



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

CASEINATO DE SÓDIO COMO CHAPERONA DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE SOB AQUECIMENTO ÔHMICO

MOREIRA TCP¹, PEREIRA RN², VICENTE AA² e CUNHA RL¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica
E-mail para contato: thaiscpmoreira@gmail.com

RESUMO – As caseínas, β - lactoglobulina e α - lactalbumina são as principais proteínas do leite. Quando aquecidas, acima de determinada temperatura, as proteínas globulares agregam-se devido à exposição e agregação de grupos hidrofóbicos, porém na presença de caseínas esta agregação pode ser menor devido à interação entre tais proteínas e as caseínas. Neste trabalho foi observada menor agregação das proteínas sob aquecimento a campos elétricos moderados (4 e 7 V cm⁻¹) possibilitando o uso desta tecnologia para o controle da agregação de proteínas globulares e permitindo vislumbrar a manufatura de produtos com características diferenciadas.

1. INTRODUÇÃO

As caseínas são compostas por subunidades: α ₁, α ₂, $\beta + \gamma$, e κ - caseínas que possuem ligações dissulfeto, podendo interagir com outras moléculas que as possuam, são hidrofóbicas, e apresentam estrutura desdobrada em solução (GUNASEKARAN, SOLAR, 2012). O isolado proteico do soro do leite (WPI) é basicamente constituído por proteínas globulares, principalmente a β - lactoglobulina e α - lactalbumina. Ambas possuem estrutura globular que acima de 70 °C se desdobra expondo grupos hidrofóbicos e pontes dissulfeto que permitem sua agregação (GUNASEKARAN, SOLAR, 2012). No entanto, as caseínas (como caseinato de sódio, NaCas) possuem atividade chaperona sobre as proteínas globulares do WPI quando aquecidas juntamente (DONATO *et al.*, 2009; GUYOMARC'H *et al.*, 2009; MORGAN *et al.*, 2005). O aquecimento ôhmico, ou aquecimento a campos elétricos moderados (MEF), ocorre pela geração interna de calor de um material submetido a determinado campo elétrico (PEREIRA, VICENTE, 2010). O uso dessa técnica já foi bastante explorado em alimentos, e atualmente tem-se estudado sua aplicação na funcionalização de proteínas visando a fabricação de produtos como géis e filmes com características distintas (PEREIRA, VICENTE, 2010; PEREIRA, TEIXEIRA, VICENTE, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015). Assim, este trabalho procurou explorar o efeito da aplicação de diferentes intensidades de campos elétricos na interação entre o NaCas e o WPI.

2. MATERIAIS E MÉTODOS



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

2.1. Materiais

Foi utilizado caseinato de sódio fornecido pela Alibra Ingredientes Ltda. (Campinas, Brasil) e proteína isolada do soro do leite, cedido pela Arla Foods (Arla Foods, Viby, Dinamarca). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

Soluções e Tratamentos: *Preparo das soluções de NaCas e WPI:* Foi preparada uma solução estoque de 1 % (m/v) na proporção 1:1 de NaCas e WPI em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo 0,01% de azida sódica. Esta solução foi agitada “overnight”, centrifugada a 3461g por 30 minutos e filtrada duas vezes (poro 0,2 μm). As proteínas foram precipitadas por redução de pH até próximo ao ponto isoelétrico utilizando método descrito por Pereira, Teixeira, Vicente (2011). *Tratamentos térmicos:* As soluções proteicas foram submetidas a aquecimento convencional (AC) e ôhmico (MEF) a 95°C por 15 minutos. No AC as amostras foram colocadas em banho térmico com temperatura controlada. O aquecimento ôhmico ocorreu conforme descrito em Rodrigues *et al.* (2015). Três diferentes campos foram utilizados neste estudo: 4, 7 e 18 V cm^{-1} . As soluções foram avaliadas quanto a distribuição de tamanho de partícula, densidade de carga, fluorescência intrínseca e dicróismo circular.

Análises: *Distribuição do tamanho de partículas e densidade de carga:* Os ensaios foram realizados em Zetasizer Nano (ZEN 3600, Malvern Instruments Ltda., Malvern, RU) a 25 °C. Os dados foram analisados pelo diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade das soluções (Zeta Software 7.11, Malvern Instruments Ltd, Malvern, RU). *Fluorescência Intrínseca:* As amostras (diluição 1:100) foram analisadas a 286/340 nm (excitação/emissão) em espectrofotômetro de fluorescência (Hittachi, F-4500, Tóquio, Japão) a pH 7,0 e pH 4,6 (solução ácida) (BIRLOUEZ-ARAGON, SABAT, GOUTI, 2002; HIDALGO *et al.*, 2012; PEREIRA, TEIXEIRA, VICENTE, 2011). *Dicróismo Circular:* A estrutura das proteínas foi analisada a 25 °C entre 190 e 260 nm em espectrofotômetro Jasco DC 1500 (Jasco Corp., Japão), utilizando-se cubeta de quartzo com caminho ótico 0,1 cm. A elipticidade molar $[\theta]$ foi calculada conforme descrito por Ioannou, Donald, Tromp (2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas apresentaram distribuição bimodal, com diferenças significativas observadas apenas entre o controle e as amostras submetidas a aquecimento (Tabela 1). Também não foram observadas diferenças entre o controle e as amostras tratadas em relação à densidade de carga. Tais semelhanças podem ser atribuídas ao uso da solução tampão que pode ter impedido a formação de agregados (DONATO *et al.*, 2009). Morgan *et al.* (2005), Zhang *et al.* (2005) e Guyomarc'h *et al.* (2009) observaram o efeito chaperona das caseínas isoladas e caseinato em seus estudos. Assim, os resultados podem ser atribuídos a este efeito, pois o NaCas competirá pelos sítios de ligação das proteínas globulares desdobradas.

Alterações na polaridade de resíduos de triptofano durante a interação da molécula chaperona podem ser observadas em espectros de fluorescência no comprimento de onda onde a intensidade é máxima (MORGAN *et al.*, 2005). Nos ensaios de fluorescência a pH 7,0, observou-se que as soluções submetidas a campos de 4 e 7 V cm^{-1} são estatisticamente semelhantes (Tabela 1), enquanto há proximidade entre as amostras tratadas sob AC, 18 V

cm^{-1} e o controle. Em pH 4,6, a solução controle se distancia das soluções termicamente tratadas e diferenças são observadas entre as soluções tratadas sob MEF e sob AC. Novamente observa-se ineficiência do processo para campos elétricos mais elevados (18 V cm^{-1}). Os ensaios de solubilidade e fluorescência intrínseca indicam que ocorreram alterações na polaridade do ambiente dos resíduos de triptofano das amostras tratadas sob MEF, principalmente entre as soluções tratadas a campos de 4 e 7 V cm^{-1} .

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico, polidispersidade, densidade de carga e picos de emissão do triptofano/tirosina a pH 7,0 e 4,6 das soluções aquecidas sob MEF e AC.

Tratamento	Densidade de Carga (mV)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)		Polidispersidade (PDI)		Intensidade dos Picos 300 a 400nm (U.A.)	
		Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2	pH 7,0	pH 4,6
Controle	$-24,88 \pm 3,31^a$	$210,87 \pm 7,20^b$	$24,55 \pm 2,00^a$	$0,17 \pm 0,03^b$	$0,07 \pm 0,02^a$	$10907,03 \pm 790,30^b$	$4331,758 \pm 259,11^c$
AC	$-23,34 \pm 3,38^a$	$170,67 \pm 6,25^a$	$25,83 \pm 7,07^a$	$0,30 \pm 0,08^a$	$0,07 \pm 0,01^a$	$12614,55 \pm 176,07^{ab}$	$872,754 \pm 81,45^b$
4 V cm^{-1}	$-21,50 \pm 3,72^a$	$174,56 \pm 6,35^a$	$25,54 \pm 5,51^a$	$0,30 \pm 0,11^a$	$0,08 \pm 0,01^a$	$13637,70 \pm 313,98^a$	$1241,66 \pm 45,92^a$
7 V cm^{-1}	$-19,31 \pm 1,31^a$	$175,34 \pm 8,27^a$	$28,93 \pm 4,17^a$	$0,26 \pm 0,07^{ab}$	$0,08 \pm 0,02^a$	$13281,81 \pm 1425,96^a$	$1229,18 \pm 64,54^a$
18 V cm^{-1}	$-25,29 \pm 4,37^a$	$174,21 \pm 9,86^a$	$28,50 \pm 7,55^a$	$0,26 \pm 0,07^{ab}$	$0,08 \pm 0,02^a$	$12699,24 \pm 403,84^{ab}$	$998,80 \pm 62,69^{ab}$

Diferentes letras na mesma coluna significam diferenças estatísticas entre as amostras ($p < 0,05$)

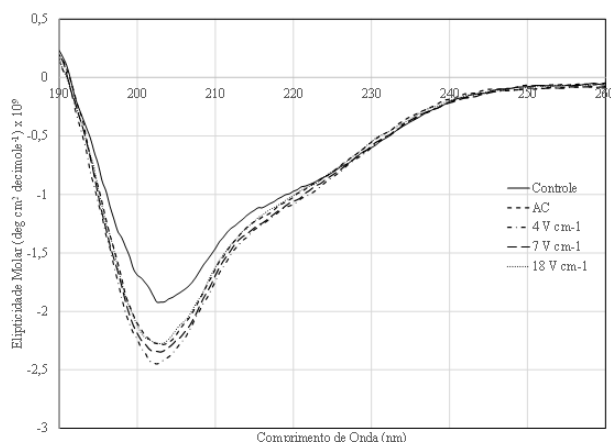


Figura 1 - Espectro do dicroísmo circular Far-UV (DC) das soluções aquecidas sob MEF e aquecimento convencional

As estruturas secundárias das proteínas podem ser identificadas por dicroísmo circular. A banda negativa entre 208 e 220 nm mostra as estruturas α -hélice, a 218 nm estruturas β -hélice, e estruturas desordenadas a 203 nm (GREENFIELD, 2007). O espectro das soluções (Figura 1) mostra maiores diferenças entre o controle e as soluções submetidas ao aquecimento. No entanto, observa-se um maior aumento na banda de 203 nm das amostras submetidas a campos de 4 e 7 V cm^{-1} , indicando que tais tratamentos permitiram maior quantidade de estruturas desordenadas, portanto, menor agregação do WPI. Assim, as amostras submetidas a tais campos apresentaram maior exposição dos campos hidrofóbicos que permitiram maior agregação entre o WPI e NaCas.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

4. CONCLUSÕES

Foi possível explorar o efeito chaperona do caseinato de sódio frente a MEF e identificar a ação destes campos na exposição dos sítios hidrofóbicos de proteínas globulares e sua interação com as caseínas. Tal estudo é particularmente interessante pela utilização de um novo processo que permite controlar a agregação de proteínas globulares com potenciais aplicações tecnológicas.

6. REFERÊNCIAS

BIRLOUEZ-ARAGON I, SABAT P, GOUTI N, A new method for discriminating milk heat treatment. *Int. Dairy J.* v. 12, p. 59–67, 2002.

DONATO L, GUYOMARC’H F, Formation and properties of the whey protein / κ -casein complexes in heated skim milk - A review. *Dairy Sci. Technol.* V.89, p. 3-29, 2009.

GREENFIELD NJ, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* v. 1, p. 2876–2890, 2007.

GUNASEKARAN S, SOLAR O, Heat-Induced Casein - Whey Protein Interactions. *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization.* Boca Raton: CRC Press, 2012.

GUYOMARC’H F et al, Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of κ -casein or sodium caseinate. *Food Hydrocoll.* v. 23, p. 1103–1110, 2009.

HIDALGO ME et al., Acid-Induced Aggregation and Gelation of Bovine Sodium Caseinate-Carboxymethylcellulose Mixtures. In: VALDEZ, Benjamin (Org.). . *Food Industrial Processes - Methods and Equipment.* [S.l.]: In Tech, 2012.

IOANNOU JC, DONALD AM, TROMP RH, Characterising the secondary structure changes occurring in high density systems of BLG dissolved in aqueous pH 3 buffer. *Food Hydrocoll.* v. 46, p. 216–225, 2015.

MORGAN PE et al., Casein Proteins as Molecular Chaperones. *J. Agric. Food Chem,* v. 53, p. 2670–2683, 2005.

PEREIRA RN, VICENTE AA. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Res. Int.* v. 43, p. 1936–1943, 2010.

PEREIRA RN, TEIXEIRA JA, VICENTE AA, Exploring the denaturation of whey proteins upon application of moderate electric fields: A kinetic and thermodynamic study. *J. Agric. Food Chem.* v. 59, p. 11589–11597, 2011.

RODRIGUES RM et al., Influence of moderate electric fields on gelation of whey protein isolate. *Food Hydrocoll.* v. 43, p. 329–339, 2015.