

LUANA CYPRIANO DE SOUZA

**INTERAÇÃO ENTRE CASEÍNA MICELAR E
NANOBLENDAS DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMEROS
TRIBLOCOS $(EO)_n-(PO)_m-(EO)_n$**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

S729i
2014 Souza, Luana Cypriano de, 1990-
Interação entre caseína micelar e nanoblendas de
polidiacetileno/copolímeros triblocos (EO)_n-(PO)_m-(EO)_n /
Luana Cypriano de Souza. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Leite. 3. Proteínas. 4. Sensores.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 620.5

LUANA CYPRIANO DE SOUZA

**INTERAÇÃO ENTRE CASEÍNA MICELAR E
NANOBLENDAS DE POLIDIACETILENO/COPOLÍMEROS
TRIBLOCOS $(EO)_n-(PO)_m-(EO)_n$**

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

APROVADA: 27 de julho de 2014.

Luis Antônio Minim

Sukarno Olavo Ferreira

Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Nélio José de Andrade
(Coorientador)

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre guiar meus passos, me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, através do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento das pesquisas realizadas.

Agradeço imensamente à professora Ana Clarissa dos Santos Pires, pela oportunidade e também por toda orientação, dedicação e confiança depositadas em mim.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, pelos valiosos conselhos e pela disponibilização de equipamentos.

À professora Maria do Carmo Hespanhol da Silva e toda equipe do laboratório QUIVECOM, pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela disponibilização de equipamentos para realização deste trabalho.

Aos professores Sukarno Olavo Ferreira e Luis Antônio Minin, por comporem a banca examinadora.

À minha mãe e ao meu pai, por serem os principais incentivadores dos meus estudos, sem o apoio e confiança de vocês jamais teria chegado até aqui. Agradeço ainda a toda minha família, meu irmão Emanuel, minha Vó, madrinha, tia Rose e ao meu namorado Leonardo, por sempre demonstrarem imenso orgulho pelas minhas conquistas, vocês sempre serão minha base e minha força!

Aos meus amigos do laboratório, Carini, Lucas, Nathália, Mayra, Maria Bethânia, Eliara e Carla, pelo companheirismo, pelos momentos de estudo, mas também por todos aqueles de descontração que tivemos.

Agradeço em especial à Jaqueline, por ter me recebido no laboratório, sendo paciente e me ajudado em etapas fundamentais da pesquisa! Aos meus amigos Ed, Paulinha, Victor, Livia, Johnson e Paula, pelos momentos divertidos, conselhos e por serem grandes amigos de todas as horas.

Aos amigos da República Selvagem, Cynthia, Amariles, Matheus e Mariana, por serem minha segunda família em Viçosa, pelos jantares, cafezinhos da tarde e inúmeros momentos especiais que me ajudaram a aliviar as tensões do mestrado!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

LUANA CYPRIANO DE SOUZA, filha de Francisco de Assis Fialho de Souza e Rosileni Maria Cypriano de Souza, nasceu em Muriaé, Minas Gerais, em 5 de dezembro de 1990.

Em 2008 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2012.

Em setembro de 2012 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em agosto de 2014.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Sensores na indústria alimentícia.....	4
3.2 Polidiacetileno.....	8
3.3 Nanoblendas de polidiacetileno	13
3.4 Aplicações de sensores de PDA para alimentos	16
3.5 Caseína micelar	17
3.6 Interações entre micelas de caseína e outras moléculas.....	21
3.7 Métodos de determinação da interação entre caseína micelar e nanoestruturas de polidiacetileno	25
INTERACTION BETWEEN MICELLAR CASEIN AND NANOBLENDS OF POLYDIACETYLENE AND TRIBLOCK COPOLYMER	48
1 Introduction	48
2 Materials and methods	50
2.1. Materials.....	50
2.2 Nanoblend production.....	51
2.3 Colorimetric Response (CR)	51
2.4 Light scattering and electrokinetic measurements	52
2.5 Microcalorimetric experiments	52
2.6 Fluorescence experiments	53
3 Results and discussion	53
4 Conclusions	66
5 Acknowledgements	66
6 References	67

RESUMO

SOUZA, Luana Cypriano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Interação entre caseína micelar e nanoblendas de polidiacetileno/copolímeros triblocos $(EO)_n-(PO)_m-(EO)_n$** . Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Nélio José de Andrade.

Polidiacetilenos são polímeros conjugados com grande potencial para utilização como sensores para alimentos por exibirem propriedades colorimétricas únicas. Entretanto, sistemas lácteos são matrizes complexas e constituintes presentes nestes alimentos podem interferir na transição colorimétrica desses sensores. O presente trabalho teve como objetivo determinar e avaliar as forças motrizes envolvidas na interação intermolecular entre caseína micelar e nanoblendas de polidiacetileno e copolímero tribloco. Foram sintetizadas nanoblendas (NB) compostas por moléculas de polidiacetileno (PDA) e copolímeros tribloco (CT). Diferentes concentrações de suspensão de caseína micelar (CM) foram adicionadas nas suspensões sensoras. A partir de análises de espectroscopia de UV-vis foi possível verificar que a suspensão de CM induziu a transição de cor, de azul para vermelho, quando adicionada às nanoblendas de PDA/L64 em uma determinada faixa de concentração ($5,10^{-4}$ a $3,10^{-3} \mu\text{mol}^{-1}$). Entretanto, a resposta colorimétrica (RC) máxima alcançada não superou 90%. Para a concentração de CT L64 (0,1%, m/m) a transição colorimétrica das nanoblendas foi reduzida para 40%. No entanto, o comportamento foi similar para as nanoblendas contendo 1,0% e 2,0% (m/m) de L64 e, desta forma, optou-se em trabalhar com concentração de L64 igual a 1,0%. Quando as nanoblendas foram separadas da suspensão de CM por membrana de diálise obteve-se praticamente o mesmo comportamento, ou seja, uma RC máxima em torno de 90%. No entanto, quando a caseína micelar dialisada (CMD) por cinco dias foi adicionada à suspensão de nanoblenda, o máximo de RC obtida foi em torno de 20% e após sete dias de diálise a RC foi aproximadamente igual a zero. . O tamanho e o potencial zeta das nanoblendas aumentaram com o aumento de concentração de CM, passando de 50 para 140 nm e -28 para -20 mV, respectivamente, demonstrando que as interações entre NB e MC ocorrem predominantemente na região superficial das nanoestruturas. A partir de medidas microcalorimétricas observa-se que até uma concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ de CM, a entalpia de interação permaneceu praticamente constante em torno de $+10 \text{kJ.mol}^{-1}$, caracterizando um interação entalpicamente dirigida. A partir desta concentração houve um aumento abrupto da

entalpia de interação, variando de -15 kJ.mol^{-1} para $+150 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Coincidentemente, a RC foi detectada nesta mesma faixa de concentração onde ocorre a variação abrupta de entalpia de interação. Em contrapartida, a CMD apresentou entalpia de interação igual a -12 kJ.mol^{-1} , permanecendo praticamente constante. O efeito do balanço hidrofílico/hidrofóbico dos CT foi avaliado por meio da substituição do CT L64 pelo F68 e observou-se que em concentrações menores de CM ($2,0 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) houve maior RC nas nanoblendas de PDA/F68. Porém, a partir desta concentração as nanoblendas de PDA/L64 mostraram-se mais sensíveis à presença de CM, Quando moléculas que interagem com CM, como as k-carragenas (k-CAR), foram adicionadas às nanoblendas observamos uma redução na RC de aproximadamente 20%, comparada com NB puras de PDA/L64. Diversos fatores podem afetar a RC deste nanosensor, como concentração de CM, sais liberados a partir da CM, balanço hidrofílico/hidrofóbico do CT além da presença de outras moléculas no meio. Desta forma, estes resultados podem no futuro contribuir para o desenvolvimento e aplicação de sensores a base de nanoblendas de PDA e CT para alimentos lácteos.

ABSTRACT

SOUZA, Luana Cypriano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2014. **Interaction between micellar casein and nanoblends of polydiacetylene and triblock copolymer (EO)_n-(PO)_m-(EO)_n**. Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-adviser: Luis Henrique Mendes da Silva and Nélio José de Andrade.

Polydiacetylene are conjugated polymers with great potential for use as colorimetric sensors because exhibit unique properties polymers. However, dairy systems are complex matrices and constituents present in these foods can interfere in colorimetric transition of these sensors. This study aimed to determine and assess the driving forces involved in the intermolecular interactions between micellar casein and nanoblends of polydiacetylene (PDA) and triblock copolymer (TC). Nanoblends (NB) composed of polydiacetylene molecules (PDA) and triblock copolymers (TC) were synthesized. Different concentrations of micellar casein suspension (CM) were added in sensor suspensions. From analysis of UV-vis spectroscopy was possible to verify that the suspension of CM induced color transition from blue to red, when added to the PDA/L64 nanoblends in a certain concentration range ($5 \cdot 10^{-4}$ a $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1}$). However, the maximum colorimetric response (CR) achieved did not exceed 90%. For the concentration of TC L64 (0.1%, w/w) the colorimetric transition of nanoblends was reduced to 40%. However, the behavior was similar to nanoblends containing 1.0% and 2.0% (m / m) of L64 and thus, we chose to work with L64 concentration equal to 1.0%. However, the behavior was similar to nanoblends containing 1.0% and 2.0% (m/m) of L64 and thus, we chose to work with L64 concentration equal to 1.0%. When nanoblends were separated from the MC suspension by dialysis membrane was obtained almost the same behavior that is a maximum RC around 90%. However, when the dialyzed micellar casein (DMC) for five days was added to the nanoblends suspension the maximum RC obtained was around 20% and after seven days of dialysis RC was approximately equal to zero. The size and zeta potential of nanoblends increased with increasing concentration of CM, from 50 to 140 nm and -28 to -20 mV, respectively, showing that the interactions between NB and MC occur predominantly in the surface region of the nanostructures. From this concentration there was an abrupt increase in enthalpy of interaction varying from -15 to 150 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Coincidentally, the RC was detected in the same concentration range where the abrupt change of enthalpy of interaction occurs. This result demonstrates that MC without calcium phosphate

interacts with nanoblend releasing energy, not absorbing enough to overcome the conformational barrier and promote the colorimetric transition energy. The effect of hydrophilic/hydrophobic balance of TC was evaluated by substitution of TC L64 by F68 and was observed that at lower concentrations of MC ($2.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$) there was higher RC in nanoblends PDA/F68. However, since this concentration the PDA/L64 nanoblends were more sensitive to the presence of CM, with a CR maximum 10% greater than for PDA/F68 nanostructures. When molecules that interact with MC, as K-carrageenan (k-CAR), were added to nanoblends we observed a decrease in the RC of about 20% compared to pure NB PDA/L64. Several factors may affect the CR of this nanosensor as MC concentration, salts released from the MC, hydrophilic/hydrophobic balance of TC and the presence of other molecules in the middle. Thus, these results may in future contribute to the development and application of sensors based on PDA/TC nanoblends for dairy foods.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as técnicas disponíveis para análise de alimentos são, em sua maioria, demoradas e, ou de alto custo, além de permitirem, apenas o diagnóstico de um problema já ocorrido. As indústrias de alimentos e os órgãos de fiscalização têm buscado métodos cada vez mais rápidos e eficientes para garantir o controle dos processos de produção e a segurança dos produtos. Além disso, existe uma pressão crescente por parte dos consumidores que estão cada vez mais conscientes em relação à qualidade e segurança dos alimentos. Uma alternativa promissora para atender a esta necessidade são os sensores que podem ser utilizados em qualquer fase do processamento, durante a vida útil até o momento de consumo dos alimentos. Neste sentido, diversos materiais têm sido estudados para atuarem como biossensores, a fim de aperfeiçoar os processos de análise nos alimentos.

Um dos materiais com grande potencial para utilização como sensores são os polidiacetilenos (PDAs). Estes polímeros são formados pela adição 1,4 de monômeros de diacetileno via radiação ultravioleta. Seu grande potencial para uso como sensor deve-se principalmente às suas propriedades colorimétricas únicas, como a capacidade de mudança da coloração do azul para o vermelho diante de alguns estímulos como estresse mecânico, presença de solventes, mudanças no pH, alterações na temperatura e interação com algumas moléculas.

O mecanismo de transição colorimétrica dos PDAs em razão da interação com diferentes agentes químicos ainda não foi completamente elucidado, entretanto sabe-se que moléculas com estrutura química similar interagem de maneira diferente com os PDAs levando a diferentes respostas colorimétricas. Este é um ponto importante para o desenvolvimento de sensores à base de PDAs para aplicação em alimentos, uma vez que as matrizes alimentícias são complexas. Desta forma, fica evidente que, para a aplicação eficiente destes polímeros como sensores para alimentos, é fundamental a compreensão, em nível molecular, da interação entre os PDAs e diferentes biomoléculas presentes em diversos alimentos, uma vez que estas podem interferir nas propriedades cromáticas dos PDAs, levando a resultados falso-positivos.

Os polidiacetilenos podem se organizar na forma de diferentes nanoestruturas, como filmes moleculares, multicamadas, micelas, vesículas e outras nanoestruturas, sendo que a forma de auto-organização dos polímeros pode influenciar na sua resposta

colorimétrica. As vesículas de PDAs são versáteis e são as formas mais pesquisadas de auto-organização destes polímeros em suspensão. Entretanto, existem limitações para sua utilização relacionadas à estabilidade durante a estocagem do sistema e à transição colorimétrica limitada. Desta forma, novas abordagens de auto-organização de PDAs devem ser estudadas para superar estas desvantagens. Nanoblendas formadas por PDAs e copolímeros triblocos têm se mostrado mais estáveis e sensíveis à transição colorimétrica na presença de diferentes estímulos e moléculas.

Assim, acredita-se que investigar, em nível molecular, a interação entre nanoblendas de PDA e copolímero tribloco e a caseína em sua forma micelar, uma proteína presente no leite e utilizada como ingrediente em diferentes alimentos é estratégico do ponto de vista científico e tecnológico visando ao desenvolvimento de sensores de PDAs eficientes para aplicação em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Determinar e avaliar as forças motrizes envolvidas na interação intermolecular entre caseína micelar e nanoblendas de polidiacetileno e copolímero tribloco.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a transição colorimétrica das nanoblendas de PDA/copolímero tribloco em função da concentração de caseína micelar.

- Investigar o efeito da adição de caseína micelar no tamanho e no potencial zeta das nanoblendas de PDA/copolímero tribloco.

- Avaliar influência da diálise da suspensão de caseína micelar sobre a resposta colorimétrica das nanoblendas de PDA/copolímero tribloco.

- Determinar a variação da entalpia de interação entre caseína micelar e nanoblendas de PDA/copolímero.

- Verificar a influência da concentração do copolímero tribloco na nanoblenda sensora na resposta colorimétrica.

- Avaliar o efeito do balanço hidrofílico/hidrofóbico do copolímero tribloco na interação das nanoblendas com a caseína micelar.

- Determinar o efeito da adição de k-carragena na suspensão contendo as nanoestruturas sensoras na resposta colorimétrica das nanoblendas em razão da adição de caseína micelar.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sensores na indústria alimentícia

Os processos de inovação e desenvolvimento de indústrias alimentícias estão cada vez mais associados com dois parâmetros fundamentais: segurança e qualidade dos alimentos. Desta forma, diante da complexidade de diversos processos produtivos torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de técnicas que garantam melhor rastreabilidade, garantindo maior eficiência e segurança ao longo de toda cadeia produtiva. A qualidade dos alimentos pode ser entendida como o fator que diferencia os produtos de acordo com as suas características sensoriais, composição e propriedades funcionais. Em análises de qualidade de alimentos, os biossensores podem ser aplicados para detectar contaminantes químicos e biológicos assim como avaliar a presença de diferentes moléculas presentes no meio (RUMAYOR *et al.*, 2005).

A análise da composição dos alimentos empregando biossensores representa uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas como seletividade, baixo custo de construção e estocagem, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido *in situ* (NISTOR *et al.*, 1999).

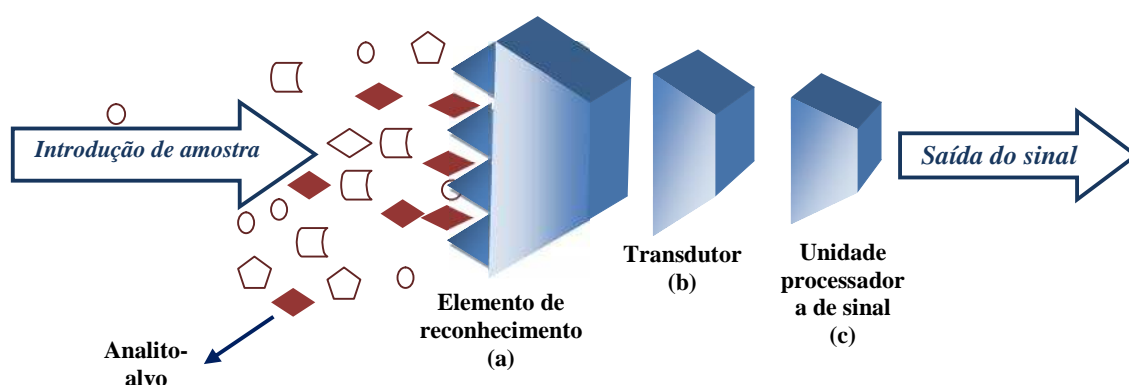
De acordo com Rumayor *et al.* (2005), o termo biossensor passou a ser utilizado a partir de 1977 quando se desenvolveu o primeiro dispositivo utilizando microrganismos vivos imobilizados na superfície de um eletrodo sensível à amônia. O dispositivo em questão era utilizado para detectar o aminoácido arginina. A partir deste momento, as tecnologias que envolvem os biossensores vêm avançando de forma notória, sendo transferidas gradativamente a outros setores, como os de meio ambiente e de forma incipiente às indústrias de alimentos.

Atualmente, a nanotecnologia voltada para o desenvolvimento de biossensores na indústria alimentícia está focada no desenvolvimento de dispositivos cada vez mais aplicáveis na cadeia produtiva de alimentos, a fim de assegurar a inocuidade de produtos além de tornar-se uma ferramenta no controle de qualidade. Desta forma, a tendência atual é a combinação da nanotecnologia com os biossensores, por meio da redução da matéria e, também, o uso de nanopartículas para construir sistemas mais sensíveis, que forneçam os resultados em tempo real. Assim, considerando a preocupação mundial com a qualidade dos alimentos, o desenvolvimento de

biossensores ocupa ainda mais espaço no mercado, devido ao interesse crescente de empresas no financiamento desse tipo de tecnologia para disponibilizá-la ao mercado (EMBRAPA, 2008).

Nanobiossensores podem ser definidos como dispositivos desenvolvidos em nano-escala que convertem eventos biológicos (distúrbios genéticos e metabólicos, ou infecções virais e bacterianas) em sinais processáveis. Reações químicas oriundas desses eventos biológicos são capazes de produzir sinais (elétricos, térmicos ou ópticos), que são enviados a um sistema de transdução, capaz de convertê-los em um efeito detectável e mensurável (RUMAYOR *et al.*, 2005; GASPAR, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2011).

A maioria dos sensores contém basicamente duas unidades funcionais: um receptor, que é o elemento de reconhecimento que promova reação bioquímica ou a ligação específica com o alvo (amostra-analito) e o transdutor, um dispositivo capaz de transformar a energia química ou física, em um sinal analítico (GASPAR *et al.*, 2010). Biorreceptores são materiais orgânicos, como enzimas, antígenos, microrganismos, hormônios e ácidos nucleicos. Enquanto os transdutores dependem do sistema e podem ser eletroquímicos, ópticos e calorimétricos (ALOCILJA; RADKE, 2003). Assim, no receptor, informações físicas ou químicas são convertidas em uma forma de energia, que pode ser medida pelo transdutor (GASPAR *et al.*, 2010). A Figura 1 ilustra a representação esquemática de um nanobiossensor.



Fonte: adaptada de Calil (2011).

Figura 1 – Representação esquemática de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).

Os biossensores podem ser divididos em duas classes, dependendo da natureza do evento de reconhecimento: dispositivos de bioafinidade e dispositivos bioanalíticos. Segundo Rasooly (2005), os biossensores de afinidade funcionam baseados na interação estequiométrica entre o elemento de reconhecimento biológico e o elemento em análise. Dessa maneira, o equilíbrio é alcançado sem o consumo da amostra pela molécula de captura. A interação antígeno-anticorpo é o melhor exemplo desse tipo de biossensor.

Para Rumayor (2005), os biossensores bioanalíticos são os mais conhecidos e aplicados. Baseiam-se na utilização de biocatalizadores, elementos que favorecem a ocorrência de uma reação química, na qual a partir de um ou vários substratos se formam um ou vários produtos conhecidos sem que o biocatalizador seja consumido podendo se regenerar e ser reutilizado.

Existem ainda diferentes tipos de sistemas de transdução, dentre eles: eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos (mássicos, gravimétricos, acústicos), termométricos e nanomecânicos. Dependendo da natureza da interação entre o elemento de reconhecimento e da espécie de interesse se pode utilizar um tipo de transdutor ou outro (MALLAT *et al.*, 2001).

Os transdutores eletroquímicos convertem o sinal produzido pela interação entre o sistema de reconhecimento e o analito a se detectar em um sinal elétrico. Desta forma, fornecem informação analítica quantitativa e semiquantitativa específica. Neste modelo, o elemento reconhecimento biológico deve estar em contato com o elemento de transdução. Este sistema transdutor pode se diferenciar ainda em quatro tipos de biossensores eletroquímicos: condutivímetros, potenciométricos, amperiométricos e impedimétricos (RUMAYOR, 2005).

Os transdutores piezoelétricos baseiam-se no princípio de revestir a superfície do biossensor com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente. A superfície revestida é colocada em uma solução contendo analitos, os quais se ligam à substância ligante. Desta forma, a massa do cristal aumenta enquanto a frequência de ressonância das oscilações diminui proporcionalmente (MEHRVAR; ABDI, 2004). Cristais de quartzo têm sido muito utilizados em sistemas piezoelétricos, pois sua frequência pode oscilar na faixa de megahertz (10^6 ciclos/segundo) de maneira proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa (WANG *et al.*, 2011).

O sistema de transdução termométrico, também chamado de termistor (THÉVENOT *et al.*, 2001), detecta substratos baseado na energia na forma de calor

envolvida nas reações bioquímicas entre o analito e uma substância biológica adequada, como um enzima, por exemplo. A forma mais utilizada deste modelo acopla as substâncias diretamente ao termistor, que irá detectar o calor envolvido na reação (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Nos transdutores nanomecânicos, o elemento de reconhecimento biológico é imobilizado sobre a superfície de uma microplaca de silício submersa em uma amostra líquida. A interação que ocorre entre o elemento de reconhecimento e o analito produz uma mudança diferencial na tensão superficial do líquido e desta forma a microplaca de silício sofre uma resposta de natureza nanomecânica, que consiste em uma mudança da deflexão e, ou, da frequência de ressonância (TAMAYO *et al.*, 2003).

A transdução óptica é outra técnica comumente utilizada em biossensores e é baseada nas medidas de luminescência, fluorescência, colorimétrica, entre outros. As técnicas colorimétricas são consideradas simples e relativamente de baixo custo, sendo amplamente aplicadas à fabricação de biossensores. Esta técnica baseia-se na mudança de cor de um determinado composto que pode ser distinguida visualmente ou por um espectrofotômetro. Assim, materiais que podem mudar de cor em virtude de estímulos externos têm despertado muito interesse de pesquisadores (CAMILLOTO, 2012).

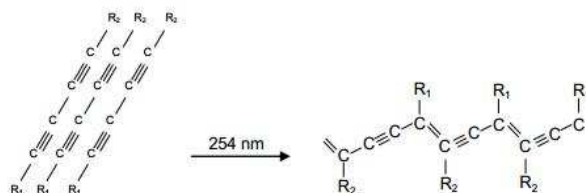
Os transdutores ópticos se baseiam nas variações da resposta a estímulos de luz como consequência da interação física ou química entre o analito de interesse e o elemento biológico de reconhecimento do biossensor. O sistema básico de medida consiste em uma fonte de luz, o elemento sensor (onde as moléculas receptoras estão encontram-se presentes) e o detector (VELASCO-GARCIA, 2003).

A detecção por bioluminescência é muito utilizada em biossensores microbianos. Esta técnica baseia-se na detecção da mudança de luminescência emitida por micro-organismos vivos que respondem à uma molécula alvo de maneira dose-dependente. O gen lux, que codifica luciferase em micro-organismos, é o gene reportado mais popular em biossensores microbianos bioluminescentes (BORISOV; WOLFBEIS, 2008).

A técnica de detecção por fluorescência é baseada na medida da intensidade de fluorescência, que por sua vez é proporcional à concentração da molécula alvo. A fluorescência pode ser detectada a um comprimento de onda maior após a excitação da substância fluorescente em um comprimento de onda menor. Biossensores fluorimétricos têm sido amplamente aplicado na química analítica devido a sua fácil construção usando técnicas de biologia molecular (IBRAHEEM; CAMPBELL, 2010).

3.2 Polidiacetileno

Um dos materiais com grande potencial para utilização como sensores ópticos são os polidiacetilenos (PDAs). Estes polímeros são formados pela adição 1,4 de monômeros de diacetileno via radiação ultravioleta (Figura 2).



Fonte: Pires (2009).

Figura 2 – Representação esquemática da polimerização de monômeros de diacetileno para polidiacetileno por exposição à luz UV.

Na Figura 2 os substituintes R são responsáveis pelas propriedades anfífilas desta molécula. Sendo R₁ um grupo com características polares e R₂ uma cadeia de carbono saturada.

A absorção ótica dos PDAs ocorre em consequência da transição eletrônica π - π^* dentro de uma estrutura linear conjugada (POTISATITYUENYONG *et al.*, 2008), sendo que o pico máximo de absorção da forma azul é observado próximo a 650 nm (banda de excitação) com um pico menor em 590 nm (banda vibrônica). No momento em que ocorre a transição ótica, a forma vermelha é formada e o pico máximo de absorção encontra-se próximo a 550 nm, com a banda vibrônica em 500 nm (SU, 2005; KEW; HALL, 2006). A Figura 3 ilustra um espectro de absorção típico de nanoestruturas de PDAs antes da perturbação, onde a banda de absorção máxima é de aproximadamente 650 nm com um ombro vibrônico em 590 nm e após a perturbação, onde o pico referente à coloração do azul diminui dando origem ao pico do vermelho, 540 nm com ombro vibrônico em 490 nm.

De acordo com Carpick *et al.* (2004), os polidiacetilenos têm recebido muita atenção nos últimos anos devido aos aspectos tecnológicos potencialmente importantes. Estes polímeros possuem características óticas únicas que incluem a mudança de cor de azul para vermelho quando a estrutura é perturbada mecanicamente (mecanocromismo) (CARPICK *et al.*, 2000), por variações de temperatura (termocromismo) (LEE *et al.*, 2002) ou interações intermoleculares com diferentes substâncias químicas e de interesse biológico (afinocromismo/biocromismo) (CARPICK *et al.*, 2004)

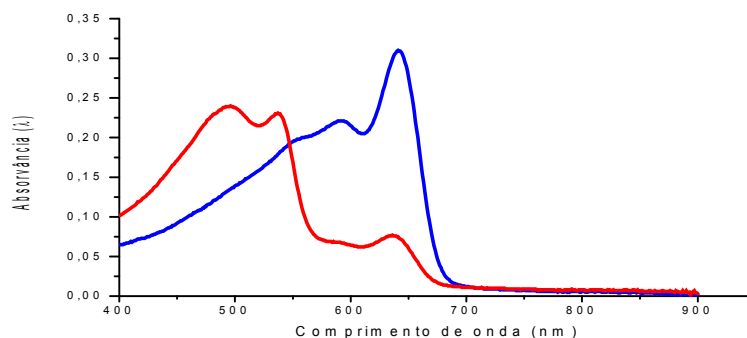


Figura 3 – Espectros de absorção em UV-visível típico de nanoblendas de PDAs antes (—) e após (—) perturbação.

O mecanismo envolvido na mudança de cor de vesículas de PDA ainda não é totalmente compreendido. Algumas teorias sugerem uma conversão entre as formas diacetilênicas e butatriênicas (CHANCE, 1977). De acordo com essa teoria a transição de cor ocorre devido a uma mudança estrutural nas duplas e triplas ligações conjugadas da cadeia carbonada do polidiacetileno dando origem à forma butatriênica, na qual aparecem três ligações duplas seguidas (Figura 4).

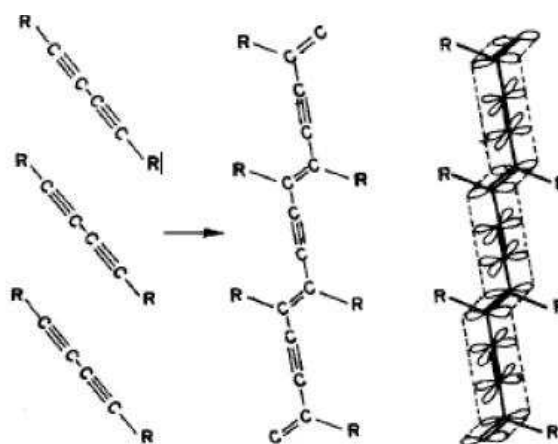


Fonte: Carpick (2004).

Figura 4 – Transformação de duplas e triplas ligações conjugadas à forma de butatrieno.

No entanto, algumas técnicas como espectroscopia de absorção de raios-X mostraram que a estrutura acetilênica está presente em ambas as formas (azul e vermelho) (SEKI *et al.*, 1989).

Outra hipótese é a de que a transição colorimétrica ocorre por meio de alterações na conformação molecular, ordenação e orientação, que transferem certa tensão ao polímero alterando sua conformação. Por consequência, estas mudanças conformacionais poderiam levar a alternâncias em estados eletrônicos e à correspondente absorção óptica (CHENG, 1998; SU, 2004; PIRES *et al.*, 2010) (Figura 5). Desta forma, esta teoria propõe que a forma azul das moléculas de PDA teriam suas cadeias carbonadas orientados de forma planar, enquanto a forma vermelha teria uma conformação não planar.



Fonte: Su (2003).

Figura 5 – Representação da transformação estrutural de monômeros a polímeros e orbitais π do polidiacetileno.

Os polidiacetilenos foram sintetizados pela primeira vez por Wegner em 1969; no entanto, apenas em 1993, Charych e seus colaboradores começaram a explorar o seu potencial como sensor utilizando um filme de PDA com ácido siálico para o reconhecimento do vírus da gripe. Os autores incorporaram à monocamada de PDA um análogo de ácido siálico, que atuou como receptor específico para hemaglutinina do vírus influenza, e obtiveram sinais de transição colorimétrica em resposta à ligação do vírus na superfície do material.

A partir deste momento as pesquisas que estavam relacionadas às moléculas de PDAs passaram a ter grande importância na comunidade científica no sentido de desenvolver novos sensores químicos, biológicos e aplicações da indústria eletrônica (CHEN *et al.*, 2010; YARIGAMA *et al.*, 2012).

Pan e Charych (1997) utilizaram o ligante gangliósido GM1 para detectar a proteína da toxina da cólera. O gangliósido GM1 é o receptor da célula hospedeira responsável pela cólera em humanos. O gangliósido GTb1 também foi incorporado em um filme de PDA que foi capaz de detectar toxina botulínica

Derivados de manose têm sido aplicados em estudos como um ligante para a *Escherichia coli* (MA *et al.*, 1998; SU *et al.*, 2005). A maneira mais provável para que tenha ocorrido a interação entre o filme e *E. coli* é por meio da interação específica manose-pili a partir da adsorção da bactéria na interface do filme.

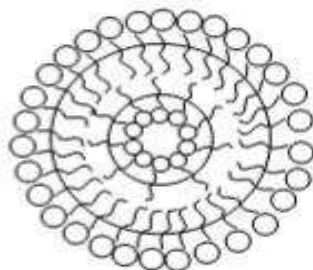
Estudo realizado por Jung *et al.* (2006) avaliou a transição colorimétrica de PDA para detectar as interações específicas entre estreptavidina (STA) e biotina. Neste trabalho, foram sintetizados dois tipos de biotina marcados com monômeros de ácido

10,12-pentacosadiinóico (PCDA). Após a adição de STA, o PDA modificado mostrou uma alteração de cor de azul para vermelho em cerca de 1 h, seguido por sua agregação e precipitação. Uma vez que as interações STA-biotina são amplamente adotadas por vários sistemas de detecção biológica, o sensor desenvolvido, contendo PDA-biotina, apresentou grande potencial para o desenvolvimento de vários biossensores colorimétricos.

Mesmo diante da existência de certo número de fatores que promovem a transição de cor dos PDAs, ainda existem poucas pesquisas que buscam elucidar os mecanismos que envolvem esta transição colorimétrica, sendo este um fator limitante na aplicação dessas estruturas em diferentes áreas da ciência.

Os PDAs podem formar diferentes estruturas auto-organizadas, como filmes monomoleculares (ENDO *et al.*, 2004) ou multicamadas (CHAMPAIBOON *et al.*, 2009) e outros tipos de nanoestruturas, como vesículas ou micelas (NAGY *et al.*, 2008; JOSE *et al.*, 2010; PERINO *et al.*, 2011). Em qualquer uma dessas formas estruturais o sistema eletrônico π garante características cromáticas para estas moléculas, quando estas são submetidas a diferentes estímulos externos.

As vesículas são genericamente definidas como estruturas compostas de bicamadas moleculares anfifílicas que incluem um determinado volume (OKADA *et al.*, 1998). São caracterizadas pela formação de três dimensões que inclui uma dimensão exterior e um centro hidrofílico separados por uma região hidrofóbica (Figura 6).



Fonte: Pires (2009).

Figura 6 – Representação esquemática de uma estrutura vesicular.

Partículas vesiculares podem atuar como sensores úteis na detecção de moléculas alvos devido à sua organização molecular definida, facilidade de preparação e robustez. As vesículas são as formas tridimensionais dos PDAs mais encontradas na literatura e se assemelham, até certo grau, à organização de uma membrana celular. Desta forma, as vesículas podem reconhecer seletivamente algumas moléculas

estratégicas em sua interface, se os monômeros apresentarem sítios de ligação específicos, assim como as “proteínas antena” na superfície da célula.

Segundo Pires *et al.* (2010) a organização de moléculas anfifílicas na conformação vesicular tem sido intensamente pesquisada devido às numerosas aplicações práticas desses agregados multimoleculares. Por exemplo, as vesículas são utilizadas para estudar o comportamento de fase, a interação proteína-ligante, a cristalização bidimensional, liberação de drogas, bem como são estruturas atraentes para aplicações em sensores (RINGS DORF *et al.*, 1988).

No entanto, dispositivos e aplicações de biossensores reais empregando vesículas são raros, principalmente devido à sua homogeneidade insuficiente, a falta de controle completo de sua composição e organização (SCINDIA *et al.*, 2007).

De acordo com Lee e Kim (2005), vesículas de PDAs tendem a polimerizar e, ou agregar em condições de temperatura ambiente por um período longo de tempo. Além disso, para algumas condições e moléculas, a resposta colorimétrica é limitada.

A estabilidade destes agregados é governada pelas forças de interação entre os monômeros de diacetileno posicionados no interior da membrana, incluindo as forças de van der Waals e forças de estabilização estérica. As forças de atração entre as cadeias hidrofóbicas e as forças repulsivas entre os grupos de cabeça hidrofílica irão determinar a geometria, o tamanho e a estabilidade das vesículas. Apesar de estruturas vesiculares contendo PDAs apresentarem grande potencial de aplicação como biossensores, existem ainda algumas limitações para sua aplicação. Além de fatores externos, outros compostos naturalmente presentes nos alimentos, além das moléculas alvo, podem interagir com a vesícula promovendo a transição colorimétrica e consequentemente resultados superestimados (LEE e KIM *et al.*, 2005).

Outras nanoestruturas contendo polidiacetilenos vêm sendo desenvolvidas visando superar as limitações das vesículas de PDA e proporcionar alternativas para a aplicação em biossensores. Em estudo realizado por Su (2006) foram utilizados agregados de ácido 10,12 pentacosadinoico (PCDA) adsorvidos em nanopartículas de sílica em solução aquosa formando nanocompósitos de PCDA. Após irradiação com luz UV a nanoestrutura adquire coloração azul e a partir deste momento uma série de perturbações no ambiente como, temperatura, pH e moléculas anfifílicas promove transição colorimétrica do nanocompósito PCDA/sílica de azul para vermelho. Desta forma, este tipo de material pode ter algumas implicações interessantes, em especial, um novo potencial sensor químico. Essas nanoestruturas de PDA também podem adquirir

outras conformações como, filmes (SONG *et al.*, 2001), filmes nanocompositos (LU *et al.*, 2001), vesículas, lamelas e nanotubo (LEE *et al.*, 2004).

3.3 Nanoblendas de polidiacetileno

Blendas poliméricas podem ser definidas como materiais obtidos através da mistura de dois ou mais polímeros (copolímeros) sem que haja um elevado grau de reações químicas entre eles. São consideradas blendas poliméricas compostos contendo acima de 2% em massa do segundo componente polimérico (HAGE, 2001).

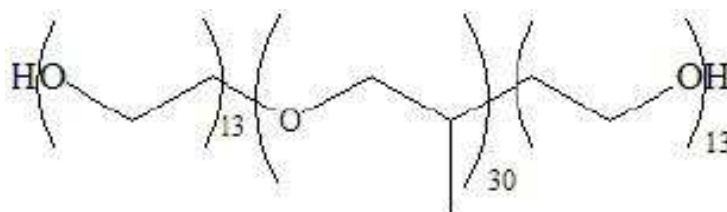
As blendas poliméricas são preparadas visando à obtenção de materiais com propriedades que não são encontradas em um único polímero. A mistura entre dois ou mais polímeros é considerada uma alternativa econômica para o desenvolvimento de novos materiais, se comparada à síntese de novos polímeros, cujo custo é mais elevado.

Quando se selecionam polímeros para a produção de uma blenda, dois fatores importantes devem ser considerados, a miscibilidade e a compatibilidade, os quais norteiam o desenvolvimento e a aplicação de novos materiais poliméricos (BARLOW *et al.*, 1984; PAUL *et al.*, 1988). Segundo Koning *et al.* (1998), também é possível desenvolver blendas poliméricas a partir de microestruturas nanoestruturadas, denominadas nanoblendas, que são blendas poliméricas imiscíveis onde a fase dispersa possui tamanho de partículas em escala nanométricas.

Copolímeros triblocos podem formar blendas com outros polímeros. Coutinho *et al.* (2003) avaliaram a eficiência do copolímero tribloco estireno-b-etileno-co-butileno-b-estireno (SEBS), como agente compatibilizante para uma blenda polimérica de polipropileno/poliestireno de alto impacto PP/HIPS. Antunes, *et al.*, (2005), realizaram estudos sobre as propriedades de blendas contendo os copolímeros Poli(3-Hidroxibutirato) (PHB) e Poli(ϵ -Caprolactona) (PCL).

Estudo realizado por Ortega (2012) propôs a síntese e avaliação de novas nanoblendas de polidiacetilenos constituídos por monômeros de ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) ou ácido 10,12-tricosadiinóico (TCDA) auto-organizados em meio anfifílico formado por soluções aquosas de copolímeros tribloco de óxido de etileno- óxido de propileno-óxido de etileno (PEO-PPO-PEO). As transições eletrônicas das nanoblendas foram estudadas em diferentes temperaturas e na presença de diferentes concentrações de NaOH e Na₂CO₃.

Estes copolímeros têm sido aplicados em diversas formulações, como detergentes, emulsificantes, antiespumantes, dispersantes, ou veículos em formulações farmacêuticas (LOPES *et al.*, 1998; LOH *et al.*, 2002). Segundo Loh *et al.* (2002), os copolímeros triblocos de óxido de etileno-óxido de propileno (Figura 7) podem ser genericamente representados pela fórmula $(EO)_n-(PO)_m-(EO)_n$, onde “n” representa o número de monômeros de óxido de etileno presentes na região hidrofílica da macromolécula e “m” expressa o número de monômeros de óxido de propileno presente na parte hidrofóbica da macromolécula.



Fonte: Rocha (2012).

Figura 7: Forma estrutural da macromolécula de L64.

Existem diferentes copolímeros triblocos formados pela combinação de diferentes tamanhos das cadeias EO e PO, o que confere a estes polímeros características diferentes em relação à hidrofobicidade, ao tamanho da molécula, à concentração micelar crítica, à temperatura micelar crítica, dentre outros (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1994). Estes copolímeros possuem nomes semi-sistemáticos que são impostos de acordo com seu uso e que geralmente se formam a partir dos nomes dos monômeros dos quais estes copolímeros são obtidos.

Os copolímeros plurônicos são designados por letras e números. A letra “L” é utilizada para líquidos, “P” para aqueles que se apresentam como pastas e “F” para sólidos. O primeiro dígito, ou nos primeiros dois números de três dígitos, multiplicando-se por 300, é aproximadamente igual à massa molecular média (MM) relativa à parte hidrofóbica da molécula. O último dígito, multiplicado por 10, indica a porcentagem de massa aproximada da região hidrofílica.

Um exemplo típico de copolímero tribloco é o L64, cuja forma estrutural está representada na Figura 7. A notação L64 é uma notação comercial para pluronics® e como dito acima o L representa o estado físico do polímero, neste caso líquido, o 6 significa que o L64 tem $6 \times 300 = 1800 \text{ g. mol}^{-1}$ de PPO e o 4 significa 40% de EO (CHU, 1995). A macromolécula de L64 é composta, em média, de 26 segmentos

hidrofílicos (OCH₂CH₂) conhecidos como óxido de etileno ficando 13 em cada ponta da cadeia de L64 e 30 segmentos hidrofóbicos de óxido de propileno (OCH₂CH(CH₃)) localizados no meio da cadeia de L64. Os segmentos hidrofílicos interagem fortemente com as moléculas de água, enquanto os segmentos hidrofóbicos interagem fracamente com as moléculas de água (ARLETH *et al.*, 2007).

Outro copolímero tribloco com balanço hidrofílico/hidrofóbico diferente do L 64 é o F68. O Pluronic F68 é um copolímero sólido cuja massa molecular da região hidrofóbica é de 1.800 (6 x 300) e a proporção de massa relativa a parte hidrofílica é de cerca de 80% (8 x 10) (PASQUALI, 2005).

A Tabela 1 apresenta a descrição de dois copolímeros triblocos (L64 e F68) com diferentes balanços hidrofílico/hidrofóbico.

Tabela 1 – Descrição de copolímeros triblocos Em relação ao tamanho das cadeias hidrofílicas e hidrofóbica e massa molecular média

Copolímeros	EO ¹ (n)	PO ² (m)	MM ³ (g.mol ⁻¹)
L 64	2 x 13	31	2900
F 68	2 x 76	30	8400

¹Óxido de etileno; ²óxido de propileno; e ³massa molar.

Os copolímeros triblocos (EO-PO-EO) são surfactantes e, assim se associam quando estão em suspensão ou em interfaces formando estruturas lamelares, micelas normais e micelas reversas (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1995).

A concentração micelar crítica (CMC), a fração de moléculas do polímero na conformação micelar, o tamanho e o número de agregação de micelas, são parâmetros de grande importância para copolímeros tribloco, PEO-PPO-PEO, quando em solução aquosa (ZHOU *et al.*, 1988).

Segundo Hunter *et al.* (1990), o parâmetro de maior valor fundamental para os copolímeros é a concentração micelar crítica, da qual ocorre a formação das estruturas micelares (ALEXANDRIDIS *et al.*, 1994). Medidas de CMC podem ser feitas por várias técnicas diferentes, como espalhamento dinâmico de luz, medidas de absorção e refratometria diferencial. Na literatura encontramos valores de 1,6 - 4,0 mM para CMC do L64 em água (BAKSHI *et al.*, 2005; MATA *et al.*, 2005).

Baseado nesta característica de auto-agregação dos copolímeros triblocos, em um trabalho pioneiro, Ortega (2012) propôs a síntese de nanoblendas formadas por

PDA e copolímeros triblocos para utilização como sensor térmico e para detecção de NaOH e Na₂CO₃. O autor observou que o aumento da temperatura provocava transição de cor tanto nas vesículas como nas nanoblendas de PDA/copolímero, mas com diferentes faixas de temperatura. As vesículas de PDA permanecem com coloração azul até aproximadamente 45 °C, mas a 70 °C a transição de cor para vermelho torna-se completa (100%). Em contrapartida, a nanoblenda de PDA permanece azul a uma temperatura inferior a 30 °C, a partir desta temperatura essas espécies também sofrem uma transição abrupta, com plena conversão eletrônica a 50 °C. Este comportamento indica que as macromoléculas adicionadas ao PDA promovem diferentes interações intermoleculares, quando compradas à forma vesicular. O autor concluiu ainda que as respostas colorimétricas (RC) das nanoblendas, sintetizadas em elevadas concentrações de L64, apresentaram-se mais sensíveis à presença dos eletrólitos em relação às nanoblendas sintetizadas em baixas concentrações do copolímero, e às vesículas de polidiacetileno convencionais. O trabalho demonstra que é possível modular novos nanossensores a partir da formação de nanoblendas de PDA/copolímero tribloco.

Trabalho realizado por Castrillon (2013) objetivou a síntese de nanossensor de PDA para a detecção de compostos como benzeno, solventes clorados e melamina. O autor observou que nanoblendas formadas de PDA e copolímero tribloco mostraram maior intensidade de coloração azul e maior estabilidade, comparadas às vesículas de PDA. A partir deste estudo, é possível perceber que a transição colorimétrica ocorre com maior intensidade para compostos hidrofóbicos (benzeno e melamina, por exemplo), uma vez que estes interagem de modo menos favorável com o meio aquoso e consequentemente apresentam maior interação com as regiões hidrofóbicas da nanoblenda, sendo detectados com maior sensibilidade se comparados à outros compostos com menor hidrofobicidade.

3.4 Aplicações de sensores de PDA para alimentos

Um das principais limitações a serem consideradas no que diz respeito ao uso de sensores baseados em moléculas de PDAs para alimentos são as possíveis interações entre estes polímeros e os demais componentes presentes no meio. Quando tratamos da aplicação de sensores em alimentos esta limitação torna-se mais evidente.

Os alimentos, de modo geral, possuem uma matriz muito complexa, composta de diversas moléculas, como proteínas, carboidratos, sais minerais entre outros. Desta forma, essas moléculas endógenas, podem interagir com o polímero fornecendo um resultado superestimado em relação à molécula alvo que se deseja estudar, ou levando a um resultado falso positivo.

O leite, assim como seus derivados, possui uma matriz alimentícia muito complexa. Desta forma, biomoléculas presentes em sua matriz, como as proteínas, podem interferir na detecção de uma determinada molécula alvo.

3.5 Caseína micelar

O leite bovino possui cerca de 3,5% (m/m) de proteínas. As proteínas do leite são divididas em duas classes principais. A primeira fração, que corresponde a aproximadamente 80% da proteína total do leite bovino, é formada pela caseína. A segunda fração (20%) compreende as proteínas do soro lácteo (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Cerca de 95% da caseína no leite está presente na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas de caseína, que contribui para estabilidade do leite diante de variações de temperatura, pH e concentração de sais, por exemplo (FOX; BRODKORB, 2008).

A composição da micela de caseína é conhecida e já está bem definida e aceita na comunidade científica, entretanto, a forma de organização destas nanoestruturas têm sido estudadas por mais de 40 anos, e ainda não estão completamente elucidadas (HORNE, 2006). O consenso é que a estrutura das micelas de caseína é principalmente estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (HOLT *et al.*, 2003).

As micelas de caseína no leite encontram-se polidispersas, com tamanhos que variam de 80 nm a 500 nm de diâmetro e com um tamanho médio de cerca de 200 nm de diâmetro (DEKRUIF, 2002). De acordo com Leonil *et al.* (2008), uma micela de caseína contém cerca de 10^4 moléculas individuais de caseína em associação coloidal com fosfato de cálcio e pequenas quantidades de magnésio, sódio, potássio e citrato, sendo a principal função nutricional dessas micelas de caseína o transporte de cálcio e fósforo.

A micela de caseína é constituída por quatro frações principais de proteína: α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseína, representando cerca de 38%, 10%, 35% e 15%, respectivamente, as

quais são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente (VEGA, 2009). Além disso, cerca de 6% da massa, em base seca, da micela de caseína é composta por fosfato de cálcio coloidal (DALGLEISH, 2011).

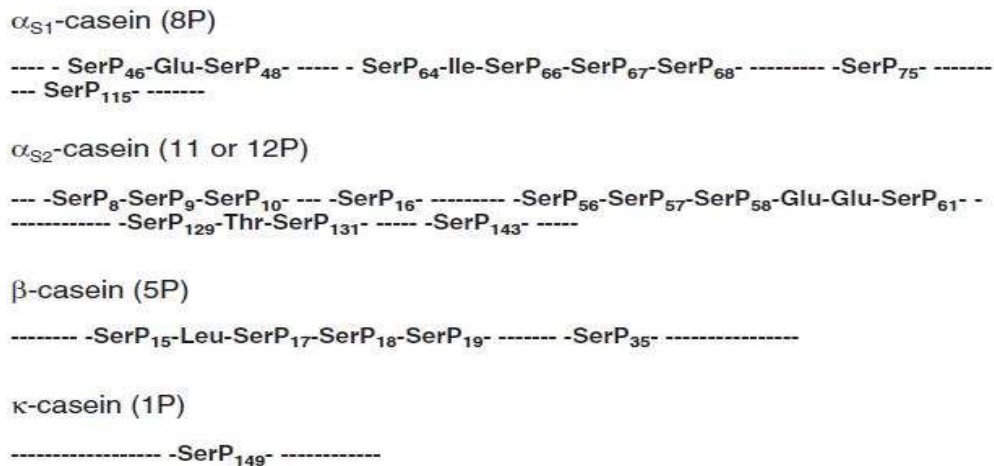
Segundo Martin *et al.* (2003) as frações de caseínas são fosfoproteínas e dividem-se em dois grupos, as que precipitam e as que são solúveis na presença de cálcio iônico. No leite bovino, as frações proteicas α_1 , α_2 e β -caseínas pertencem ao primeiro grupo. Por outro lado, κ -caseína é estável na presença de cálcio e, em condições normais (força iônica entre 0,067 e 0,08M e pH 6,6) do leite desempenha um papel importante na estabilidade da micela, impedindo a precipitação das demais frações, na presença deste íon. Essa propriedade estabilizadora é perdida durante a coagulação enzimática pela ação da quimosina (SHAMMET *et al.*, 1992).

A κ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína (DALGLEISH, 1998; WALSTRA, 1999). Trata-se de uma proteína anfipática com uma região hidrofílica na porção N-terminal e uma região C-terminal hidrofóbica com carga quase zero. Nos sítios de ligação com o cálcio, os resíduos de fosfoserina possuem carga -2 na ausência de íons cálcio (FOLLOWS *et al.*, 2004). Esta fração deve estar localizada na micela de modo a estabilizar as frações sensíveis ao cálcio (α e β), permitir hidrólise rápida e específica pela ação de quimosina e proteases similares além de promover a formação de complexos com proteínas do soro quando o leite for aquecido. De forma a atender estes requisitos, a κ -caseína deve estar posicionada numa região superficial da micela, dando origem à uma região conhecida como “camada pilosa”. Devido a este posicionamento, a κ -caseína proporciona à micela uma estabilidade estérica (HORNE *et al.*, 1998; FOX, 2003). Além do posicionamento da κ -caseína, estudos realizados por Bansai *et al.* (2006) demonstram que o peptídeo N-terminal da κ -caseína apresenta uma estrutura helicoidal irregular que também pode contribuir para a estabilidade estérica da micela.

A fração α_1 possui uma cadeia polipeptídica formada por duas regiões hidrofóbicas separadas por uma região hidrofílica. Todos os grupos fosfato, com exceção de um, estão presentes no segmento hidrofílico 45-89 e 17 resíduos de prolina se distribuem nos segmentos hidrofóbicos. Portanto, esta proteína pode ser considerada como uma cadeia polipeptídica frouxa e flexível. A caseína α_1 precipita com níveis de cálcio muito baixos (OLIVEIRA, 2007). De acordo com Walstra e Jenness (1984), a

fração α s-2 possui uma estrutura bipolar carregada negativamente concentrada próximo a extremidade N-terminal e outra porção positivamente carregada na porção C-terminal. Além disso, é mais sensível à precipitação pelo Ca^{2+} que a fração α s-1.

Uma característica da **β -caseína** é sua dependência da temperatura, formando grandes agregados a 20 °C, mas não a 4 °C (WALSTRA; JENNESS, 1984; GOFF, 2006). A adsorção de β -caseína aos núcleos de fosfato de cálcio limita o crescimento desses (FOLLOWS *et al.*, 2004). Segundo Horne (2003), a β -caseína ligada ao núcleo de fosfato de cálcio atua como uma ponte de ligação a outras caseínas. Por ser mais fosforilada que a κ -caseína, a β -caseína é mais sensível a altas concentrações de cálcio, embora seja menos sensível a precipitação com cálcio do que as α -caseínas (WALSTRA, 1999). A Figura 8 representa as diferentes frações que compõe a micela de caseína e também a posição dos grupos fosfoserina.



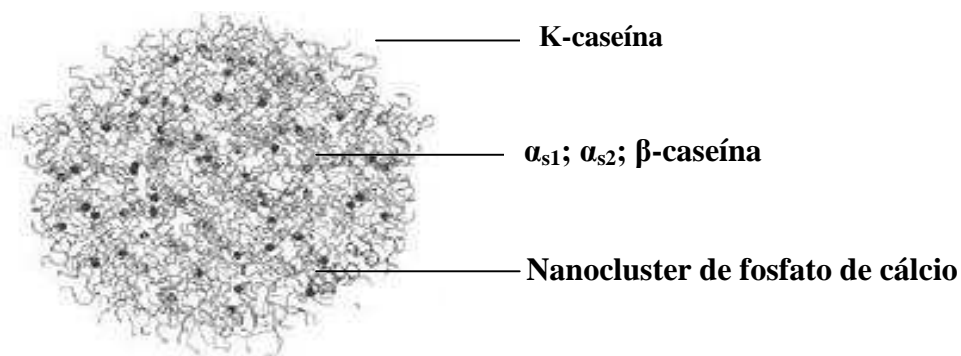
Fonte: Fox (2003).

Figura 8 – Posições de resíduos de fosfato na caseína de leite bovino, indicando os grupos de fosfoserina.

De acordo com McHugh *et al.* (1994), as caseínas apresentam baixo nível de estrutura secundária e terciária, provavelmente devido ao seu elevado teor de prolina, que rompe as α -hélices e as folhas β -pregueadas e também as ligações de hidrogênio e eletrostáticas. Já as associações hidrofóbicas facilitam a formação de interações intermoleculares que aumentam a coesão entre as cadeias para formar filmes.

Em relação à estrutura micelar da caseína, ao longo de décadas, foram propostos uma variedade de modelos para descrever a estrutura de micelas de caseína presentes em leite bovino. Esses modelos se enquadravam em três categorias: modelo núcleo-

córtex baseado em estudos da solubilidade da caseína em soluções com Ca^{2+} , modelos de subunidades e modelos de estrutura interna, baseado nas propriedades de cada componente isoladamente, causando ou direcionando a formação da estrutura interna das micelas de caseína. Cada uma dessas categorias foi proposta pela primeira vez na década de 1960, e os modelos originais foram abandonados ou modificados conforme informações suplementares sobre micelas de caseína foram sendo obtidas por pesquisas posteriores (PHADUNGATH, 2005). Atualmente, o modelo mais aceito aborda a micela de caseína como um agregado formado por diferentes frações proteicas, alguns sais e nanoestruturas de fosfato de cálcio (Figura 9). Segundo Holt *et al.* (2004), essa estrutura micelar é mantida estável devido a presença de resíduos de fosfoserina que se ligam ao cálcio, formando aglomerados nanométricos (nanoclusters de fosfato de cálcio) que atuam como agente “cimentante”.



Fonte: Holt (2004).

Figura 9 – Micela de caseína, modelo da estrutura interna.

A obtenção da caseína em escala industrial pode ser realizada basicamente por dois métodos: precipitação isoelétrica e coagulação enzimática. No primeiro método, o leite é acidificado em pH 4,6 (ponto isoelétrico) para induzir a coagulação da caseína. Em seguida a temperatura é ajustada para 30-40 °C, o coalho é lavado, prensado ou centrifugado (para remover o excesso de água) e finalmente seco e moído. A diferença entre os dois métodos está nos meios de coagulação. No segundo método, uma enzima cliva a κ -caseína, desestabilizando as micelas e promovendo a coagulação na presença de cálcio (GENNADIOS, 2002).

A α -caseína é a principal fração que compõe a micela de caseína. Este grupo de proteína contém de 8 a 10 resíduos de serina, enquanto as frações β -caseína contém cerca de 5 resíduos de serina, sendo mais hidrofóbica do que as frações α e κ -caseína.

3.6 Interações entre micelas de caseína e outras moléculas

Micelas de caseína podem interagir com diferentes moléculas, como proteínas do soro, enzimas como a quimosina e polissacarídeos.

Sabe-se há muito que diante de certas condições as micelas de caseína podem formar interações com proteínas do soro. O tratamento térmico aplicado ao leite a temperaturas acima de cerca de 70 °C provoca alterações na estrutura e em propriedades funcionais das micelas de caseína. Este fenômeno ocorre principalmente devido a desnaturação das proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina), que formam complexos diretamente com a fração κ -caseína, através de ligações covalentes dissulfeto e interações hidrofóbicas (ANEMA *et al.*, 2003; VASBINDER *et al.*, 2003). Desta forma, a região pilosa da caseína será composta por κ -caseína associada à proteínas do soro desnaturadas. A formação destes agregados é de grande importância, pois podem influenciar mudanças no ponto isoelétrico da proteína além da hidrofobicidade da superfície da micela (GUYOMARC'H *et al.*, 2007). A formação destes complexos também afetam intimamente diversos processos de lácteos, como queijos HEMAR; 2002; MÉNARD *et al.*, 2005), iogurte (GUYOMARC'H *et al.*, 2003; GUYOMARC'H *et al.*, 2007), o armazenamento de leite UHT (CHAVAN *et al.*, 2011) e elaboração de ingredientes funcionais (PATEL *et al.*, 2006).

A carragena e suas variações formam o segundo maior grupo dos polissacarídeos na indústria de alimentos (PICULELL, 2006). A funcionalidade deste polissacarídeo em sistemas lácteos tem sido muito estudada ao longo de vários anos. Isto porque este polissacarídeo interage sinergicamente com proteínas do leite, em especial, micelas de caseína, para produzir viscosidade promover geleificação do meio. Esta característica da carragena depende de muitos fatores, como a concentração de carragena, o tipo de proteína, a temperatura, o pH e o ponto isoelétrico da proteína (DE VRIES, 2002).

Existem algumas teorias que buscam explicar as interações entre carragena e micelas de caseína. Apesar do fato de ambas as estruturas, carragena e caseína, possuírem carga líquida negativa, uma das teorias citadas com maior frequência propõe que haja uma interação específica entre os grupos sulfato, presentes na carragena, e uma região muito curta carregada positivamente situada entre os resíduos 97 e 112 da κ -caseína, localizada na superfície da micela (SNOREN *et al.*, 1975; DALGLEISH; MORRIS, 1988).

Estudos vêm mostrando que a carragena interage com micelas de caseína. Dalgleish e Morris (1988) utilizaram a técnica de micro-eletroforese para medir o potencial zeta, que está estreitamente relacionado com a densidade de cargas de micelas de caseína. Seus resultados mostraram que a densidade de cargas da micela de caseína torna-se mais negativa com concentrações cada vez maiores das três formas de carragena (K-, λ - e ι -carragena). Isto demonstra que as três formas de carragena são adsorvidas por micelas de caseína.

Langendorff *et al.* (2000) demonstraram que abaixo das temperaturas de transição das formas β -caseína- α -hélice, o diâmetro aparente de micelas de caseína medido por DLS aumenta na presença de k-carragena. Segundo os autores, este comportamento sugere que as micelas de caseína estão interligadas com as regiões helicoidais da k-carragena dando origem a uma rede.

Outro estudo realizado sugere que a k-carragena adsorve na superfície das micelas de caseína. Abaixo da concentração de geleificação de k-carragena (< 0,03%) e a temperatura de 25 °C, o aumento do tamanho das micelas de caseína apresenta-se linearmente relacionada com a concentração de k-carragena. Através de observações microestruturais foi possível perceber uma superfície aberta e porosa de micelas de caseína, o que poderia sugerir que um grande polímero como a carragena pode penetrar a camada pilosa e adsorver na superfície das micelas de caseína (SPAGNUOLO, DALGLEISH *et al.*, 2005).

Um estudo demonstrou que a interação entre k-carragena e micelas de caseína é dependente da concentração de k-carragena, ou seja, em altas concentrações do polissacarídeo, as interações entre ambas as moléculas são favorecidas e deste modo micelas de caseína ficam aprisionadas dentro da rede tridimensional formada pela k-carragena. Este comportamento foi observado em concentrações de k-carragena bem acima das concentrações mínimas de gelificação no leite (0,03%) (SCHORSCH *et al.*, 2000).

Uma quantidade considerável de pesquisas centrou-se na funcionalidade da carragena em sistemas modelo à base de leite contendo caseína na forma micelar (LYNCH *et al.*, 1994a, 1994b; LANGENDORFF *et al.*, 1999, 2000; SCHORSCH *et al.*, 2000; PUVANENTHIRAN *et al.*, 2003; TRCKOVA *et al.*, 2004; LYNCH; MULVIHILL, 1996; ARLTOFT *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2008).

No entanto, poucos trabalhos mostraram a interação entre carragena e sistemas de caseína não micelares (KEOGH *et al.*, 1996; OAKENFULL *et al.*, 1999; HEMAR *et al.*, 2002; NONO *et al.*, 2011).

Nono *et al.* (2011) testaram a interação entre caseinato de sódio (CS) e K-carragena (KC) presentes em solução com pH 7,0 e também na presença de íon sódio (Na^+) com o intuito de verificar a influência da força iônica do meio. Os autores observaram que houve interação e posterior agregação entre as moléculas de CS em todas as concentrações testadas de KC. Além disso, a fração de CS presente nos aglomerados aumenta linearmente com a concentração de KC. Com a modificação da força iônica pela adição de elevada concentração de íons Na^+ ($> 0,2 \text{ M}$) percebe-se uma diminuição na formação de aglomerados de CS, provavelmente, devido à uma maior repulsão entre os sais. Em contrapartida, o decréscimo de pH do meio promove uma diminuição da densidade de carga do CS, o que aumenta a repulsão eletrostática diminuindo a formação de aglomerados de CS. Desta forma, apesar de não haver interação entre as duas moléculas a KC influencia na formação de clusters de CS, com precipitação e posterior sedimentação.

De Vries *et al.* (2002) demonstraram que a força de interação entre carragena e caseína do leite é muito maior em comparação com as misturas contendo caseinato e proteína de soro de leite.

A fim de entender melhor a interação de carragena e componentes proteicos na forma não micelar, Hemar *et al.* (2002) estudaram a interação de k-carragena com derivados do leite como, leite em pó desnatado, concentrado proteico de leite e caseinato de sódio. Em todos estes ingredientes lácteos a caseína é o principal componente proteico. Após a obtenção do leite em pó e do concentrado de proteínas a estrutura micelar da caseína é mantida. No entanto, esta estrutura é perdida após o processo de obtenção do caseinato de sódio. Quando caseinato de sódio foi adicionado a k-carragena, a viscosidade das misturas era aproximadamente a mesma que a viscosidade de k-carragena sozinha. Isto indica que, o caseinato de sódio teve pouco efeito sobre o comportamento de escoamento dos sistemas contendo k-carragena, mostrando a baixa interação entre as duas estruturas.

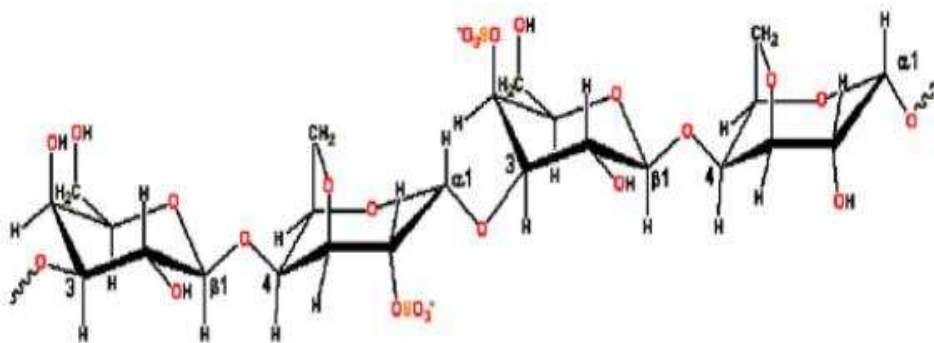
Oakenfull *et al.* (1999) estudaram o comportamento de géis formados por k-carragena e caseinato de sódio pelas técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e reometria. A DSC mostrou que durante a gelificação o comportamento térmico da k-carragena quase não foi influenciado pela presença de caseinato de sódio. Estes

resultados mostram que a interação de κ -carragena com caseinato de sódio tem pouco ou nenhum efeito sobre a transição conformacional da carragena (bobina α -hélice).

De acordo com Goff (2006), apesar de muitas pesquisas terem sido realizadas neste ramo, o mecanismo de interação entre κ -carragena e caseína em sistemas complexos de leite ainda não é totalmente compreendido.

A carragena foi descoberta em 1785 na cidade de Carragena, norte da Irlanda, onde algas marinhas eram utilizadas para aumentar a viscosidade do leite consumido pela população. O Musgo irlandês, ou carragena, é um aditivo bastante utilizado na indústria de alimentos, devido à maneira peculiar com que este interage com as proteínas do leite (PRADELLA, 2006). Trata-se de uma mistura complexa formada por no mínimo cinco polímeros distintos, designados kappa (κ), lambda (λ), mu (μ), iota (ι) e nu (ν). Dentre estes, λ -carragena e κ -carragena são de maior importância nos alimentos (VILLANUEVA; MONTAÑO, 2003).

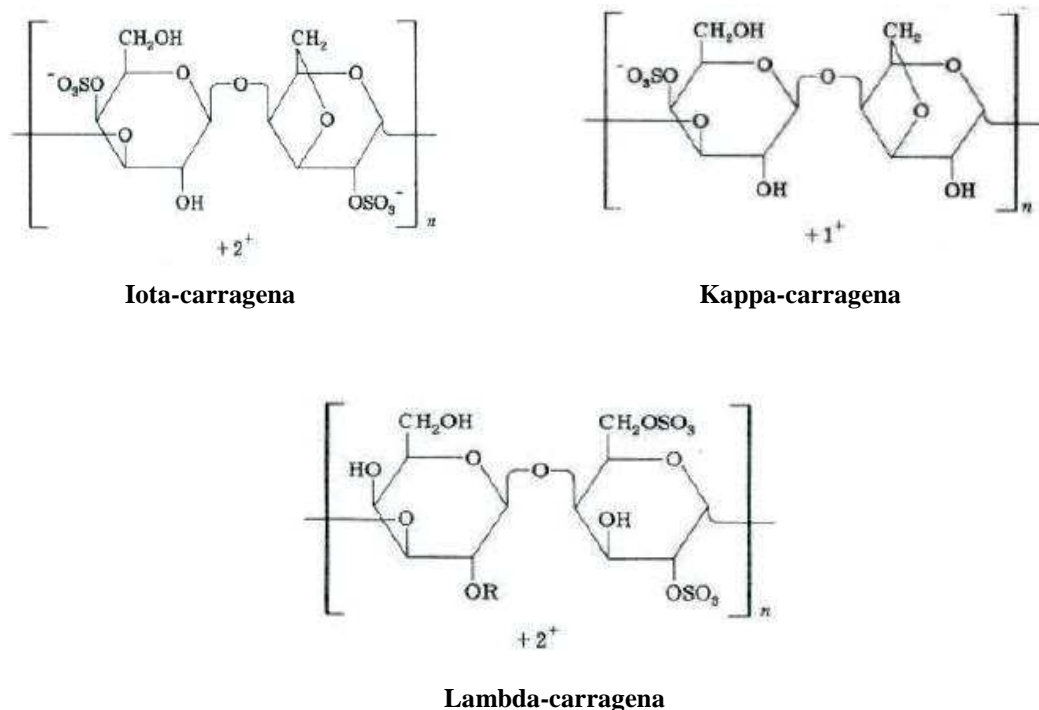
A carragena possui elevada massa molecular r (200 a 400. 10^3 g.mol $^{-1}$), variando de 15 a 40% de éster de sulfato, sendo formada por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-galactose (3,6-AG) unidas por ligações α -1,3 e β -1,4-glicosídica (Figura 10). Contém ainda alguns sais como, cálcio, magnésio, potássio e ésteres de sulfato de cálcio (SOUZA, 2006).



Fonte: Chaplin (2005).

Figura 10 –Estrutura molecular da carragena.

As estruturas das três formas principais de carragena (Figura 11) diferem apenas no número de grupos de sulfato por dissacarídeo. Kappa possui um, iota dois e lambda três. Iota e kappa-carragena sofrem uma mudança conformacional em função da temperatura quando em solução aquosa passando da conformação desordenada para a ordenada (helicoidal) (estado ordenado) (ROCHAS *et al.*, 1980).



Fonte: Villanueva e Montañó (2003).

Figura 11 – Principais tipos de carragenas e respectivas estruturas.

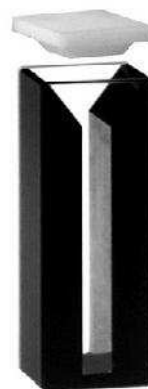
3.7 Métodos de determinação da interação entre caseína micelar e nanoestruturas de polidiacetileno

Existem diversas técnicas capazes de avaliar a interação intermolecular entre diferentes espécies químicas. Em relação às interações que resultam na transição colorimétrica de nanoestruturas de PDA, a espectrofotometria de UV-vis vem sendo bastante utilizada para o cálculo do parâmetro de resposta colorimétrica (RC). A Figura 12 ilustra o espectrofotômetro de UV-vis.

A fim de avaliar o potencial de reversibilidade colorimétrica de um novo biossensor formado por PDA e fenilacetamida, Chen *et al.* (2011) determinaram a resposta colorimétrica desta solução em diferentes temperaturas. Segundo os autores, a 30 °C o biossensor apresentava coloração púrpura, com absorvância a 625 nm. Com o aquecimento até 70 °C a resposta colorimétrica sofreu um gradual aumento, ou seja, ocorreu transição colorimétrica de roxo para vermelho com o aumento da temperatura. No entanto, quando a solução foi resfriada, voltando à 30 °C a cor púrpura retornou, acompanhada de um valor decrescente da RC (%).



(a)



(b)

Figura 12 – O espectrómetro de UV-vis (Shimadzu UV-2550) é ilustrado na Figura “a”. A Figura “b” ilustra a cubeta que irá conter a solução a ser analisada.

Em estudo realizado por Su *et al.* (2004), foi utilizada a técnica de determinação de RC para avaliar o efeito de moléculas anfifílicas (etanol e 1-pentanol) em vesículas de PDA. Os autores observaram que a resposta colorimétrica foi maior para vesículas adicionadas de 1-pentanol em função da sua maior hidrofobicidade comparado ao etanol.

Wang *et al.* (2005) desenvolveram uma vesícula de PDA com o objetivo de detectar, por métodos colorimétricos, oligossacarídeos presentes no meio. Através de técnicas espectrofotométricas, constatou-se que após a polimerização a vesícula de PDA apresentou pico máximo de absorção a 640 nm e coloração intensamente azul. Os autores avaliaram a RC (%) apresentada pela vesícula após a adição de oligossacarídeos numa faixa de concentração entre 20 nM e 20 μM. Os autores observaram que após a adição de oligossacarídeos a concentração de 20 μM, à temperatura ambiente e sob agitação a solução vira de azul para vermelho. Desta forma, os autores concluem que o método descrito é simples, rápido e adequado para detecção colorimétrica de oligossacarídeos.

A RC (Equação 1) é uma medida semi-quantitativa proposta por Charych *et al.* (1993) para determinar a porcentagem de moléculas de PDA que passaram da coloração azul para a coloração vermelha.

$$RC = \frac{\left(\frac{A_{blue}}{A_{blue} + A_{red}}\right)_b - \left(\frac{A_{blue}}{A_{blue} + A_{red}}\right)_a}{\left(\frac{A_{blue}}{A_{blue} + A_{red}}\right)_b} \times 100 \quad (1)$$

Na Equação 1, A é a absorvância dos componentes das cores azul (~ 650 nm) e vermelho (~ 540 nm), obtidos por espectroscopia de UV-visível. Os termos “azul” e “vermelho” estão relacionados à aparência material, e os índices “b” e “a” representam as absorvâncias antes e depois da exposição da amostra a estímulos do solvente, respectivamente.

Embora seja um parâmetro importante para a quantificação da extensão da transição colorimétrica da nanoestrutura polidiacetilênica, a obtenção da RC não fornece parâmetros termodinâmicos relacionados à interação intermolecular entre a molécula alvo e o PDA. A determinação destes parâmetros é importante para o conhecimento da energia envolvida nas interações, bem como para elucidar as diferentes forças motrizes que levam à transição colorimétrica dos PDAs. Desta forma, a utilização de técnicas sensíveis e específicas para a determinação de parâmetros de interação intermolecular é estratégica para o desenvolvimento eficiente de nanossensores baseados em PDA, além de contribuir para o avanço científico na área. Dentre estas técnicas, podem-se citar: a espectroscopia de fluorescência, as medidas eletrocinéticas e a microcalorimetria de titulação isotérmica.

A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação do meio por uma radiação luminosa, estimulando a resposta da autofluorescência dos cromóforos endógenos presentes no local, permitindo não apenas a caracterização como também a quantificação desses cromóforos. São considerados cromóforos todas as moléculas que absorvem luz, e reemitem luz em frequência diferente. O triptofano presente em diversas proteínas, como a caseína, é um típico exemplo de cromóforo (RAMANUJAM, 2000; NICOLA *et al.*, 2007). A Figura 13 ilustra o espectrofluorímetro utilizado neste tipo de análise.

Por meio de interpretações dos níveis de energia, é possível obter informações detalhadas a respeito das estruturas das moléculas que originam os espectros. A fluorescência é produzida quando as espécies excitadas regressam ao estado fundamental.

Diversas proteínas possuem a capacidade de emitir determinada fluorescência e esta característica está intimamente associada à presença de certos aminoácidos como, triptofano, tirosina e fenilalanina. Os resíduos de triptofano são a fonte dominante de absorção de UV em proteínas. Além disso, a emissão de fluorescência de triptofano é altamente influenciada pela composição de seu ambiente local. Este fato é frequentemente utilizado como indicador de mudanças conformacionais da estrutura

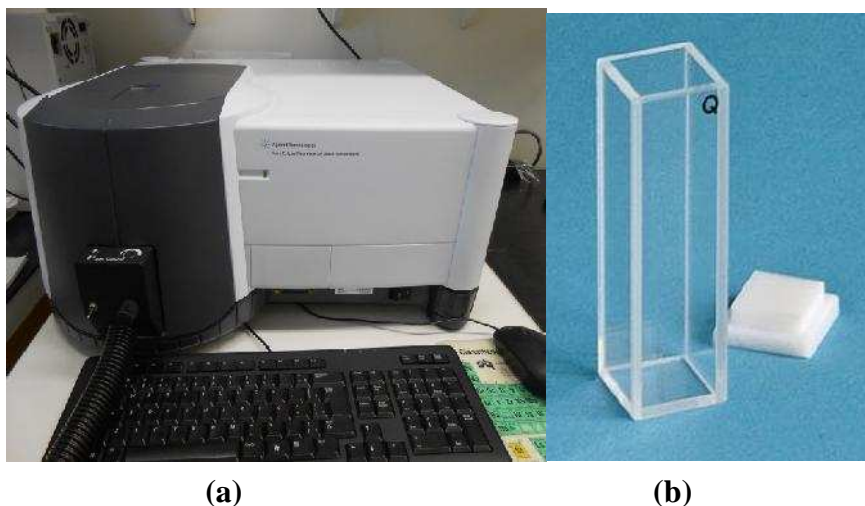


Figura 13 – O espectrofluorímetro (Agilent Technologies) é ilustrado na Figura “a”; e a Figura “b” ilustra a cubeta de quartzo que irá conter a solução.

protéica, uma vez que o máximo de emissão proveniente de proteínas reflete o teor de resíduos de triptofano voltados para a fase aquosa (LAKOWIZ, 1999). Nas micelas de caseína, o triptofano carboxiterminal localizado na posição 199 da α_1 -caseína é responsável por 30% da fluorescência emitida, enquanto o resíduo triptofano na posição 164 contribui em 70% para o efeito (OSTOA-SALOMA, 1990). De acordo com Royer (1995), as propriedades de fluorescência dos resíduos de aminoácidos tendem a variar diante de processos de desnaturação proteica. No entanto, não é possível prever como a mudança estrutural pode mudar a intensidade de fluorescência. Algumas proteínas ao desnaturarem podem apresentar um aumento ou diminuição da intensidade de emissão de fluorescência. Por exemplo, as proteínas do grupo heme exibem, normalmente, um aumento na intensidade de fluorescência ao sofrerem desnaturação. Isto ocorre devido à perda do grupo heme, que desativa a emissão do triptofano em seu estado nativo. Desta forma, a energia média de emissões proveniente de resíduos de triptofano geralmente muda para o vermelho com desnaturação devido a sua exposição ao solvente. Em seu estado nativo os resíduos de triptofano apresentam um espectro com um máximo de 340 nm. No entanto, quando se encontra numa estrutura proteica desnaturada adquire um espectro máximo de 355 nm.

Estudo desenvolvido por Yazdi e Corredig (2011) utilizaram a espectroscopia de fluorescência com o objetivo de estudar detalhadamente as interações entre curcumina e caseína no leite. Neste trabalho, os autores testaram a hipótese de que temperaturas elevadas induzem a interação de proteínas do soro desnaturadas com a superfície da

micela de caseína, o que afetaria sua ligação com a curcumina (molécula hidrofóbica). Os autores observaram que a intensidade de fluorescência da curcumina aumenta após o aquecimento do leite (80 °C por 10 minutos). Este fenômeno demonstra que a formação de complexos entre caseína e proteínas do soro, após o aquecimento, aumenta a capacidade de interação entre curcumina e micelas de caseína. Esta maior capacidade de interação pode ser atribuída à desnaturação das proteínas do soro, que ao se desdobrarem expõe seus grupamentos hidrofóbicos proporcionando melhor interação entre caseína e curcumina.

Outra técnica muito importante na avaliação das interações intermoleculares é a determinação do potencial zeta. Trata-se de uma propriedade eletrocinética interfacial aplicada no estudo de grande número de fenômenos naturais, tais como a cinética de eletrodo, eletrocatalise, corrosão, adsorção, crescimento de cristais, estabilidade coloidal e características de fluxo de suspensões coloidais e soluções de eletrólitos através de meios porosos e microcanais. O potencial zeta é um parâmetro chave na determinação da energia de interação entre as partículas e conseqüentemente, a estabilidade dos sistemas de suspensão coloidais (HUNTER, 1981).

De acordo com Morrison e Ross (2002), o potencial zeta descreve a magnitude da carga presente em partículas coloidais indicando assim a estabilidade desses sistemas. As partículas com um elevado potencial zeta possuem elevada estabilidade, uma vez que a sua carga inibe a coalescência e melhora a estabilidade.

O potencial zeta é o potencial eletrostático gerado pela concentração de íons na região superficial da partícula. Este parâmetro pode ser aplicado na determinação da carga de superfície de partículas como nanopartículas, proteínas, lipossomas, entre outros. A superfície da partícula está organizada numa dupla camada elétrica, composta pela região interna, conhecida por camada de Stern (onde os íons estão fortemente ligados à superfície) e a região externa ou camada difusa (onde os íons estão ligados à superfície de um modo mais fraco). Dentro da camada difusa existe uma fronteira onde íons e partículas formam uma entidade estável, denominada de plano deslizante e o potencial existente nesta fronteira é designado de potencial zeta, como ilustra a Equação 5. O potencial zeta se reduz a partir da superfície da partícula, e se torna zero onde a concentração de cargas elétricas é igual. O potencial zeta aumenta à medida que diminui a distância em relação à superfície da partícula, e a sua redução se consegue pelo ajuste do pH próximo do ponto isoelétrico, onde a carga primária é zero não conseguindo

portanto a dupla camada para produzir esse potencial, podendo ser reduzido também com adição de íons ou coloides de carga oposta ao sistema coloidal (NENO, 1982).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa R) \quad (5)$$

em que U_E é a mobilidade eletroforética, ε e η são a constante dielétrica e a viscosidade do solvente, respectivamente, ζ é o potencial zeta e $f(\kappa R)$ a função de Henry. Dois valores são normalmente usados como aproximações para $f(\kappa R)$. Se o cálculo do potencial zeta for efetuado para sistemas aquosos, adota-se $f(\kappa R)$ é igual a 1,5 referindo-se à aproximação de Smoluchowski, se, no entanto, for efetuado para sistemas não aquosos, $f(\kappa R)$ é igual a 1,0 e refere-se à aproximação de Huckel (DOUGHERTY *et al.*, 2008).

O potencial zeta geralmente é mensurado em equipamentos sofisticados (Figura 14). Assim, é aplicado um campo elétrico que interage com as partículas carregadas fazendo com estas sejam atraídas para o eletrodo de carga oposta. A velocidade da partícula mediante o campo elétrico refere-se à mobilidade eletroforética. Assim, o potencial zeta relaciona-se com a mobilidade eletroforética pela equação de Henry (equação 5).

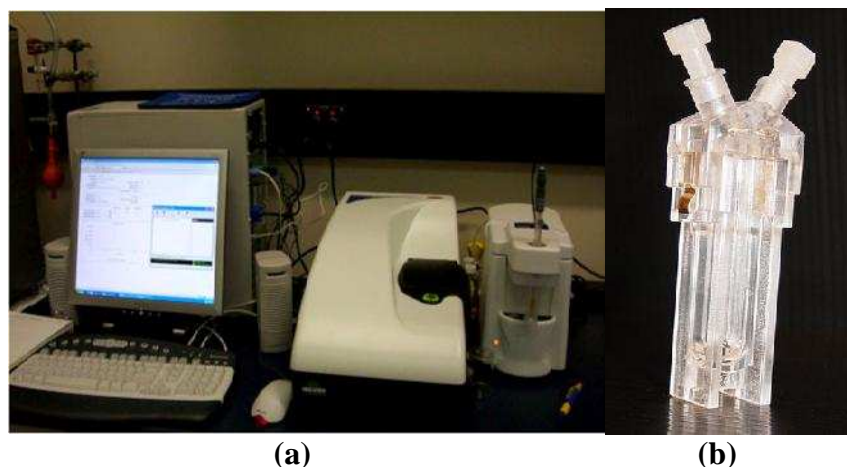


Figura 14 –(a) Ilustração do equipamento Zetasizer nano ZS90 (Malvern). Em detalhes, à direita da foto está a cubeta (b) que irá conter a solução com partículas carregadas.

Pesquisas envolvendo potencial zeta e produtos lácteos tem sido realizadas como indicador de carga elétrica dos glóbulos de gordura (WADE; BEATTIE, 1997; MICHALSKI *et al.*, 2002) e também de micelas de caseína e demais partículas

presentes no meio (ANEMA; KLOSTERMEYER, 1996; FAMELART *et al.*, 2003; PHILIPPE *et al.*, 2005).

Relatos de potencial zeta de micelas de caseína em pH natural do leite (6,7) variam entre -8 mV, determinado por Schmidt e Poll (1986), a -22 mV, segundo Philippe *et al.* (2005). Neste caso, as técnicas de medição e condições ambientais influenciam significativamente os resultados.

A fim de avaliar o mecanismo de estabilidade promovido por moléculas de pectina adicionada às bebidas lácticas fermentadas, Sejersen *et al.* (2006) avaliaram o potencial zeta da interação entre moléculas de pectina e caseína presentes no meio. Os autores observaram uma alteração no potencial zeta, de positivo para valores negativos, com adição de pectina, sendo este fenômeno resultado da eletroadsorção da pectina à micela de caseína. O potencial zeta dos agregados de caseína tornou-se cada vez mais negativos, com o aumento da concentração de pectina, o que indica que mais de pectina foi adsorvido. O tratamento térmico da bebida láctea com pectina adicionada resultou em uma diminuição numérica no potencial zeta, provavelmente devido à dessorção parcial e/ou rearranjo de pectina, o que poderia explicar o aumento da instabilidade observada da bebida láctea tratada termicamente.

De todas as técnicas disponíveis para avaliar ligações entre moléculas, a microcalorimetria de titulação isotérmica é a única capaz de medir diretamente a constante de ligação (K)_a, variação da entalpia (ΔH) e estequiometria da interação entre duas ou mais moléculas presentes sistema.

É necessário entender o significado de algumas variáveis termodinâmicas para conseguir interpretar os dados de calorimetria. A variável medida na técnica de ITC é a energia na forma de calor Q , liberada ou absorvida em algum processo físico-químico que ocorre no sistema. Q pode ser relacionado com a variável entalpia H (Equação 6).

$$H = U + PV \quad (6)$$

em que U é a energia interna; P a pressão; e V o volume do sistema.

Em um processo a volume constante pode-se derivar ambos os lados da equação 6 para se obter a equação 7.

$$\Delta H = \Delta U + P \cdot \Delta V \quad (7)$$

em que $P \cdot \Delta V$ é o trabalho realizado pelo sistema ou sobre o sistema (W).

A termodinâmica nos diz que a variação da energia interna é igual à quantidade de calor que entra ou sai do sistema menos, o trabalho realizado pelo sistema ou sobre o sistema (Equação 8).

$$\Delta U = Q - W \quad (8)$$

Substituindo a equação 8 na equação 7 obtém-se a relação da entalpia coma energia na forma de calor liberada ou absorvida pelo sistema (Equação 9).

$$\Delta H = Q \quad (9)$$

Com a interação entre a molécula alvo, como por exemplo, a micela de caseína, as cadeias de PDA podem sofrer alterações conformacionais, ocorrendo ainda um rearranjo das moléculas do solvente que circundam o sítio de ligação. Como resultado destes fenômenos termodinâmicos há liberação ou absorção de energia na forma de calor. O sistema de microcalorimetria isotérmica (ITC) é capaz de quantificar esta energia proporcionando uma completa descrição da termodinâmica de interação, estequiometria da ligação e a constante de associação. Além disso, análises de ITC são rápidas e muito precisas, não destrutivas e compatíveis com substratos fisiológicos e sintéticos (adaptado de JEAN-PIERRE *et al.*, 2006).

O equipamento de ITC (Figura 13) consiste de duas células de 1,8 mL, uma de amostra e a outra de referência. Elas são construídas com uma forma padrão. A figura 13 ilustra ambas as células e o equipamento como um todo. Na célula de amostra é titulada uma solução ou suspensão que fica numa seringa com precisão de 0,5µL, enquanto na célula de referência não será titulado nada. Um típico motor de passo é responsável pelas injeções da seringa podendo ser controlado por um software. Um agitador roda no interior da célula de amostra a 300 rpm. servindo para homogeneizar a amostra. O fluxo de energia na forma de calor é detectado por um sistema de termopilhas que tem uma precisão de 10⁻⁸ J. Antes de começar as medidas abaixam-se as torres e é necessário esperar um determinado tempo para que a células entrem em equilíbrio térmico com um banho que fica localizado no interior do calorímetro. Espera-se um tempo até formar uma linha base que é simplesmente quando a potência dissipada no calorímetro é constante da ordem de alguns microwatts e o desvio desse valor é da ordem de décimos de microwatts (HOLDGATE, 2001).



(a)

(b)

Figura 13 – Ilustração do equipamento de ITC. Em detalhes, à direita da foto (b) está o sistema de injeção e o motor de agitação, além das células de amostra e referência. A foto da direita mostra em detalhes a seringa, o motor de agitação e as duas células de amostra e referência.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: Thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*, v. 27, p. 14-24, 1994.

ALEXANDRIDIS, P.; OLSSON, U.; LINDMAN, B. Self-assembly of amphiphilic block copolymers: The (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃-water-p-xylene system. *Macromolecules*, v.28, p.7710, 1995.

ALOCILJA, E. C.; RADKE, S. M. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics. Am. Chem. Soc.*, v.18, p. 841-846, 2003.

ANEMA, S. G.; KLOSTERMEYER, H. Z-potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120°C. *International Dairy Journal*, v. 6, p. 673-687, 1996.

ANEMA, G. S.; LI, Y. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Food Science Section*, v. 70, p. 73-83, 2003.

ANEMA, S. G.; LEE, S. K.; LOWE, E. K.; KLOSTERMEYER, H. Rheological properties of acid gels prepared from heated pH-adjusted skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 337 e 343, 2004.

ANEMA, S. G.; PINDER, D. N.; HUNTER, R. J.; HEMAR, Y. Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 386-393, 2006.

ANEMA, S. G.; PATEL, H. A.; CONSIDINE, T.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments – A Review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.8, p.1-23, 2007.

ANEMA, S. G. Heat and/or high-pressure treatment of skim milk: changes to the casein micelle size, whey proteins and the acid gelation properties of the milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 61, p. 245-252, 2008.

ANTUNES, M. C. C.; FELISBERTI, M. I. Blends of poly(hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) obtained from melting mixture. Unicamp: Instituto de Química, *Polímeros*, v.15, 2005.

ARLETH, L.; SVENSSON, B.; OLSSON, U. Block copolymer micro-emulsion with solvent-induced segregation. *Langmuir*, v. 23, p. 2117-2125, 2007.

ARLTTOFT, D.; IPSEN, R.; MADSEN, F.; DE VRIES, J. Interactions between carrageenans and milk proteins: a microstructural and rheological study. *Biomacromolecules*, v.8, p. 729-736, 2007.

BAKSHI, M. S.; SACHAR, S.; SINGH, K.; SHAHEEN, A. Mixed micelle behavior of Pluronic L64 and Triton X-100 with conventional and dimeric cationic surfactants, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 286, p. 286-369, 2005.

BANSAI, P. S.; GRIEVE, P. A.; MARSCHKE, R. J.; DALY, N. L.; MCGHIE, E.; CRAIK, D. J. E.; ALEWOOD, P. F. Chemical synthesis and structure elucidation of bovine β -casein (1-44). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 340, p. 1098-1103, 2006.

BARLOW, J. W.; PAUL, D. R. A binary interaction model for miscibility of copolymers in blends. *Polymer*, v. 25, p. 487-494, 1984.

BORISOV, S. M.; WOLFBEIS, O. S. Optical biosensors. *Institute of Analytical Chemistry. Chemo. and Biosensors*, v. 108, p. 423-461, 2008.

BRANDÃO, H. M. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. *Revista CRMV*, Brasília, v.17, n. 53, p. 61-67, 2011.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. Instituto de Estudos Farmacêutico (IFAR), 2011 (artigo de revisão).

CAMILLOTO, G. P. *Termodinâmica de Interação entre lactato e vesículas nanoestruturadas de polidiacetileno*. 2012.83 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

CARPICK, R. W.; SASAKI, D. Y., BURNS, A. R. First observation of mechanochromism at the nanometer scale. *Langmuir*, v. 16, p. 1270-1278, 2000.

CARPICK, R. W.; SASAKI, D. Y.; MARCUS, M. S.; ERIKSSON, M. A.; BURNS, A. R. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. *Institute of Physics Publishing: Condensed Matter*, v.16, p. 679-697, 2004.

CASTRILLON, E. D. C. *Nanosensores ópticos de polidiacetileno para el reconocimiento de moléculas de interés ambiental y alimenticio*. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

CHAMPAIBOON, T.; TUMCHARERN, G.; POTISATITYUENYONG, A.; WACHARASINDHU, S.; SUKWTTANASINITT, M.A. Polydiacetylene multilayer film for naked eye detection of aromatic compounds *Sens. Actuators*, v. 139, p. 532-537, 2009.

CHANCE, R. R.; BAUGHMAN, H. M.; ECKHARDT, C. J. Thermochromism in a polydiacetylene crystal. *The Journal of Chemical Physics*, v. 67, p. 3616, 1977.

CHAPLIN, M. *Carrageenan*. 2005. Disponível em: <www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html>. Acesso em: 2 abr. 2014.

CHARYCH, D. H.; NAGY, J. O.; SPEVAK, W.; BEDNARSKI, M. D. Direct colorimetric detection of a receptor/ligand interactions by a polymerized bilayer assembly. *Science*, v. 261, p. 585-588, 1993.

CHARYCH, D. H.; SPEVAK, W.; NAGY, J. O.; SCHAEFER, M. E.; GILBERT, J. H.; BEDNARSKI, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 115, p. 1146, 1993.

CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R.; KHEDRAR, C.; JANA, A. H. UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A review. *Food Science and Food Safety*, v. 10, p. 251-268, 2011.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Proteínas alimentárias. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 37, p. 161-168, 1989.

CHENG, Q.; STEVENS, R. C. Charge-induced chromatic transition of amino acid-derivatized polydiacetylene liposomes. *Langmuir*, v. 14, p. 1974-1976, 1998.

CHEN, X.; JIANG, H.; WANG, Y.; ZOU, G.; ZHANG, Q. β -cyclodextrin-induced fluorescence enhancement of a thermal-responsive azobenzene modified polydiacetylene vesicles for a temperature sensor. *Materials Chemistry and Physics*, v. 124, p. 3640, 2010.

CHEN, X.; YOON, J.; A thermally reversible temperature sensor based on polydiacetylene: Synthesis and thermochromic properties. *Dyes and Pigments*, v. 89, p. 194-198, 2011.

CHITPINITYOL, S.; CRABBE, S. M. J. C. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, v. 61, p. 395-418, 1998.

CHU, B.; ZHOU, Z.; GUANGWEI, W.; & FARRELL, H. M. JR. Laser light scattering of model casein solutions: effects of high temperature. *Journal of Colloid Interface Science*, v. 170, p. 102-112, 1995.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, p. 1-13, 2003.

DALGLEISH, D. G. Casein micelles as colloids: Surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 3013-3018, 1998.

DALGLEISH, D. G.; MORRIS, E. R. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, v. 4, p. 311-320, 1988.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles –On the structural models of bovine casein micelles: review and possible improvements. *Royal Society of Chemistry*, v. 7, p. 2265-2272, 2011.

DE VRIES, J. Interaction of carrageenan with other ingredients in dairy dessert gels. *Gums and stabilizers for the food industry*, v. 11, p.200-210, 2002.

DEKRUIF, C. G.; TUINIER, R. An attempt to provide an intermicellar potential based on a simple summation of contributions, but neglecting the effects of changes in micellar internal structure. Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemistry Physics*, v. 117, p.1290-1295, 2002.

DONATO, L.; ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D. G. Acid gelation in heated and unheated milks: interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 4160-4168, 2007.

DOUGHERTY, G. M.; ROSE, K. A.; TOK, J. B.-H.; PANNU, S. S.; CHUANG, F. Y. S.; SHA, M. Y.; CHAKAROVA, G.; PENN, S. G. The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. *Electrophoresis*, v. 29, p. 1131-1139, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA.(Org.) FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. *Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos*. Fortaleza: Embrapa, 2008. 22p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 117).

ENDO, O.; OTSUBO, H.; TODA, N.; SUHARA, M.; OZAKI, H.; MAZKI, Y. Phase Transition of a single sheet of sashlike polydiacetylene atomic sash on a solid surface. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, p. 9894-9895, 2004.

FAMELART, M. -H.; TOMAZEWSKI, J.; PIOT, M.; PEZENNEC, S. Comparison of rheological properties of acid gels made from heated casein with b-lactoglobulin or egg ovalbumin. *International Dairy Journal*, v.13, p.123-134, 2003.

FOLLOWS D.; HOLT, C.; NYLANDER, T.; THOMAS, R.; TIBERG, F. β -Casein Adsorption at the Silicon Oxide-Aqueous Solution Interface: Calcium Ion Effects. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 319-325, 2004.

FOX, P. F. Milk proteins: general and historical aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Ed.) *Advance Dairy Chemistry*; Vol. 1; *Proteins*, 3rded. New York: Kluwer Academic-Plenum Publishers, 2003. p. 427 e 435.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, Canada, v. 18, p. 677-684, 2008.

GASPAR, C. H. *Preparação caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores*. 2010. 39 f.

Dissertação(Mestrado em Engenharia Microelectrónica e Nanotecnologias) – Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

GENNADIOS, A. *Protein-based films and coatings*. Flórida: CRC Press, 2002. 650 p.

GILLILAND, G.; WIBORNE, E. L.; NACHMAN, J.; WLODAWER, A. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 8, p. 82-101, 1990.

GOFF, H. D.; MARTIN, A. H.; SMITH, A.; DALGLIESH, D. G. Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, v, 20, p. 817 e 824, 2006.

GUYOMARC'H. F.; LAW, A. J. R.; DALGLEISH, D. G. Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 4652-4660, 2003.

GUYOMARC'H, F.; AMIOT, S.; DALGLEISH, D. G. Formation of whey protein/ κ -casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with κ -casein in the casein micelles. *International Dairy Journal*, v.17, p. 1161-1167, 2007.

HADJSADOK, A.; PITKOWSKI, A.; BENYAHIA, L.; NICOLAI, T.; MOULAI-MOSTEFA, N. Characterization of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 34-41.

HAGE JR., E. *Apostila do curso de blendas poliméricas*. São Carlos: PPGCEM-UFSCAR, 2001.

HEMAR, Y.; HALL, C. E.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, v.12, p.371-381, 2002.

HOLDGATE, G. A. Making cool drugs hot: The use of isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotchniques*, v.31, p.164-184, 2001.

HOLT, C.; DEKRUIF, C. G. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. (Ed.). *Advanced dairy chemistry*. 3rd ed. *Proteins*, v. 1, p. 213-276, 2003.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal*, v. 33, p. 421-434, 2004.

HORNE, D. S. Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, v.8, p. 171-177, 1998.

- HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 12, p. 255-263, 2003.
- HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 16, p.148-153, 2006.
- HUNTER, R. J. *Zeta potential in colloid science: Principles and applications*. London: Academic Press, 1981.
- HUNTER, J.R.; KILPATRICK, P.K.; CARBONELL, R.G.; Lysozyme adsorption at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 137, p. 462-482, 1990.
- IBRAHEEM, A.; CAMPBELL, R. E. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 14, p. 3036, 2010.
- JEAN, K.; RENAN, M.; FAMELART, M. H.; GUYOMARC'H, F. Structure and surface properties of the serum heat-induced protein aggregates isolated from heated skim milk. *International Dairy Journal*, v.16, p. 303-315, 2006.
- JEAN-PIERRE E. G; DEL RIO, J.M. Isothermal titration calorimetry: A thermodynamic interpretation of measurements. *J. Chem. Thermodynamics*, v.55, p. 193-202, 2012.
- JI, S.; CORREDIG, M.; GOFF, H. D. Aggregation of casein micelles and k-carrageenan in reconstituted skim milk. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p.56-64, 2008.
- JOSE, D. A.; KÖNIG, B. Polydiacetylene vesicles functionalized with N-heterocyclic ligands for metal cation binding. *Org. Biomol. Chem.*, v.8, p. 655-662, 2010.
- JUNG, Y. K.; PARK, H. G.; KIM, J. M. Polydiacetylene (PDA)-based colorimetric detection of biotin-streptavidin interactions. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21 p. 1536-1544, 2006.
- KEOGH, M. K.; LAINE, K. I.; O'CONNOR, J. F. Rheology of sodium caseinate-carrageenan mixtures. *Journal of Texture Studies*, v. 26, p. 635-652, 1996.
- KEW, S. J.; HALL, A. H. Structural effect of polymerization and dehydration on bolaamphiphilic polydiacetylene assemblies. *Journal of Materials Chemistry*, v. 16, p. 2039-2047, 2006.
- KIM, J. M.; LEE, Y. B.; YANG, D. H.; LEE, J. S.; LEE, G. S.; AHN, D. J. Polydiacetylene-based fluorescent sensor chip. *Journal of American Chemical Society*, v. 127, p. 17580-17581, 2005.

KONING, C.; MARTIN, van D.; PAGNOLLE, C.; JEROME, R. Strategies for compatibilization of polymer blends. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 4, p.707-757, 1998.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; DE KRUIF, C. G. Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 211-218, 1999.

LAGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; DE KRUIF, C.G. Effects of carrageenan type on the behaviour of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 273-280, 2000.

LAKOWICZ, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 3rd ed., v.2, 1999. p. 23-31.

LEE, D. C.; SAHOO, S. K.; CHOLLI, A. L.; SANDMAN, D. J. Structural aspects of the thermochromic transition in urethane-substituted polydiacetylenes. *Macromolecules*, v. 35, p. 4347-4355, 2002.

LEE, S. H.; YUAN, Z.; LEE, C. W. Reversible thermochromism in hydrogen-bonded polymers containing polydiacetylenes. *Angewandte Chemie*, v. 116, p. 4293-4296, 2004.

KIM, J. M.; LEE, Y.B.; YANG, D.H.; LEE, J, S.; LEE, G, S.; AHN, J. D.A Polydiacetylene-Based Fluorescent Sensor Chip. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, p. 17580–17581, 2005.

LEONIL, J.; HENRY, G.; JOUANNEAU, D.; DELAGE, M. M.; FORGE, V. F.; PUTAUX, J. L. Kinetics of fibril formation of bovine κ -casein indicate a conformational rearrangement as a critical step in the process. *Journal of Molecular Biology*, v. 381, n. 5, p.1267-1280, Sept. 2008.

LOH, W. Block copolymer micelles. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, v. 13, p. 802-813, 2002.

LOPES, J. R.; LOH, W. Selective decoration of a phase-separated diblock copolymer with thiol-passivated gold nanocrystals. *Langmuir*, v.14, p. 750-756, 1998.

LU, Y.; YANG, Y.; SELLINGER, A.; LU, M.; HUANG, J.; FAN, H.; HADDAD, R.; LOPEZ, G.; BURNS, A. R.; SASAKI, D. Y.; SHELNUTT, J.; BRINKER, C. J. Self-assembly of mesoscopically ordered chromatic polydiacetylene/silica nanocomposites. *Nature*, v. 410, p. 913-917, 2000

LYNCH, M. G.; MULVIHILL, D. M. Rheology of i-carrageenan gels containing caseins. *Food Hydrocolloids*, v. 10, p. 151-157, 1996.

LYNCH, M. G.; MULVIHILL, D. M. The influence of caseins on the rheology of κ -carrageenan gels. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. (Ed.). *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, v.7, p. 323-332, 1994a.

LYNCH, M. G.; MULVIHILL, D. M. The influence of caseins on the rheology of κ -carrageenan gels. *Food Hydrocolloids*, v.8, p. 317-329, 1994b.

MA, Z.; LI, J.; LIU, M.; CAO, J.; ZOU, Z.; TU, J.; JIANG, L. Colorimetric detection of *Escherichia coli* by polydiacetylene vesicles functionalized with glycolipid. *Journal of American Chemical Society*, v. 120, p. 12678-12679, 1998.

MALLAT, E.; BARCELO, D.; BARZEN, C.; GAUGLITZ, G.; ABUKNESHA, R. Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 20, p. 124-132, 2001.

MARTIN, P.; FERRANTI, P.; LEROUX, C.; ADDEO, F. Non-bovine caseins: quantitative variability and molecular diversity. *Proteins*, v. 1, p. 277-317, 2003.

MATA, J. P.; MAJHI, P. R.; GUOC, C.; LIUC, H. Z.; BAHADUR, P. Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer pluronic L64 in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 292, p. 548, 2005.

McHUGH T. H.; KROCHTA, J. M. Milk protein-based edible films and coatings. *Food Technology*, v. 48, p. 97-103, 1994.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences*, v. 20, p. 1113-1126, ago. 2004.

MELO, S. J.; RAMOS, M. L.; VALENTE, A. J. M.; BURROWS, H. D.; LOBO, V. M. M.; PINA, J.; TAPIA, N. J.; PRADHAM, S.; SCHERF, U. Fluorescence Enhancement of the water-soluble poly(1,4-phenylene-(9,9-bis-(4-phenoxybutylsulfonate)fluorene-2,7-diyl)copolymer in *n*-dodecylpentaoxyethylene glycol ether micelles. *Macromolecules*, v. 37, 2004.

MICHALSKI, M. -C.; MICHEL, F.; SAINMONT, D.; BRIARD, V. Apparent ζ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.23, p.23-30, 2002.

MOHANTY, A. K.; MULHOPADHYAY, U. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application en cheese manufacture. *Biotechnol. Adv.* v. 17. 1999.

MORRISON, I. D.; ROSS, S. *Colloidal dispersions: suspensions, emulsions and foams*. New York: Wiley-InterScience, 2002.

NAGY, J. O.; ZHANG, Y.; LIU, E. Y. X.; MOTARI, E.; SONG, J. C.; LEJEUNE, J. T.; WANG, P. G. Glycopolymers as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, p. 700-703, 2008.

NENO, E. Y. *Estudos de física*. São Paulo: Ed. Moderna, 1982.

NICOLA, J. H.; HERNANDEZ, J. W. R.; NICOLA, E. M. D.; REIS, E. R.; MESQUITA, R. Follow up of native fluorescence induced by glucose diet in Wistar rats. In: *Anais do WALT – Photomedicine and Laser Surgery*, v.4, p. 4-35, 2007.

NISTOR, C.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, v. 387, p.309-326, 1999.

NONO, M.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Gel formation of mixtures of k-carrageenan and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v.25, p. 750-757, 2011.

OAKENFULL, D.; MIYOSHI, E.; NISHINARI, K.; SCOTT, A. Rheological and thermal properties of milk gels formed with k-carrageenan. Sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 525-533, 1999.

OKADA, S.; PENG, S.; SPEVAK, W.; CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. *Acc. Chemistry Research*, v. 31, p. 229-239, 1998.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. *Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida*. Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2007.

ORTEGA, P. F. R. *Novas nanoestruturas de polidiacetileno: Fundamentos e aplicações*. 2013. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

OSTOA-SALOMA, P.; RAMIREZ, J.; PEREZ-MONTFORT, R. Causes of the decrease in fluorescence due to proteolysis of α -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1041, p. 146-152, 1990.

OSTOA-SALOMA, P.; RAMIREZ, J.; PEREZ-MONTFORT, R. Causes of the decrease in fluorescence due to proteolysis of α -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 32, p. 1460-1466, 2007.

PAN, J.; CHARYCH, D. Molecular recognition and colorimetric detection of cholera toxin by poly(diacetylene) liposomes incorporating GM1 ganglioside. *Langmuir*, v. 13, p. 1365-1367, 1997.

PASQUALI, R. C.; CHIAPPETTA, D. A.; BREGNI, C. Los copolímeros en bloques anfífilos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 8, p. 610, 2005.

PATEL, H. A.; SINGH, H.; ANEMA, S. G.; CREAMER, L. K. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 3409-3420, 2006.

PAUL, D. R.; BARLOW, J.; KESKKULA, H. Polymer blends. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, v. 12, p. 339-461, 1988.

PERINO, A.; KLYMCHENKO, A.; MORERE, A.; CONTAL, E.; RAMEAU, A.; GUENET, J.; MÉLY, Y.; WAGNER, A. Structure and behavior of polydiacetylene-based micelles. *Macromol. Chem. Phys.*, v. 212, p. 111-117, 2011.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: A concise review. *Journal Science Technol.*, v. 27, p. 201-212, 2005.

PHILIPPE, M.; LE GRAE, T. Y.; GAUCHERON, F. The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. *Food Chemistry*, v. 90, p. 673-683, 2005.

PICULELL, L. Gelling carrageenans. *Food Polysaccharides and Their Applications*, v. 19, p. 239-287, 2006.

PIRES, A. C. S. *Avaliação da transição colorimétrica de nanoestruturas de polidiacetileno provocada por diferentes moléculas*. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; MAGESTE, A. B.; SOARES, R. F.; TEIXEIRA, A. V. N. C.; ANDRADE, N. J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 13365-13371, 2010a.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, L. H. M.; ANDRADE, N. J.; SILVEIRA, M. F. A.; CARVALHO, A. F. Polydiacetylene as a biosensor: Fundamentals and applications in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 172-181, 2010.

POTISATITYUENYONG, A.; ROJANATHANES, R.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions of polydiacetylene vesicles. *Langmuir*, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e intermediários químicos: subsídios para elaboração de políticas de biotecnologia industrial no Brasil. *Química Nova*, v. 30, p. 7-13, 2007.

PUVANENTHIRAN, A.; GODDARD, S. J.; MCKINNON, I. R.; AUGUSTIN, M. Milk-based gels made with kappa-carrageenan. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 137e141, 2003.

RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, v.2, p. 89-117, 2000.

RASOOLY, A. Biosensor technologies. *Methods*, v. 37, p. 1-3, 2005.

RINGSDORF, H.; SCHLARF, B.; VENZMER, J. Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: models for the study of organization, surface recognition, and dynamics of biomembranes. *Angewandte Chemie International*, v. 27, p. 113-158, 1988.

ROCHA, J. C. B. *Estudo da formação de micelas reversas do copolímero tribloco (Eo)I3(Po)30(Eo)I3 em P-xileno: Efeito da adição de solução salina*. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, v. 19, p. 1675-1687, 1980.

ROYER, C. A. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.*, v. 68, p. 1191-1196, 1995.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*, v.13, p. 113, 2005.

SCHMIDT, D. G.; POLL, J. K. Electrokinetic measurements on unheated and heated casein micelle systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 40, p. 269-280, 1986.

SCHORSCH, C.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. Phase behavior of pure micellar casein/k-carrageenan systems in milk salt ultrafiltrate. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 347-358, 2000.

SCINDIA, Y.; SILBERT, L.; VOLINSKY, R.; KOLUSHEVA, S.; JELINEK, R. Colorimetric detection and fingerprinting of bacteria by glass-supported lipid/polydiacetylene films. *Langmuir*, v. 23, p. 4682-4687, 2007.

SEJERSEN, M. T.; SALOMONSEN, T.; IPSEN, R.; CLARK, R.; ROLIN, C.; ENGELSEN, S. B. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. *International Dairy Journal*, v.17, p. 302-307, 2007.

SEKI, K.; YOKOYAMA, T.; EDAMATSU, M. K.; OHTA, T. X-ray absorption spectra of poly-*p*-phenylenes and polyacenes: localization of π orbitals. *IopScience*, 1989.

SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; MAHON, D. J. Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1373-70, 1992.

SNOREN, TH. H. M.; PAYENS, T. A. J.; JEUNINK, J.; BOTH, P. Electrostatic interaction between K-carrageenan and K-casein. *Milch Wissenschaft*, v. 30, p. 393-396, 1975.

SNOREN, T. H.; H. M.; PAYENS, T. A. J.; JEUNINK, J.; BOTH, P. Electrostatic interaction between K-carrageenan and K-casein. *Milchwissenschaft. Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 30, p. 994-998, 1979.

SONG, J.; CHENG, Q.; KOPTA, S.; STEVENS, R. C. Modulating artificial membrane morphology: pH-induced chromatic transition and nanostructural transformation of a bolaamphiphilic conjugated polymer from blue helical ribbons to red nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, p. 3205-3213, 2001.

SOUZA, M. C.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; SILVA, F. R. S.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, v. 19, p. 153-160, 2006.

SPAGNUOLO, P. A.; DALGLEISH, D. G.; GOFF, H. D.; MORRIS, E. R. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 371-377, 2005.

SU, Y. L. Assembly of polydiacetylene vesicles on solid substrates. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 292, p. 271-276, 2003.

SU, Y. L.; LI, J. R.; JIANG, L. Effect of amphiphilic molecules upon chromatic transitions of polydiacetylene vesicles in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 39, p. 113-118, 2004.

SU, Y. L.; LI, J. R.; JIANG, L. Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli*. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 284, p. 114-119, 2005.

SU, Y. L. Preparation of polydiacetylene/silica nanocomposite for use a chemosensor. *Reactive & Functional Polymers*, v. 66, p. 967-963, 2006.

TAMAYO, J.; ALVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Digital tuning of the quality factor of micromechanical resonant biological detectors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 89, p. 33-39, 2003.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, Oxford, v. 16, n. 1, p. 121-131, 2001.

TRCKOVA, J.; STETINA, J.; KANSKY, J. Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. *International Dairy Journal*, v. 14, p. 337-343, 2004.

- VAN VLIET, T.; LAKEMON, C. M. M.; VISSCHER, R. W. Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 9, p. 298-304, 2004.
- VASBINDER, J. A.; DEKRUIF, C. G. Casein–whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 669-677, 2003.
- VEGA, C.; GOFF, H. D. Phase separation in soft-serve ice cream mixes: rheology and microstructure. *International Dairy Journal*, v.59, p. 284-287, 2004.
- VELASCO-GARCÍA M. Y.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. *Biosystems Engineering*, v. 84, p.1-12, 2003.
- VILLANUEVA, R. D.; MONTAÑO, M. N. Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (Sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, v. 39, p. 513, 2003.
- WADE, T.; BEATTIE, J. K. Electroacoustic determination of size and zeta potential of fat globules in milk and cream emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 10, p. 73-85, 1997.
- WADSÖ, R. G. Standards in isothermal microcalorimetry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, v. 73, p. 1625-1639, 2001.
- WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy*, v. 9, p. 189-192, 1999.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R.; BADINGS, H. T. Dairy chemistry & physics. *Dairy Chemistry & Physics*, v. 18, p. 467, 1984.
- WANG, C.; MA, Z. Colorimetric detection of oligonucleotides using a polydiacetylene vesicle sensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, p. 1708-1710, 2005.
- WANG, G. *et al.* A living cell quartz crystal microbalance biosensor for continuous monitoring of cytotoxic responses of macrophages to single-walled carbon nanotubes. *Particle and Fibre Toxicology*, v.8, n.4, 2011.
- WEGNER, G. Z. *Naturforsch*, v.24, p. 824, 1969.
- YARIGAMA, O.; JAWORSKI, J.; YOON, B.; KIM, J. *Chem. Commun.*, v. 48, 2469-2485, 2012.
- YAZDI, S. R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. Department of Food Science, University of Guelph. *Food Chemistry*, v.132, p. 1143-1149, 2011.

ZHOU, Z.; CHU, B.J. Anomalous micellization behavior and composition heterogeneity of a triblock ABA copolymer of (A) ethylene oxide and (B) propylene oxide in aqueous solution. *Colloid Interface Sci.*, v. 126, p. 171, 1988.

Interaction between micellar casein and nanoblends of polydiacetylene and triblock copolymer

Abstract: Nanoblends of polydiacetylene (PDA) and triblock (TC) copolymer were synthesized in order to detect micelle casein (MC). The UV-vis electronic spectrum shows that the MC was able to induce blue-to-red transition in nanoblends, however the maximum colorimetric response (CR) achieved 90%. MC diameter (from 50 to 140 nm) and zeta potential (from -28 to -20 mV) enhanced with the addition of MC showing that nanoblend-MC interaction occurred mainly at the surface of both structures. When nanoblend and MC were separated by dialysis membrane the CR was almost the same, while the MC was dialyzed before addition to nanoblend suspension there was a strongly reduction in CR. These results point to that small molecules present into MC, such calcium phosphate, were responsible to change PDA color. Microcalorimetric analysis found the enthalpy variation of interaction ($\Delta_{\text{int}}H$) between nanoblends and MC. It was verified an abrupt increase in $\Delta_{\text{int}}H$ ($= +160 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), which coincided with MC concentration where colorimetric transition was detected. The effect of the hydrophobic/hydrophilic balance of TC (L64 and F68) in colorimetric response were also evaluated, showing that the kind of TC affect the colorimetric response of both nanoblends. The presence of molecules that interact with MC, such as k-carrageenan (k-CAR), also influenced colorimetric transition of nanoblends. We observed a reduction in the colorimetric response of around 20% compared to pure PDA/L64 nanoblends. It was concluded that MC salts interacted with nanoblends and cause color change. In addition many factors can affect sensors' response such as MC concentration, salt release from MC, hydrophobic/hydrophilic balance of TC that forming nanoblend and the presence of other molecules in the sensor system. These results can contribute to future application of PDATC nanoblend sensors to dairy models.

1 Introduction

Microbial growth in milk and dairy products leads to shelf-life reduction and increases the risk of foodborne diseases (Cavallo et al., 2014). In addition, milk is also susceptible to contamination by chemicals such as Aflatoxin M₁ (Duarte et al., 2013; Bilandzic et al., 2014), pesticides (Deti et al., 2014), heavy metals (Rahimi, 2013), antibiotics (Trevisi et al., 2014), and other compounds (Tato et al., 2011; Fierens et al., 2012).

Milk and dairy products are widely consumed as part of the human diet, particularly by children, and because of the risk of microbiological contamination, it is possible that toxic elements are present in the final products (Suturovic et al., 2014). Over the last decades, the dairy industry has been trying to improve milk and dairy safety by implementing new control technologies. Until now, several techniques such as chromatography, spectroscopy, electrophoresis, polymerase chain reaction (PCR), among others, have been successfully used to determine milk and dairy quality. Despite the accuracy and robustness of these techniques, some of them require expensive instruments and/or are time consuming (Villar et al., 2012; Sadeghi and Motaharian, 2013).

Nowadays, there is special interest in developing simple, low-cost, rapid, reliable, non-invasive and non-destructive devices that are able to evaluate real-time milk and dairy quality (Pires et al., 2010a; Kuswandi et al., 2012; Cavallo et al., 2014). Thus, different kinds of sensors for milk and dairy products have been studied (Magan et al., 2001; Haugen et al., 2006; Villar et al., 2012; Beltrán et al., 2014). Polydiacetylene (PDA) shows large potential to be used as colorimetric sensor devices due to facile processibility and easily detectable color transition (Bhushan et al., 2014). PDA molecules feature alternated double and triple bonds along their backbones, and optical absorption occurs by $\pi - \pi^*$ transitions. Generally, unperturbed PDA nanoaggregates exhibit a deep blue color (absorbance at ~640 nm), and a dramatic color transition to red (absorbance at ~540 nm) occurs as a result of various environmental stimuli, such as light, heat, solvents and different biological molecules (Li et al., 2012).

Diacetylene monomers can self-assemble into different aggregates, such as micelles, vesicles, nanotubes, lamellar structures, films and nanocomposites (Su, 2006; Delbecq and Kawai, 2013). The various types of structure in solutions, and their stability, depend mainly on the PDA-PDA local interactions, as well as on interactions between PDA and different molecules (Pattanatornchai et al., 2013).

PDA vesicles have been intensively used to detect different target molecules; however, vesicles show some limitations due to low stability to aggregation and polymerization (Lee; Seo and Kim, 2012); besides, for some conditions and molecules, colorimetric transitions are limited, hindering visual detection of color change. To overcome these disadvantages, new PDA nanostructures can be designed. Previous studies carried out by our group have shown that nanoblends formed by PDA and

triblock copolymers (TC) can be more stable and sensitive to color transition than PDA vesicles (Castrillon, 2013; Ortega, 2012).

The biggest difficult to use PDA as sensors to milk and dairy products is due to the complexity of the matrices. Endogenous molecules, such as proteins, can interact with PDA leading to false positive results. Hence, investigation on the interactions between PDA and milk biomolecules is essential to develop efficient PDA sensors.

Casein (CN) is the main protein of cow milk, accounting for approximately 80% of all milk proteins, and has an important nutritional and technological role in milk and dairy products. CN is formed by different fractions (α_{s1} , α_{s2} , β and κ -CN) and salts (calcium phosphate, mainly) that are self-assembled as nanoaggregates known as casein micelles, whose diameters vary between 50 and 300 nm (Choi et al., 2011). It is known that CN micelles interact with different macromolecules, such as chitosan (Ausar et al., 2001), pectin (Cucheval et al., 2009), carrageen (Wang et al., 2014), and triblock copolymers (Kessler et al., 2014), among others.

In this context, we propose to investigate the interactions between micellar casein (MC) and nanoblends of PDA and TC, in the presence or absence of receptor molecules such as k-carrageenan. The determination of interaction parameters is important to establish the base to develop an efficient nanosensor to be used in food products that contain casein. To achieve this, the colorimetric response of nanoblends was evaluated in the presence of different concentrations of MC. The zeta potential, the size of the clusters and the energy associated with the interaction of MC with PDA were also determined by microcalorimetric and fluorescence measurements.

2 Materials and methods

2.1. Materials

Micellar casein (70 % w/w of purity) was obtained by ultrafiltration, and was kindly provided by the Reference Center of Membrane Technique Applied to Dairy Industry (Brazil). All reagents were of analytical grade and were used as received without further purification. 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA, 97% w/w) was purchased from Fluka (USA). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide), L64 and F68, were used as triblock copolymers, with an average molar mass (M_m) of 2900 and 8400 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. These copolymers have the following nominal compositions: L64 = $(\text{EO})_{13}(\text{PO})_{30}(\text{EO})_{13}$, and F68 =

(EO)₈₀(PO)₃₀(EO)₈₀. Both copolymers were acquired from Aldrich (USA). k-Carrageenan was purchased from Sigma (USA) and sodium azide was used to avoid casein spoilage and was provided by Vetec (Brazil). Millipore water (USA) was used in all experiments ($R \geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

2.2 Nanoblend production

Nanoblends of PDA and L64 or F68 were prepared by dissolving TC in water, at concentrations of 0.1; 1.0 and 2.0 % (w/w). PCDA (1 mM) was dissolved in the copolymer solution. The resulting solution was solubilized using an ultrasound Sonics Vibra/cell with amplitude of 70% for 10 minutes until obtaining a clear solution, which was then filtered out through a 0.45- μm PVDF filter (Millipore). The system was kept at 4 °C overnight to orientate PCDA monomers and promote the polymerization reaction. Photopolymerization was carried out by exposure to UV radiation (254 nm) for 10 min, generating blue PCDA/TC nanoblends.

To evaluate the effect of different receptor molecules, nanoblends containing k-carrageenan (0,3%) were also prepared. The receptors were added at the initial stage in the copolymer solution before addition of PCDA.

2.3 Colorimetric Response (CR)

To investigate the interaction between micellar casein (MC) and PDA/TC nanoblends, MC and their fractions (α_{s1} , β , κ -casein and GMP) suspensions (0.5 % w/w) were added to the nanoblends suspensions so as to obtain mixtures with different concentrations until $2.76 \times 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The mixtures were stirred for 30 s, and maintained at 25 °C for 12 h to achieve color change equilibrium. After this time the mixture is centrifuged (5000 rpm) to reduce the turbidity of the medium. The spectra were obtained between 350 and 900 nm (Shimadzu UV-2550) at 25 °C. To quantify the extension of blue-to-red transition, the CR (%) was calculated with Equation 1. CR is a semi-quantitative parameter that represents the percentage of PDA molecules that undergo blue-to-red transitions (Charych et al., 1993).

$$\text{CR}(\%) = \left[\frac{\left(\left(\frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b - \left(\frac{A_{540}}{A_{650} + A_{540}} \right)_a \right)}{\left(\frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}} \right)_b} \right] \times 100 \quad (1)$$

where A is the absorbance of blue ($\lambda \sim 650$ nm) and red components ($\lambda \sim 540$ nm) obtained by UV-vis spectroscopy. The terms “blue” and “red” are related to material appearance, and the indices “b” and “a” represent the absorbances before and after micellar casein exposure, respectively.

To verify the contributions of casein micelle, casein fractions and salts found in the micelle to the colorimetric transition of nanoblends, the CR experiment was repeated using a dialysis system. In a first experiment, 3 mL of PDA/L64 nanoblends were added to a dialysis bag which was allowed to interact with 38 mL of MC suspension at the same previously used concentrations. The systems were maintained at 25 °C for 12 h, after which the nanoblends were collected from the dialysis bag and the CR was determined. In a second experiment, the CR was determined using dialyzed micellar casein, which was maintained at 25 °C and was washed daily for one week. This step was necessary to ensure that casein micelle and fractions were kept inside the dialysis membrane. For both dialysis experiments we used dialysis bags with a molecular weight cut-off of 3.5 kDa.

2.4 Light scattering and electrokinetic measurements

The size and zeta potential of nanostructures were measured with a Zetasizer nano ZS90 (Malvern), at 25 °C. The parameters were determined for micellar casein suspension before and after dialysis experiments, and for PDA/L64 nanoblends added at different concentrations of micellar casein. The mixtures were stirred for 30 s, and maintained at 25 °C for 12 h to achieve color change equilibrium. . Each experiment was repeated 3 times and each result was the average of 10 measurements.

2.5 Microcalorimetric experiments

The energetic analyses were performed on an isothermal titration microcalorimeter (IT μ C) model CSC 4200 (Calorimeter Science Corporation), controlled by ITCRun software. The microreaction system was analyzed on a titration mode with a 1.8-mL stainless steel vessel (sample and reference), containing PDA/TC nanoblends, which were maintained under constant stirring at 300 rpm. When thermal equilibrium between the vessel and the heat sink was reached, 10- μ L aliquots of the micellar casein solution were titrated with a Hamilton microliter syringe at 3600-s

intervals. All calorimetric measurements were performed in triplicate, and the calculated relative standard deviation in the interaction enthalpy was on the order of 0.5%.

2.6 Fluorescence experiments

Fluorescence spectra were recorded on a CaryEclipse Fluorescence Spectrometer (Agilent), using a 1-cm path length quartz cuvette. Aliquots of nanoblends were added to the micellar casein solution, and the fluorescence emission spectra were recorded between 310 and 500 nm at the excitation wavelength of 295 nm, which is specific for the excitation of tryptophan residues.

3 Results And discussion

To apply PDA/L64 nanoblends as nanosensors in dairy products, it is essential to understand the interactions between these nanoblends and casein micelles, which are the main protein components in milk. Figure 1 shows the electronic spectra of PDA/L64 nanoblends in the blue and red forms.

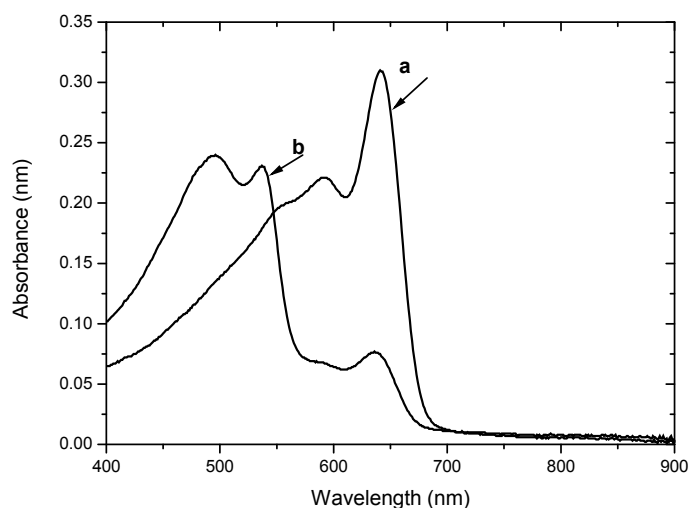


Figure 1 – UV-vis spectra of PDA/L64 nanoblends: (a) in the absence (blue form) and (b) in the presence (red form) of micellar casein.

It is possible to observe that nanoblends, in the absence of micellar casein, presented an intense blue color with maximum absorption at 640 nm and a vibronic shoulder at 590 nm. The main information that this spectrum gives is that the presence

of L64 triblock copolymers did not avoid the polymerization step of diacetylenic monomers. In addition, when compared with UV-vis absorption data obtained in the literature for PDA vesicles at the same concentrations (Pires et al., 2010b; Anekthirakun et al., 2013), it was observed that the yield of polymerization of diacetylenic monomers was higher within the nanoblend templates than within the vesicle aggregates. Possibly this higher efficiency in the process of polymerization of the PCDA monomers when mixed with the copolymer L64 is caused by better packing and orientation of the PCDA monomers because increasing hydrophobic regions in the system allows more favorable PCDA monomers interactions (CASTRILLON, 2013).

On the other hand, in the presence of casein ($2.76 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$), changes were verified on electronic and vibronic bands, from 650 and 590 nm to 540 and 490 nm, respectively. The PDA/L64 colorimetric transition induced by micellar casein demonstrated a specific interaction between both nanostructures. To quantify the extent of nanoblend-casein interactions, one can determine the colorimetric response (CR) of the PDA/L64 nanoblend in the presence of casein. The CR of PDA/L64 1.0% (m/m) nanoblend as a function of the MC concentration, at 25 °C is presented in Figure 2.

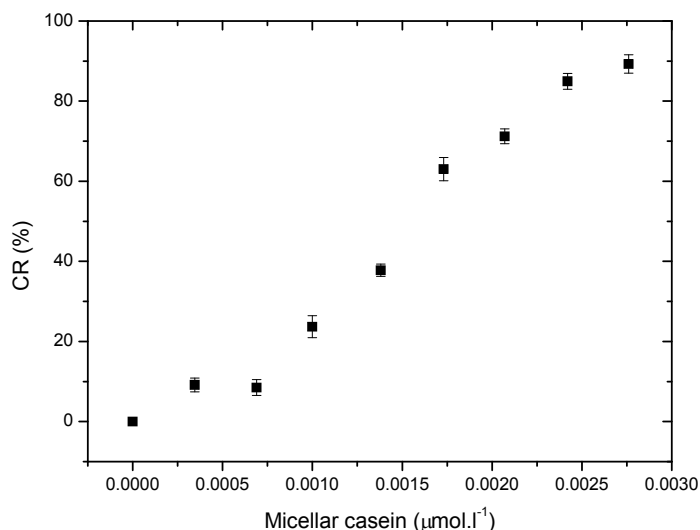


Figure 2 –Colorimetric response (CR, %) of nanoblends formed by PDA (1 mM) and L64 1.0 % (w/w) as a function of micellar casein concentration.

We can see that the increasing concentration of casein micelle led to an almost linear enhance in the CR up to $3.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ of MC, which ensured 90 % of CR. In these thermodynamic conditions, it was not possible to achieve 100 % of CR, since

approximately 10 % of the PDA molecules remained at the blue conformation. This results is probably due to the ion saturation in the binding sites of the PDA.

Aiming to verify the effect of nanoblends composition on the colorimetric transition, the L64 concentration was changed from 1.0 % to 0.1 and 2.0 % (w/w). Figure 3 illustrates the CR curves for nanoblends containing different concentrations of L64.

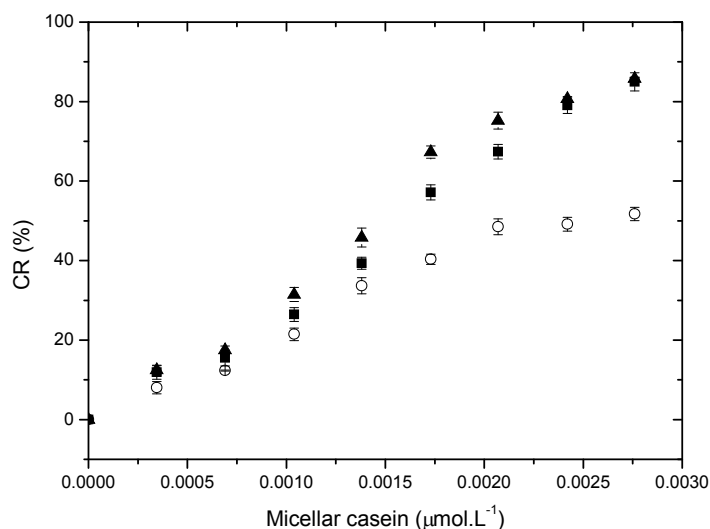


Figure 3 – Colorimetric response (CR, %) of PDA/L64 nanoblends at different L64 concentrations (w/w): (○) 0.1 %, (■) 1.0 % and (▲) 2.0 %, as a function of micellar casein concentration.

For low concentration of L64 (0.1 %) the colorimetric transition of nanoblends was reduced. For nanoblends containing 1.0 and 2.0 % the same amount of MC resulted in CR up to 2.2 times higher than that obtained with 0.1 % of L64. The critical micelle concentration (c.m.c.) of L64 in water at 25 °C is around 0.35 % (w/w) (Causse et al. 2010). This indicates that self-assembly of triblock copolymers as micelles contributed to induce colorimetric transition. It is possible that polydiacetylene chains are dissolved in the copolymers' hydrophobic regions, and then at 0.1 %, there are only L64 macromolecules dispersed in the solution with few hydrophobic regions. On the other hand, when L64 micelles are formed, it is possible that PDA molecules are dissolved in the micelle hydrophobic core, where they are more packed with higher energy content due to electrostatic repulsions of identical headgroups. Therefore, lower amounts of target molecules (MC, in this case) are sufficient to disturb polydiacetylenic conformations and change the color from blue to red. However, a higher number of TC

micelles did not seem to influence the CR; therefore, it was decided to continue the experiments with nanoblends formed by PDA and L64 at 1.0 % (w/w).

Light scattering and electrokinetic measurements have shown that nanoblends and MC molecules have average hydrodynamic diameters and zeta potentials equal to 52 nm and - 32,4 mV, and 212 nm and - 21,0 mV, respectively.

In order to determine the effect of nanoblend-MC interactions on the structure and surface of nanoblends, the size and zeta potential were measured for the PDA/L64 nanoblends, and the pH of the systems was monitored during the colorimetric transition. Figure 4 shows the variations in size, zeta potential and pH as a function of MC concentration in the nanoblends.

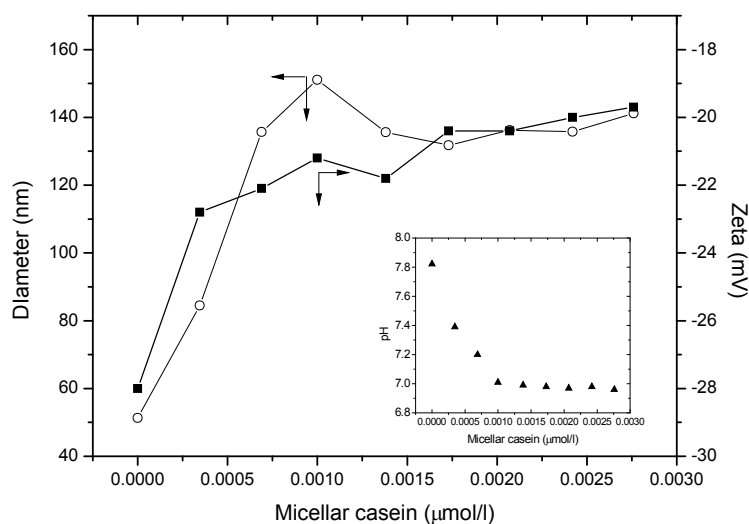


Figure 4 – Variation of diameter (○), zeta potential (■) and pH (▲) of PDA/L64 1.0 % (w/w) nanoblends as a function of micellar casein concentration.

Upon MC addition, the pH of the system decreased, indicating that the nanoblend-MC interaction promoted ionization from acid surface groups present in the nanoblends and MC aggregates. This hydrogen release probably occurred in order to promote hydrogen bonding between the nanoblends and MC molecules. Interestingly, there was no decrease in zeta potential to more negative values during the ionization process, which corroborates the hypothesis of surface neutralization caused by hydrogen bonding formation. In addition, the MC-nanoblend interactions caused an increase in the nanoblend size, which is an evidence of coalescence of PDA/L64 nanoblends. These results point out that nanoblend-MC interactions occurred mainly at the surface of both structures.

Casein micelles do not contain only casein fractions. MC is a very complex nanocomposite formed by α_{s1} -casein, α_{s2} -casein, β -casein, κ -casein and nanoclusters of calcium phosphate. Approximately 6 % of the MC dry basis is composed by salts, comprising which is commonly known as colloidal calcium phosphate (CCP) (Phadungath, 2005). CCP nanoclusters are formed mainly by calcium phosphate, but citrates, Mg and Zn can also be present, and are essential to casein micelle stability (Walstra et al., 2003). Choi et al. (2011) reported that the molecular weight of CCP nanoclusters is around 7 kDa, and their size is close to 3 nm. It is very important to elucidate if one of these components is exclusively or predominantly the main force that drives the colorimetric transition of nanoblends.

To verify if fractions of casein were responsible to change the nanoblend color, the CR of PDA/L64 nanoblends was evaluated after addition of α_{s1} -casein, β -casein, κ -casein or glucomacropeptide (GMP), ensuring that there was no blue-to-red transition. In order to determine the role of calcium phosphate on the colorimetric change of nanoblends, two experiments were carried out using dialysis: first, the nanoblends and the micellar casein were separated using a dialysis membrane, then calcium phosphate depleted-MC was used.

The nanoblend and the MC suspension separated by the membrane showed similar CR behavior to that observed with the direct addition of MC suspension to the PDA/L64 nanoblend system (Figure 5), indicating that only small molecules that are capable of crossing the membrane pores (molecular weight cut-off of 3.5 kDa) promoted blue-to-red transition in the nanosensors.

To produce MC without calcium phosphate, the dialysis of MC dispersion was carried out during 7 days. Curiously, after 5 days of dialysis, the CR was drastically reduced to around 20 %, and after 7 days the calcium phosphate depleted-MC was not able to induce colorimetric transition on the PDA/L64 nanoblends (Figure 6). These results indicate that dissolved calcium phosphate is the main cause of blue-red changes observed in the nanosensor, since neither casein fractions nor CCP nanoclusters were able to cross the dialysis membrane pore.

The effect of dialysis on the MC size and zeta potential was also investigated, and the results are shown in Figure 7.

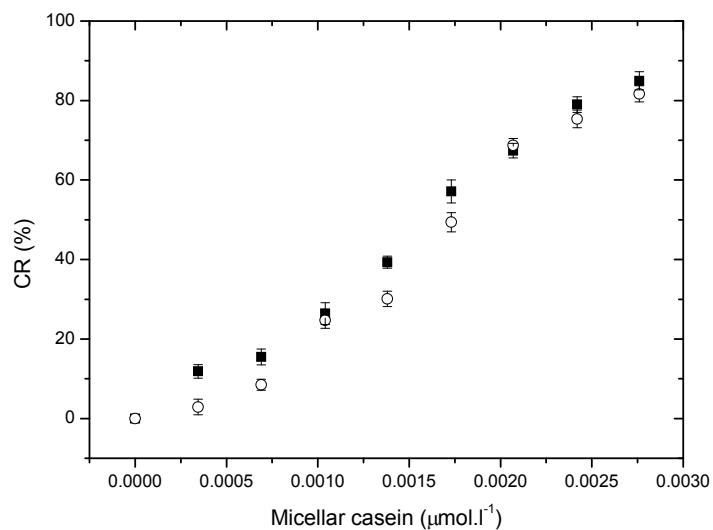


Figure 5 –Colorimetric response (CR, %) of PDA/L64 nanoblends: (■) MC added directly into PDA/L64 nanoblends, and (○) MC separated from PDA/L64 nanoblends by dialysis membrane.

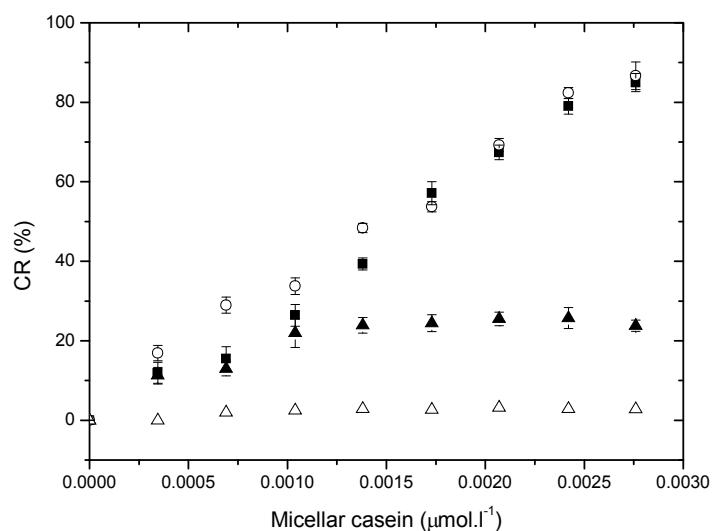


Figure 6 – Colorimetric response (CR, %) of PDA/L64 nanoblends as a function of micellar casein (MC) concentration: (■) MC without dialysis, and after (○) 2 days, (▲) 5 days and (△) 7 days of dialysis.

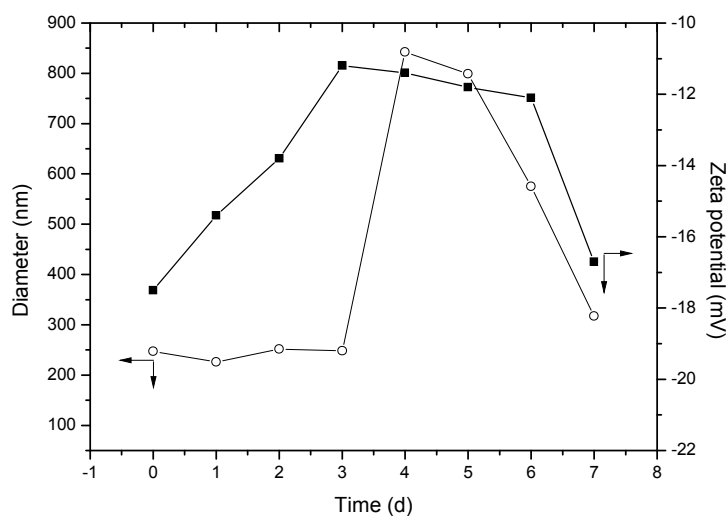


Figure 7 – Variation in the hydrodynamic diameter (○) and zeta potential (■) of micellar casein during 7 days of dialysis, with removal of salts from the micelle core.

It was observed that up to the third day of dialysis, the MC size did not change much, but increased abruptly at the fourth day and decreased linearly from the fifth day of dialysis. The zeta potential increased linearly up to the third day, decreasing slightly until the fifth and then abruptly at the seventh day. We propose the following model to explain the behavior of the size and zeta potential curves. At the beginning of the dialysis process (4 days), calcium phosphate (CP) released from the MC core by diffusion is concentrated on the electrical double layer, which reduces the charge asymmetry and consequently the zeta potential, from -18 to -12 mV. This reduction in zeta potential leads to the aggregation of micelles, which can be justified by the expressive increase in particle size (up to 842.1 nm). By the fifth day of washing out, the CP was almost completely removed from the MC dispersion, and interfacial charges were re-established, causing the collapse of MC aggregates, as verified by the behavior of the zeta potential and size, almost returning to the original values.

If complexes are formed at fundamental states, the fluorescence intensity is quenched, enabling to follow intermolecular interactions by determining the fluorescence dependence on the quencher concentration. The fluorimetric experiments also corroborated the proposal that CP is the cause of blue-to-red transition of nanoblends, since there was no change on the casein fluorescence spectrum due to PDA/L64 nanoblend-casein micelle interactions, indicating that small molecules such as salts and not tryptophan-rich molecules, such as casein fractions, were interacting with the nanoblends.

Microcalorimetric assays were also conducted to elucidate the energy involved in the MC-nanoblend interactions and in the nanoblend colorimetric transitions caused by MC. Since it was verified that blue-to-red transitions of nanoblends were caused by small molecules, such as salts, found within the casein micelle, the molar enthalpy data were calculated based on the amount of calcium phosphate inside the MC nanoclusters. Figure 8 shows the variation of enthalpy interaction ($\Delta_{\text{int}}H$) between PDA/L64 nanoblends and MC and dialyzed MC (D-MC).

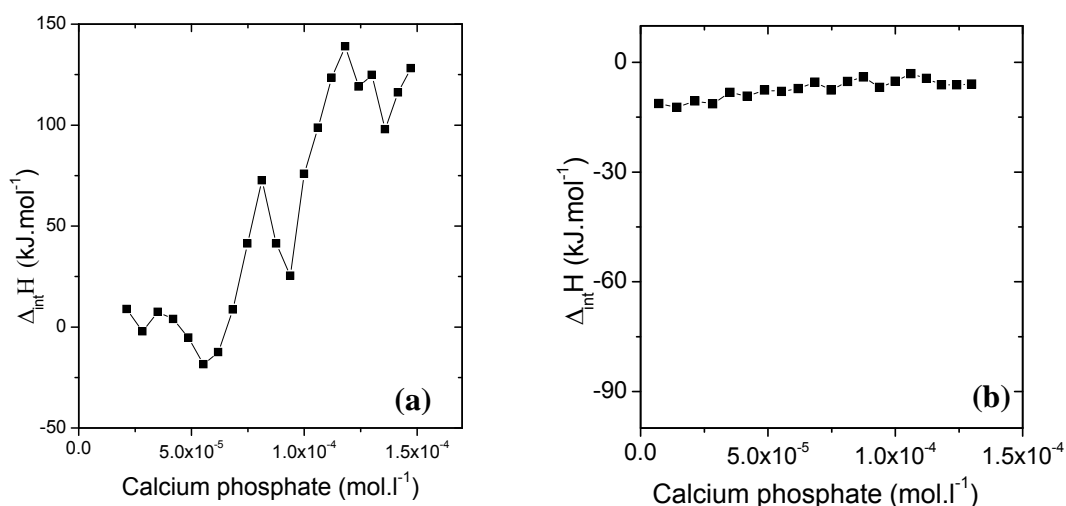


Figure 8 – $\Delta_{\text{int}}H$ between MC/ions and PDA/L64 as a function of micellar casein concentration equivalent as calcium phosphate concentration: (a) MC suspension and (b) dialyzed MC suspension.

It is possible to observe that up to $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ of phosphate, the enthalpy interaction was almost constant at approximately +10 kJ/mol, demonstrating that the initial phosphate-nanoblend interaction was entropically driven. This enthalpy interaction value is due to mainly two processes: the ionization of carboxylic headgroups of the PDA molecules (absorbing energy) and the formation of complexes with calcium phosphate at the nanoblend interface (releasing energy). The endothermic nature of the phosphate-nanoblend interaction is related to the fact that the ionization process consumes more energy than what is released by the complex formation. The entropic gain is related to the increase in the translational entropy of hydrogen and water during the MC-nanoblend interaction. Above this phosphate concentration, the enthalpy interaction increased abruptly from approximately -15 kJ/mol to +150 kJ/mol. For this same interval of phosphate concentration, in which the abrupt variation of $\Delta_{\text{int}}H$ occurred, colorimetric transition was also detected. These results indicated that

colorimetric transition required +160 kJ/mol. Pires et al. (2010b) determined the variation of enthalpy of colorimetric transition in PDA vesicles and found +12 kJ/mol. The higher value observed for the nanoblends could be caused by intermolecular interactions between PDA and triblock copolymer molecules, which increased the potential conformational change barrier.

On the other hand, the D-MC-nanoblend enthalpy interaction was negative (-12 kJ/mol) and almost constant for all phosphate concentration range. This result points out that depleted-phosphate casein interacted with nanoblend releasing energy, thereby not absorbing the energy needed to overcome the conformational barrier for colorimetric transition.

One of the main advantages to use (EO)_n-(PO)_m-(EO)_n triblock copolymers as templates for the nanoblend synthesis is the possibility of building macromolecules with different proportions between hydrophobic PO groups and hydrophilic EO units. In order to evaluate the effect of the hydrophobic/hydrophilic balance of the copolymer molecule in the colorimetric response of nanosensors, the L64 copolymer [(EO)₁₃-(PO)₃₁-(EO)₁₃] was replaced with the F68 copolymer [(EO)₇₆-(PO)₃₀-(EO)₇₆], both of which have almost the same hydrophobic moiety as far as size is concerned. However, the hydrophilic moiety of the F68 copolymer is around 6 times larger than that of L64.

It was verified that MC was able to induce colorimetric transitions in nanoblends formed with PDA and F68 (Figure 9). Small concentrations of MC (up to $2.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$) promoted higher CR into F68 nanoblends compared to that formed with L64. However, above this concentration, the PDA/L64 nanoblends were more sensitive to interaction with MC, achieving a maximum CR value that was around 10 % higher than that of the PDA/F68 nanostructure. As it was observed for PDA/L64 nanoblends, the D-MC was not able to induce blue-to-red transitions in PDA/F68 nanosensors, corroborating the conclusion that calcium phosphate ions are responsible for PDA colorimetric changes.

The higher CR of PDA/F68 nanoblends is due to the larger hydrophilic shell of F68 molecules, which allows better water solvation for all chemical species (ions and EO units) present in this region, enhancing ion transfer from the bulk solution to the nanoblend core-shell interface. This ionic preferential diffusion close to PDA carboxylic groups promoted stronger interactions between ions and PDA molecules, resulting in a more efficient colorimetric transition. However, at higher MC concentrations, sufficient amounts of ions can be found in the nanoblend hydrophilic shells, promoting

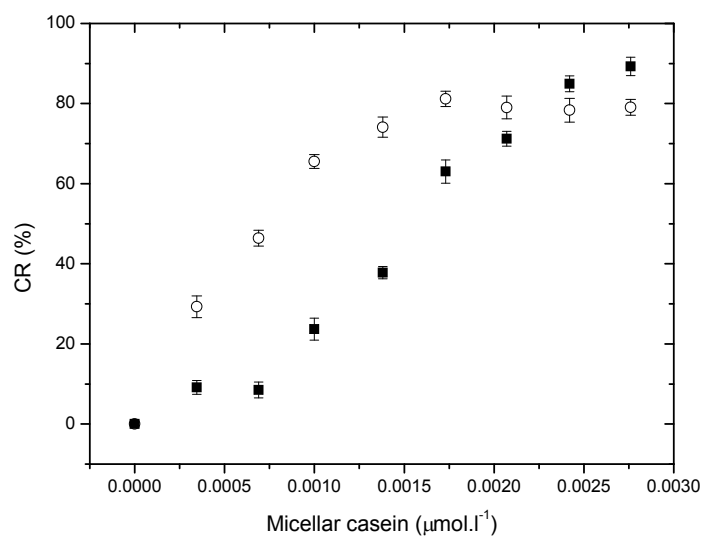


Figure 9 – Colorimetric response (CR, %) of nanoblends as a function of micellar casein concentration (w/w): (■) PDA/L64 nanoblends and (○) PDA/F68 nanoblends.

intermolecular interactions that are capable of converting the maximum amount of PDA molecules from blue to red conformation.

Microcalorimetric experiments were also carried out to evaluate the enthalpic energy involved in the interaction of MC and D-MC and PDA/F68 nanoblends (Figure 10).

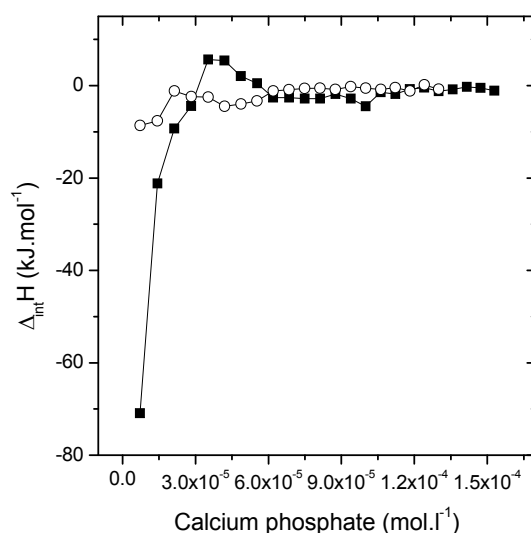


Figure 10 – $\Delta_{\text{int}}H$ between MC/ions and PDA/F68 as a function of micellar casein concentration equivalent as calcium phosphate concentration: (■) MC suspension and (○) dialyzed MC suspension.

One can observe that the interactions between MC/ions and PDA/F68 nanoblends occurred with the release of energy, whilst energy absorption was detected with the MC/ions-PDA/L64 interactions. These results show that interactions between MC/ions with PDA/F68 nanoblends were more thermodynamically favorable than with PDA/L64, since the former interactions have an enthalpic contribution. However the PDA/F68 colorimetric transition process became less exothermic as the MC concentration increased. As observed in the PDA/L64 case, in this case, the values of $\Delta_{\text{int}}H$ result from the contribution of two processes: one endothermic (due to the release of hydrogen ion and water ion solvation) and another exothermic (due to the ion-PDA interaction). Since the solvation layer of the F68 hydrophilic shell is thicker than that of L64, ions interacting with PDA molecules in the F68 nanoblends have their hydration corona more preserved, requiring less energy to interact with the PDA carboxylic groups. This behavior yields an interaction enthalpy that is more negative.

After the first injections of MC there was a large variation in $\Delta_{\text{int}}H$, from -70 kJ/mol to +10 kJ/mol, which can be an effect of the presence of ions on the F68 hydrophilic shell, causing immediate saturation of the carboxylic interaction sites. The calorimetric data obtained for interaction between D-MC and PDA/F68 nanosensors were similar to those determined for D-MC-PDA/L64 nanoblend interactions, indicating the absence of molecular interactions and consequently no colorimetric transition when salt ions were removed from MC by dialysis.

Aiming to evaluate the contribution of food additives that interact with casein micelles, systems containing PDA/L64 nanoblends and k-carrageenan (k-CAR) were prepared. It is well established that casein micelles interact with k-CAR (Wang et al., 2014). Figure 11 shows the CR curves for PDA/L64/k-CAR compared with PDA/L64 nanoblends.

Similar behavior was verified for both curves at low casein concentrations (up to $1.0 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/L}$). However, above this concentration, the CR for the system with k-CAR underwent a reduction of around 20 % compared to pure PDA/L64 nanoblends. These results indicate that k-CAR was not incorporated into the nanoblends. In order to detect if and how adsorption of k-CAR occurs at the nanoblend surface, the pH of the system was measured as a function of MC concentration compared to the same curve of pure PDA/L64 nanoblend (Figure 12).

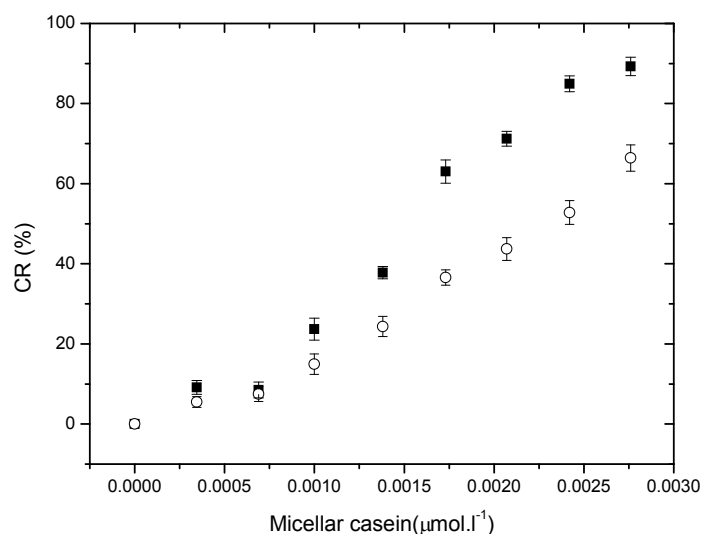


Figure 11 – Colorimetric response (CR, %) of PDA/L64 (1.0 %) nanoblends (■) and PDA/L64/k-CAR (○).

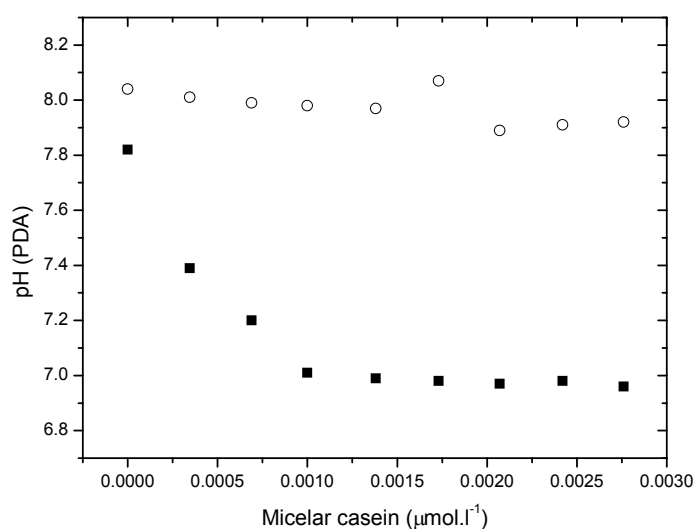


Figure 12 – Variation of the pH of nanoblends as a function of micellar casein concentration: (■) PDA/L64 and (○) PDA/L64/k-CAR systems.

On one hand, for pure nanoblends, the increase in the MC concentration led to a reduction in pH due to ionization of the PDA carboxylic groups. By contrast, for PDA/L64/k-CAR nanoblends there was no change in pH (around 8.0), which is enough to promote colorimetric transition in PDA nanoblends (Ortega, 2012) and vesicles (Charoenthai et al., 2011). This surprising behavior (no PDA color change at pH 8.0) could be explained by the adsorption of k-CAR at the PDA interface by means of hydrogen bonds between PDA carboxylic groups and k-CAR hydroxyl groups. When

MC was added, interactions arose between MC and k-CAR, allowing PDA carboxylic groups to be occupied by salts released from MC.

Microcalorimetric experiments provided the energy parameters of MC/ions interactions with PDA/L64/k-CAR (Figure 13).

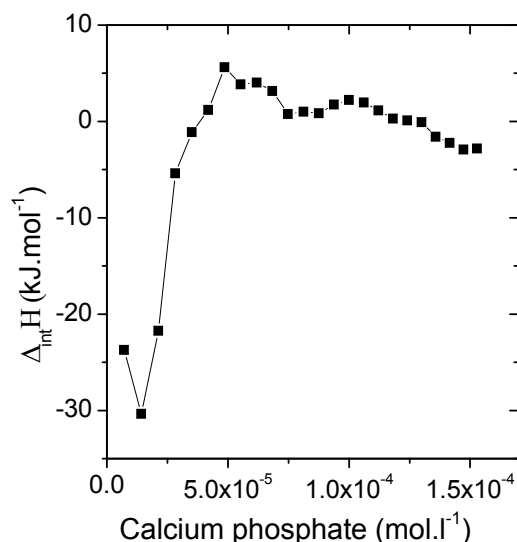


Figure 13 – $\Delta_{\text{int}}H$ between MC/ions and PDA/L64/k-CAR systems as a function of micellar casein concentration equivalent as calcium phosphate concentration.

The interaction between MC/ions and PDA/L64 nanoblends containing k-CAR occurred with energy release until 5.0×10^{-5} mol/L of phosphate. From this concentration, the process became endothermic. It is important to emphasize that $\Delta_{\text{int}}H$ values resulted from two simultaneous molecular processes: one endothermic (energy absorbed to break hydrogen bonds and water desolvation) and another exothermic (energy released from ion adsorption on the PDA surface and complex formation between MC and k-CAR). It was verified that MC/ions interactions with pure PDA/L64 nanoblends were endothermic, which allowed to conclude that the amount of energy released in the presence of polysaccharides is due to the formation of MC-k-CAR complexes. The constant and almost close to zero values observed above 5.0×10^{-5} mol/L of phosphate is probably associated with the saturation of binding sites of k-CAR by MC molecules. The microcalorimetric results corroborated the conclusion that the lower CR values of PDA/L64/k-CAR systems stem from the formation of complexes between MC and k-CAR.

4 Conclusions

A new colorimetric nanosensor was developed to detect small amounts of micellar casein, based on specific interactions between calcium phosphate ions released from the MC core and PDA carboxylic groups. This sensor was obtained as a nanoblend formed by a mixture of PDA and triblock copolymers. The main force that drives the intermolecular interactions which are responsible for colorimetric transitions depends on the hydrophobic/hydrophilic balance of the nanoblends. The interactions are endothermic for more hydrophobic nanoblends (PDA/L64), showing that the main contribution is the increase in the system entropy; conversely, for more hydrophilic nanostructures (PDA/F68), the interaction with MC/ions was driven mainly by the system enthalpy decrease. The concentration of triblock copolymer affected the colorimetric response of PDA/L64 nanoblends, mainly because the CR depends on the aggregation state of the copolymer. For more sensitive detection, it is necessary to examine the formation of copolymer micelles. The presence of other molecules that interact with MC, such as k-CAR, may influence the colorimetric transition of nanoblends. The knowledge of the induced colorimetric response of PDA/copolymer nanoblends by MC contributes to the efficient application of these nanosensors in several dairy systems.

5 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Prof. Antonio Fernandes de Carvalho from Reference Center of Membrane Technique Applied to Dairy Industry (DTA/UFV) for kindly providing micellar casein. We also thank CNPq and FAPEMIG for financial support. L.C.S. and E.D.C.C. thank CAPES and J.P.R. thanks CNPq for scholarships.

6 References

ANEKTHIRAKUN, P.; SUKWATTANASINITT, M.; TUNTULANI, T.; IMYIM, A. Naked eye screening of 11 phenolic compounds and colorimetric determination using polydiacetylene vesicles with α -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 111, p. 91-96, 2013.

AUSAR, S. F.; BIANCO, I. D.; BADINI, R. G.; CASTAGNA, L. F.; MODESTI, N. M.; LANDA, C. A.; BELTRAMO, D. M. Characterization of casein micelle precipitation by chitosans. *Journal Dairy Science*, v. 84, p. 361-369, 2001.

BELTRAN, M. C.; ALTHAUS, R. L.; BERRUGA, M. I.; MOLINA, A.; MOLINA, M. P. Detection of antibiotics in sheep milk by receptor-binding assays. *International Dairy Journal*, v.34, p.184-189, 2014.

BHUSAHN, B.; KUNDU, T.; SINGHT, B. P. Synthesis and nonlinear optical response of silver nanoparticles decorated polydiacetylene composite nanovesicles. *Optics Communications*, v. 312, p. 127-133, 2014.

BILANDZIC, N.; BOZIC, D.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIC, B. S.; VARENINA, I.; TANKOVIC, S.; CVETNIC, Z. Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control*, v. 40, p. 260-264, 2014.

CASTRILLON, E. D. C. *Nanosensores opticos de polidiacetileno para el reconocimiento de moleculas de interes ambiental y alimenticio*. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

CAUSSE, J.; OBERDISSE, J.; JESTIN, J.; LAGERGE, S. Small-angle neutron scattering study of solubilization of tributyl phosphate in aqueous solutions of L64 pluronic triblock copolymers. *Langmuir*, v. 26, p. 15745-15753, 2010.

CAVALLO, J. A.; STRUMIA, M. C.; GOMEZ, C. G. Preparation of a milk spoilage indicator adsorbed to a modified polypropylene film as an attempt to build a smart packaging. *Journal of Food Engineering*, v.136, p. 48-55, 2014.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIIPHOL, R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 360, p. 565-573, 2011.

CHARYCH, D. H.; NAGY, J. O.; SPEVAK, W.; BEDNARSKI, M. D. Direct colorimetric detection of a receptorligand interactions by a polymerized bilayer assembly. *Science*, v. 261, p. 585-588, 1993.

CHOI, J.; HORNE, D. S.; LUCEY, A. Determination of molecular weight of a purified fraction of colloidal calcium phosphate derived from the casein micelles of bovine milk. *Journal Dairy Science*, v.94, p.3250-3261, 2011.

CUCHEVAL, A.; AL-GHOBASHY, M. A.; HEMAR, Y.; OTTER, D.; WILLIAMS, M. A. K. Direct measurements of interfacial interactions between pectin and κ -casein and implications for the stabilisation of calcium-free casein micelle mimics. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 338, p. 450-462, 2009.

DELBECQ, F.; KAWAI, T. Colorimetric response and lipoplex formation with DNA of a high sensitive amine oxide substituted polydiacetylene. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 430, p. 85-90, 2013.

DETI, H.; HYMETE, A.; BEKHIT, A. A.; BEKHIT, A. M. I. M. A. E. A. Persistent organochlorine pesticides residues in cow and goat milks collected from different regions of Ethiopia. *Chemosphere*, v.106, p. 70-74, 2014.

DUARTE, S. C.; ALMEIDA, A. M.; TEIXEIRA, A. S.; PEREIRA, A. L.; FALCÃO, A. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*, v. 30, p. 411-417, 2013.

FIERENS, T.; HOLDERBEKE, M. V.; WILLEMS, H.; HENAUW, S.; SIOEN, I. Phthalates in Belgian cow's milk and the role of feed and other contamination pathways at farm level. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p.2945-2953, 2012.

HAUGEN, J. E.; RUDI, K.; LANGSRUD, S.; BREDHOLT, S. Application of gas-sensor array technology for detection and monitoring of growth of spoilage bacteria in milk: A model study. *Analytica Chimica Acta*, v. 565, p. 10-16, 2006.

KESSLER, A.; MENENDEZ-AGUIRRE, O.; HINRICH, J.; STUBENRAUCH, C.; WEISS, J. α -Casein – PE6400 mixtures: Surface properties, miscibility and self-assembly. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.118, p. 49-56, 2014.

KUSWANDI, B. JAYUS; RESTYANA, A.; ABDULLAH, A.; HENG, L. Y.; AHMAD, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control*, v.25, p. 184-189, 2012.

LEE, J.; SEO, S.; KIM, J. Colorimetric detection of warfare gases by polydiacetylenes toward equipment-free detection. *Advanced Functional Materials*, v. 22, p. 1632-1638, 2012.

LI, J.; YU, Z.; JIANG, H. ZOU, G.; ZHANG, Q. Photo and pH dual-responsive polydiacetylene smart nanocontainer. *Materials Chemistry and Physics*, v. 136, p. 219-224, 2012.

MAGAN, N.; PAVLOU, A.; CHRYSANTHAKIS, I. Milk-sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sensors and Actuators*, v. 72, p. 28-34, 2001.

MENARD, O.; CAMIER, B.; GUYOMARC'H, F. Effect of heat treatment at alkaline pH on the rennet coagulation properties of skim milk. *Lait*, v. 85, p. 515–526, 2005.

ORTEGA, P. F. R. *Novas nanoestruturas de polidiacetileno: Fundamentos e aplicações*. 2013. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

PATTANATORNCHAI, T.; CHAROENTHAI, N.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIPIHOL, R. Control over the color transition behavior of polydiacetylene vesicles using different alcohols. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 391, p. 45-53, 2013.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. *Journal Science Technoly*, v. 27, p. 201-212, 2005.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, L. H. M.; ANDRADE, J. A.; SILVEIRA, M. F. A.; CARVALHO, A. F. Polydiacetylene as a biosensor: Fundamentals and applications in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 172-181, 2010a.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H.; MAGESTE, A. B.; SOARES, R. F.; TEIXEIRA, A. V. N. C.; ANDRADE, N. J. Thermodynamic study of colorimetric transitions in polydiacetylene vesicles induced by the solvent effect. *Journal Physics Chemistry*, v.114, p. 13365-13371, 2010b.

RAHIMI, E. Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food Chemistry*, v.136, p. 389-391, 2013.

SADEGHI, S.; MOTAHARIAN, A. Voltammetric sensor based on carbon paste electrode modified with molecular imprinted polymer for determination of sulfadiazine in milk and human serum. *Materials Science and Engineering*, v. 33, p. 4884-4891, 2013.

SU, Y. Preparation of polydiacetylene/silica nanocomposite for use as a chemosensor. *Reactive & Functional Polymers*, v.66, p. 967-973, 2006.

SUTUROVIC, Z.; KRAVIC, S.; MILANOVIC, S.; DUROVIC, A.; TANJA, B. Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step. *Food Chemistry*, v. 155, p. 120-125, 2014.

TATO, L.; TREMOLADA, P.; BALLABIO, C.; GUAZZONI, N.; PAROLINI, M.; CACCIANIGA, M.; BINELLI, A. Seasonal and spatial variability of polychlorinated biphenyls (PCBs) in vegetation and cow milk from a high altitude pasture in the Italian Alps. *Environmental Pollution*, v.159, p. 2656-2664, 2011.

TREVISI, E.; ZECCONU, A.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; GROSSI, P.; AMADORI, M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in Veterinary Science*, v. 96, p. 229-233, 2014.

VILLAR, A.; GORRITXATEGI, E.; ARANZABE, E.; FERNANDEZ, S.; OTADUY, D.; FERNANDEZ, L.A. Low-cost visible–near infrared sensor for on-line monitoring of fat and fatty acids content during the manufacturing process of the milk. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2756-2760, 2012.

WALSTRA, P. Physical chemistry of foods. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 1965-1973, 2003.

WANG, F.; LIU, X.; HU, Y.; LUO, J.; LY, X.; GUO, H.; REN, F. Effect of carrageenan on the formation of rennet-induced casein micelle gels. *Food Hydrocolloids*, v. 36, p. 212-219, 2014.