 2011.
- ✓ Gliadin conformation analysis by FT-IR
X Brazilian MRS Meeting – Gramado – RS – 2011.
- ✓ Análise da estrutura secundária da gliadina por FTIR
3º Encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces – São Pedro – SP – 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. FARINHA DE TRIGO E GLÚTEN	21
2.2. GLIADINA.....	26
2.2.1. Definição	26
2.2.2. Classificação da Gliadina	27
2.2.3. Estrutura Secundária das proteínas	30
2.2.3.1. A Estrutura da Gliadina.....	31
2.3. DOENÇA CELÍACA	33
2.4. O ESTUDO HIDRODINÂMICO DE PROTEÍNAS	35
2.5. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS).....	37
2.5.1. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	39
2.6. POTENCIAL ZETA (PZ)	41
2.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR)	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. OBJETIVOS GERAIS	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE	45
4.1. MATERIAIS	45
4.2. MÉTODOS DE ENSAIO	45
4.2.1. Espalhamento de Luz (LS).....	45
4.2.1.1. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	46
4.2.2. Potencial Zeta (PZ).....	46
4.2.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)	49

5.1.1.	Análise do Índice de Polidispersão da Gliadina em Solução	49
5.1.2.	Análise do Coeficiente de difusão Aparente (D_{ap}) da Gliadina em Solução	51
5.1.3.	Análise do Diâmetro Hidrodinâmico da Gliadina em Solução	53
5.1.3.1.	Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico para a Amostra em H ₂ O deionizada.....	54
5.1.3.2.	Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico para a Amostra em DMSO.....	57
5.1.3.3.	Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico para a Amostra em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v.....	60
5.1.3.4.	Análise dos Diâmetros Hidrodinâmicos Relacionando os solventes.....	63
5.2.	POTENCIAL ZETA.....	65
5.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	68
5.3.1.	Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em H ₂ O deionizada por FTIR-ATR	69
5.3.2.	Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em DMSO por FTIR-ATIR.....	72
5.3.3.	Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v por FTIR-ATIR.....	75
6.	DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS E A GLIADINA	79
7.	CONCLUSÕES.....	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido natural : o grupo R ou cadeia lateral (rosa) ligado ao carbono α (azul) é diferente em cada aminoácido. 18
- Figura 2. Representação esquemática das diferentes conformações apresentadas por uma proteína. 19
- Figura 3. Projeção na produção e consumo de trigo no Brasil até 2020/2021 (mil toneladas). 22
- Figura 4. Representação da prolamina (gliadina) e glutenina presentes no glúten 23
- Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a interação estrutural entre a gliadina e glutenina 24
- Figura 6. Demonstração das propriedades da gliadina (extensibilidade) e glutenina (elasticidade) Características estruturais das subunidades das gluteninas de alta massa molecular que podem determinar a elasticidade do glúten. 24
- Figura 7. Características estruturais das subunidades das gluteninas de alta massa molecular que podem determinar a elasticidade do glúten. 24
- Figura 8. Modelo para o efeito de hidratação. 1) configuração de equilíbrio. 2) pequena extensão, somente os “loops” são deformados. 3) grande extensão, os “loops” são achatados e as ligações de hidrogênio estão quebradas de modo que as cadeias deslizem uma sobre as outras. 25
- Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da α -gliadina, uma das frações da gliadina 26
- Figura 10. Estruturas de α -, γ - e ω -gliadina – B, D e F respectivamente – (amarelo) e subunidades da glutenina de baixa massa molecular – A, C, E e G respectivamente – (azul). 28
- Figura 11. Estrutura esquemática da α -gliadina. A proteína consiste de um domínio N-terminal curto (S), seguido por um domínio repetitivo (R) e um domínio não repetitivo longo (NR1) e separados por duas repetições poli-glutâmicas (Q1 e Q2). Nos domínios não repetitivos cinco resíduos conservados estão presentes. 29

Figura 12. Modelo estrutural da γ -gliadina. A sequência começa com um sinalizador com 20 resíduos, seguido por um domínio N-terminal curto não repetitivo (I), um domínio variável altamente repetitivo (II), um domínio não repetitivo contendo a maioria dos resíduos de cisteína (III), uma região rica em glutamina (IV) e um domínio C-terminal não repetitivo contendo dois resíduos de cisteína conservados (V).....	29
Figura 13. Níveis estruturais de proteínas: a estrutura primária consiste de uma sequência de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas e inclui todas as ligações dissulfeto. O polipeptídico resultante pode ser enrolado em unidades de estrutura secundária, tais como α -hélice. A hélice é uma parte da estrutura terciária do polipeptídeo dobrado, o que é em si uma das subunidades que compõem a estrutura quaternária de uma proteína.....	30
Figura 14. Diagrama esquemático de estruturas secundárias geralmente adotadas por proteínas: a) estrutura aleatória (<i>random coil</i>), b) α -hélice e c) folhas- β anti paralelas.....	31
Figura 15. Diferentes graus de imagens do intestino delgado de pacientes com doença celíaca: a e b) vilosidades normais; c e d) atrofia leve/moderada das vilosidades; e e f) vilosidades totalmente atrofiadas.	34
Figura 16. Diagrama dos processos que podem ocorrer em uma proteína quando em solução: estado nativo (conformação original), parcialmente enovelada, agregada e desenovelada.....	35
Figura 17. Diagrama de energia-entropia para o dobramento de proteínas e agregação. A largura do diagrama representa a entropia, e a profundidade, a energia. A proteína não dobrada progride desde um estado desordenado de alta entropia (azul) para um único estado de conformação nativa com baixa entropia (verde) e energia. Região A: descreve a busca conformacional de uma única cadeia polipeptídica de um monômero funcional. Região B: associações intermoleculares da proteína (agregação) aumentam drasticamente o tamanho do funil	36
Figura 18. Representação da distribuição de íons de uma partícula esférica carregada negativamente dispersa em um líquido.	41
Figura 19. Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier.	43
Figura 20. Representação de uma célula de reflexão atenuada total.....	47

Figura 21. Função de correlação temporal obtida para as amostras de gliadina em H ₂ O deionizada, gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v e gliadina em DMSO no pH 9,8 à 24°C.....	50
Figura 22. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em H ₂ O deionizada em função do diâmetro hidrodinâmico nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8 à 24°C.....	54
Figura 23. Ilustração de moléculas de H ₂ O (esferas azuis) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado desenovelado.	55
Figura 24. Ilustração de moléculas de H ₂ O deionizada (esferas azuis) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado enovelado (ilustração sugerida para o pH 9,8).....	56
Figura 25. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em DMSO em função do diâmetro hidrodinâmico nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8 à 24°C.....	57
Figura 26. Ilustração de moléculas de DMSO (esferas amarelas) formando uma camada de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado nativo (A), desenovelada (B) e agregada (C).....	59
Figura 27. Ilustração de moléculas de DMSO (esferas amarelas) formando uma camada de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos que agora ficaram expostos)) no estado parcialmente colapsado (A), desenovelada (B) e agregada (C)	60
Figura 28. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v em função do diâmetro hidrodinâmico nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8 à 24°C	61
Figura 29. Ilustração de moléculas de H ₂ O/EtOH 40/60% v/v (esferas verdes) formando uma camada de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado desenovelado	62
Figura 30. Ilustração de moléculas de H ₂ O/EtOH 40/60% v/v (esferas verdes) formando uma camada de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa) no estado nativo (A), desenovelada (B) e agregada (C) (ilustração sugerida para o pH 9,8).....	63

Figura 31. Potencial Zeta como função do pH das amostras de gliadina em H ₂ O deionizada e em DMSO	66
Figura 32. Solução de gliadina em água nos pHs (A) 6,8 onde a proteína tem uma tendência a agregação e (B) 9,8 onde a proteína tende a uma leve estabilidade.....	67
Figura 33. Espectro do filme de gliadina em H ₂ O deionizada no pH 9,8: A) espectro original na região da banda de amida I, B) espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas).....	70
Figura 34. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em H ₂ O deionizada nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8.....	70
Figura 35. Espectro do filme de gliadina em DMSO no pH 9,8: A) espectro original na região da banda de amida I, B) espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas)	73
Figura 36. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em DMSO nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8.....	74
Figura 37. Espectro do filme de gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v no pH 9,8: A) espectro original na região da banda de amida I, B) espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas).....	76
Figura 38. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Principais países consumidores de trigo, consumo total e específico (milhões de toneladas), na safra 2011/2012.....	21
Tabela II. Composição das proteínas da farinha de trigo.....	22
Tabela III. Índice de polidispersão (<i>PD. I</i>) das amostras em H ₂ O deionizada, H ₂ O/EtOH 40/60% v/v e DMSO nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8.	51
Tabela IV. <i>D_{ap}</i> da gliadina nos solventes H ₂ O deionizada, H ₂ O/EtOH 40/60% v/v e DMSO pHs 1,2; 6,8 e 9,8 (a partir do programa CONTIN (<i>software</i> Bookhaven Instruments)).	53
Tabela V. Média dos diâmetros hidrodinâmicos (<i>D_h</i>) das partículas de gliadina nos solventes analisados nos pHs 1,2, 6,8 e 9,8.	63
Tabela VI. Bandas na região do infravermelho características das bandas Amida I.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Agregado

A_2 : segundo coeficiente virial

AFM: Microscopia de Força Atômica

ATR: *Attenuated Total Reflection*

α : polarizabilidade

β : fator que depende da geometria experimental

B: linha de base

CD: Dicroísmo Circular

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

D_{ap} : Coeficiente de Difusão aparente

DC: Doença celíaca

D: Desenovelado

d_f : dimensão fractal

D_h : diâmetro hidrodinâmico

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

DMSO: Dimetilsulfóxido

ϵ : constante dielétrica

ELS: *Electrophoretic Light Scattering*

EtOH: Etanol

FDA: *Food and Drug Administration*

$f(ka)$: função de Henry

FTIR: Infravermelho por Transformada de Fourier

$g_{(1)}(\tau)$: função de correlação do campo elétrico

$g_{(2)}(\tau)$: função de correlação da intensidade

Gln: Glutamina

HMW-GS: Glutenina de alta massa molecular

HSA: Albumina de soro humano

I_θ : luz espalhada

I_0 : luz incidente

$I(t)$: intensidade de espalhamento de luz

k_B : constante de Boltzmann

k_c : constante relacionado ao incremento do índice de refração

k_e : vetor de onda da radiação espalhada
 k_i : vetor de onda da radiação incidente
 λ : comprimento de onda
LMW-GS: Glutenina de baixa massa molecular
LS: Espalhamento de Luz
 μ_e : mobilidade eletroforética
MeOH: Metanol
 μ_2 : variância de distribuição
 M_w : massa molecular ponderal média
 N_A : número de Avogrado
N: equilíbrio nativo
 n_θ : índice de refração
NR1: domínio não repetitivo longo
 N : número de partículas espalhantes
 η : viscosidade
PD. I: índice de polidispersão
PE: Parcialmente enovelado
Phe: Fenilalanina
PI: Ponto Isoelétrico
 ζ : Potencial Zeta
Pro: Prolina
PZ: Potencial Zeta
Q1 e Q2: poliglutamínicas
 q : vetor de espalhamento
 r : distância entre o centro de espalhamento e o observador
R: domínio repetitivo
ROA: Atividade Óptica Raman
 R_θ : razão de Rayleigh
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
S: domínio N-terminal curto
 Γ : taxa de relaxação média
 T : temperatura
 t : tempo
 τ : tempo de atraso (*delay time*)

TFE: Trifloretoanol

Tyr: Tirosina

θ : ângulo formado entre a direção de propagação da luz espalhada com a luz incidente

RESUMO

O objetivo deste trabalho visou realizar o estudo físico-químico da gliadina em solução, em diferentes solventes e sob variação de pH. Os solventes usados foram H₂O deionizada, H₂O/EtOH 40/60% v/v e dimetilsulfóxido (DMSO). As técnicas utilizadas foram Espalhamento de Luz (LS), Potencial Zeta (PZ) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). LS revelou a presença de um sistema polidisperso para todas as amostras, com a presença de moléculas pequenas coexistindo com moléculas maiores. O coeficiente de difusão sofreu mudanças com a variação de pH, o que corroborou com os resultados de diâmetro observados. A gliadina em H₂O deionizada e DMSO (pH 9,8) apresentaram uma menor distribuição de tamanho. Para as amostras em H₂O/EtOH 40/60% v/v este fato foi observado apenas em pH 1,2. A análise de PZ forneceu informações sobre a estabilidade do sistema. Para a amostra em H₂O deionizada, a estabilidade foi observada em pH 9,8. Em DMSO verificou-se uma instabilidade, com a presença de várias conformações coexistindo no sistema. A análise de FTIR-ATR mostrou-se adequado para o estudo da estrutura secundária. Em H₂O deionizada, a conformação predominante é folhas- β . Em DMSO evidenciou-se uma banda em 1660 cm⁻¹ (relacionado ao desenovelamento da proteína). Já em H₂O/EtOH 40/60% v/v a conformação é instável. Em pH 1,2 foi observado um aumento na estrutura helicoidal. As diferentes conformações encontradas para a proteína e sua estabilidade em diferentes solventes e pHs fornecem uma idéia do potencial de aplicação desta proteína como biomaterial, em especial como bioadesivo.

ABSTRACT

This work presents the physical-chemical study of the gliadin in different solvents and pH, using Light Scattering (LS), Zeta Potential (ZP) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques. The solvents used were H₂O, H₂O/EtOH 40/60% v/v and dimethylsulfoxide (DMSO). Dynamic Light Scattering (DLS) indicated the presence of a polydispersity system for all samples (small and larger molecules coexisting). Samples in DMSO and H₂O showed a lower size distribution at pH 9.8, while samples in H₂O/EtOH 40/60% v/v only at pH 1.2. The ZP analysis were used to study the system stability, showing that the gliadin in water at pH 9.8 was the most stable system. In addition, the ZP results suggest that the gliadin in DMSO is unstable due to presence of several conformations of protein at all pH. The ATR-FTIR analysis showed to be appropriate for the secondary structure study, showing that the samples in H₂O were predominantly β -sheets. In DMSO an absorption band was observed at 1660 cm⁻¹ (this band indicate the unfolding of the protein). The conformations of samples in H₂O/EtOH 40/60% v/v are unstable, besides at pH 1.2 it was observed that the helical structure increased. The several conformations and stabilities for the gliadin at different solvents and pH provide an idea of the application potential of this protein as a biomaterial, with a bioadhesive.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a luta por uma sociedade sustentável iniciou um aumento no estudo de materiais baseados em recursos renováveis, ou biomateriais, em substituição a materiais com bases fósseis e sintéticas.^{1, 2, 3} As alternativas para a produção de biomateriais incluem uma variedade de proteínas e polissacarídeos. Dentre as proteínas, podem-se citar as proteínas do soro do leite, caseína, proteínas da soja, gelatina, zeína e proteínas do trigo.⁴

Sabe-se que em proteínas, diversas interações intra e intermoleculares estão presentes e estudos indicam que as conformações assumidas por uma proteína e suas interações podem afetar as características dos diversos materiais desenvolvidos. Dentro deste contexto, surge a necessidade de estudarem-se os biomateriais em nível molecular, determinando as características de interações entre moléculas, através de diferentes técnicas experimentais, bem como determinar-se a estruturação molecular característica em cada caso.^{5, 6}

Quanto a sua origem, as proteínas são polímeros de origem biológica, constituídos por unidades estruturais conhecidas como aminoácidos os quais apresentam diferenças em relação a sua cadeia lateral ionizável. São encontrados aproximadamente 20 tipos de aminoácidos na natureza. Os mesmos apresentam um grupo carboxílico (COO^-) e um grupo amino (H_3N^+) ligado a um átomo de carbono (carbono α) (Figura 1).^{7, 8}

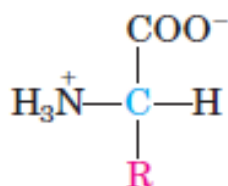


Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido natural: o grupo R ou cadeia lateral (rosa) ligado ao carbono α (azul) é diferente em cada aminoácido.⁷

A diferença existente entre os aminoácidos naturais está relacionada às cadeias laterais, ou grupos R, que variam em estrutura, tamanho, carga elétrica, influenciando a solubilidade dos aminoácidos.⁷ Os mesmos ligam-se covalentemente por ligações peptídicas ou ligações dissulfeto formando uma longa cadeia peptídica (uma proteína apresenta mais de 100 aminoácidos e sua cadeia é chamada de cadeia polipeptídica).⁸

Para as proteínas, a tarefa de descrever e compreender suas estruturas é abordado em vários níveis de complexidade, organizados em uma espécie de hierarquia conceitual, nesse caso, suas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias.⁷

O arranjo espacial dos átomos de uma proteína que vão formar as estruturas é chamado de conformação. As conformações possíveis de uma proteína (*random coil*, globular e *rigid rod*) são mostradas na Figura 2 e incluem qualquer estado estrutural que pode ser alcançado sem quebra das ligações covalentes.⁴

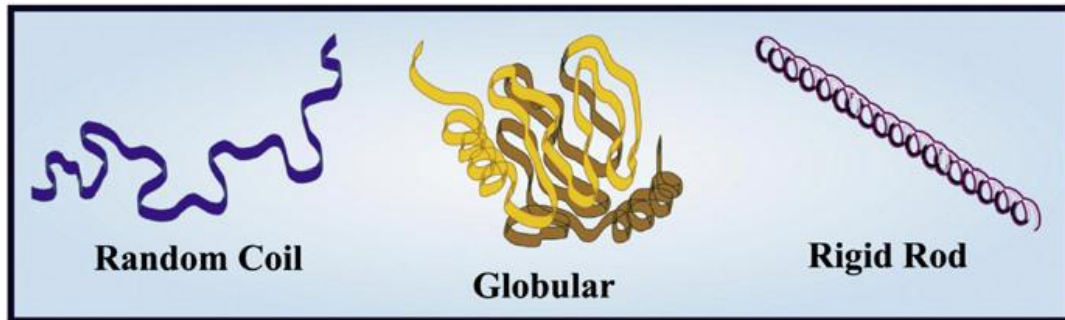


Figura 2. Representação esquemática das diferentes conformações adotadas por uma proteína.⁴

A estrutura molecular global adotada pela proteína depende da sequência específica de aminoácidos, condições ambientais, pressão, solventes, força iônica e pH. As mesmas tendem a adotar uma estrutura que minimiza o total de energia livre do sistema, desde que não haja restrição cinética que as impeça de alcançar este estado de baixa energia. Sendo assim, é importante ter conhecimento da morfologia, propriedades físicas (densidade e índice de refração), tamanho, carga e estabilidade (frente à temperatura, pH e força iônica). Estes fatores determinarão como as proteínas podem afetar as propriedades reológicas, ópticas e características de estabilidade dos produtos nos quais elas são incorporadas.⁴

As proteínas de armazenamento do trigo, constituintes do glúten, apresentam uma grande aplicabilidade, dentre elas, o melhor desempenho da massa durante o cozimento da farinha, elaboração de biomateriais (uma alternativa que tem sido proposta nos últimos anos são adesivos baseados em proteínas do trigo)¹ e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos.^{9,10}

A gliadina, proteína estudada nesta dissertação, está presente no glúten, e apresenta grande interesse industrial.¹¹ Sendo um biopolímero, a mesma pode ser usada na fabricação de biomateriais com aplicabilidade em filmes comestíveis, na confecção de embalagens, na preparação de nanopartículas para liberação controlada de drogas, entre outros.^{11, 12} Por outro lado, fragmentos peptídicos específicos de uma subfração da gliadina (a α -gliadina) tem sido identificado como fator predominante, em alguns indivíduos susceptíveis, pela toxicidade conhecida como doença celíaca.^{11, 13} Esta doença é caracterizada por atrofiar totalmente ou

parcialmente a mucosa do intestino delgado, causando uma má absorção dos alimentos em determinados indivíduos.¹⁴ Logo, conhecer a conformação desta proteína pode vir a facilitar sua detecção no glúten.

Ao longo das duas últimas décadas, tem-se visto avanços consideráveis em metodologias^{11, 14, 15} para a análise de sistemas de biopolímeros em um ambiente onde os mesmos ocorrem naturalmente e executam a sua função biológica, ou seja, um ambiente em solução.¹⁵ Estes avanços incluem o estudo da conformação da proteína a partir de técnicas espectroscópicas (onde se pode determinar a dimensão, a massa molecular, o coeficiente de difusão translacional e o raio da proteína em solução) e eletroforéticas (que informa as características elétricas envolvidas nas interações).^{4, 15} Além disso, a partir das análises espectroscópicas da proteína em solução pode-se analisar o aumento das dimensões da molécula através de agregação, ou diminuição do seu tamanho, resultando em moléculas em equilíbrio termodinâmico.^{16, 17}

Assim, com a finalidade de compreender melhor o caráter conformacional e estrutural da gliadina frente aos solventes, pH e variação de temperatura faz-se necessário uma análise mais detalhada sobre a conformação e estruturação. Esta informação é valiosa para o entendimento desta macromolécula e seu comportamento frente a diferentes condições experimentais. Esta compreensão irá facilitar o entendimento das inúmeras funcionalidades da gliadina, seja em métodos de detecção para diagnóstico da doença celíaca, para sua utilização como potencial biomaterial, ou ainda seu entendimento como subunidade essencial na indústria de processamento de cereais (trigo).¹⁸

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FARINHA DE TRIGO E GLÚTEN

O trigo é uma das culturas de cereais mais importantes do mundo em termos de produção e utilização, juntamente com o milho e o arroz. Ele constitui uma fonte importante de energia, proteína e fibra na nutrição humana e alimentação animal.^{19, 20, 21}

Cerca de 600 milhões de toneladas são colhidas anualmente e o cultivo se estende por uma vasta área geográfica, da Escandinávia à Argentina, incluindo altitudes mais elevadas nos trópicos.²² Os principais países consumidores do de trigo, incluindo consumo humano, industrial e alimentação animal é mostrado na tabela 1.²²

Tabela I. Principais países consumidores de trigo, projeção de consumo total e específico (milhões de toneladas), na safra 2011/2012.²²

País/Bloco	Consumo total	Consumo humano e industrial	Alimentação animal e resíduos
Europa	125,5	70,0	55,5
China	116,0	98,5	17,5
Índia	83,1	82,9	0,2
Rússia	38,6	22,6	16,0
Estados Unidos	31,5	27,5	3,9
Paquistão	23,4	23,0	0,4
Egito	18,8	16,3	2,5
Turquia	18,1	16,7	1,4
Irã	15,5	14,5	1,0
Ucrânia	13,4	8,5	4,6
Brasil	11,2	10,7	0,5
Canadá	9,0	5,1	3,9
Cazaquistão	9,0	5,0	4,0
Argélia	8,9	8,9	0,1

Conforme tabela acima o Brasil encontra-se em 11º lugar quanto a consumo deste produto. Sua produção concentra-se na região Sul, nos estados do Paraná, 56,4% e Rio Grande do Sul, 33,6%. Segundos técnicos da CONAB (Companhia Nacional de

Abastecimento), o Brasil tem um grande potencial de aumentar a sua produção apresentando uma grande importância estratégica. Até 2020/2021 acredita-se que o crescimento é de 6,2 milhões de toneladas e um consumo de 11,7 milhões de toneladas no mesmo ano. A Figura 3 mostra o crescimento previsto na produção e o consumo da farinha de trigo até 2020/2021.²³

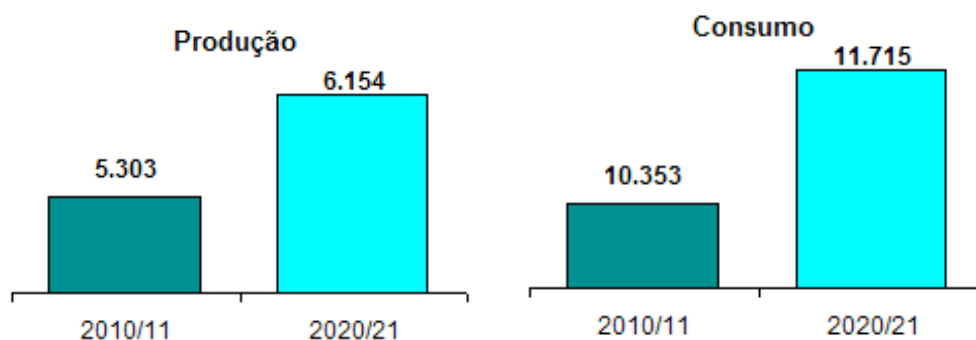


Figura 3. Projeção na produção e consumo de trigo no Brasil até 2020/2021 (mil toneladas).²³

Um dos motivos que tem contribuído para o sucesso do trigo têm sido suas propriedades únicas na massa que permitem que a mesma seja transformada em uma gama de produtos alimentares tais como o pão, massas e outros produtos de panificação. A propriedade que caracteriza esta capacidade é conhecida como viscoelasticidade, ou seja, o equilíbrio entre a extensibilidade e elasticidade na determinação da qualidade do produto final.¹⁹ Esta característica é determinada pela composição das proteínas presentes na farinha de trigo que pode ser formador de massa com propriedades reológicas necessárias para a produção de pão fermentado.¹⁹

Desta forma, a farinha de trigo é composta de proteínas solúveis e insolúveis em água conforme tabela II abaixo.^{24, 25}

Tabela III. Composição das proteínas da farinha de trigo.²⁴

Fração	% de proteína total
Albumina	7-10
Globulina	6-10
Gliadina	40-45
Glutenina	40-45

A gliadina e glutenina, insolúveis em H₂O, são também denominadas prolaminas por causa do seu alto teor de prolina e glutaminas.²⁶ Constituem as proteínas de armazenamento.²⁷

Juntas estas proteínas correspondem uma fração conhecida como glúten e compõem cerca de 80-85% das proteínas presentes na farinha de trigo. Já a albumina e globulina constituem uma fração de 15-20% do conteúdo total de proteínas do grão, possuindo funções metabólicas e estruturais sendo solúveis em H₂O.^{21, 24, 26}

Segundo a definição atual do *Codex Alimentarius*, o glúten é uma fração de proteína do trigo, centeio, cevada, aveia ou suas variedades cruzadas e respectivos derivados, sendo insolúvel em água e NaCl 0,5 mol.L⁻¹. Mais recentemente, a FDA (*Food and Drug Administration*) definiu o glúten como “proteínas que ocorrem naturalmente e que podem causar efeitos adversos na saúde de pessoas com doença celíaca. Alternativamente, o glúten é por vezes definido por sua solubilidade, uma característica derivada do elevado teor de prolina e glutamina das proteínas nativas do glúten.”²⁸

Quanto à composição, pode-se dizer que o glúten é dividido em duas frações de acordo com sua solubilidade em soluções alcoólicas (tipicamente 60-70% (v/v)): gliadinas (solúveis) e gluteninas (insolúveis) que constituem 80% das proteínas do trigo (Figura 4).^{20, 29.}

30

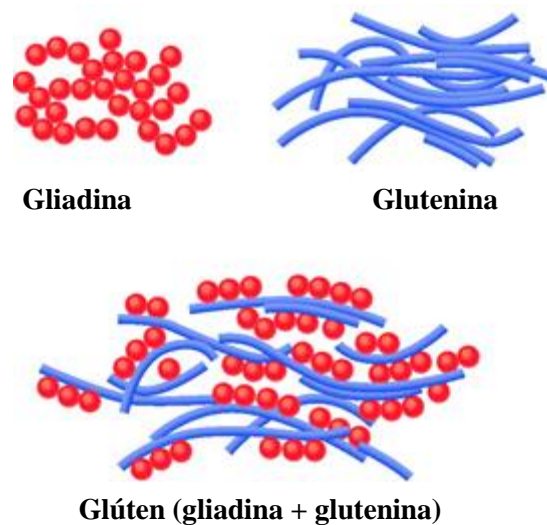


Figura 4. Representação da prolamina (gliadina) e glutenina presentes no glúten.³¹

Já Figura 5 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura onde é possível observar as interações entre a gliadina e glutenina (a glutenina forma uma malha de fibras em que a gliadina está aprisionada).³¹

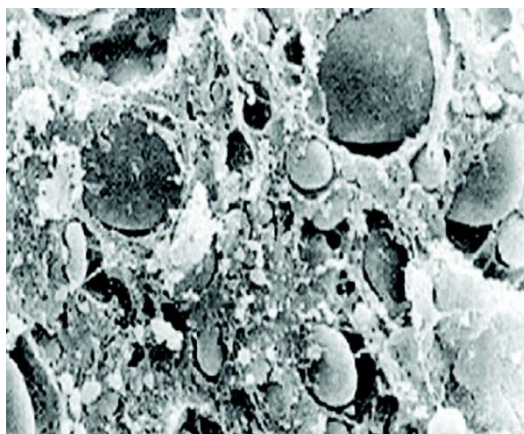
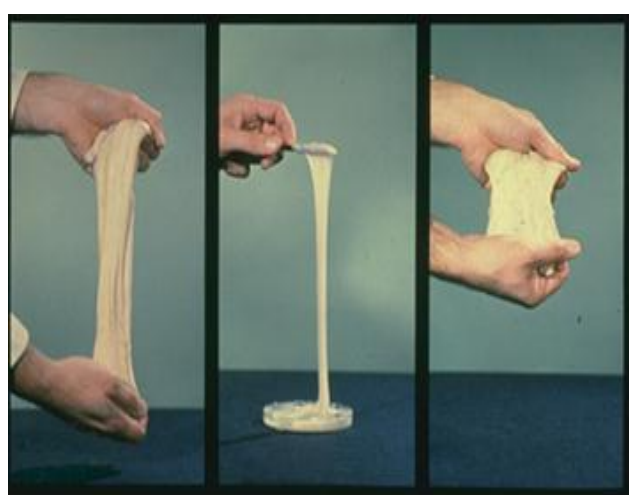


Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a interação estrutural entre a gliadina e glutenina.³¹

Fatores que contribuem para a baixa solubilidade em água das proteínas do glúten pode-se incluir um baixo teor de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis, elevados teores de glutamina e de aminoácidos apolares tais como glicina e prolina.²¹

Pode-se dizer que o glúten tem uma estrutura no qual as subunidades da glutenina de alto peso molecular formam uma “espinha dorsal elástica” que consiste basicamente de polímeros com “cabeça de cauda” com ligações dissulfeto intercadeias. Esta “espinha dorsal” forma uma base para as subunidades de baixo peso molecular (ligados por ligação dissulfeto). A gliadina também pode interagir com a glutenina por forças não-covalentes, embora estas interações seja tradicionalmente consideradas como contribuintes da viscosidade e não da elasticidade.³² O comportamento da massa frente a estas duas proteínas é visto na (Figura 6).



Glúten

Gliadina

Glutenina

Figura 6. Demonstração das propriedades da gliadina (extensibilidade) e glutenina (elasticidade).³³

Acredita-se que o tamanho molecular e o emaranhamento de diferentes moléculas de glutenina fornecem continuidade à massa. A elasticidade muito provavelmente depende do estiramento reversível de uma conformação energética mais favorável da glutenina “dobrada”. Embora a sua estrutura em “ β -espiral” (Figura 7) possa conferir uma elasticidade intrínseca para glutenina de alta massa molecular (HMW-GS) a sua contribuição para as propriedades elastoméricas ainda não é compreendida.²¹



Figura 7. Características estruturais das subunidades das gluteninas de alta massa molecular que podem determinar a elasticidade do glúten.²¹

Em nível molecular, a elasticidade tem sido sugerida como sendo mediada por ligações não covalentes (principalmente ligações de hidrogênio) inter e intra cadeias de gluteninas individuais. Neste contexto um modelo proposto por Belton³⁴ sugere um modelo chamado de “laçadas e trens”, ou seja, regiões onde há grupos de interações de superfícies de polímeros e regiões onde existem grupos de interação polímero-solvente (ligações de hidrogênio entre o solvente e a proteína).³⁴ Quanto maior a hidratação do sistema, mais regiões de “*loops*” são formados (Figura 8-1). Em um estiramento pequeno os primeiros “*loops*” são estendidos descompactando as regiões (Figura 8-2). Sob um alongamento, a resistência à deformação aumenta devido às interações proteína-proteína nas cadeias rígidas estendidas (Figura 8-3).^{20, 21, 34}



Figura 8. Modelo para o efeito de hidratação. 1) configuração de equilíbrio. 2) pequena extensão, somente os “*loops*” são deformados. 3) grande extensão, os “*loops*” são achatados e as ligações de hidrogênio estão quebradas de modo que as cadeias deslizem uma sobre as outras.²¹

Já a gliadina enfraquece as interações entre as cadeias de glutenina e essencialmente atua como um plastificante sobre a estrutura do glúten, conferindo assim elasticidade à massa.²¹

2.2. GLIADINA

2.2.1. Definição

As gliadinas são consensualmente definidas como componentes proteicos da farinha de trigo ou proteínas do glúten que são insolúveis em H₂O ou soluções salinas neutras, mas solúveis em soluções aquosas sem redução das ligações dissulfeto.¹⁸ São proteínas monoméricas que interagem principalmente por interações não-covalentes. Sua distribuição varia dependendo do trigo cultivado e das condições de crescimento.³⁵

A conformação e interações moleculares das proteínas de armazenamento do trigo têm sido amplamente investigadas utilizando várias técnicas tais como Microscopia de Força Atômica (AFM), Atividade Óptica Raman (ROA), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Técnicas Espectroscópicas, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Dicroísmo Circular (CD) e Viscosidade.³⁶

Embora haja relatos na literatura sobre a estrutura da gliadina e/ou suas frações^{36, 37, 38, 39} ainda é necessário conhecer a conformação da mesma em vários solventes, pHs e temperaturas.

A Figura 9 mostra a representação tridimensional de uma das frações da gliadina (a α -gliadina).⁴⁰

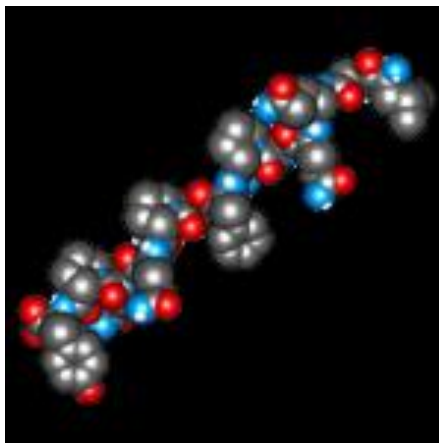


Figura 9. Representação da estrutura tridimensional da α -gliadina, uma das frações da gliadina.⁴⁰

2.2.2. Classificação da Gliadina

As gliadinas apresentam massa molecular de 30 000 g.mol⁻¹ a 78 000 g.mol⁻¹ e de acordo com sua mobilidade eletroforética podem ser separadas em quatro subfrações: α -, β -, γ - e ω -gliadinas.^{36, 37, 41} Estudos químicos e genéticos sugerem que a α - e β -gliadina são muito similares então, atualmente, somente três tipos de gliadina (α/β -, γ - e ω -) são classificados.⁴¹

Outra classificação da proteína é baseada na análise da sequência de aminoácidos. Seguindo esta classificação, a gliadina pode ser dividida em ricas em enxofre (α - e γ -) e pobre em enxofre (ω -gliadina). A α - e γ -gliadina são componentes que estão em maior quantidade em uma estrutura mais compacta, como revelado por imagens de microscopia. Já a ω -gliadina está em menor quantidade e apresenta estruturas variáveis dependendo do grau de hidratação.³⁵ A fração α -gliadina é monomérica a pH e força iônica baixa, mas em valores de pH maiores as proteínas se juntam para formar uma rede fibrilar estabilizada por interações físicas. No entanto, ao ser considerado a α - e ω -gliadina juntas o resultado será uma morfologia bicontínua de fase separada e isto dependerá da composição das frações e condição da mistura.⁴² Várias outras classificações foram dadas a gliadina e suas frações. Em 1980 Salcedo⁴³ *et al.* descreveram dez proteínas com massa molecular menor do que 20kD, tendo similaridades com a família das gliadinas e sugeriu que as mesmas fossem denominadas de gliadina de baixa massa molecular (LMW). Kasarda⁴⁴ *et al.* em 1983 classificaram a fração ω -gliadina em três tipos: ω -1, ω -2 e ω -5. Além disso, as gluteninas de baixa massa molecular (LMW – GS) eram similares a gliadina em suas características bioquímicas e sequências de

aminoácidos. Metakovsky⁴⁵ *et al.* em 1997 e Anderson⁴⁶ *et al.* em 2001 caracterizaram a gliadina em quatro famílias: α -, γ -, ω -gliadinas e gluteninas LMW embora não houvesse um conceito geral sobre o assunto na literatura. Já nos anos de 2001 e 2003, Anderson⁴⁶ *et al.* e Clarke⁴⁷ *et al.* respectivamente, relataram que as gliadinas-LMW estavam relacionadas com as sequências de gliadinas do trigo, mas não eram semelhantes para outras famílias e daí surgiria mais uma fração.⁴⁸

Estudos recentes distinguem as subfrações em α -, γ - e ω -gliadina. Seis resíduos de cisteína em α - gliadina e oito resíduos de cisteína em γ -gliadina estão localizados em posições altamente conservadas e todos estão envolvidos em ligações intracadeias de enxofre impedindo-os de participar na estrutura quaternária da glutenina, bem como que se envolvam em reações de troca SH-SS em condições ambientais. Já a ω -gliadina não apresenta resíduos de cisteína.^{21, 49} A estrutura primária da gliadina consiste de vários domínios de tamanhos variáveis (Figura 10).²¹

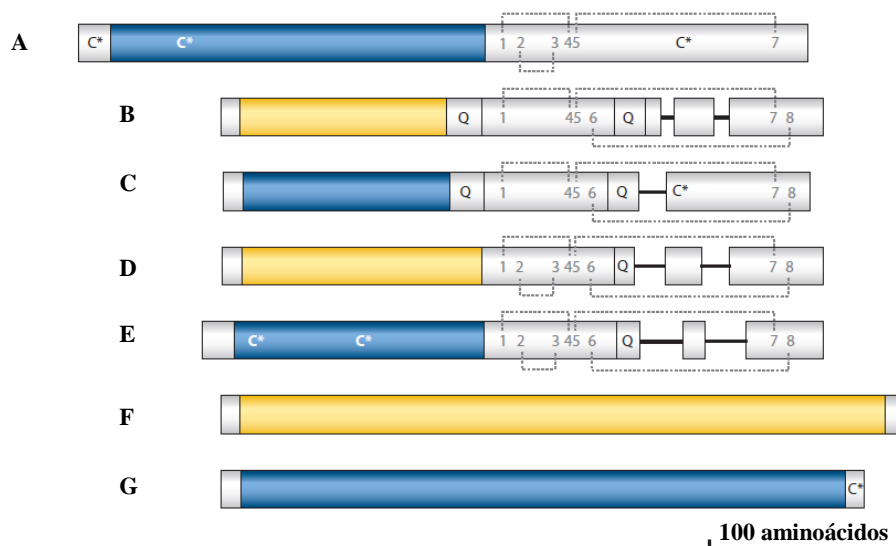


Figura 10. Estruturas de α -, γ - e ω -gliadina – B, D e F respectivamente – (amarelo) e subunidades da glutenina de baixa massa molecular A, C e G respectivamente – (azul).²¹

O domínio N-terminal curto consiste de 5 a 14 resíduos de aminoácidos. O domínio repetitivo central contém 100 resíduos organizados em sequências de repetição de um ou dois motivos composto principalmente de glutamina, prolina e aminoácidos hidrofóbicos (fenilalanina ou tirosina). Finalmente o domínio não repetitivo C-terminal é uma sucessão de poliglutamina e lisina e sequências ricas em arginina que incluem todos os aminoácidos que contém enxofre.^{21, 48}

Ao se analisar as frações, de acordo com a literatura, a α -gliadina consiste de um domínio N-terminal curto de cinco resíduos, um domínio com cerca de 113 a 134 resíduos e

um domínio C-terminal com cerca de 144 a 166 resíduos, o último domínio contendo duas regiões poli-glutamina (Figura 11). O domínio repetitivo consiste de um motivo de repetição de cinco a oito resíduos com sequência Pro (Phe/Tyr) Pro Gln Gln Gln (Gln) (Gln) e diferenças no comprimento dos domínios repetitivos definem as diferenças na massa molecular desta fração que varia entre 30 000 a 34 000.³⁷

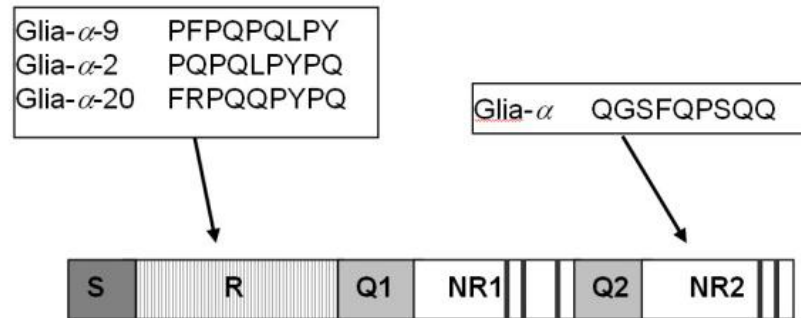


Figura 11. Estrutura esquemática da α -gliadina. A proteína consiste um domínio N-terminal curto (S), seguido por um domínio repetitivo (R) e um domínio não repetitivo longos (NR1) e separados por duas repetições poliglutamínicas (Q1 e Q2). Nos domínios não repetitivos cinco resíduos conservados estão presentes.⁵⁰

A γ -gliadina tem uma estrutura de domínio semelhante a α -gliadina consistindo de 12 resíduos no domínio N-terminal, um domínio repetitivo de 78 a 161 resíduos com um consenso de repetição consistindo de Pro Phe Pro Gln Gln (Gln) Pro Gln Gln (Pro Gln Gln) e um domínio C-terminal com 135 a 149 resíduos que contém uma região de poli-glutamina única (Figura 12). Diferenças no comprimento dos domínios repetitivos fazem com que a massa molecular varie de 26 000 a 36000.³⁷



Figura 12. Modelo estrutural da γ -gliadina. A sequência começa com um sinalizador com 20 resíduos, seguido por domínio N-terminal curto não repetitivo (I), um domínio variável altamente repetitivo (II), um domínio não repetitivo contendo a maioria dos resíduos de cisteína (III), uma região rica em glutamina (IV) e um domínio C-terminal não repetitivo contendo dois resíduos de cisteína conservados (V).⁵¹

Para a ω -gliadina existem poucas sequências completas disponíveis. Uma consiste em um domínio N-terminal curto de 11 resíduos, um domínio repetitivo de 238 resíduos e um domínio C-terminal curto de 12 resíduos. O consenso de repetição consiste de 6 a 11 resíduos de Pro Phe Pro Gln (Gln) (Gln) Pro Gln (Gln) (Gln) (Gln) e é semelhante à γ -gliadina.³⁷

As sequências dos domínios repetitivos da gliadina que vimos acima e/ou estrutura da mesma, são apontados como sendo os fatores causadores de um número de doenças humanas, dentre elas a doença celíaca.³⁷

2.2.3. A Estrutura das Proteínas

As proteínas podem ser descritas em termos de níveis de organização, ou seja, suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, como se vê na Figura 13.^{7,8}

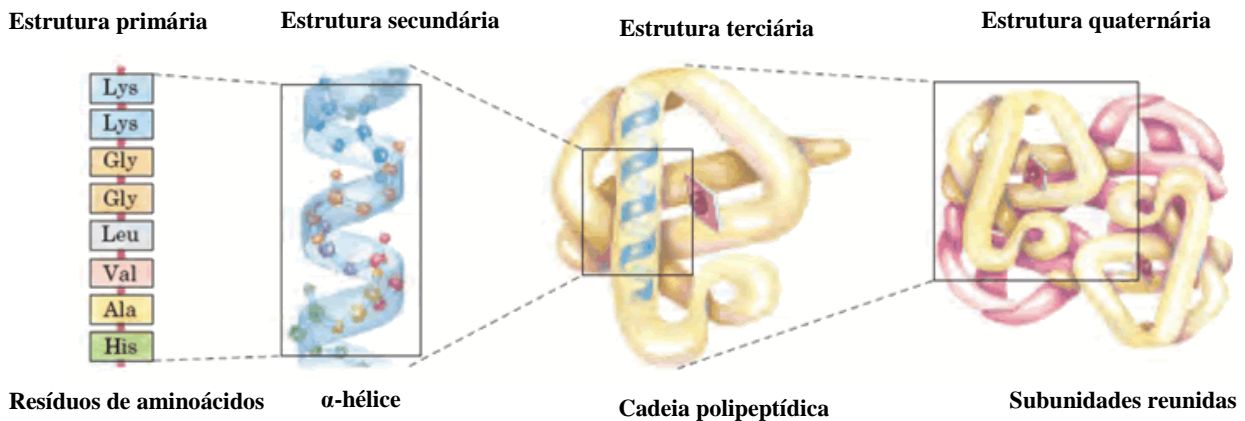


Figura 13. Níveis estruturais de proteínas: a estrutura primária consiste de uma sequência de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas e inclui todas as ligações dissulfeto. O polipeptídico resultante pode ser enrolado em unidades de estrutura secundária, tais como α -hélice. A hélice é uma parte da estrutura terciária do polipeptídeo dobrado, o que é em si uma das subunidades que compõem a estrutura quaternária de uma proteína.⁷

A estrutura primária representa todas as ligações covalentes (principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto) que ligam os resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica. O elemento mais importante desta estrutura é a sequência de aminoácidos presentes.^{7,8}

A estrutura secundária refere-se a arranjos estáveis que dão origem a padrões estruturais (tais como α -hélice, folhas- β e estrutura aleatória (Figura 14)).^{7,8}

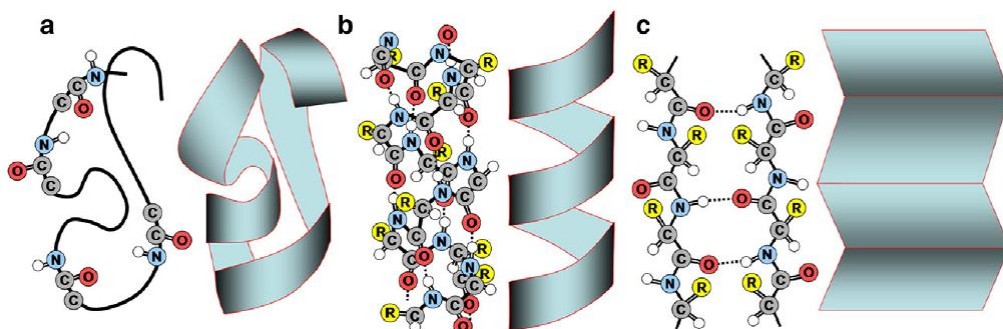


Figura 14. Diagrama esquemático de estruturas secundárias geralmente adotadas por proteínas: a) estrutura aleatória (*random coil*), b) α -hélice e c) folhas- β anti paralelas.⁵²

A estrutura terciária descreve todos os aspectos de dobragem tridimensional de uma proteína e quando a mesma tem duas ou mais subunidades polipeptídicas, a sua disposição no espaço é referida como estrutura quaternária.^{7,8}

Sabe-se que a estabilidade das proteínas está relacionada com a tendência da mesma de manter sua conformação nativa. Sabe-se que as proteínas nativas são apenas marginalmente estáveis e as mesmas podem assumir inúmeras conformações diferentes, sendo que o estado enovelado é caracterizado por um elevado grau de entropia conformacional.⁷ As interações químicas que combatem estes efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem ligações basicamente ligações hidrogênio, forças de *van der Waals* e interações hidrofóbicas.⁸ O conhecimento destas interações é importante para a compreensão de como as cadeias polipeptídicas enovelam em estruturas secundárias específicas e como ocorre o desenovelamento.⁷

2.2.3.1. A Estrutura da Gliadina

Embora as proteínas do glúten tenham sido estudadas durante um longo tempo, a estrutura secundária e terciária destas proteínas não está bem definida.¹¹ A determinação da estrutura destas proteínas apresenta problemas tais como: elevada massa molecular destas proteínas, suas repetições extensas e devido ao grande número de prolínas em sua estrutura primária.¹¹ Vários estudos espectroscópicos^{6, 53, 54, 55} forneceram informações sobre a estrutura secundária do glúten e seus constituintes, principalmente em solventes não fisiológicos. Em todos os estudos a estrutura secundária da gliadina mostrou ser muito sensível às condições ambientais, tais como solvente, pH, hidratação e temperatura.¹¹

Estudos moleculares referentes à estrutura da gliadina, em especial, são muito difíceis de realizar principalmente devido à sua solubilidade incomum e sua elevada tendência de

formar agregados macromoleculares. Para evitar ou diminuir a agregação, a maioria dos estudos é feita em misturas de H₂O/EtOH ou com solventes orgânicos, que produzem alterações na estrutura da proteína.³⁹

Como veremos abaixo, uma variedade de técnicas têm sido aplicadas para elucidar a estrutura tridimensional de proteínas. Inicialmente, em 1935, com o objetivo de analisar as frações da gliadina utilizou-se ultracentrifugação analítica.⁵⁶ A partir deste estudo foi demonstrada a natureza heterogênea desta proteína. Já em 1936 e 1941 a forma da gliadina foi analisada usando difusão translacional e medidas de dispersão dielétricas. Ambos os estudos mostraram que esta proteína é formada de moléculas assimétricas.^{51, 52}

Uma técnica muito usada para o estudo da estrutura secundária de proteínas é a Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).³⁹ Esta técnica é muito sensível a ferramentas espectrais e, portanto, pode ser usada para estudar quaisquer reações que envolvam alterações na atividade óptica. Desta forma, a mesma é excelente para a medição do grau de desnaturação das proteínas e transições *random coil* - hélice de polipeptídeos.⁵⁷

Esta técnica já foi usada para analisar a estrutura secundária da gliadina nos solventes trifluoretanol (TFE), H₂O, cloreto de sódio 0,5%, em solução aquosa de propanol e em solução aquosa de etanol 70% v/v. Em todos os casos foram observadas alterações na estrutura secundária da gliadina devido ao solvente utilizado.^{39, 57, 58, 59} Estudos de CD em solução aquosa de etanol 70% v/v mostraram que a ω -gliadina não contém estrutura α -hélice ou folhas- β detectável porém é rica em voltas reversas. O aumento da temperatura acarretou um aumento nesta estrutura. Em contrapartida, a α - e γ -gliadina contém de 30-35% de estrutura α -hélice e folhas- β (10% em α -gliadina). A partir destes dados concluiu-se que a ω -gliadina é estabilizada por fortes interações hidrofóbicas enquanto que as principais forças estabilizadoras na α - e γ -gliadina são as ligações dissulfeto covalentes e ligações de hidrogênio não covalentes.³⁹ Alterações na estrutura secundária também foram encontradas quando a gliadina foi preparada em solução aquosa de propanol.⁵⁷

Outra técnica utilizada para análise da estrutura secundária da gliadina foi a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).^{6, 60} De acordo com estes estudos, a gliadina do trigo apresenta uma mistura de diferentes estruturas secundárias, com uma importante contribuição de voltas reversas no domínio N-terminal (ricos em resíduos de prolina – 30%) e uma contribuição de α -hélice no domínio não repetitivo.^{6, 57, 60, 61,}

⁶²

Por outro lado, os estudos feitos por FTIR também mostraram que a estrutura secundária da gliadina é caracterizada por um elevado teor de conformações ordenadas (64-

67%) e um pequeno conteúdo de regiões α -helicoidais curtas (até 5%) devido a predominância de gliadinas ricas em enxofre (α - e γ -gliadina).⁶³

Ao se analisar a estrutura secundária das frações da gliadina, estudos indicam que as gliadinas ricas em enxofre (α - e γ -gliadina) e as pobres em enxofre (ω -gliadina) apresentam diferentes estruturas secundárias com diferentes graus de estabilização por ligação dissulfeto, ligações de hidrogênio não covalentes e interações hidrofóbicas.³⁹

Além disso, os estudos de FTIR mostraram que a estrutura secundária da α - e γ -gliadina compreende voltas reversas nos domínios repetitivos e α -hélices nos domínios não repetitivos, dando a esta proteína uma estrutura molecular compacta. A ω -gliadina também contém voltas reversas, mas contém baixos níveis de α -hélice e folhas- β (regiões com cadeias β -pregueadas estendidas).^{21, 39, 63, 64} Estes resultados corroboram com os encontrados a partir da técnica de Dicroísmo Circular.

Posteriormente, Tatham⁶⁵ *et. al.* mostrou que, embora as α -gliadina tenham uma estrutura compacta e menos regular, a γ -gliadina tem a tendência de formar uma estrutura terciária “espiral-estendida”. Já a Shewry⁶⁶ *et. al.* mostrou que a ω -gliadina presumivelmente adota uma conformação de “bobina” rígida ao invés de uma estrutura compacta.²¹

Nesta dissertação busca-se verificar se ocorrerá alterações na conformação da gliadina (composta por uma mistura contendo todas as frações da mesma) nos solventes e pHs utilizados.

2.3. DOENÇA CELÍACA

Apesar das propriedades físicas e químicas interessantes do glúten, em indivíduos propensos, o mesmo pode vir a desencadear uma toxicidade conhecida como doença celíaca (DC). Esta doença é uma resposta imunológica descontrolada causada por frações do glúten, tendo prevalência entre 0,3 e 1% da população caucasiana.^{42, 67}

Uma alta prevalência também ocorre no Norte Africano e populações do Oriente Médio. Está em grande parte confinada a noroeste do subcontinente indiano, sendo raramente relatada em povos africanos negros. Também ocorre com uma incidência maior em mulheres, possivelmente relacionada com a probabilidade de detecção, como resultado da deficiência de ferro ou associadas à autoimunidade. Esta doença pode-se apresentar em qualquer idade após o desmame. Apesar de comumente diagnosticada na infância, pode permanecer “latente” por períodos de tempo consideráveis. Aproximadamente de 10 a 15% de parentes de primeiro grau são afetados.⁶⁷

A patologia desta doença é caracterizada por inflamação, atrofia das vilosidades do intestino (Figura 15) e hiperplasia das criptas no intestino delgado. É frequentemente assintomática, mas os pacientes sem sintomas podem notar um aumento do bem estar em tratamento. A apresentação clássica na infância é uma diarreia profusa e retardo no crescimento após o desmame, mas as características sutis podem ocorrer em crianças mais velhas, como velocidade de crescimento reduzida ou prejuízo no desempenho escolar. A diarreia pode ser devida a má absorção de gordura. No entanto, os sintomas gastrointestinais podem ser mínimos, sendo confundido com síndrome no intestino. Também pode ocorrer perda de peso, porém a obesidade não exclui o diagnóstico. Outros sintomas incluem fadiga, depressão, anemia e distensão abdominal.^{13, 67, 68, 69}

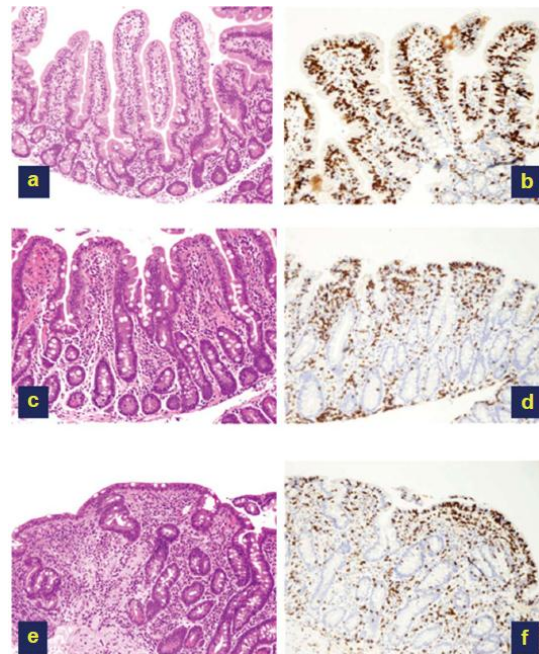


Figura 15. Diferentes graus de imagens do intestino delgado de pacientes com doença celíaca: a e b) vilosidades normais; c e d) atrofia leve/moderada das vilosidades; e e f) vilosidades totalmente atrofiadas.⁶⁹

Para pacientes com a DC, até o momento, a única maneira de reverter o dano ao intestino e demais sintomas citados acima é a remoção do glúten da dieta. Graças a este fato, uma ampla gama de produtos sem glúten está disponível em supermercados.⁶⁷

Atualmente acredita-se que uma das frações da gliadina (a α -gliadina) é o fator predominante pela toxicidade do glúten. Esta proteína é resistente à digestão completa dos aminoácidos pelas proteases gástricas e intestinais devido à abundância e localização de resíduos de prolina em sua cadeia polipeptídica. Fragmentos peptídicos específicos da α -

gliadina tem sido identificados como possíveis desencadeadores da resposta ao glúten aos pacientes com DC.^{13, 42, 69}

No entanto, a base estrutural para a toxicidade da gliadina em pacientes celíacos não é totalmente clara, nem a base molecular da toxicidade é compreendida, devido a estrutura complexa desta proteína.³⁰ Sendo assim, estudos relacionados com esta proteína só trarão benefícios ao conhecimento científico possibilitando assim, o desenvolvimento de métodos de detecção da DC.

2.4. O ESTUDO HIDRODINÂMICO DE PROTEÍNAS

Como são retratadas de forma estática pode-se imaginar que as proteínas são estruturas rígidas e fixas. No entanto, as mesmas são moléculas flexíveis e com oscilações rápidas, cujas mobilidades estruturais são significativas do ponto de vista funcional.⁸ Modestas alterações no ambiente da proteína, tais como pH, força iônica, solvente, pureza e etc. podem trazer mudanças estruturais capazes de afetar sua função.^{7, 70} Portanto, estas alterações no ambiente fazem com que ocorra a perda da conformação original (nativa) causada pela modificação da estrutura terciária ou quebra das ligações não covalentes da estrutura quaternária.⁸

Sabe-se que a cadeia polipeptídica das proteínas globulares é enovelada apresentando uma forma compacta e esta conformação é importante para a função biológica exercida por elas. Ao ser exposta a pHs extremos, variação no solvente, entre outros a proteína tende a desenovelar e este processo pode ocorrer em várias etapas, com a formação de um ou mais estados intermediários.⁷¹ O diagrama abaixo representa um modelo para os processos de desenovelamento de uma proteína (Figura 16).

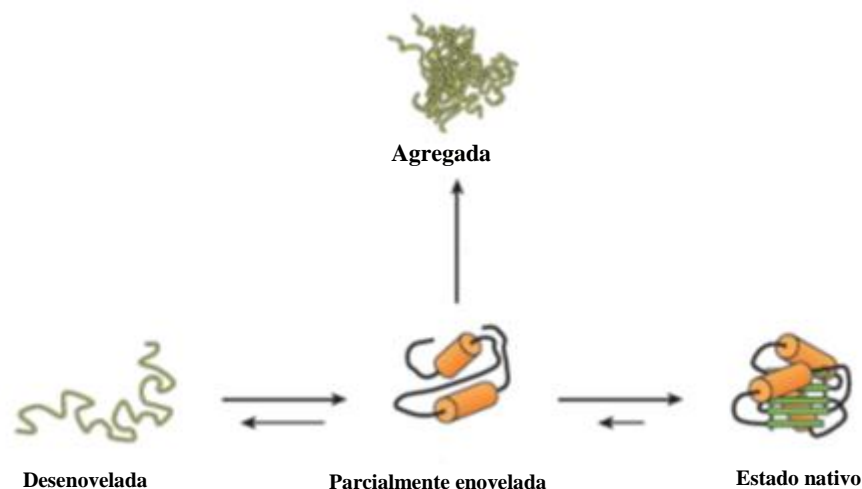


Figura 16. Diagrama dos processos que podem ocorrer em uma proteína quando em solução: estado nativo (conformação original), parcialmente enovelada, agregada e desenovelada.⁷²

Cabe ressaltar que o equilíbrio deve sempre estar deslocado em direção ao estado nativo evitando assim a formação de estruturas não funcionais.⁷² Caso ocorra a desnaturação da proteína, o esqueleto covalente permanece intacto, mas a cadeia polipeptídica desdobra-se ao acaso em conformações irregulares e variáveis. Este estado é estabilizado por quatro tipos de interação: ligação de hidrogênio entre as cadeias laterais ou grupos R, atração iônica entre os grupos R com cargas elétricas opostas, interações hidrofóbicas e/ou interações covalentes. Os estados conformacionais existentes neste momento apresentam maior mobilidade interna da cadeia conferindo uma frágil estabilidade à conformação nativa (que é caracterizada por uma estrutura altamente organizada).⁷² Os diferentes estados de energia apresentados pelas diferentes conformações é mostrado na Figura 17.

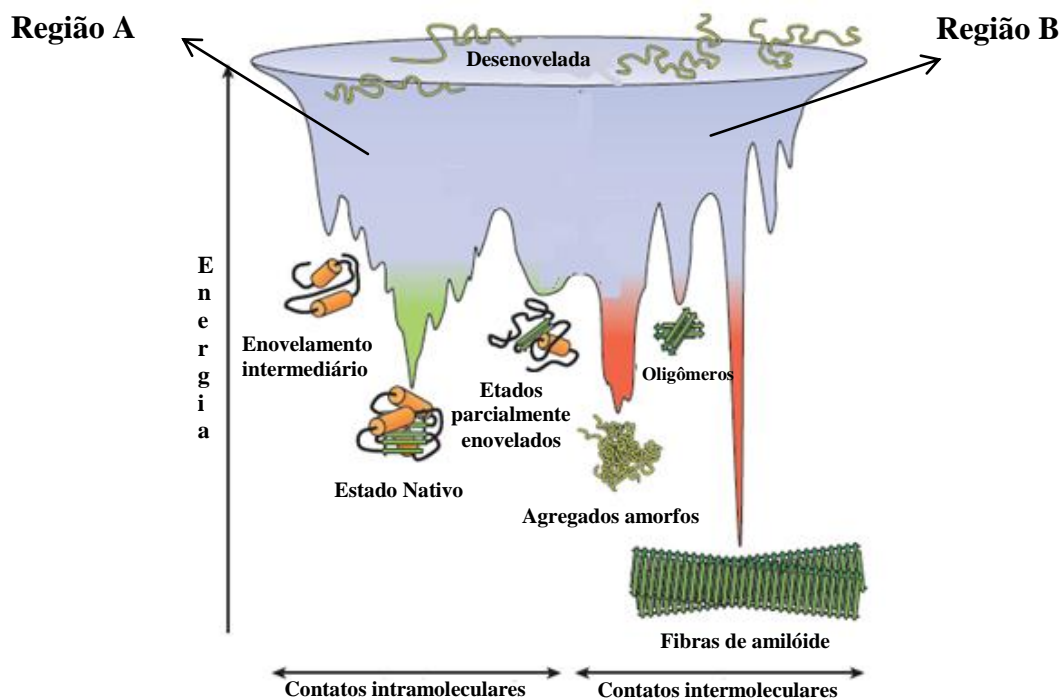


Figura 17. Diagrama de energia-entropia para o dobramento de proteínas e agregação. A largura do diagrama representa a entropia, e a profundidade, a energia. A proteína não dobrada progride desde um estado desordenado de alta entropia (azul) para um único estado de conformação nativa com baixa entropia (verde) e energia. Região A: descreve a busca conformacional de uma única cadeia polipeptídica de um monômero funcional. Região B: associação intermoleculares de proteína (agregação) aumentam drasticamente o tamanho do funil.⁷²

Neste modelo, chamado funil de dobramento (Figura 17) a energia e entropia estão relacionadas.⁷² Um polipeptídeo desenovelado apresenta muitas possibilidades de

conformação (alta entropia). Com o enovelamento em um número cada vez menor de conformações possíveis, a sua entropia e sua energia livre diminuem. O diagrama de energia-entropia não é um vale suave, mas uma paisagem acidentada. Pequenos buracos ou elevação representam conformações que são temporariamente aprisionados até que, por ativação térmica aleatória, consiga sobrepor a barreira de energia livre e possam progredir para uma conformação de menor energia.^{8, 72, 73}

O conhecimento do processo de dobramento das proteínas, das formas na qual a mesma é estabilizada e das dimensões em diferentes ambientes é essencial para obter uma compreensão completa da conformação e o seu papel no enovelamento da mesma.⁷⁴

2.5. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS)

A técnica de Espalhamento de Luz é considerada um método não destrutivo para o estudo de fluidos complexos, ou seja, soluções de polímeros, suspensões coloidais, sistemas micelares e nanopartículas de uma forma geral. A partir desta técnica é possível dimensionar partículas com tamanhos entre 2 nm e 500 nm.^{75, 76}

A mesma consiste na interação da radiação com partículas suspensas em um meio através da qual a radiação é transmitida. Ao incidir na partícula, parte da radiação é espalhada e a intensidade do espalhamento depende, basicamente, do tamanho da partícula, da forma, das interações entre a partícula e o meio e da diferença entre os índices de refração das partículas e o meio.⁷⁷ Medidas de espalhamento de luz são, portanto, de grande valor na determinação de tamanho, forma, interações de partículas, e uma de suas mais importantes aplicações encontra-se no estudo de substâncias macromoleculares em solução ou suspensão.⁷⁸

Nesta técnica um feixe de laser incide na amostra e a intensidade da luz espalhada é detectada em uma fotomultiplicadora. Caso a dimensão das partículas seja menor que o comprimento de luz incidente o espalhamento recebe o nome de espalhamento de Rayleigh. A diferença vetorial entre a radiação incidente na fotomultiplicadora \vec{k}_i , e a radiação espalhada \vec{k}_e é chamado de vetor de espalhamento \vec{q} sendo definido a partir da equação 1,

$$\vec{q} = \vec{k}_e - \vec{k}_i = \frac{4\pi\eta_0}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Onde η_0 representa a viscosidade, λ_0 o comprimento de onda e θ o ângulo existente entre \vec{k}_i e \vec{k}_e .

O vetor de espalhamento \vec{q} é importante, pois permite a observação de partículas com maior ou menor nitidez, dependendo de sua magnitude. O mesmo é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, ou seja, quanto maior o seu valor, maior será a resolução da partícula observada.^{76, 77}

2.5.1. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é um método experimental que utiliza a intensidade da luz dispersa a partir de uma amostra em solução para caracterizar o tamanho, forma e as interações das partículas em solução.⁷⁹ Nesta técnica as flutuações de intensidade da luz dispersa são dadas por,

$$g_2(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left[\frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau) dt \right] \quad (8)$$

Onde $I(t)$ representa intensidades de espalhamentos de luz nos tempos t e $t + \tau$ e τ é chamado “delay time” ou tempo de atraso. O fator “2” indica uma função de correlação de segunda ordem.⁷⁶ Em muitos casos de interesse prático a função de autocorrelação pode também ser expressa em termos de campo elétrico de acordo com a relação de Sierget:^{80, 81}

$$g_2(\tau) = B + \beta [g_1(\tau)]^2 \quad (9)$$

Onde β é um fator que depende da geometria experimental e B se refere como linha de base.

Para amostras polidispersas, como proteínas complexas, a função é de primeira ordem sendo representada por uma soma ou uma integral sobre a distribuição das taxas de decaimento.⁸⁰

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad (10)$$

Onde $\Gamma(\tau^{-1})$ é a frequência de relaxação do movimento dinâmico da partícula em observação e $G(\Gamma)$ é normalizada de forma que,

$$\int_0^\infty G(\Gamma) d\Gamma = 1 \quad (11)$$

A partir das flutuações da intensidade da luz dispersa obtém-se o coeficiente de difusão das macromoléculas.⁷⁶

$$(12)$$

$$D = \frac{\Gamma}{q^2}$$

O raio hidrodinâmico é derivado do coeficiente de difusão a partir da equação de Stokes-Einstein,^{75, 81}

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (13)$$

Onde k_B , T e η são a constante de Boltzmann, a temperatura absoluta e a viscosidade do solvente, respectivamente.

O índice de polidispersão ($PD.I$) descreve a distribuição de tamanho da partícula. Este parâmetro é usado na análise de cumulantes usados nas medidas de DLS. É determinado relacionando a taxa de relaxação média (Γ) com a variância de distribuição (μ_2),⁸²

$$PD.I = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (14)$$

2.6. POTENCIAL ZETA (PZ)

Em uma partícula em suspensão, o desenvolvimento de uma carga na superfície afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante, o que resulta em um aumento na concentração de íons de carga oposta próxima a superfície. Assim, uma dupla camada elétrica existe ao redor de cada partícula. Na camada interna, chamada de camada de Stern, os íons estão fortemente ligados, diferente do que ocorre na camada externa, difusa.^{83, 84}

Dentro da camada difusa há um limite teórico dentro do qual os íons e as partículas formam uma unidade estável. Ao se aplicar um campo elétrico no líquido, as partículas entrarão em movimento em direção ao pólo positivo ou negativo do campo aplicado (a direção escolhida é uma indicação do sinal da carga que transportam). Os íons que estiverem dentro deste limite teórico movem-se. Este limite é chamado plano de escorregamento.

O Potencial Zeta (PZ) é o potencial que existe neste plano de cisalhamento (Figura 18).^{84, 85}

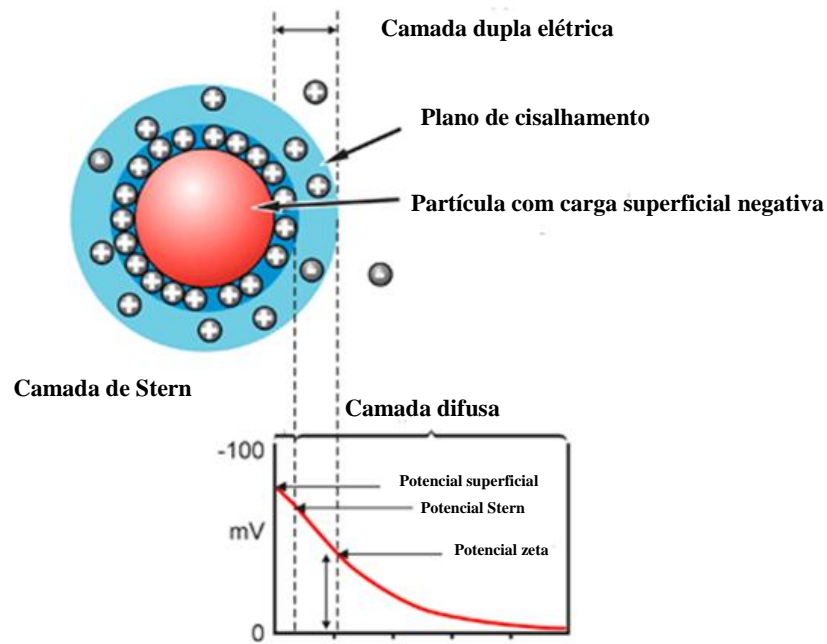


Figura 18. Representação da distribuição de íons de uma partícula esférica carregada negativamente dispersa em um líquido.⁸⁶

Em microeletroforese, técnica utilizada nesta dissertação, o potencial zeta é determinado a partir da mobilidade eletroforética de acordo com a equação de Henry:⁸⁴

$$\mu_e = \zeta \frac{\varepsilon}{1,5 \eta} f(ka) \quad (15)$$

A mobilidade eletroforética (μ_e) representa a mobilidade que partículas carregadas em um líquido apresentam frente a um campo elétrico aplicado.⁸⁷ O potencial zeta (ζ) é dado a partir da relação entre a mobilidade, a constante dielétrica (ε) do meio, a viscosidade (η) e a função de Henry ($f(ka)$).⁸⁴

Para soluções aquosas, concentrações de eletrólitos moderada e líquidos altamente polares utiliza-se a aproximação de Smoluchoski, neste caso $f(ka)$ é igual a 1,5.⁸⁸

O potencial zeta indica a estabilidade do sistema. Se o potencial apresentar um valor maior que 30 mV ou menor do que -30 mV a tendência das partículas dispersas é de repelirem-se mutuamente não ocorrendo agregação, sendo assim, o sistema será estável. No entanto, se o valor do potencial zeta ficar entre -30 mV e 30 mV não existem forças para evitar a agregação e o sistema apresentar-se-á instável.⁸⁴

2.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma das mais antigas e bem estabelecidas técnicas experimentais que pode ser utilizada para monitorar a estrutura secundária de proteínas. Nos últimos anos esta técnica vem sendo utilizada para estudar a conformação de proteínas de vários alimentos sob a influência de vários fatores ambientais, podendo ser aplicada em amostras no estado líquido, semissólido e sólido.^{89,90,91}

A espectroscopia FTIR é uma medida do comprimento de onda e intensidade da absorção de radiação infravermelha de uma amostra.⁹² O espectrofotômetro de transformada de Fourier apresenta três componentes básicos (Figura 19): fonte (de radiação), interferômetro (composto de um divisor de feixe, um espelho fixo e um móvel) e detector.

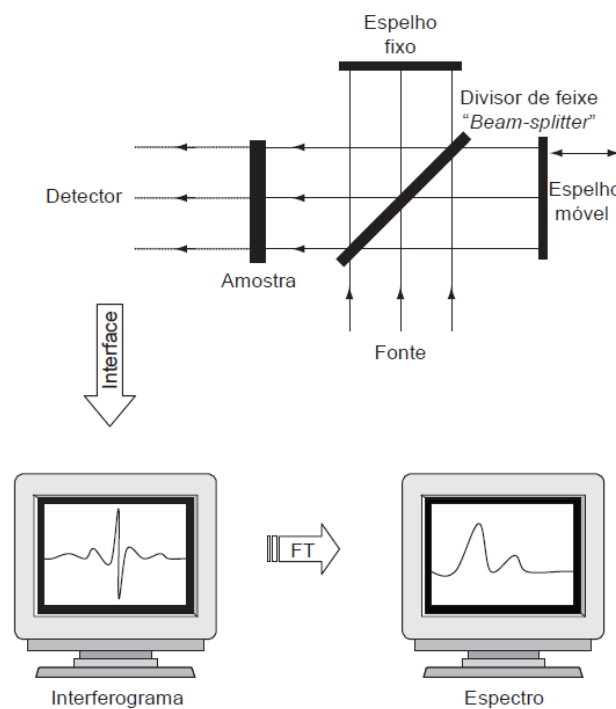


Figura 19. Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier.⁹⁰

O interferômetro de Michelson é composto basicamente por dois espelhos (um fixo e um móvel) e um divisor de feixe (conhecido como beam-splitter). Este divisor de feixe transmite 50% da radiação incidente da fonte para o espelho móvel e reflete os outros 50% para o espelho fixo. Já os espelhos refletem os dois feixes para o divisor, onde se recombinam. Se os dois espelhos encontram-se equidistantes do divisor, as amplitudes combinam-se construtivamente. Se o espelho móvel mover-se a uma distância de $\lambda/4$ do

divisor, as amplitudes combinam-se destrutivamente. Para a radiação no infravermelho (policromática), a soma de todas as interações construtivas e destrutivas para cada componente resulta num sinal complexo denominado interferograma. Após a aquisição do interferograma, aplica-se a transformada de Fourier. A mesma converte os dados obtidos no interferômetro em um espectro que relaciona a intensidade versus número de onda (frequência).⁹⁰

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Estudar a conformação da gliadina em solução com o emprego de diferentes solventes por meio de análise de Espalhamento de Luz Dinâmico acompanhado por estudos de Potencial Zeta e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o índice de polidispersão (*PD. I*), a difusividade e o diâmetro hidrodinâmico (*D_h*) da gliadina por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em função do pH e em diferentes solventes;
- ✓ Analisar o potencial superficial elétrico por meio do Potencial Zeta (*PZ*) em função do pH e do solvente utilizado;
- ✓ Analisar a estrutura secundária da proteína em solução e em filme utilizando a técnica de FTIR levando em consideração o solvente e o pH.

4. MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE

4.1. MATERIAIS

As amostras de gliadina nativa (composta por suas subfrações α -, ω - e γ -) (Sigma Aldrich[®]) foram utilizadas sem purificação prévia. Os demais reagentes utilizados apresentam grau analítico.

4.2. MÉTODOS DE ENSAIO

4.2.1. Espalhamento de Luz (LS)

Os experimentos de Espalhamento de Luz foram realizados em um espectrômetro Brookhaven Instruments (goniômetro BI200M e correlador digital BI9000AT) e uma fonte de luz verticalmente polarizada Coherent He-Ne Laser ($\lambda = 632,8$ nm).

As amostras a serem analisadas nesta dissertação por espalhamento de luz, foram obtidas pela dissolução da gliadina na concentração 100 mg.L^{-1} nos solventes H₂O deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO) e H₂O/EtOH 40/60% (v/v). Durante a preparação as mesmas foram mantidas sob agitação magnética por 36 h (amostras em DMSO) e 24 h (demais amostras) na temperatura de 50°C e no pH 9,8. O ajuste de pH foi feito com NH₄OH. Após dissolução, ajustou-se o pH para 6,8 (pH intestinal) e 1,2 (pH gástrico) com HCl 1 mol.L^{-1} . Em seguida, as mesmas foram centrifugadas (para remover qualquer componente indesejável que contribua para a intensidade de espalhamento, tais como partículas de pó e agregados⁷⁵) e reservadas para análise.

Em análises de LS, a amostra preparada antecipadamente, foi colocada dentro de uma célula de vidro a qual é inserida em uma cuba de espalhamento que contém decalina ($n_0 = 1,469$), um solvente corretor do índice de refração (similar ao do vidro). Desta foram amenizadas as reflexões provenientes das paredes onde se encontra a amostra. Um feixe de laser He-Ne, incide na amostra sendo que a intensidade da luz espalhada é detectada em uma fotomultiplicadora.⁷⁵ As medidas de espalhamento de luz foram feitas em duplicata à temperatura ambiente.

4.2.1.1. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Neste trabalho obtiveram-se as funções de correlação temporal em um modo chamado multi- τ , usando-se 224 canais e as mesmas foram analisadas a partir do método dos cumulantes, do programa CONTIN, os quais foram disponibilizados pelo fabricante do

equipamento (*software* Bookhaven Instruments) e por meio da transformada inversa de Laplace fornecida pelo *software* Gendist (REPES). Todas as medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico foram feitas em duplicata à temperatura de 24°C com um ângulo de espalhamento de 90°. O índice de refração das partículas utilizado foi o índice de refração de α -gliadina encontrada na literatura no valor de 1,623.⁹³

4.2.2. Potencial zeta (PZ)

Para as medidas de PZ o biopolímero em estudo (gliadina) foi preparado na concentração 100 mg.L⁻¹ nos solventes H₂O deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO) e H₂O/EtOH 40/60% (v/v), obedecendo a metodologia apresentada no ítem 4.2.1.

A fim de se determinar o PZ das amostras, o equipamento utilizado foi Brookhaven Instrument's ZetaPlus e o software Brookhaven ZetaPALS. O método PALS é uma técnica mais sensível utilizada para mobilidades eletroforéticas baixas presentes em meios com baixa constante dielétrica, alta viscosidade, alta condutividade ou quando a partícula está próxima do seu ponto isoelétrico.⁸⁰

O equipamento utiliza células descartáveis e eletrodo de Paládio com suporte em acrílico. A técnica empregada – *Electrophoretic light scattering (ELS)* – é baseada em um feixe de referência óptico (modulado) e um sistema de eletrodo “mergulhado” (dip-in). O mesmo utiliza um laser de comprimento de onda 660 nm com potência de 35 mW. Todas as medições foram realizadas em triplicata, na temperatura de 24°C. Os potenciais zeta foram calculados automaticamente a partir da mobilidade eletroforética de acordo com a equação de Henry e a aproximação de Smoluchowski.

4.2.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR - ATR)

Nesta dissertação os dados de infravermelho foram analisados a partir de uma célula de reflexão atenuada total (*Attenuated Total Reflection – ATR*). Esta técnica tem se mostrado útil para estudar a estrutura secundária e outras propriedades das proteínas em uma variedade de ambientes.⁹⁴

A ATR consiste em colocar a amostra sobre um cristal óptico denso com índice de refração elevado (diamante, zinco ou germânio). A reflexão total interna de um feixe infravermelho ao incidir na superfície do cristal, a um ângulo abaixo do ângulo de incidência crítico irá produzir uma onda que se dissipará no limite entre o cristal óptico e a amostra. A radiação refletida penetra através do cristal, sendo absorvida pela amostra (Figura 20). Nas regiões onde a amostra absorve energia, a onda dissipada será alterada, o que será detectado.⁹⁵

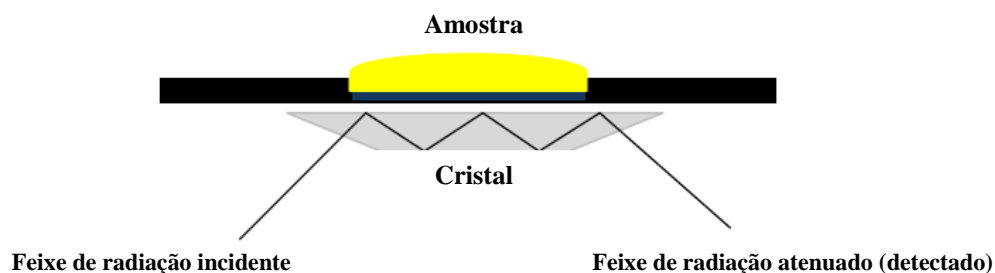


Figura 20: Representação de uma célula de reflexão atenuada total.⁹⁵

Em polímeros os dados espectrais de infravermelho são geralmente interpretados em termos das vibrações de uma unidade de repetição estrutural. Já para proteínas e polipeptídios as unidades de repetição dão origem a nove bandas de absorção características de infravermelho, conhecidas como amida A, B, e I – VII.⁹²

Dentre estas bandas, as bandas amidas I e II são as duas mais relevantes bandas vibracionais do esqueleto da proteína.⁹² A maioria das informações de FTIR sobre as estruturas secundárias das proteínas (α -hélice, folhas- β , voltas reversas e randômicas) é normalmente obtida a partir da análise da amida I que ocorre na região de 1700-1600 cm^{-1} . Esta banda é devida principalmente ao estiramento da ligação C = O da ligação peptídica (cerca de 80%) e é sensível às diferentes conformações das estruturas secundárias das proteínas.^{91, 95, 96}

Alta sensibilidade e pequenas variações na geometria molecular e padrão das ligações de hidrogênio, fazem com que a banda de amida I seja útil para a análise da composição estrutural secundária de proteínas e mudanças conformacionais da mesma. No entanto, a banda de amida I apresenta grande sobreposição de bandas subjacentes às quais estão em estreita proximidade umas com as outras. Assim, métodos matemáticos, como técnicas de aprimoramento da resolução, são necessárias para identificar a componente de banda individual correspondente a estrutura secundária.^{91, 97}

Os métodos de aumento de resolução são baseados na separação dos picos que compõem a banda de amida I, correlacionando suas áreas ou intensidades com as estruturas secundárias das proteínas.⁹² No desenvolvimento deste trabalho os componentes e as composições relativas da estrutura secundária foram estimados quantitativamente por um algoritmo de ajuste de curvas a partir de uma função Gaussiana. O método de aumento de resolução utilizado é o ajuste do sinal. Este ajuste é um processo de decomposição de um sinal complexo em seus componentes individuais, através da otimização pelo critério de números quadrados, tendo como parâmetros de entrada o número e posições dos picos, forma e largura do sinal e uma linha de base.^{91, 95, 98}

Conforme literatura neste método a proporção relativa das estruturas secundárias presentes nas proteínas (α -hélice, folhas- β , voltas reversas e randômicas) é calculada para ser a área fracionada do pico correspondente, dividido pela soma das áreas de todos os picos.⁹⁷

Nas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) as amostras de gliadina na concentração 100 g.L⁻¹ foram preparadas nos solventes H₂O deionizada, H₂O/EtOH 40/60% (v/v) e dimetilsulfóxido (DMSO). O procedimento de preparação obedeceu a metodologia apresentada no item 4.2.1. Após o ajuste dos pHs as amostras foram secadas obtendo-se assim filmes em cujo meio os espectros de FTIR foram medidos. A fim de comparação, para as amostras no solvente DMSO também foram feitas soluções na concentração de 100 mg.L⁻¹. O procedimento da solução também obedeceu a metodologia do item 4.2.1. Após esta etapa, fez-se o ajuste do pH e as medidas de FTIR. A temperatura de análise foi de 24°C. Esta análise foi feita em quadriplicata.

O equipamento utilizado para as análises de FTIR foi o Bruker Modelo Alpha-P de Módulo de ATR com prisma de diamante. Os espectros foram obtidos com corridas de 24 scans, com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

5.1.1. Análise do Índice de Polidispersão da Gliadina em Solução

A Figura 21 mostra as funções de correlação temporal da gliadina nos solventes H₂O deionizada, DMSO e H₂O/EtOH 40/60% v/v no pH 9,8 à 24°C fornecidas a partir do algoritmo REPES.

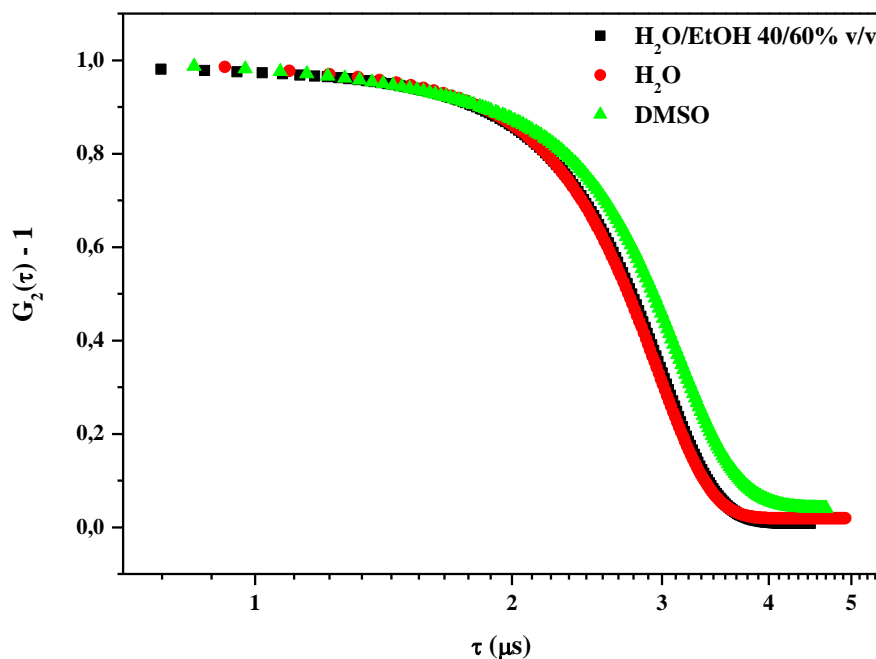


Figura 21. Função de correlação temporal obtida para as amostras de gliadina em H₂O deionizada, gliadina em H₂O/EtOH 40/60% v/v e gliadina em DMSO no pH 9,8 à 24°C.

Para analisar o índice de polidispersão de amostras em solução o melhor método conhecido é o dos Cumulantes (*software* Bookhaven Instruments).⁹⁹

O índice de polidispersão (*PD. I*) é uma medida da largura da distribuição da taxa de decaimento,⁹⁹ estando relacionada com a homogeneização das moléculas em solução.¹⁰⁰ Quanto maior o índice, maior a distribuição de tamanho e maior será o decaimento. Uma diminuição na polidispersão significa uma maior homogeneidade dos tamanhos das moléculas (*PD. I* > 0,3 indica a presença de um sistema polidisperso).¹⁰⁰

A partir da Figura 21 verifica-se que a taxa de decaimento é larga em todos os solventes, com uma semelhança para as amostras nos solventes H₂O deionizada e H₂O/EtOH 40/60% v/v, o que pode estar relacionado aos valores do índice de polidispersão (*PD. I*). É possível observar também que para a amostra de gliadina em DMSO têm-se um leve aumento

no decaimento da curva de correlação temporal. É sugerido que este aumento esteja relacionado a uma menor homogeneização da amostra.

Para confirmar estas afirmações a tabela III apresenta as médias dos valores de *PD. I* obtidos para as amostras nos solventes acima, em pH 1,2; 6,8 e 9,8.

Tabela III. Índice de polidispersão (*PD. I*) das amostras nos solventes H₂O deionizada, H₂O/EtOH 40/60% v/v e DMSO nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8

Amostra	pH	<i>PD. I</i>	ERRO
Gliadina em H ₂ O deionizada	1,2	0,27	0,07
	6,8	0,15	0,12
	9,8	0,28	0,02
Gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v	1,2	0,24	0,04
	6,8	0,19	0,07
	9,8	0,26	0,02
Gliadina em DMSO	1,2	0,37	0,01
	6,8	0,37	0,13
	9,8	0,40	0,09

Analisando a tabela III vê-se que os valores de *PD. I* encontram-se no limite inferior do método para uma amostra polidispersa, ou seja, os valores estão entre 0,2 e 0,4. Além disso, é possível observar um comportamento semelhante para as amostras com solvente em H₂O deionizada e H₂O/EtOH 40/60% v/v, o que está de acordo com as funções de correlação mostradas na Figura 21. Já para as amostras em DMSO, os valores de *PD. I* são mais altos (em torno de 0,4). É sugerido que neste solvente a amostra encontra-se em um sistema com um maior grau de polidispersão, ou seja, a amostras encontra-se menos homogênea. Este fato também corrobora com a função de correlação mostrada na Figura 21 correspondente ao DMSO.

A análise da tabela III em função do pH fornece mais uma semelhança entre os solventes H₂O deionizada e H₂O/EtOH 40/60% v/v. Em pH 6,8, nestes dois solventes, ocorre uma redução do *PD. I*. Este fato pode significar uma maior homogeneidade da solução em pH neutro.

5.1.2. Análise do Coeficiente de Difusão Aparente (D_{ap}) da Gliadina em Solução

Medidas do coeficiente de difusão da proteína nos solventes estudados também foram realizadas. Os dados destas medidas permitem que seja fornecida uma estimativa do tamanho das moléculas de proteínas.¹⁰¹ O coeficiente de difusão é um parâmetro macroscópico que reflete os diversos processos moleculares que ocorrem em um líquido. Em uma análise hidrodinâmica, o coeficiente está relacionado ao tamanho das moléculas que difundem e à resistência que o solvente oferece à difusão (ou seja, sua viscosidade).¹⁰¹

Nesta dissertação, o coeficiente de difusão D_{ap} das proteínas foi calculado usando a equação de Stokes-Einstein para a difusão de uma partícula esférica através de um líquido:

$$D_{ap} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (16)$$

Neste caso, embora as estruturas de proteínas não sejam esferas perfeitas, elas são globulares, sendo assim os valores calculados representam o coeficiente de difusão de uma esfera de tamanho equivalente viajando através do solvente.¹⁰²

Apesar do coeficiente de difusão aparente obtido a um determinado ângulo de uma dispersão não ser suficiente para obter uma informação correta sobre o tamanho real das moléculas, ele nos dá uma ideia sobre o tamanho das mesmas em um dado solvente. Para se obter um valor real, deve-se extrapolar os coeficientes de difusão aparentes obtidos em diferentes ângulos para zero e também extrapolar a concentração para zero.¹⁰³ Nesta dissertação isto não foi realizado pois ao usar esta técnica e extrapolar para o ângulo zero as moléculas maiores (agregados) se sobrepuseram sobre as moléculas menores. Estas moléculas representam a interação proteína-proteína (ou seja, os agregados) e não a interação proteína-solvente. Este fato ocorreu em todos os solventes utilizados. Os ângulos baixos são afetados pela presença de moléculas grandes (neste caso, moléculas agregadas) mesmo que as mesmas se encontrem em uma pequena quantidade na solução. Como será visto posteriormente, estes valores podem afetar as medidas. Desta forma, para minimizar este problema um ângulo de 90° foi utilizado nas análises realizadas.

A tabela IV apresenta valores de D_{ap} obtidos a partir da equação 16 sendo que o R_h utilizado foi obtido a partir do programa CONTIN disponibilizado pelo *software* Brookhaven Instruments.

Tabela IV. D_{ap} da gliadina nos solventes H₂O deionizada, H₂O/EtOH 40/60% v/v e DMSO pHs 1,2; 6,8 e 9,8 (a partir do programa CONTIN (*software* Bookhaven Instruments)).

Amostra	pH	D_{ap} ($\cdot 10^{-8}$ cm ² .s ⁻¹)	ERRO
Gliadina em H ₂ O deionizada	1,2	2,98	0,37
	6,8	1,98	0,56
	9,8	7,18	0,03
Gliadina em H ₂ O/EtOH 40/60% v/v	1,2	5,57	1,4
	6,8	3,40	0,51
	9,8	5,10	0,40
Gliadina em DMSO	1,2	3,30	0,14
	6,8	5,37	1,21
	9,8	6,41	0,57

Inicialmente, observa-se nesta tabela, que em todos os solventes a relação do coeficiente de difusão aparente em pH 9,8 é semelhante. Fato este que corrobora com as curvas de correlação mostradas na Figura 21 para o pH 9,8. Nota-se também, em todos os solventes, uma modificação no D_{ap} à medida que o pH varia. Este fato é uma indicação de que ocorre uma alteração na conformação da gliadina devido à variação do pH.

Com base na equação 16 sabe-se que o D_{ap} é inversamente proporcional ao R_h . Sabe-se que o coeficiente de difusão depende do tamanho do soluto¹⁰², desta forma, a partir da tabela IV, vê-se, nos solventes H₂O deionizada e DMSO, que à medida que o pH aumentou, ocorreu um aumento nos valores do D_{ap} . Sugere-se desta forma que ocorre uma diminuição no tamanho da molécula à medida que o meio torna-se mais básico. Já para a amostra em H₂O/EtOH 40/60% v/v têm-se uma similaridade entre a gliadina em meio ácido e meio básico, logo, os tamanhos das moléculas no pH ácido e básico é semelhante e menor do que o valor encontrado em pH neutro.

5.1.3. Análise do Diâmetro Hidrodinâmico da Gliadina em Solução

A partir do método dos cumulantes obtém-se também o diâmetro médio das partículas em solução.¹⁰³ Na técnica DLS a intensidade de luz dispersa é proporcional à sexta potência do tamanho da partícula¹⁰⁴, sendo assim, mesmo se a concentração de agregados for baixa, devido ao seu grande tamanho, eles podem contribuir significativamente para a intensidade da luz dispersa.¹⁰⁵

Nesta dissertação foi observado, a partir do método dos cumulantes, que o diâmetro hidrodinâmico médio da proteína apresenta um alto valor (em torno de 300 nm) nos três solventes analisados, possivelmente devido a sistemas agregados presentes na solução. Sendo assim, este método não foi usado para análise de tamanho da gliadina.

Para analisar a distribuição de tamanhos da proteína em solução utilizou-se o algorítmico CONTIN (*software* Brookhaven Instruments). A partir deste método pode-se obter o diâmetro hidrodinâmico em função do número de partículas presentes em um determinado volume.⁹⁹ Cabe ressaltar que uma vez que as proteínas sofrem mudanças significativas no raio hidrodinâmico as observações dessas mudanças (e conseqüentemente no diâmetro hidrodinâmico) pode ser um bom indicativo do desdobramento da proteína.¹⁰⁶

5.1.3.1. Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico Para a Amostra em H₂O

Inicialmente, foi feito o estudo da gliadina utilizando como solvente H₂O deionizada. Estudos afirmam que neste solvente, biomoléculas, em particular as proteínas, enovelam-se e exibem funções biológicas.¹⁰⁷

A Figura 22 apresenta as distribuições de tamanhos da gliadina usando H₂O deionizada como solvente em pH 1,2; 6,8 e 9,8.

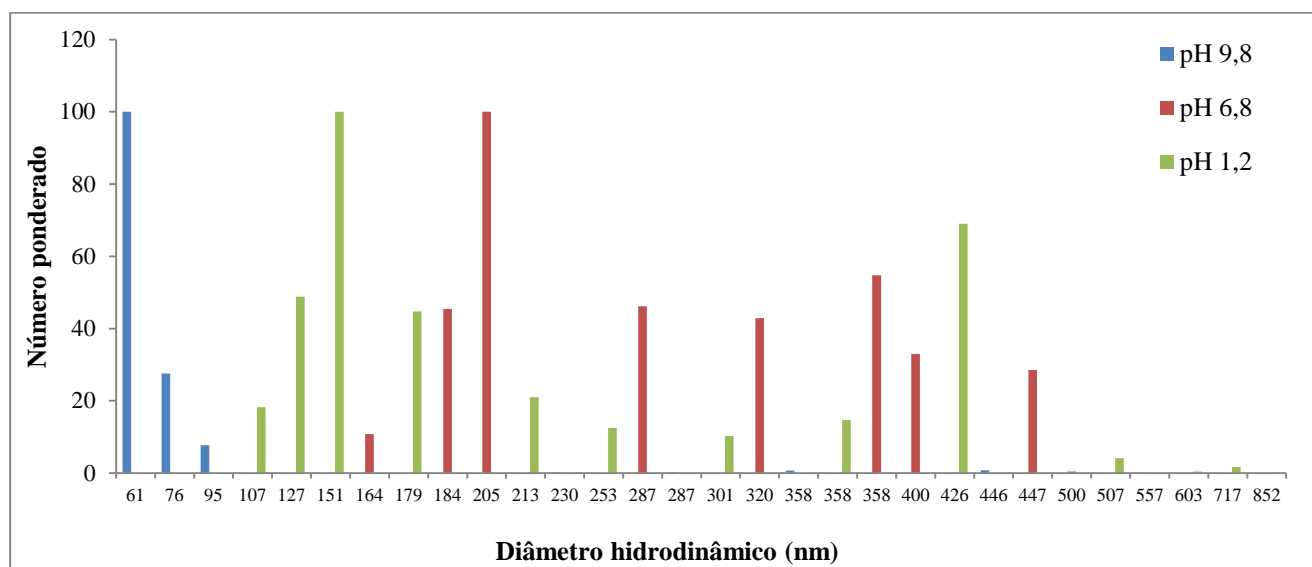


Figura 22. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em H₂O deionizada em função do diâmetro hidrodinâmico em pH 1,2; 6,8 e 9,8 à 24°C.

Observa-se que os dados encontrados nesta etapa estão de acordo com os dados obtidos de *PD. I* a partir do método dos cumulantes, mostrado na tabela III. Em outras

palavras, proteína apresenta uma distribuição de tamanho variada, o que acarreta um alto valor de *PD. I*.

Estudos afirmam que a biomolécula em solução aquosa interage com dois “tipos” diferentes de H_2O : a H_2O presente internamente e as moléculas de H_2O presentes na superfície da proteína. As moléculas de H_2O internamente ligadas à proteína, parecem ser extensivamente envolvidas na mesma por ligações de hidrogênio. Assim, a H_2O atua mantendo o empacotamento da proteína globular. Já a H_2O presente na superfície é a primeira camada de H_2O que interage com os átomos da proteína expostos ao solvente.¹⁰⁸

Em soluções essencialmente aquosas e neutras, o estado nativo (N) de uma proteína tem maior estabilidade, o que é fundamental para preservar sua função.¹⁰⁸ Porém, vários fatores, tais como, pH e concentração do soluto podem afetar este equilíbrio nativo (N) promovendo o surgimento de conformações intermediárias tais como parcialmente enovelados (PE), agregados (A) e desenovelados (D).

Nos sistemas acima (que são essencialmente aquosos, porém apresentam variação de pH) possivelmente os estados N, PE, A e D da proteína estão circundados por moléculas de H_2O , organizadas em camadas de hidratação. A quantidade de energia livre envolvida na hidratação é proporcional ao tamanho da camada. A forma D, por exemplo, apresenta uma grande superfície, logo sua camada de hidratação é mais extensa comparada ao estado N (Figura 23).¹⁰⁸

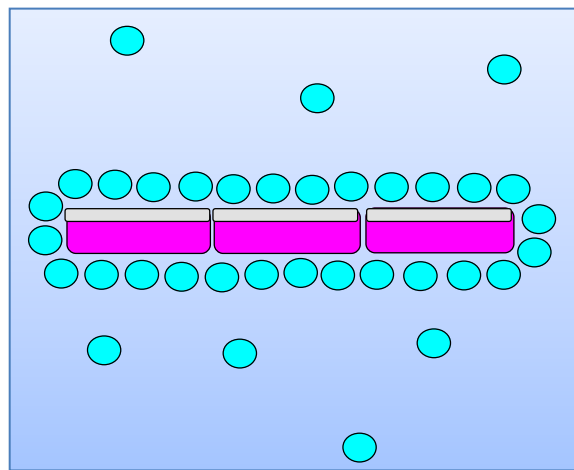


Figura 23. Ilustração de moléculas de H_2O (esferas azuis) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado desenovelado.¹⁰⁸

No entanto, este estado desenovelado D requer uma quantidade de energia livre de hidratação muito mais elevada que o estado nativo N para ser organizado. Esta energia é

proveniente das interações hidrofóbicas entre os grupamentos apolares de aminoácidos. Como no estado D estes grupamentos estão expostos ao solvente, a interação com a água não fornece esta energia. O estado N então, apesar de ter uma entropia conformacional desfavorável (Figura 24), a energia livre é menor e facilmente obtida pela força hidrofóbica que compele os grupos apolares da proteína a permanecerem unidos, com menor entropia, no interior da molécula. Portanto, este estado tende a ser o mais estável.¹⁰⁸

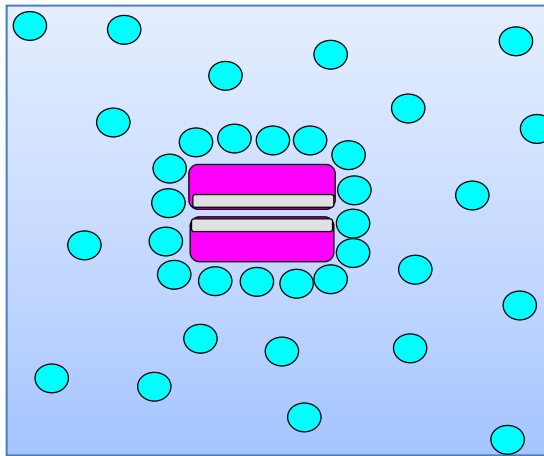


Figura 24. Ilustração de moléculas de H₂O (esferas azuis) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado enovelado (ilustração sugerida para o pH 9,8).¹⁰⁸

Sabe-se que o pH caracteriza o equilíbrio entre íons H⁺ e OH⁻ de uma solução e sua mudança afeta o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos de uma proteína. Assim, mudanças no pH vão afetar a distribuição de cargas de uma proteína e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína, entre a proteína e o solvente e entre as próprias moléculas do solvente.¹⁰⁸ Mudanças no pH irão protonar e desprotonar cadeias laterais ionizáveis mudando a solubilidade da proteína em determinados solventes e por conseqüência há variação na distribuição de cargas na proteína.

De acordo com a figura 22, em pH 9,8 observa-se uma menor distribuição de tamanho, diferente do que ocorre nos demais pHs. Acredita-se que no pH 1,2 os grupos carboxilatos (-COO⁻) da gliadina encontram-se protonados e os resíduos dos grupos amina da glutamina estão ionizados. A repulsão das cargas entre a cadeia lateral com os íons H⁺ induz um parcial desenovelamento da proteína, ruptura das ligações de hidrogênio e um rompimento das interações hidrofóbicas. Já em pH 9,8, ocorre a desprotonação dos grupos amino (-NH₃⁺). Como este meio contém grupos OH⁻ disponíveis (presentes devido ao aumento do pH) pode ocorrer uma diminuição nas forças de interação repulsivas, o que diminui a formação da

interação proteína-proteína e consequente redução dos agregados. Desta forma tem-se neste pH um sistema com uma configuração mais estável.

5.1.3.2. Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico Para a Amostra em DMSO

O dimetilsulfóxido (DMSO), segundo solvente no qual a gliadina foi analisada, desempenha um papel importante na biologia como um agente crioprotetor^{109, 110} e apresenta também uma aplicação farmacológica generalizada como um solvente.¹¹⁰

Sabe-se que o estado nativo enovelado e a função de muitas proteínas são significativamente influenciados pela presença deste solvente. Acredita-se que o DMSO possa competir e romper muitas interações não covalentes concorrentes, como por exemplo, ligação de hidrogênio, forças de *van der waals* e etc., que estabilizam a estrutura da proteína.¹¹¹ Além disso, estudos mostram que estas ligações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas são importantes para a agregação da gliadina e implicam na estrutura e propriedade física da farinha de trigo.³⁸

Com o objetivo de analisar o tamanho da proteína e a presença de agregados neste solvente têm-se a Figura 25 abaixo.

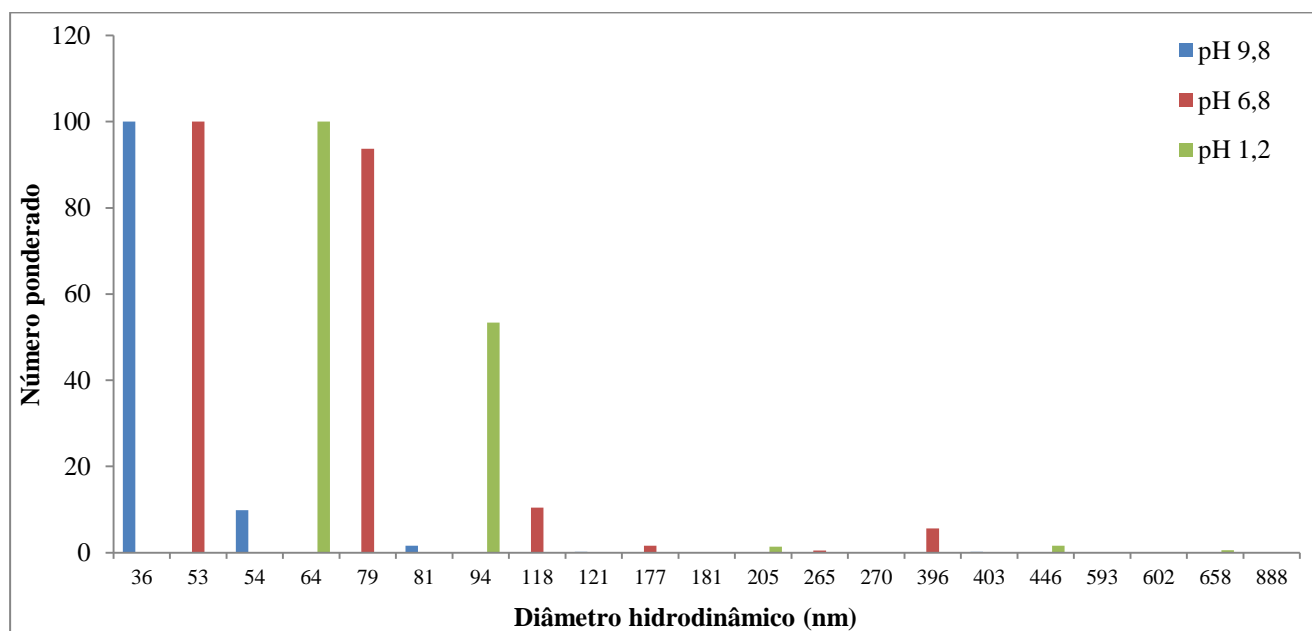


Figura 25. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em DMSO em função do diâmetro hidrodinâmico nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8 à 24°C.

Novamente observa-se um alto valor de *PD. I* confirmando o que foi visto na tabela III. Com base nesta figura pode-se supor que para a gliadina em DMSO há um aumento na distribuição de tamanho (principalmente em pH 1,2), causado pela ruptura das ligações não

covalentes intermoleculares ocasionando uma maior interação proteína-proteína. Estes eventos acarretaram a agregação da gliadina, que é verificada nesta figura a partir dos altos valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos pela técnica. No entanto, a representação numérica destes agregados é pouca quando comparada ao número ponderado de moléculas presentes na solução.

Outra observação importante para este sistema é que diferentemente das amostras em água, os agregados (a distribuição de tamanho de maior tamanho) não contribuem significativamente para o sistema (em relação ao número de moléculas), devido a variação do pH. Acredita-se que neste solvente a amostra é polidispersa apresentando uma conformação variada. Um sistema com caráter heterogêneo na concentração deste estudo já foi observada na proteína lisozima.¹¹²

Sabe-se que a conformação da proteína neste solvente é dependente da concentração de DMSO presente. De acordo com a literatura, em concentrações de 10 a 70%, o DMSO pode influenciar as propriedades das proteínas de várias maneiras. O mesmo pode atuar como um estabilizador bem como um agente desnaturante.¹¹³ A propriedade desnaturante poderia ser atribuída ao fato do DMSO conter um forte aceitador de ligação de hidrogênio (S=O) que rompe as ligações de hidrogênio intramoleculares dos grupos peptídicos N-H (os grupos S=O são aceptores de H mais fortes que os grupos C=O). Já os dois grupos CH₃- do DMSO presumivelmente interagem com os resíduos hidrofóbicos da proteína.^{111, 114}

Para a lisozima, nesta faixa de concentração, a estrutura nativa da proteína mantém os aminoácidos com resíduos hidrofóbicos profundamente enterrados dentro do núcleo da molécula. Desta forma pode-se dizer que a proteína está enovelada nesta concentração. Na faixa entre 70 e 90% de DMSO, rompe-se a estrutura terciária e os resíduos hidrofóbicos ficam expostos, ocorrendo assim o desenovelamento da proteína. De 90 a 100% de DMSO, a proteína minimiza a área de contato entre o solvente e muitos dos resíduos hidrofóbicos no núcleo da proteína que agora ficam expostos, e os que estavam expostos ficam agora aprisionados no núcleo. Este regime recebeu o nome de estado conformacional da proteína colapsada parcialmente.¹¹²

Para a gliadina, as medidas de DLS dadas a partir do programa CONTIN (*software* Brookhaven Instruments), mostraram a presença de um sistema polidisperso (Figura 25) com a presença de estruturas compactas com tamanhos de 66 nm (para amostras em pH 1,2) e 34 nm (para amostras em pH 9,8). Duas hipóteses de conformação podem ser dadas com base nos dados acima:

✓ Primeira hipótese:

A gliadina não sofreu o completo desenovelamento estando em um sistema intermediário, que contém várias conformações, entre elas a gliadina nativa (N), desenovelada (D) e agregada (hipótese para o pH 9,8) (Figura 26).

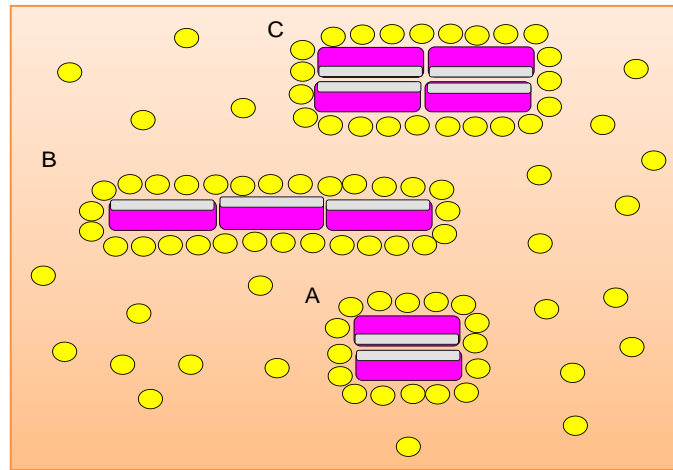


Figura 26. Ilustração de moléculas de DMSO (esferas amarelas) formando camadas de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado nativo (A), desenovelada (B) e agregada (C).

✓ Segunda hipótese:

Semelhante ao observado na lisozima, a gliadina está em um regime conformacional chamado de parcialmente colapsado onde os resíduos hidrofóbicos que estavam aprisionados na estrutura nativa agora ficam expostos, aprisionando os demais resíduos em um enovelamento inverso. Acompanhado desta estrutura teríamos ainda regiões em que a gliadina estaria desenovelada (devido a presença do forte aceitador de ligação de hidrogênio (S=O) e ainda teríamos regiões com agregados (devido a interação proteína-proteína) (Figura 27).

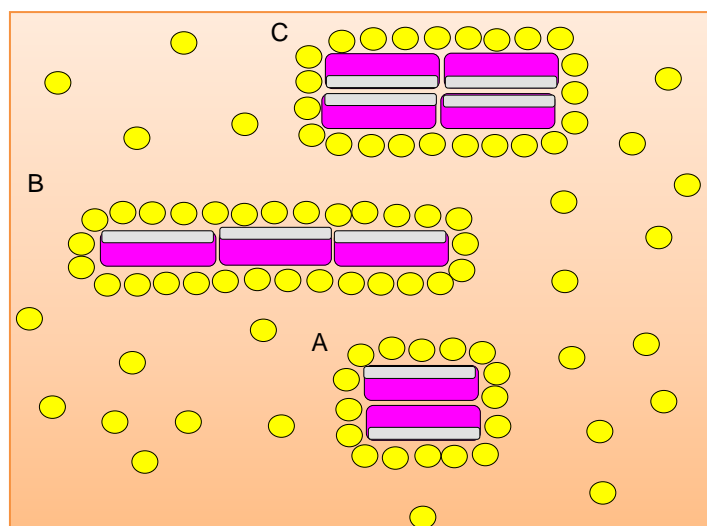


Figura 27. Ilustração de moléculas de DMSO (esferas amarelas) formando camadas de solvatação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos que agora ficaram expostos)) no estado parcialmente colapsado (A), desenovelada (B) e agregada (C).

5.1.3.3. Estudo do Diâmetro Hidrodinâmico Para a Amostra em H₂O/EtOH 40/60% v/v

O último solvente analisado por DLS foi água/etanol 40/60% v/v. Os álcoois são conhecidos como desestabilizadores da estrutura nativa de proteínas. Informações sobre as propriedades de estados não nativos de proteínas podem fornecer informações sobre os mecanismos de enovelamento, estabilidade e transporte de proteínas através de membranas. Além disso, ao contrário do que ocorre com as proteínas no estado nativo, poucos estudos estruturais e biofísicos foram realizados com as proteínas no estado não nativo¹¹⁵, em especial, com a gliadina, proteína a que se refere esta dissertação.

Afirma-se que o etanol produz três efeitos distintos sobre a estrutura da proteína: destruição da estrutura nativa rígida, indução de uma estrutura helicoidal e dissolução dos peptídeos ou seus agregados.^{115, 116} Estes efeitos nos polipeptídeos podem causar a formação de conformações não nativas nas proteínas. Em proteínas como a ribonuclease A, citocromo C, mioglobina e lisozima, foi observado que a adição de álcool induziu estados parcialmente enovelados com elevados conteúdos helicoidais.¹¹⁵

No entanto, este efeito é dependente da concentração de etanol presente no solvente. Estudos realizados com a proteína albumina de soro humano mostraram que em uma concentração em torno de 30-50% de etanol, ocorre uma transição de folhas- β ligadas a hidrogênio intramoleculares para folhas- β ligadas a hidrogênio intermoleculares. Além disso,

observou-se a redução do conteúdo helicoidal acompanhado de um aumento na estrutura folhas- β . Fato também observado com a proteína concanavalina. Em concentrações de 35-60% observa-se também um aumento nos agregados formados. Acredita-se então que nesta concentração de solvente a amostra apresenta uma instabilidade importante em sua estrutura. A concentrações elevadas (80-90% (v/v)) o teor helicoidal novamente é aumentado, sugerindo uma nova reorganização das moléculas de proteína, acompanhada por um ganho de estrutura α -hélice.¹¹⁵

Com o objetivo de analisar a diâmetro hidrodinâmico da gliadina em H₂O/EtOH 40/60% v/v têm-se a Figura 28.

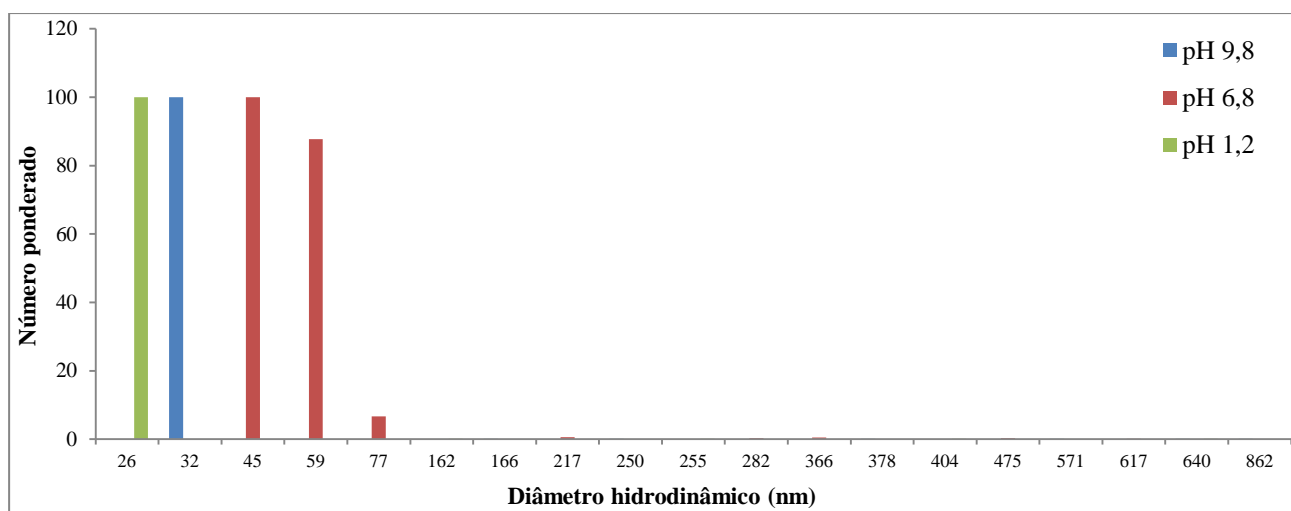


Figura 28. Distribuição do número ponderado de partículas de gliadina em H₂O/EtOH 40/60% v/v em função do diâmetro hidrodinâmico nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8 à 24°C.

A partir dela, novamente se observa uma distribuição de tamanhos de moléculas dependente do pH analisado. Porém, para este solvente, tal como em DMSO, o número ponderado das moléculas maiores são insignificantes comparados às moléculas menores (digam-se insignificantes em relação à quantidade de partículas dispersas no solvente, porém sabe-se que estes agregados influenciam as medidas de DLS).

Outra observação importante é que, diferente do que ocorre nos demais solventes, a menor distribuição de tamanho de moléculas é obtido no pH 1,2, ou seja, em um meio protonado. É possível se observar que neste pH a proteína encontra-se mais compacta comparada a amostra no pH 9,8. Logo, acredita-se que alterações no pH podem estar relacionadas a agregação e desagregação da proteína que irá provocar uma mudança na conformação ou estrutura da mesma.

Até o momento não existe consenso sobre como as moléculas do etanol interagem com as moléculas de proteína. São propostas algumas hipóteses: a primeira afirma que as

cavidades hidrofóbicas são os principais locais de ligação e a segunda hipótese é que a interação ocorre entre as cadeias de aminoácidos polares da proteína e os grupos hidroxil do álcool. É possível que estes dois tipos de ligação estejam envolvidos na interação proteína-álcool.¹¹⁵

Semelhante à análise feita nos demais solventes, em pH 9,8, nesta amostra tem-se: H₂O, etanol (que é um caotrópico anfifílico, com um segmento hidrocarbonado hidrofóbico (-CH₂-CH₂-) junto com um grupo hidrofílico (-OH)) e OH⁻ (usado para ajuste do pH). Caso o percentual de etanol fosse maior (acima de 70%) e não houvesse alteração de pH, o solvente iria misturar-se com a água acomodando no solvente os grupos apolares da proteína, atenuando a força hidrofóbica, desfavorecendo o estado nativo em detrimento ao estado desnaturado. O caotrópico então diminuiria a energia livre do estado desenovelado em relação ao estado nativo de uma proteína (Figura 29), deslocando o equilíbrio nativo e desenovelado no sentido do estado desenovelado.¹⁰⁸

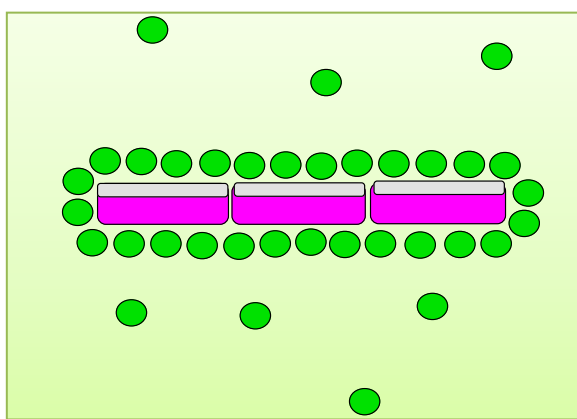


Figura 29. Ilustração de moléculas de H₂O/EtOH 40/60% v/v (esferas verdes) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa (resíduos hidrofílicos) e cinza (resíduos hidrofóbicos)) no estado desenovelado.

No entanto, o percentual de etanol (60%) e a presença de OH⁻ (devido ao ajuste do pH), provoca uma instabilidade no sistema, fazendo com que se tenha moléculas nativas, desenoveladas e agregadas (Figura 30), semelhante com o que ocorre com a amostra em DMSO.

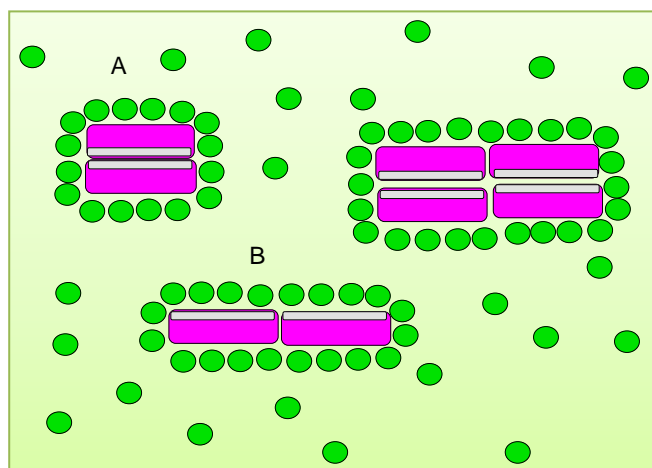


Figura 30. Ilustração de moléculas de H₂O/EtOH 40/60% v/v (esferas verdes) formando uma camada de hidratação ao redor da proteína (estruturas em rosa), no estado nativo (A), desenovelado (B) e no estado agregado (C), em pH 9,8.

5.1.3.4. Análise dos Diâmetros Hidrodinâmicos Relacionando os solventes

A tabela V apresenta a média dos diâmetros hidrodinâmicos das moléculas encontradas em maior quantidade nos três solventes estudados.

Tabela V. Média dos diâmetros hidrodinâmicos (D_h) das partículas de gliadina nos solventes analisados nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8.

Amostra	D_h - pH 1,2	Erro	D_h - pH 6,8	Erro	D_h - pH 9,8	Erro
H ₂ O deionizada	165,0 nm	± 20,5 nm	257,0 nm	± 73,0 nm	68,0 nm	± 0,3 nm
DMSO	66,0 nm	± 3,0 nm	42,0 nm	± 9,4 nm	34,0 nm	± 3,1 nm
H ₂ O/EtOH 40/60% v/v	32,0 nm	± 8,3 nm	51,0 nm	± 7,1 nm	34,0 nm	± 2,6 nm

É possível concluir que as partículas de gliadina nos solventes H₂O deionizada e DMSO encontram-se mais estáveis em pH básico (em torno de 9,8) apresentando uma estrutura mais compacta, com uma distribuição de tamanho reduzida (comparada aos demais pHs analisados). Em H₂O deionizada, neste pH, a gliadina encontra-se com uma conformação mais enovelada. Para a amostra em DMSO, em 9,8, comparada aos demais pHs, também encontramos uma estrutura mais compacta e enovelada. Conclui-se assim, que para estas amostras um sistema mais estável se dá em pH 9,8.

Já as amostras em etanol apresentam uma estrutura instável e dois comportamentos parecidos. Em pH 9,8 e 1,2 a amostra encontra-se mais compacta com uma menor distribuição de tamanho em pH 1,2. É sugerido então, que a amostra em pH 1,2, encontra-se

mais enovelada. Já a amostra em pH 9,8 é mais instável apresentando um teor maior de agregados e moléculas desenoveladas.

5.2. POTENCIAL ZETA (PZ)

Na dispersão das partículas em um líquido, encontros frequentes entre as partículas ocorrem devido ao movimento Browniano. A força entre as partículas é que determinará se tais encontros resultam em contato permanente ou se partículas permanecem livres. A estabilidade das partículas dependerá das interações atrativas e repulsivas que atuam entre as elas.¹¹⁷ Logo, a técnica de PZ é frequentemente a chave para entender os processos de dispersão e agregação de proteínas.

De acordo com a literatura, se as partículas apresentam valores de PZ positivos ou negativos altos, elas se repelem, o que inibe a agregação e melhora a estabilidade do sistema. Se os valores absolutos de PZ são baixos, as partículas vão aglomerar e a dispersão torna-se instável. Atualmente admite-se que potenciais zeta de ± 30 mV até maiores que ± 60 mV são necessários para a plena estabilização eletrostática. Entre ± 5 mV e ± 15 mV estão no limite de agregação limitada e entre ± 5 mV e ± 3 mV máxima agregação. Resumindo: a agregação de partículas é menos provável de ocorrer em partículas carregadas (alto potencial) devido a repulsão elétrica.¹¹⁸

Nesta dissertação, com o objetivo de analisar a estabilidade a partir da técnica de PZ, considerou-se a variação do pH das amostras nos solventes H₂O deionizada e DMSO. Para o solvente H₂O/EtOH 40/60% v/v as análises de PZ também foram realizadas, porém, dois motivos impediram que os mesmos não fossem apresentados nesta dissertação. Primeiramente os valores medidos em duplicata foram muito diferentes entre si. Uma explicação para o fato deve-se a instabilidade do sistema. Em segundo lugar, o eletrodo utilizado não era adequado para a realização das medidas (o mesmo poderia ser danificado caso as análises continuassem a ser feitas). Sendo assim, resolveu-se não realizar as análises neste solvente. A figura 31 fornece as medidas de PZ encontradas para as amostras em H₂O deionizada e DMSO.

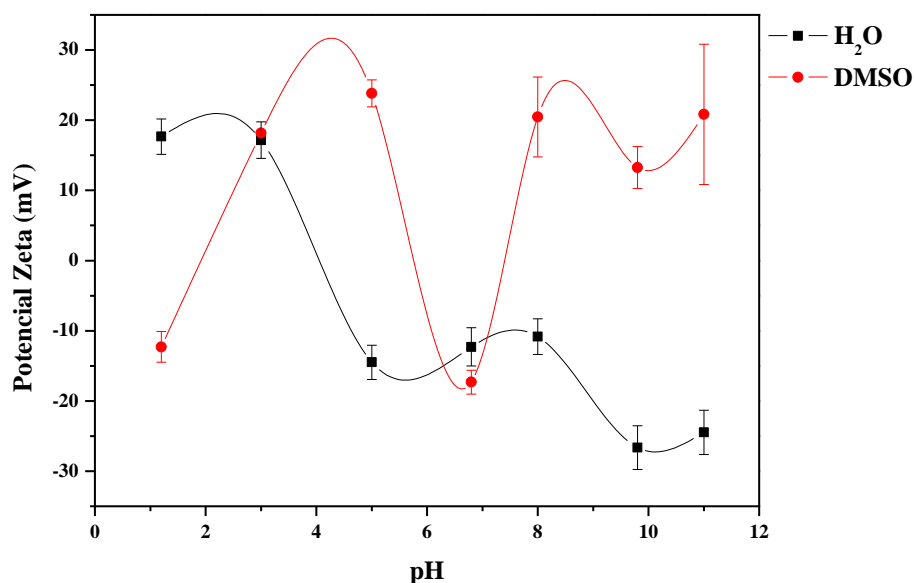


Figura 31. Potencial Zeta como função do pH das amostras de gliadina em H₂O deionizada e em DMSO.

Os resultados indicam que o pH tem um efeito pronunciado sobre o PZ das partículas nos dois casos analisados. De acordo com a teoria, a carga de superfície do material é largamente influenciada pela protonação ou ionização.¹¹⁹ Sendo assim, os dados encontram-se dentro do esperado.

Além disso, as proteínas apresentam um determinado ponto conhecido como ponto isoelétrico (PI). Neste ponto ocorre um equilíbrio entre cargas positivas e negativas o que ocasiona um PZ nulo.¹²¹ Para a gliadina o PI é estimado em aproximadamente 5,76 em solução aquosa pura.¹²⁰ Vê-se que o ponto isoelétrico é dependente do solvente utilizado.

A amostra em H₂O deionizada, em pH 1,2, apresenta PZ com valor de +17,7 mV enquanto que para a amostra em DMSO, neste mesmo pH, o valor de PZ é de -12,29 mV. Uma hipótese pode ser fornecida: para a amostra em água, em pH 1,2, os grupos carboxilatos (-COO⁻) encontram-se protonados e os resíduos dos grupos amida estão ionizados. Como vimos nos resultados de DLS, teremos um parcial desenovelamento da proteína e conseqüentemente o sistema será instável nesta condição. Já para a amostra em DMSO, é sugerido que os resíduos hidrofóbicos em água, estejam agora expostos, ou seja, que a proteína tenha uma conformação parcialmente colapsada, semelhante ao que ocorre com a lisozima.

Em aumentarmos o pH, ocorre a desprotonação da amostra (nos dois casos). Para a amostra em água, com a variação do pH, ocorre uma variação decrescente do PZ até que o mesmo atinja um valor de aproximadamente -26,6 mV. É sugerido que a desprotonação da

amostra em H₂O deionizada acarreta uma maior estabilidade da mesma. Acredita-se desta forma, que quanto maior o PZ (em módulo) o mais provável é que a suspensão seja mais estável porque as partículas carregadas se repelem e assim superam a tendência natural a agregação. Este dado corrobora com os valores encontrados para as medidas de *PD*, *I* e diâmetro hidrodinâmico encontrados nos itens anteriores.

A figura 32 mostra as soluções de gliadina em H₂O deionizada e a alteração visual da mesma dependendo do pH, outro fator comprovador de “leve” estabilidade a pHs básicos.



Figura 32. Solução de gliadina em H₂O deionizada nos pHs (A) 6,8 onde a proteína tem uma tendência a agregação, e (B) 9,8 onde a proteína tende a uma leve estabilidade.

Já para a amostra em DMSO, o comportamento é completamente diferente. A amostra é instável, com uma distribuição de tamanho variada (como mostrado no item 5.1.3.2). Desta forma o PZ varia de valores positivos a negativos de acordo com a variação do pH. Os dados de DLS corroboram com estes resultados, mostrando a partir da Figura 25 a variada distribuição de tamanho das amostras o que indica as diferentes conformações que a proteína pode adquirir: nativa, desenovelada e os agregados.

5.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR - ATR)

A partir da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) deseja-se investigar mudanças na conformação da gliadina nos solventes e pHs estudados. As bandas I e II são as duas mais proeminentes bandas vibracionais do esqueleto da proteína. A banda de amida I é a região espectral mais sensível aos componentes estruturais da estrutura secundária de proteínas e é quase inteiramente devido à deformação axial das ligações C=O (cerca de 80%). A banda de amida II resulta principalmente das flexões N-H (40 a 60% da energia potencial) e da vibração C-N (18-40%) mostrando muito menos sensibilidade conformacional que a banda de amida I.⁹²

A tabela VI apresenta as variações na banda de Amida I e as estruturas relacionadas a ela.

Tabela VI. Bandas na região do infravermelho características das bandas Amida I.^{121, 122}

Amida I (cm ⁻¹)	Conformação
1600-1609	(NH ₂ ⁺)
1606-1611	(NH ₂ ⁺)
1617-1623	folha- β
1627-1632	folha- β
1636-1643	estrutura ao acaso – <i>random coil</i>
1647-1655	α -hélice
1668-1671	voltas reversas
1692-1693	folha- β

Mudanças da banda de Amida I serão usadas para monitorar a formação das ligações de hidrogênio entre C=O das ligações de amida da proteína e as moléculas do solvente. Sendo a banda de Amida I a mais confiável para análise da estrutura, (a mesma é composta por vários componentes que se sobrepõem que podem ser atribuídas a diferentes conformações da estrutura secundária)¹¹ ela foi escolhida para análise.

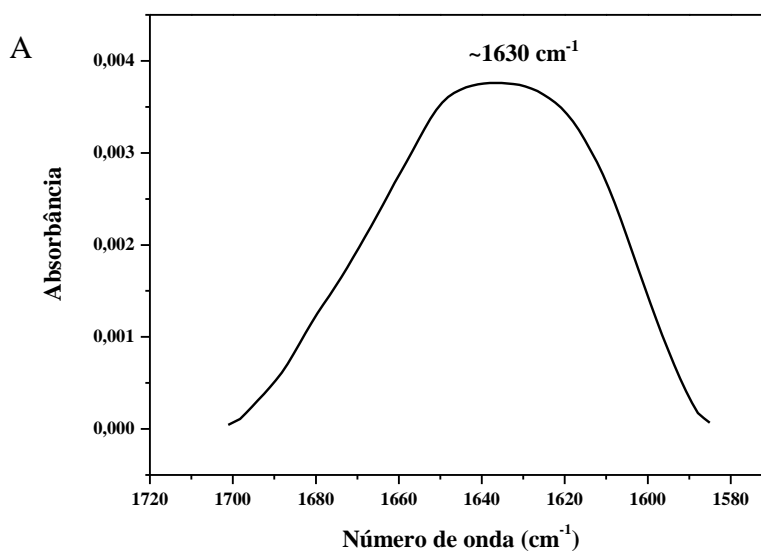
Estudos anteriores realizados com filmes de gliadina apresentaram características gerais semelhantes ao glúten do trigo e gliadina purificada em seu estado hidratado.⁶ Sendo assim, acredita-se que apesar da análise de FTIR ter sido realizada em filmes (para as amostras em H₂O deionizada e H₂O/EtOH 40/60% v/v) as características dos resultados serão

semelhantes aos encontrados em solução. Acredita-se ainda, que o fato de diferentes tipos de gliadina terem sido estudados como uma mistura e não separadas como na maioria dos estudos^{39, 60, 123}, não afetou os resultados. Já se realizou um estudo com a gliadina na forma de mistura onde se observou este fato.¹¹ Este estudo sugere que a α , e γ -gliadina tem estruturas primárias semelhantes sendo ricas em α -hélice nos domínios não repetitivos. Além disso, seus domínios repetitivos tem motivos peptídicos muito semelhantes a ω -gliadina.¹¹

Conforme descrito no item 4.2.3., a gliadina foi preparada em H₂O deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO) e H₂O/EtOH 40/60% v/v e o solvente foi secado (amostras em DMSO em solução também foram feitas). Os espectros na região de Amida I foram analisados e em seguida foi feito o ajuste de curvas gaussianas com o objetivo de se conhecer o teor das várias estruturas secundárias presentes.

5.3.1. Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em H₂O deionizada por FTIR-ATR

A figura 33 mostra o espectro de infravermelho da gliadina em água (A) juntamente com o espectro após o ajuste da curva (B). Já a figura 34 mostra as áreas relativas das bandas que foram atribuídas aos componentes estruturais.



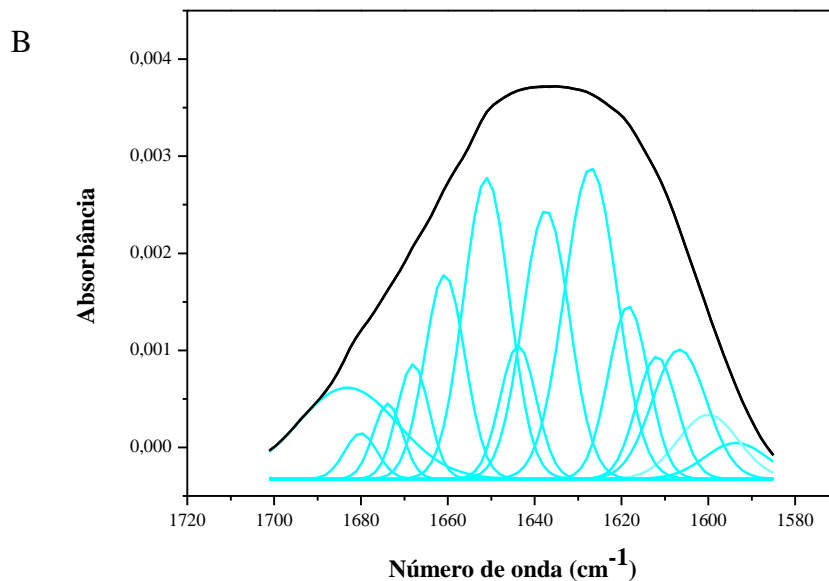


Figura 33. Espectro do filme de gliadina em H₂O deionizada no pH 9,8: A) Espectro original na região da banda de Amida I, B) Espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas).

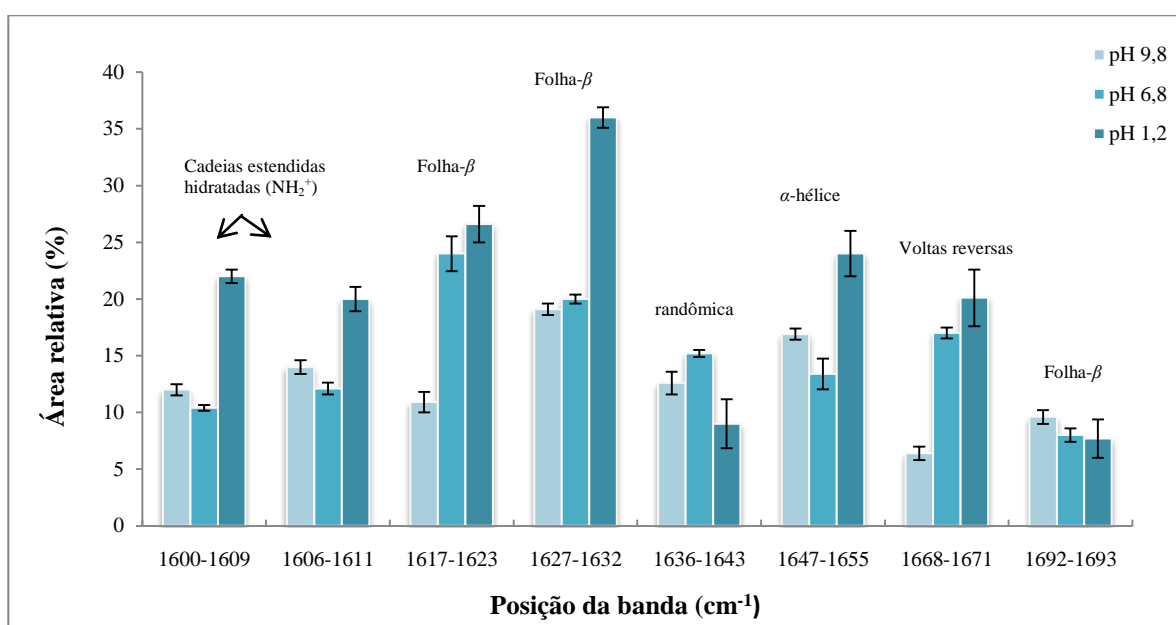


Figure 34. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em H₂O nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8.

Como pode ser visto na figura 33 (A) a gliadina exibe uma banda de amida I intensa centrada aproximadamente em 1627-1632 cm⁻¹ com uma porcentagem de 20% para as amostras em pH 9,8 e 6,8. Esta banda sofre um aumento à medida que se reduz o pH, atingindo o percentual de 36% da estrutura no pH 1,2. De acordo com a literatura a banda em aproximadamente 1630 cm⁻¹ está relacionada a uma estrutura folhas- β estendida,¹²⁴

caracterizada por um aumento na interação proteína-proteína. Estudos indicam que esta estrutura seja formada, pois as ligações das moléculas de água irão ocorrer preferencialmente nos grupos peptídeos amida polares, quebrando as ligações de hidrogênio internas, especialmente aquelas envolvendo as cadeias laterais polares, retirando o efeito de distorção sobre a estrutura secundária e dando liberdade da proteína se mover. O aumento da mobilidade das partes hidratadas permitiria rearranjos estruturais com a formação de folhas- β . A competição entre as interações proteína-proteína e proteína-água é determinada pela disponibilidade de parceiros para a ligação.¹²³ Sugere-se que o aumento do pH faz com que a quebra das ligações de hidrogênio diminua e novas sejam feitas diminuindo assim a presença desta banda.

As absorções entre 1600-1611 cm^{-1} são devido a vibração das cadeias estendidas NH_2 e o teor desta banda aumenta consideravelmente para aproximadamente 20% à medida que se diminui o pH.

Já as bandas entre 1617-1623 cm^{-1} são associadas a redes de folhas- β intermoleculares uma vez que ocorrem facilmente sobre a agregação de proteínas e polipeptídeos.¹²⁴ Estas bandas tem um teor de 11% no pH 9,8, aumentando para 24% no pH 6,8 e 27% no pH 9,8. Este fato está de acordo com o observado nos dados de DLS e PZ onde a amostra com pH 9,8 mostrou-se menos polidispersa (com um teor menor de agregados) e mais estável. Além disso, de acordo com alguns autores, as bandas entre 1692-1693 cm^{-1} são atribuídas a estruturas folhas- β antiparalelas, ligadas a hidrogênio intermoleculares pertencentes a agregados de proteínas,⁹⁷ porém o teor é fraco (8% nos pHs 1,2 e 6,8 e 10% no pH 9,8). Para a gliadina, constatou-se que a secagem induz a formação de folhas- β ligadas a hidrogênio intermoleculares.

De 1636-1643 cm^{-1} a conformação é randômica, caracterizada por uma estrutura aleatória. Seu teor é de 13% no pH 9,8, aumenta para 15% no pH 6,8, diminuindo para 9% no pH 1,2, o que indica que houve um aumento na organização do sistema.

Embora as absorções 1647 a 1655 cm^{-1} também possam conter algumas contribuições devido à conformação randômica e para a cadeia lateral da glutamina, ela é convencionalmente atribuída à estrutura α -hélice.^{11, 121} Em pH 9,8 o teor desta estrutura é 17%, sofrendo uma redução para 13% no pH 6,8 e novamente um aumento para 24% no pH 1,2. Atualmente sabe-se que esta estrutura está presente principalmente no domínio C-terminal enquanto que o domínio repetitivo N-terminal contém voltas reversas repetidas regularmente. Estudos indicam que os domínios N-terminal da α -gliadina contém predominantemente a estrutura voltas reversas, com um menor teor de estrutura β , α -hélice e estrutura desordenada.

Além disso, os peptídeos correspondentes ao domínio C-terminal mostrou absorvâncias principais associadas a α -hélice com menor conteúdo de outros tipos de estrutura.¹²⁴

As absorções em 1668-1671 cm^{-1} foram relacionadas a estruturas voltas reversas cujo conteúdo 6% no pH 9,8, aumentando para 17% no pH 6,8 e 20% no pH 1,2. Este tipo de estrutura é predita em domínios repetitivos da gliadina, ricos em prolina (30%)⁶ e também no glúten tendo sido observado a partir da técnica Dicroísmo Circular em prolaminas altamente repetitivas.¹²⁴ Além disso é sugerido que as gliadinas são ricas em resíduos de glutamina (30-50%), sendo assim alguns autores atribuíram esta conformação a resíduos da cadeia lateral de glutamina.⁶

Finalizando, as absorções entre 1622 cm^{-1} e 1693 cm^{-1} são atribuídas a ligações intermoleculares (folhas- β) e a presença de agregados de proteínas.⁶ Estes agregados contribuem com cerca de 35% do sinal no pH 1,2, 32% no pH 6,8 e 20% no pH 9,8. Novamente observamos um aumento na agregação com a diminuição do pH. O aumento desta banda sugere um aumento da estrutura folhas- β ligada a hidrogênios intermoleculares típicos de agregados.

O presente estudo da proteína em água mostrou que a estrutura secundária é caracterizada por um maior teor de folhas- β (36%) em pH ácido e um pequeno conteúdo de regiões α -hélice (24%) devido a predominância na mistura das gliadinas ricas em enxofre (α , γ -gliadina).³⁹ O aumento do pH (até 9,8) resultou em uma diminuição no teor das folhas- β (19%) e das regiões de α -hélice (17%). No pH de 9,8 a amostra encontra-se mais estável.

5.3.2. Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em Dimetilsulfóxido (DMSO) por FTIR-ATR

O segundo solvente utilizado nas análises de FTIR-ATR é o dimetilsulfóxido (DMSO). Como visto no item 4.2.1., para este solvente, as análises foram realizadas em filme (a fim de comparação com as amostras contendo H_2O deionizada) e em solução. Ao se analisar a amostra em filme e em solução não foi detectada diferença significativa entre os dois casos, sendo assim, as análises mostradas, referem-se às amostras em solução devido ao fato das demais análises terem sido feitas desta forma.

Estudos^{111, 112, 113} indicam que o DMSO atua como agente desnaturante de proteínas. Sabe-se que a estrutura dobrada nativa e função de proteínas são significativamente influenciadas por este solvente. O mesmo é polar e tende a competir e romper muitas

interações não covalentes, por exemplo, ligação de hidrogênio, e forças de *van der Waals*, que estabilizam a estrutura da proteína.¹¹¹

O papel do DMSO sobre a conformação da gliadina não é bem entendido, sendo assim a técnica de FTIR será uma ferramenta poderosa para detectar estas mudanças.

A figura 35 apresenta o espectro de infravermelho da gliadina em DMSO acompanhado do espectro com o ajuste da curva. Na figura 36 são mostradas as áreas relativas das bandas que foram atribuídas as componentes.

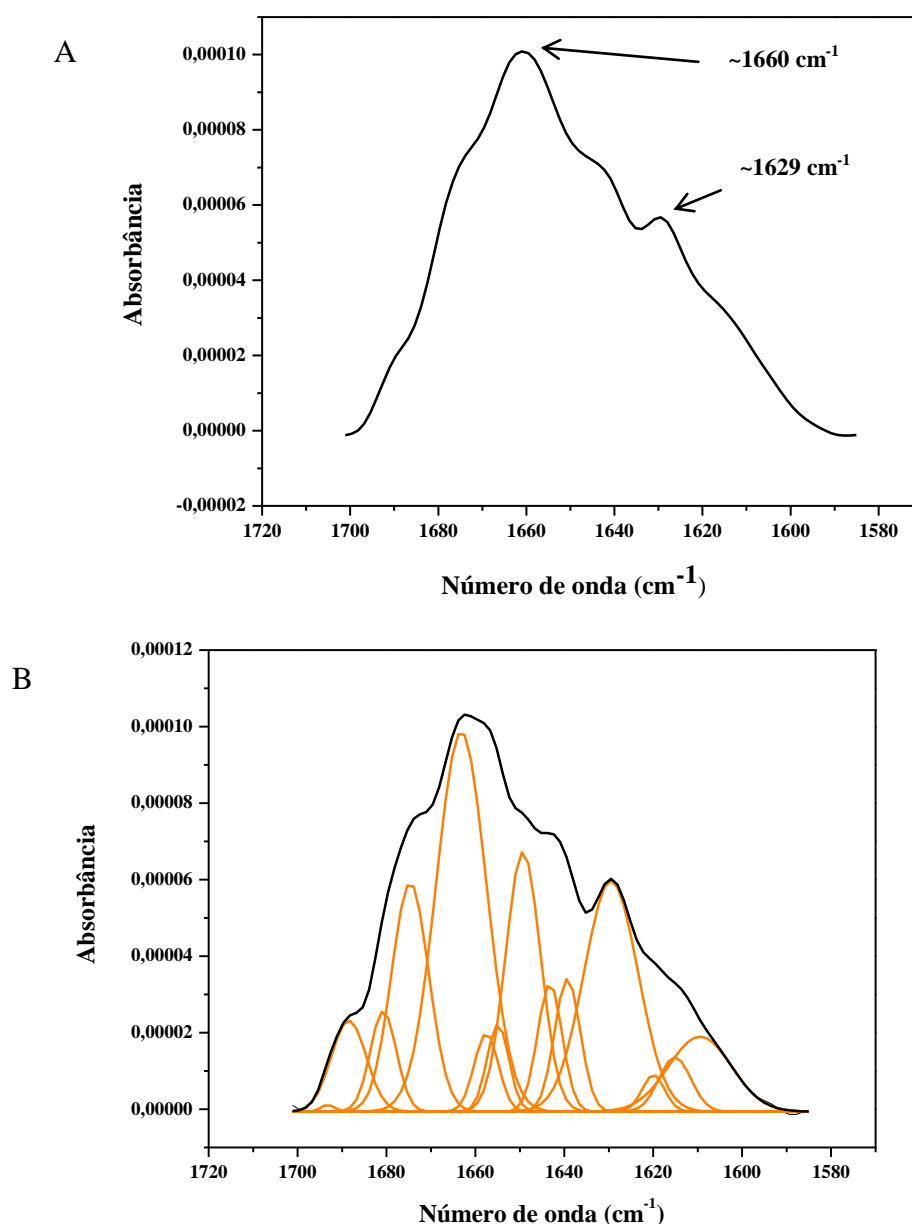


Figura 35. Espectro do filme de gliadina em DMSO no pH 9,8: A) Espectro original na região da banda de Amida I, B) Espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas).

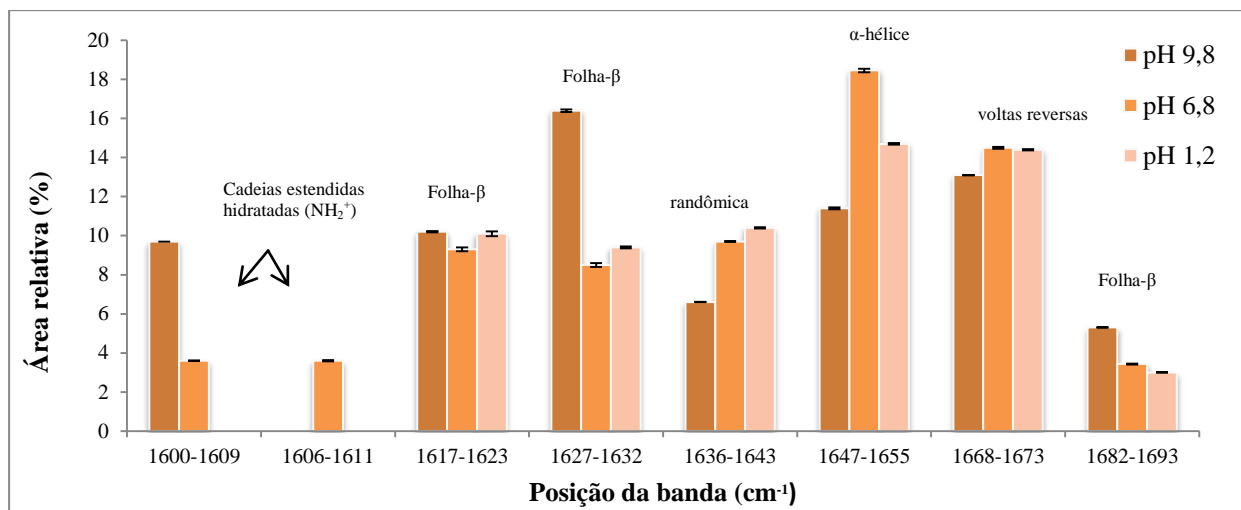


Figure 36. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em DMSO nos pHs 1,2; 6,8 e 9,8.

Observando a figura 35 (A) vê-se que a banda de Amida I máxima está centrada em aproximadamente 1660 cm^{-1} , com o aparecimento de outra banda em aproximadamente 1629 cm^{-1} . Acredita-se que estas alterações estejam relacionadas à quebra da estrutura secundária da proteína. Observações semelhantes foram observadas em outras proteínas, tais como mioglobina, concanavalina A, α -caseína, β -caseína, lisozima, hemoglobina e lactoglobulina.¹²⁵
¹²⁶ Sabe-se que a presença de um forte aceitador de ligação de hidrogênio ($S = O$) no DMSO, resulta na interrupção de todas as ligações de hidrogênio intramoleculares e o aparecimento de uma característica absorção de Amida I com grupos $C = O$ livres. Desta forma todos os peptídeos dos grupos $N - H$ fazem ligação de hidrogênio com as moléculas do solvente e todos os peptídeos do grupo $C = O$ não estão envolvidos em qualquer ligação de hidrogênio.¹²⁵

Sabe-se que as bandas com absorções em $1600-1609\text{ cm}^{-1}$ e $1606-1611\text{ cm}^{-1}$ referem-se a cadeias estendidas hidratadas e são provenientes das cadeias laterais de glutamina.⁹⁷ É observado na figura 36 que a absorção $1606-1611\text{ cm}^{-1}$ ocorre somente no pH 6,8 e as absorções em $1600-1609\text{ cm}^{-1}$ ocorrem nos pHs 9,8 e 6,8 com um teor de 10 e 4% respectivamente. Sugere-se que em pH ácido as moléculas do solvente estejam interagindo com as cadeias laterais da proteína o que faz com que estas bandas desapareçam neste pH.

Em $1617-1623\text{ cm}^{-1}$ nos três pHs as absorções são semelhantes entre si, apresentando um teor de aproximadamente 10% em todos os pHs. É sugerido que bandas dentro desta faixa sejam atribuídas as folhas- β . No entanto, uma banda em tal posição também tem sido demonstrada estar relacionado à desnaturação de proteínas e para refletir ligações de hidrogênio intermoleculares ou agregação.¹²⁵ A partir da figura 36 observa-se uma constância

no teor desta banda, o que pode estar relacionada a presença de agregados em todos os pHs analisados. Esta teoria está de acordo com os dados encontrados nas medidas de DLS onde se observou a presença de agregados em todos os pHs.

As absorções em $1627-1632\text{ cm}^{-1}$ também são muito acentuadas, com um teor de 16% no pH 9,8, 9% no pH 6,8 e 10% no pH 1,2. Já as bandas em $1682-1693\text{ cm}^{-1}$ diminuem o seu teor: 5% no pH 9,8, 3,4% no pH 6,8 e 3% no pH 1,2. Estas bandas estão relacionadas a uma conformação folhas- β e também se relacionam à agregação, o que evidencia a dificuldade de se fazer medidas de DLS e SLS para as amostras neste solvente.

A estrutura randômica é observada nas absorções $1636-1643\text{ cm}^{-1}$, apresentam um teor 7% no pH 9,8, aumentando para 10% no pH 6,8 e 11% nos pH 1,2.

Em $1647-1655\text{ cm}^{-1}$ a estrutura característica é a α -hélice com um teor de 11% no pH 9,8, 19% no pH 6,8 e 15% no pH 1,2. Finalizando, em $1668-1673\text{ cm}^{-1}$ a configuração característica é a voltas reversas. Suas absorções apresentam um teor de 13% no pH 9,8, 15% nos pH 6,8 e 1,2.

De maneira geral, pode-se inferir que neste solvente a estrutura da gliadina é afetada não só pelo solvente utilizado, mas também pelo pH da solução. Uma banda característica é visualizada em 1660 cm^{-1} , possivelmente devido ao desdobramento da cadeia polipeptídica da proteína. Acredita-se que o surgimento desta banda é resultado das interações entre o DMSO e as cadeias laterais da proteína (fato observado em outras proteínas).¹²⁵

5.3.3. Análise da Estrutura Secundária da Gliadina em H₂O/EtOH 40/60% v/v por FTIR-ATR

Como foi discutido no ítem 5.2.3.3 os álcoois são conhecidos por estabilizar estruturas secundárias helicoidais, mas desestabilizar a estrutura terciária de proteínas, ocasionando assim, a formação de estados não nativos. Estudos realizados^{127, 128} mostraram que este efeito depende do tipo de álcool usado (a ordem de eficiência para desestabilização da estrutura terciária e estabilização de estruturas helicoidais de proteínas seria Trifluoretanol (TFE) > Propanol > Etanol (EtOH) > Metanol (MeOH).¹¹⁵

As figuras 37 e 38 apresentam os espectros de infravermelho da gliadina em H₂O/EtOH 40/60% v/v, o ajuste das curvas e também o teor em percentual das áreas relativas das bandas correspondentes.

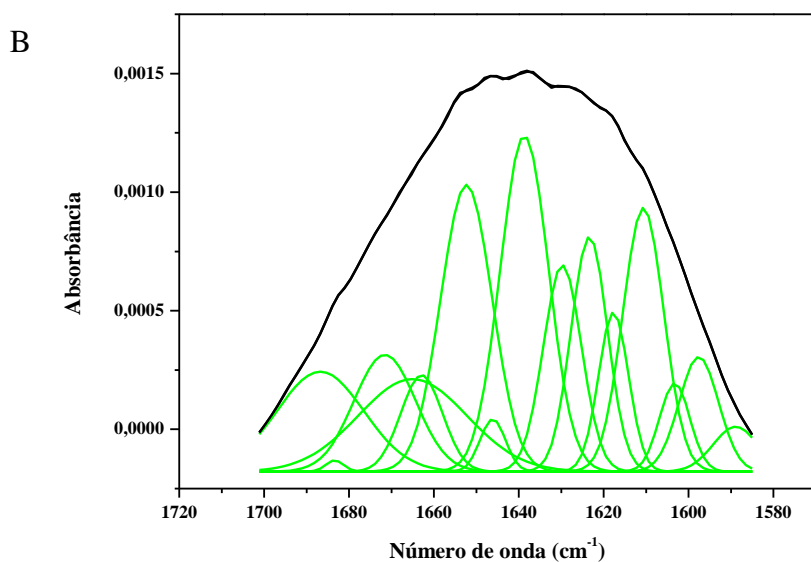
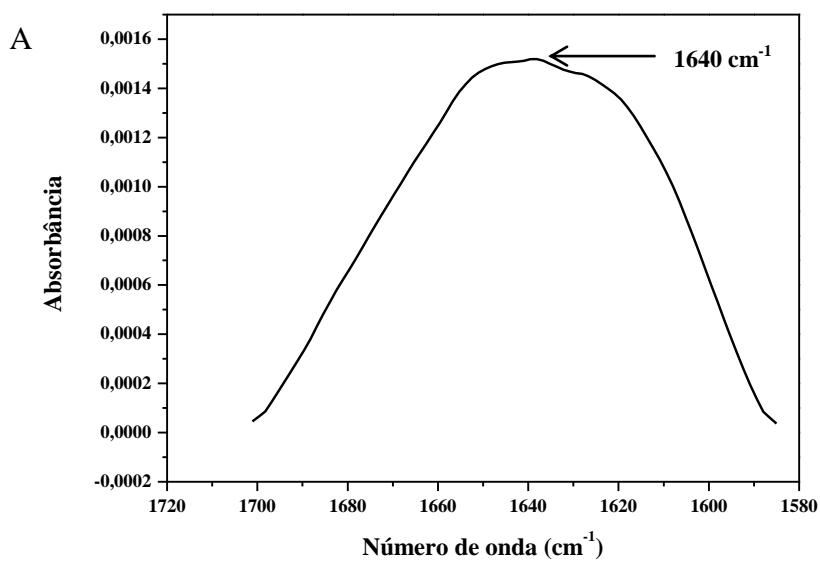


Figura 37. Espectro do filme de gliadina em $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 40/60% v/v no pH 9,8: A) Espectro original na região da banda de Amida I, B) Espectro após ajuste da curva (o espectro após ajuste foi desenhado a partir da soma das bandas gaussianas fitadas).

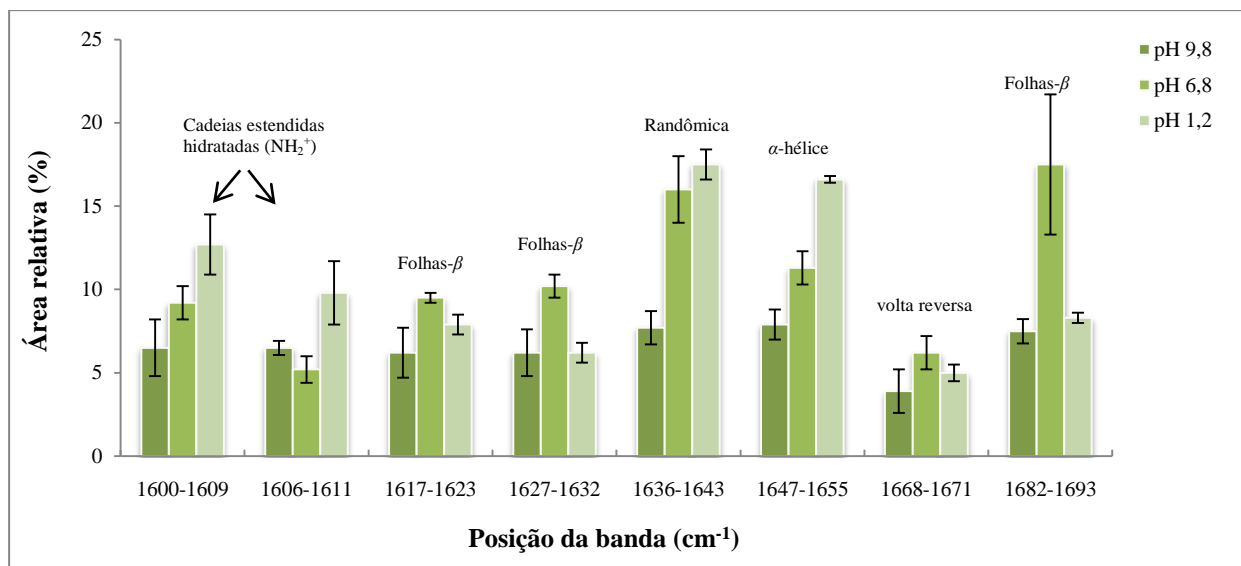


Figura 38. Posições e áreas relativas das bandas nos espectros de Fourier da gliadina preparada em H₂O/EtOH 40/60% v/v nos pHs 9,8; 6,8 e 1,2.

A partir das figuras 38 vê-se que as absorções mais proeminentes encontram-se entre 1636-1643 cm⁻¹ (com um teor de 8% no pH 9,8, 16% no pH 6,8 e 18% no pH 1,2). Nesta faixa (1636-1643 cm⁻¹) a estrutura conformacional adotada é a randômica. É possível se observar que à medida que se diminui o pH ocorre um aumento desta estrutura desordenada.

Em pH 9,8, é observado também que o teor das conformações aleatórias (na faixa 1636-1643 cm⁻¹) e folhas-β (na faixa 1682-1693 cm⁻¹) são semelhantes a conformação helicoidal (em torno de 8%). Fato semelhante a este foi observado com a albumina de soro humano (HSA).¹²⁹ Nesta proteína, na concentração em torno de 60%, as conformações α-hélice, folhas-β, volta reversa e randômica apresentaram uma concentração muito parecida.

A mesma observação pode ser feita sobre os teores nas demais faixas de absorção analisadas no pH 9,8 (1600-1609 cm⁻¹, 1606-1611 cm⁻¹, 1617-1623 cm⁻¹, 1627-1632 cm⁻¹ e 1668-1671 cm⁻¹) cujos valores estão em torno de 6%.

Nota-se também na figura 38, que a variação do pH ocasiona uma mudança drástica na conformação da proteína.

Em pH 6,8 ocorre um aumento acentuado na conformação randômica (16%) na faixa de absorção 1636-1643 cm⁻¹ bem como na conformação folhas-β (18%) na faixa 1682-1693 cm⁻¹. Como já foi dito anteriormente, as bandas próximas das faixas 1622 cm⁻¹ e 1693 cm⁻¹ podem estar relacionadas à agregação da proteína.¹²⁴ Logo, acredita-se que em pH 6,8, a amostra encontra-se em um ambiente altamente instável.

Para este pH também se observa um aumento no teor da conformação α -hélice (em torno de 11%), assim como o teor de folhas- β nas faixas de absorção 1617-1623 cm^{-1} (10%), 1627-1632 cm^{-1} (10%).

Para a amostra no pH 1,2 outra mudança é observada na conformação. Neste pH ocorre um aumento no teor da conformação randômica, na faixa 1636-1643 cm^{-1} , (aproximadamente 18%), seguida da conformação helicoidal na absorção 1647-1655 cm^{-1} com um teor de 17%. É sugerido então que em pHs ácido a amostra esteja em um ambiente protonado, favorecendo o aparecimento de uma estrutura mais helicoidal.

A conformação folhas- β nas absorções 1617-1623 cm^{-1} , 1627-1632 cm^{-1} e 1682-1693 cm^{-1} apresentam teores de 8%, 6% e 8% respectivamente e apresentam características semelhantes à amostra em pH 9,8.

Já as absorções em 1600-1609 cm^{-1} e 1606-1611 cm^{-1} representam as cadeias hidratadas estendidas e apresentam um teor de 13% e 10% respectivamente.

Em conclusão, em pH 9,8 as conformações α -hélice, folhas- β e volta reversa apresentam um teor muito próximo (em torno de 8%) mostrando que neste pH a amostra está instável. Em pH 6,8 ocorre um aumento na conformação randômica (em torno de 16%) e da conformação folhas- β (18%), o que pode estar relacionado a uma agregação da amostra. Já em pH ácido (pH 1,2) a predominância é de uma conformação randômica (em torno de 18%) acompanhada de uma conformação helicoidal (em torno de 17%).

6. DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS E A GLIADINA

Durante as últimas décadas, a comunidade científica tem feito um esforço concentrado para elucidar as propriedades das proteínas do glúten de trigo. Como mostrado no capítulo 1, estas proteínas apresentam propriedades viscoelásticas únicas (elasticidade e extensibilidade), necessárias para o processo de fabricação e preparo de pães e massas em geral.^{20, 130} Além disso, atualmente, existe uma grande tendência em se produzir materiais de fontes renováveis em substituição a materiais fósseis e sintéticos.¹ Desta forma, os atributos únicos destas proteínas, permitiram o desenvolvimento de aplicações não alimentares a elas, tais como em produtos sintéticos, detergentes, borracha e vários outros produtos poliméricos.¹³⁰

O glúten de trigo tem sido amplamente investigado como fonte de proteína não só por suas propriedades viscoelásticas, mas também por ser anualmente renovável e prontamente disponível como matéria-prima de baixo custo.¹³⁰

A gliadina é uma das proteínas do glúten cuja propriedade está relacionada à extensibilidade. Estudos recentes indicam sua aplicabilidade em adesivos, principalmente devido ao fato dos existentes atualmente no mercado serem baseados em fontes fósseis, limitadas e não renováveis.¹

Porém, para que a gliadina possa ser utilizada como matéria-prima para a fabricação de adesivos, estudos estão sendo realizados sobre as propriedades da mesma. Sabe-se que no estado nativo muitas proteínas tem uma estrutura globular e adotam estruturas regulares tais como α -hélice, folhas- β , randômica e etc, muitas vezes resultando em estruturas muito compactas com uma densidade de empacotamento atômico interno de 75%. Já os adesivos devem consistir de cadeias poliméricas relativamente grandes, flexíveis, entrelaçadas e firmemente ligadas à superfície do sólido por adsorção.²

Com o objetivo de tornar a proteína adequada para matéria-prima de adesivos, deve-se desdobrá-la. As proteínas geralmente possuem muitos grupos laterais apolares. Ao ser dissolvidas em um solvente polar a maioria dos grupos apolares ficam escondidos no interior do glóbulo, enquanto a maioria das partes polares ficam em contato com o solvente. Se for possível alterar a polaridade do solvente possivelmente estes grupos apolares podem se mover para fora tornando a proteína menos sensível a este solvente e com capacidade de se desenovelar.²

Os fatos acima corroboram com o fato de que o primeiro passo ao se preparar uma matéria prima para o uso em adesivos é o conhecimento da conformação, escolha do solvente,

pH, temperatura e possíveis modificações que podem ser realizadas na proteína para que a mesma possa ter funcionalidade em adesivos.

Sabe-se que apesar do grande avanço nos estudos referentes às proteínas do glúten, importantes lacunas sobre a estrutura nativa e funcionalidade ainda persistem. Sendo assim, uma melhor compreensão das relações estrutura e funcionalidade das proteínas do glúten iriam levar à pesquisa para uma aplicação mais racional dos processos. Outro objetivo é que estes estudos tornem estes materiais baratos e biodegradáveis de modo que possam ser inseridos no mercado competindo com os materiais existentes atualmente.¹³⁰

De modo geral os desafios futuros envolvem: analisar as reações químicas que ocorrem na proteína com o objetivo de prepará-la para se transformar em uma matéria – prima de adesivos, analisar as capacidades mecânicas do mesmo, ou seja, adquirir conhecimento físico-químico, mecânico e de processamento envolvidos no desenvolvimento do mesmo.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo a avaliação estrutural da gliadina nos solventes H₂O deionizada, H₂O/EtOH 40/60% v/v e dimetilsulfóxido (DMSO) variando o pH, revelou conformações diferenciadas nos diversos sistemas.

A técnica Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) mostrou índices de polidispersão variando de 0,2 a 0,3 para as amostras em H₂O e H₂O/EtOH 40/60% v/v e 0,4 para amostras em DMSO. Acredita-se desta forma que as amostras em DMSO apresentam uma maior distribuição de tamanhos e uma menor homogeneidade.

A partir de DLS também foi possível analisar os coeficientes de difusão nos solventes e pHs acima. Foi observado, em todas as amostras, variações no coeficiente de difusão à medida que o pH varia. Este fato é uma indicação de alterações na conformação da proteína. Para as amostras em água e em DMSO é observado um aumento no D_{ap} à medida que o pH aumenta. Sugere-se que ocorra uma redução no tamanho da molécula à medida que o meio torna-se básico. Já para as amostras em H₂O/EtOH 40/60% v/v o comportamento é variável. A conformação é mais compacta, ou seja, mais enovelada, em pHs 9,8 e 1,2.

Na amostra em H₂O deionizada, em pH 9,8, a gliadina apresenta-se mais estável com uma menor distribuição de tamanho e diâmetros hidrodinâmicos em torno de 68 nm. Estes diâmetros hidrodinâmicos aumentam à medida que se diminui o pH da amostra. Em 9,8, a desprotonação do meio diminui a repulsão entre as cadeias laterais intramoleculares diminuindo assim a agregação. Já em pH ácido o meio protonado aumenta a repulsão entre os grupos da cadeias laterais ocasionando assim o desenovelamento da proteína.

Para a gliadina em DMSO, o sistema é polidisperso com tamanhos que variam de 34 nm (pH 9,8) e 66 nm (pH 1,2). Em meio básico duas hipóteses foram dadas ao sistema: a amostra apresenta conformações variadas (nativa, parcialmente enovelada e agregada) ou, semelhante ao ocorrido com a proteína lisozima, a gliadina está em um regime parcialmente colapsado (causada pela exposição de grupos antes hidrofóbicos ao solvente), acompanhada de conformações parcialmente enoveladas e agregadas.

Já em H₂O/EtOH 40/60% v/v, o sistema é instável e possivelmente a concentração de etanol (60%) favoreceu a presença de agregados e conformações variadas. O diâmetro hidrodinâmico variou: 34 nm (pH 9,8), 51 nm (pH 6,8) e 31,7 nm (pH 1,2).

A técnica de PZ forneceu uma ideia da estabilidade do sistema. Foi possível mostrar que a gliadina é mais estável em H₂O deionizada, no pH 9,8. Para a amostra em DMSO, esta

técnica mostrou a instabilidade do sistema. Os fatos acima corroboram com a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico.

Finalmente, a estrutura secundária da gliadina foi analisada por FTIR-ATR. Desta forma pode-se ter uma ideia mais clara sobre a conformação da proteína. A partir desta técnica as seguintes conclusões podem ser tiradas:

Em H₂O deionizada a conformação predominante em pH básico é folhas- β (19%), apresentando também um teor de α -hélice (17%). A diminuição do pH ocasionou um aumento no teor tanto das folhas- β (36%) como de α -hélice (24%). O teor de folhas- β está relacionado à agregação, desta forma conclui-se que em pH básico (9,8) a amostra encontra-se mais estável. Fato que corrobora com as demais análises realizadas.

Em DMSO, ocorreu o surgimento de uma banda em 1660 cm⁻¹. Acredita-se que a mesma seja devido ao desenovelamento da proteína. Porém, em pH básico, o alto teor de folhas- β (16%) indica também a presença de agregados ao sistema. Sendo assim, a gliadina neste pH encontra-se instável com a presença de várias conformações. O teor da estrutura randômica aumenta à medida que o pH diminui. Desta forma, a proteína perde uma quantidade significativa da sua forma globular compacta.

Finalmente, em água/etanol 40/60% v/v a proteína não tem um comportamento estável, semelhante à amostra em DMSO. Em pH básico, o teor das conformações α -hélice, folhas- β e voltas reversas é semelhante e a presença destes estados em igual proporção pode ser um indicativo desta instabilidade. Em pH neutro têm-se um aumento na conformação randômica e no teor de folhas- β o que pode estar relacionado ao alto teor de agregados neste pH. Já em meio ácido (pH 1,2) o teor helicoidal sofre um acréscimo (~17%), seguido da estrutura randômica (~18%).

Considerando os resultados obtidos e os estudos em andamento sobre a gliadina conclui-se que a mesma apresenta um grande potencial de aplicação como biomaterial. Este fato é justificado, pois além da gliadina ser derivada de um recurso renovável, a mesma assume conformações variadas e estabilidade nos diferentes solventes e pHs. Desta forma, a partir da escolha do melhor solvente e meio de trabalho, a mesma torna-se uma matéria prima interessante em Ciências dos Materiais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Nordqvist, P.; Thedjil, D.; Khosravi, S.; Lawteher, M.; Malmström, E.; Khabbaz, F. *Journal of Applied Polymer Science*. **2012**, 123, 1530.
- ² van der Leeden, M. C.; Rutten, A. A. C. M.; Frens, G. *Journal of Biotechnology*. **2000**, 79, 211.
- ³ Lagrain, B.; Goderis, B.; Brijs, K.; Delcour, J. A. *Biomacromolecules*. **2011**, 3, 533.
- ⁴ Matalanis, A.; Jones, O. J.; McClements, D. J. *Food Hydrocolloids*. **2011**, 25, 1865.
- ⁵ Morasso, C.; Barbot, F.; Bellini, T.; Gramatica, F.; Morasso, C.; Prospero, D. *IEEEExplore*. **2011**, 1.
- ⁶ Mangavel, C.; Barbot, J.; Popineau, Y.; Gue'guen, J. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 867.
- ⁷ Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Company. **2000**.
- ⁸ Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*. New York: John Wiley and Sons. **1997**.
- ⁹ Banc, A.; Desbast, B.; Renard, D.; Popineau, Y.; Mangavel, C.; Navaielles, L. *Biopolymers*. **2009**, 91, 610.
- ¹⁰ Banc, A.; Desbat, B.; Renard, D.; Popineau, Y.; Mangavel, C.; Navailles, L. *Langmuir* **2007**, 23, 13066.
- ¹¹ Secundo, F.; Guerrieri, N. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1757.
- ¹² Soares, R. M. D. *Caracterização físico-química, morfológica e influência da reticulação em soluções precursoras e biofilms de gliadina*, Santa Catarina: UFSC, **2008**.
- ¹³ Liang, L.; Pinier, M.; Leroux, J.; Subirade, M. *Biopolymers*. **2009**, 93, 418.
- ¹⁴ Araújo, H. M. C.; Araújo, W. M. C.; Botelho, R. B. A.; Zandonadi, R. P. *Rev. Nutr.*, **2010**, 23, 467.
- ¹⁵ Harding, S. E.; Abdelhameed, A. S.; Morris, G. A. *Polym Int.* **2011**; 60, 2.
- ¹⁶ Silveira, N. P.; Giacomelli, F. C.; Riegel, I. C., Petzhold, C. L. *Macromolecules*. **2008**, 41, 2677.
- ¹⁷ Giacomelli, F. C.; Silveira, N. P.; Stepánek, P. *Macromolecules*. **2009**, 42, 3818. Helmus, M.; Tweden, K. *Materials selection*. **1995**, 27.
- ¹⁸ Zhang, Z.; Scanlon, M. G. *Journal of Cereal Science*. **2011**, 54, 181.
- ¹⁹ Žilić, S.; Barać, M.; Pešić, M.; Dodig, D.; Ignjatović-Micić, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 5878.
- ²⁰ Shewry, P. R.; Halford, N. G.; Belton, P. S.; Tatham, A. S. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **2002**, 357, 133.

-
- ²¹ Delcour, J. A.; Joye, I. J.; Pareyt, B.; Wilderjans, E.; Brijs, K.; Lagrain, B. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2012**, 3, 469.
- ²² <www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/economia/2012_03_trigo_numeros.pdf>. Acesso em: 12 de maio, **2012**.
- ²³ Dossa, D.; Bastos, E. T.; Gasques, J. G. *Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020-2021*. Brasília: Embrapa, **2011**.
- ²⁴ Krull, L. H.; Wall, J. S. *Bakers Digest*. **1969**, 43, 38.
- ²⁵ Van der Zalm, E. E. J.; Grabowska, K. J.; Strubel, M.; Van der Goot, A. J.; Hamer, R. J.; Boom, R. M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 10487.
- ²⁶ Waga, J. *Pol. J. Food Nutri. Sci.* **2004**, 4, 327.
- ²⁷ Rodrigues, O.; Teixeira, M. C. C. *Bases ecofisiológicas para manutenção da qualidade do trigo*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, **2010**.
- ²⁸ Lester, D. R. *Plant Methods*. **2008**, 4, 26.
- ²⁹ Gómez, A. V.; Ferrer, E.; Añón, M.; Puppo, M. C. *Food Research International*. **2012**, 46, 62.
- ³⁰ Ferranti, P.; Mamone, G.; Picariello, G.; Addeo, F. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 1531.
- ³¹ Fassano, A. *Physiol Rev.* **2011**, 91, 151.
- ³² Ferrer, E. G.; Gómez, A. V.; Añón, M. C.; Puppo, M. C. *Spectrochimica Acta Part A*. **2011**, 79, 278.
- ³³ <paraiso.etfto.gov.br/docente/admin/uplod/docs_upload/material_70382b1875.pdf>. Acesso em: 12 de maio, **2012**.
- ³⁴ Belton, P. S.; Tweden, K. *Journal of Cereal Science*. **1999**, 29, 103.
- ³⁵ Kontogiorgos, V. *Food Research International*. **2011**, 44, 2582.
- ³⁶ Sun, S.; Song, Y.; Zheng, Q. *Journal of Food Engineering*. **2009**, 90, 207.
- ³⁷ Ang, S.; Kogulanathan, J.; Morris, G. A.; Kök, M. S.; Shewry, P. R.; Tatham, A. S.; Adams, G. G.; Rowe, A. J.; Harding, S. E. *Eur Biophys J.* **2010**, 39, 255.
- ³⁸ Kim, S. *Journal of Cereal Science*. **2011**, 54, 168.
- ³⁹ Tatham, A.; Shewry, P. R. *Journal of Cereal Science*. **1985**, 3, 103.
- ⁴⁰ <www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=1282&pf=1&Lcg.id=o>. Acesso em: 12 de maio, **2012**.
- ⁴¹ Melnikova, N. V.; Kudryavtseva, A. V.; Kudryavtseva, A. M. *Biochimie*. **2012**, 94, 551.

-
- ⁴² Mitea, C.; Salentijn, E. M. J.; Veelen, P. V.; Goryunova, S. V.; Meer, I. M. van der.; Broek, H. C.; Mujico, J. R.; Monserrat, V.; Gillisen, L. J. W. J.; Drijfhout, J. W.; Dekking, L.; Koning, F.; Smulders, M. J. M. *Plos One*. **2010**, 12, 15637.
- ⁴³ Salcedo, G.; Prada, J.; Sanchez-Monge, R.; Aragoncillo, C. *Theor. Appl. Genet.* **1980**, 56, 65.
- ⁴⁴ Kassarda, D. D.; Okita, T. W.; Bernardim, J. E.; Baecker, P. A.; Nimmo, C. C.; Lew, E. J. L.; Dietter, M. D.; Greene, F. C. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **1984**, 81, 4712.
- ⁴⁵ Metakovsky, E. V.; Branlard, G.; Chernakov, M. M.; Upelniek, V. P.; Redaelli, R.; Pogna, N. E. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, 94, 788.
- ⁴⁶ Anderson, O. D.; Hisa, C. C.; Torres, V. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, 103, 323.
- ⁴⁷ Clarke, B. C.; Phongkhan, T.; Gianibelli, M. C. *Theor. Appl. Genet.* **2003**, 106, 629.
- ⁴⁸ Mazzaracchio, P.; Tozzi, S.; Boga, C.; Fornali, L.; Pifferi, P. G.; Barbiroli, G. *Food Chemistry*. **2011**, 129, 1100.
- ⁴⁹ Lagrain, B.; Rombouts, I.; Brijs, K.; Delcour, J. A. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 2034.
- ⁵⁰ van Herpen, T. W.; Goryunova, S. V.; van der Schoot, J.; Mitreva, M.; Salentijn, E.; Vorst, O.; Mitreva, M.; Salentijn, E.; Vorst, O.; Schenk, M. F van Veelen, P. A.; Koning, F.; van Soest, L. J.; Vosman, B.; Bosch, D.; Hamer, R. J.; Gilissen, L. J.; Smulders, M. J. *BMC Genomics*. **2006**, 7, 1.
- ⁵¹ Q, P.; Wei, Y.; Ouellet, T.; Chen, Q.; Tan, X.; Zheng, Y. *BMC Genomic*. **2009**, 10, 168.
- ⁵² Carlsen, A.; Lecommandoux, S. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. **2009**, 14, 329.
- ⁵³ Georget, D. M. R.; Belton, P. S. *Biomacromolecules*. **2006**, 7, 469.
- ⁵⁴ Blanch, E.; Kasarda, D.; Hecht, L.; Nielsen, K. *Biochemistry*. **2003**, 42, 5665.
- ⁵⁵ Lullien-Pellerin, V.; Popineau, Y.; Meersman, F.; Morel, M. H.; Heremans, K.; Lange, R.; Balny, C. *Biochem*. **2001**, 268, 5701.
- ⁵⁶ Krejci, I.; Svedberg, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 27.
- ⁵⁷ Tatham, A. S.; Field, J. M.; Smith, J. S.; Shewry, P. R. *Journal Of Cereal Science*. **1987**, 5, 203.
- ⁵⁸ Lamm, O.; Poulson, A. *Biochem*. **1936**, 30, 528.
- ⁵⁹ Taylor, N. W.; Cluskey, J. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 97, 399.
- ⁶⁰ Kasarda, D. D.; Bernardin, J. E.; Gaffield, W. *Biochemistry*. **1968**, 7, 3950.
- ⁶¹ Sun, S.; Song, Y.; Zheng, Q. *Food Hydrocolloids*. **2008**, 22, 1090.

-
- ⁶² Holl, M.; Suli-Vargha, H.; Medzihradzky, K.; Fasmant, G.; Kunoss, G.; Graf, F. *Neuropeptides*. **1990**, 17, 111.
- ⁶³ Makarenko, S. P.; Trufanov, V. A.; Putilina, T. E. *Russian Journal of Plant Physiology*. **2002**, 49, 365.
- ⁶⁴ Shimoni, Y.; Galili, G. *The Journal of Biological Chemistry*. **1996**, 271, 18869.
- ⁶⁵ Tatham, A. S.; Massom, P.; Popineau, Y. *J. Cereal Sci.* **1990**, 11, 1.
- ⁶⁶ Shewry, P. R.; D'Ovidio, R.; Lafiandra, D.; Jenkis, J. A.; *Wheat, Chemistry and Technology*. St. Paul, USA: Khan, K. Shewry, P. R. **2009**.
- ⁶⁷ Woodward, J. *Medicine*. **2010**, 39, 3.
- ⁶⁸ Mariotti, M.; Iametti, S.; Cappa, C.; Rasmussem, P.; Lucisano, M. *Journal of Cereal Science*. **2011**, 53, 319.
- ⁶⁹ Volta, U.; Villanacci, V. *Cellular & Molecular Immunology*. **2011**, 8, 96.
- ⁷⁰ Giannopoulou, A.; Aletras, A. J.; Pharmakakis, N.; Papatheodorou, G. N.; Yannopoulos, S. N. *The Journal of Chemical Physics*. **2007**, 127, 205101.
- ⁷¹ Silva, V. A. *Mecanismo de ação de adjuvantes de enovelamento protéico: modulação conformacional da proteína apomioglobina como sistema modelo*. Rio de Janeiro: UFRJ, **2006**.
- ⁷² Hartl, F. U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. *Nature*. **2011**, 45, 324.
- ⁷³ John, T. R.; Radford, S. E. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2008**, 469, 100.
- ⁷⁴ Dev, S.; Surdia, A. J. *Bioscis*. **2006**, 31, 551.
- ⁷⁵ Silveira, N. P.; Giacomelli, F. C. *Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia*. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
- ⁷⁶ Giacomelli, F.C. *Estruturação e comportamento físico-químico de sistemas coloidais sob efeito de campo elétrico externo como perspectiva para a ciência macromolecular*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2009**.
- ⁷⁷ Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E. E. C. *Caracterização de peso molecular e análise térmica*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, **2001**.
- ⁷⁸ Shaw, D. J. *Introdução à química dos colóides e de superfícies*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, **1975**.
- ⁷⁹ Zhu, X.; Shen, J.; Wang, Y.; Sun, X.; Wang, X. *Optics & Laser Technology*. **2011**, 43, 1128.
- ⁸⁰ Frisken, B. J.; *Applied Optics*. **2001**, 40, 4087.

-
- ⁸¹ Tang, Y.; Duan, J.; Wu, J. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* **2012**, 395, 82.
- ⁸² Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; López, O. *Chemistry and Physics of Lipids.* **2006**, 140, 88.
- ⁸³ Zimm Plot Software for Molecular Weight Determination in Dilute Polymer Solutions. *Instruction Manual for BI-ZPW.* New York: Brookhaven Instruments Corporation, **2000**.
- ⁸⁴ Zetasizer Nano Series. *User Manual.* England: Malvern Instruments. **2004**.
- ⁸⁵ The Zeta Potential. *Electroacoustics Tutorial.* Australian: Colloidal Dynamics. **1999**.
- ⁸⁶ <www.malvern.com/labeng/technology/zeta_potential/zeta_potential_Ide.htm>. Acesso em: 13 de maio **2012**.
- ⁸⁷ Rumbo, M.; Chirido, F. G.; Fossati, C. A.; Añón, M. C. *J. Agric Food Chem.* **2001**, 49, 5719.
- ⁸⁸ ZetaPlus, Zeta Potential Analyser. *Instruction Manual.* New York: Brookhaven Instruments Corporation. **2002**.
- ⁸⁹ Forato, L. A.; Filho, R. B.; Colnago, L. A. *Química Nova.* **1997**, 20, 5.
- ⁹⁰ Helfer, G. A.; Ferrão, M. F.; Ferreira, C. V.; Hermes, N. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26, 779.
- ⁹¹ Settle, F. A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* New Jersey: Prentice-Hall. **1997**.
- ⁹² Kong, J.; Yu, S. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* **2007**, 39, 549.
- ⁹³ <www.chemnet.com/cas/supplier.cgi?terms=alphagliadin&I=en&exact=dict&f=plist&mark=&submit.x=0&submit.y=0&submit=search>. Acesso em: 12 de maio **2012**.
- ⁹⁴ Oberg, K. A.; Fink, A. L. *Analytical Biochemistry.* **1998**, 256, 92.
- ⁹⁵ <www.chem.ucla.edu/~bacher/Special/topics/ATR%20protocol_students_Web%20version.pdf>. Acesso em 13 de maio, **2012**
- ⁹⁶ Sakudo, A.; Kuratsune, H.; Kato, Y. H.; Ikuta, K. *Clinica Chimica Acta.* **2009**, 402, 75.
- ⁹⁷ Mizutani, Y.; Matsumura, Y.; Imamura, K.; Nakanishi, K.; Mori, T. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 229.
- ⁹⁸ Lin, S.; Hsu, C.; Sheu, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **2010**, 53, 799.
- ⁹⁹ Instruction Manual for BI-9000AT digital Autocorrelator. New York: Brookhaven Instruments Corporation. **1998**.

-
- ¹⁰⁰ Michel, N.; Fabiano, A. S.; Polidori, A.; Jack, R.; Puccini, B. *Chemistry and Physics of lipids*. **2006**, 139, 11.
- ¹⁰¹ Gun'ko, V. M.; Klyueva, A. V.; Levchuk, Y. N.; Leboda, R. *Advances in Colloid and Interface Science*. **2003**, 105, 201.
- ¹⁰² Engberg, K.; Frank, C. W. *Biomed. Mat.* **2011**, 6, 1.
- ¹⁰³ Cole, E. W.; Kasarda, D. D.; Lafiandra, D. *Biochem. Biophys. Acta*. **1984**, 787, 244.
- ¹⁰⁴ Hawe, A.; Hulse, W. L.; Jiskoot, W.; Forbes, R. T. *Pharm. Res.* **2011**, 28, 2302.
- ¹⁰⁵ Li, Y.; Lubchenko, V.; Vekilov, P. G. *Review of Scientific Instruments*. Mizutani, **2011**, 82, 053106.
- ¹⁰⁶ Bernert, D. B.; Isenbügel, K.; Ritter, H.; *J. Incl. Phenom Macrocycl. Chem.* **2012**, 72, 241.
- ¹⁰⁷ Nakasako, M. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **2004**, 359, 1191.
- ¹⁰⁸ Fonseca, L. C.; Corrêa, N. C.; Garrote-Filho, M. S.; Cunha, C. C.; Penha-Silva, N. *Quim. Nova*. **2006**, 29, 543.
- ¹⁰⁹ Barbosa, R. T.; Polisseni, J.; Guerra, M. O.; Camargo, L. S.; Peters, V. M. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. **2009**, 1, 32.
- ¹¹⁰ Huang, A.; Liu, C. Tong, Z.; Lin, R. *J. Chem. Thermodynamics*. **2012**, 49, 95.
- ¹¹¹ Liu, C.; Bo, A.; Cheng, G.; Lin, X.; Dong, S. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**, 1385, 53.
- ¹¹² Voets, I. K.; Cruz, W. A.; Moitzi, C.; Lindner, P.; Areâs, E. P. G. *J. Phys. Chem B*. **2010**, 114, 11875.
- ¹¹³ Tjernberg, A.; Markova, V. *J. Biomed. Screen.* **2006**, 11, 131.
- ¹¹⁴ Bhattacharjya, S.; Balaram, P. *Proteins: Structure function and genetics*. **1997**, 29, 492.
- ¹¹⁵ Perham, M.; Liao, J.; Wittung-Stafshede, W. *Biochemistry*. **2006**, 45, 7740.
- ¹¹⁶ Lin, S.; Wei, Y.; Li, M.; Wang, S. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2004**, 57, 457.
- ¹¹⁷ Molina-Bolivar, J. A.; Ortega-Vinuesa, J. L. *Langmuir*. **1999**, 15, 2644.
- ¹¹⁸ Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.; Benoit, J. *Biomaterials*. **2003**, 24, 4283.
- ¹¹⁹ Belicciu, C. M.; Morau, C. I. *Food Hydrocolloids*. **2011**, 25, 1448.
- ¹²⁰ Krejci, L.; Svedberg, J. *Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 946.
- ¹²¹ Cespedes, G. F.; Vicente, E. F.; Cilli, E. M. *Quim. Nova*. **2011**, 34, 589.
- ¹²² Ukai, T.; Matisumura, Y.; Urade, R. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 1122.
- ¹²³ Wellner, N.; Belton, P. S.; Tatham, A. S. *Biochem. J.* **1996**, 1078, 231.

-
- ¹²⁴ Pézolet, M.; Bonenfant, S.; Dousseau, F.; Popineau, Y. *Elsevier Science Publishers*. **1992**, 299, 247.
- ¹²⁵ Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1991**, 51, 229.
- ¹²⁶ Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **1995**, 30, 95.
- ¹²⁷ Herskovits, T.T.; Gadegbekv, B. Jaiet, H. *J. Bio. Chem.* **1970**, 245, 2598.
- ¹²⁸ Bianchi, E. Rampone, R., Tealdi, A.; Ciferri, A. *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3341.
- ¹²⁹ Taboada, D.; Barbosa, S.; Castro, E.; Gutierrez- Pichel, M.; Mosquera, V. *Chemical Physics*. **2007**, 340, 59.
- ¹³⁰ Woerdeman, L.; Veraverbeke, W. S.; Parnas, R. S.; Johnson, D.; Delcour, J. A.; Verpoest, I.; Plummer, C. J. G. *Biomacromolecules*. **2004**, 5, 1262.