



XXXI Congresso de
Iniciação Científica
Unicamp

2023



Microparticulação de proteínas globulares: modulando o comportamento das proteínas do soro de leite e da ervilha

Palavras chave: MICROPARTICULAÇÃO, TRATAMENTO TÉRMICO, GELIFICAÇÃO

Autores:

Pedro Gomes da Silva - FEA/UNICAMP

Leandro Vinicius Bernardes - FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Guilherme M. Tavares - FEA/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As proteínas do soro do leite e as da ervilha tem alta relevância na fabricação de ingredientes proteicos com vários usos industriais, principalmente pela capacidade dessas proteínas de modular a consistência de produtos que as utilizam (NUNES *et al.*, 2019). Porém, quando submetidas a tratamentos térmicos, este pode desencadear alterações estruturais com reflexos indesejáveis. Visto isso, a produção de ingredientes proteicos microparticulados surge como uma solução para produtos com alto teor de proteínas, que demandem elevada estabilidade térmica (TANGER *et al.*, 2021). Durante os processos de produção de ingredientes microparticulados, variáveis como o pH, características da matéria-prima, condições de tratamento térmico e cisalhamento e o teor e natureza de açúcares redutores presentes podem impactar as características do produto obtido (WIJAYANTI *et al.*, 2014; Tobin *et al.*, 2010).

Na microparticulação, ao submeter proteínas globulares a altas temperaturas simultaneamente a um intenso cisalhamento, as proteínas sofrem desnaturação, porém teremos preferencialmente a formação de pequenos agregados proteicos (Spiegel, 1999). Há no mercado internacional a produção de ingredientes proteicos microparticulados a base de proteínas do soro de leite. No entanto, a microparticulação de proteínas vegetais não é amplamente explorada. Por isso, as proteínas de ervilha aparecem como boas candidatas para o estudo dessa estratégia de inovação (TANGER *et al.*, 2021).

METODOLOGIA:

Preparo das amostras:

As amostras foram preparadas a partir de concentrados proteicos de soro de leite e de ervilha contendo 80% m/m de proteínas. As amostras de proteínas do soro de leite foram preparadas na concentração de 5% m/m em pH 7 ou 4,5 e submetidas a tratamento térmico de 95°C por 15 min sob agitação de 12000 rpm. Após o tratamento as amostras forem resfriadas em banho de gelo e o pH foi reajustado para 7 quando necessário. Controles foram previstos submetendo as amostras às mesmas condições (cisalhamento e ajustes de pH), salvo a etapa de aquecimento. Para as amostras de proteínas de ervilha, dispersões na concentração de 5% m/m em pH 7 foram preparadas e submetidas à mesma temperatura e cisalhamento das amostras de proteínas do soro de leite. No entanto, três tempos de processo foram aplicados: (i) duas etapas subsequentes de 15 min com resfriamento entre elas; (ii) duas etapas subsequentes de 30 min com resfriamento entre elas e (iii) 30 minutos

de tratamento ininterruptos. Controles reproduzindo o tempo e cisalhamento foram realizados. Amostras obtidas foram congeladas e liofilizadas.

Gelificação termo induzida

Dispersões proteicas das diferentes amostras em concentração variável foram preparadas em pH 7 e submetidas a tratamento térmico a 95 °C por 15 minutos. O aspecto visual das amostras foi comparado para avaliação qualitativa do efeito do tratamento térmico.

Determinação da concentração de grupos sulfidril livres totais (SH):

A determinação da concentração de grupos –SH livres totais foi realizada conforme Wang e colaboradores (2012): Amostras de 1% (m/m) foram analisadas e o conteúdo de SH foi calculado segundo Ellman (1959).

Eletroforese em gel de Dodecil sulfato de Sódio-Poliacrilamida (SDS-PAGE):

As frações insolúveis das diferentes dispersões proteicas preparadas em pH 7 foram avaliadas segundo Laemmli (1970). Amostras de 0.5% (m/m) foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 25°C, e o precipitado foi analisado por SDS-PAGE em condições redutoras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Capacidade de Gelificação Termo Induzida:

As amostras produzidas foram testadas quanto sua capacidade de formação de gel termo induzido, para verificar de forma qualitativa se os tratamentos de microparticulação resultaram em alguma alteração no comportamento das proteínas quando submetidas a tratamento térmico adicional. A Figura 1 mostra claramente o comportamento esperado para este processo aplicado às proteínas do soro do leite. O comportamento, em termos de formação de gel, observado para as amostras de proteínas de soro do leite mantidas em pH 7 durante todo o processo foi idêntico ao observado para as amostras que passaram pelo pH 4,5 durante a microparticulação. As dispersões das proteínas do soro do leite foram preparadas na concentração de 6% m/m por ser a concentração crítica de gelificação observada para o material controle (não submetido ao processo de microparticulação). Para as amostras de proteínas de ervilha, a avaliação do efeito do processo de microparticulação foi realizada em dispersões a 9,5% m/m. A Figura 2 apresenta os resultados observados para as diferentes amostras. Observou-se que o tratamento de microparticulação aplicado às proteínas de ervilha fez com que as amostras ficassem mais fluidas quando submetidas a subsequente tratamento térmico, indicando menor agregação das proteínas.

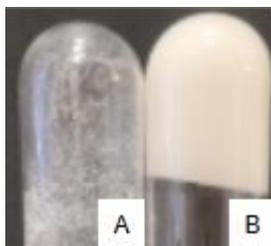


Figura 1. Comparação de formação de gel termo induzido entre amostras contendo proteínas de soro de leite na concentração de 6% m/m. (A) amostras submetidas ao processo de microparticulação (5% m/m e pH 4,5). (B) Amostras não submetidas ao processo de microparticulação (controle).

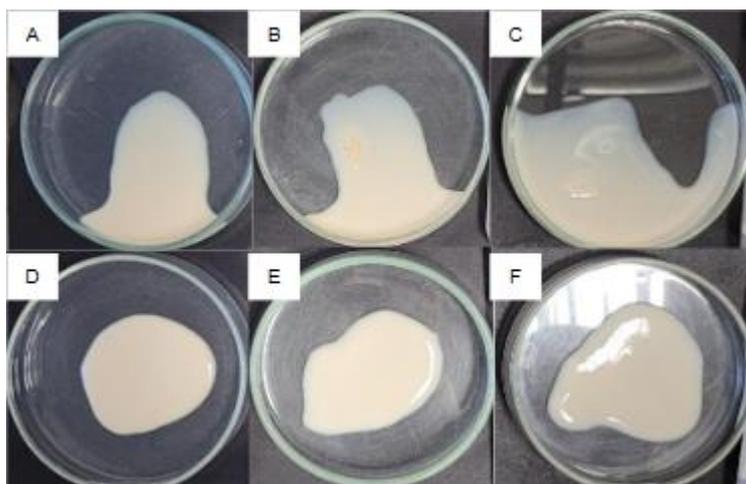


Figura 2. Comparação de formação de gel termo induzido entre amostras contendo 9,5% m/m de proteínas de ervilha. (A), (B) e (C) amostras submetidas a processos de microparticulação (tratamento aplicado em dispersões de 5% m/m, e tempo variável de tratamento). (D), (E) e (F) amostras controle (submetidas ao cisalhamento, mas não ao tratamento térmico). (A) e (D) tempo de processo de 60 minutos, divididos em dois tratamentos sucessivos de 30 minutos; (B) e (E) tempo de processo de 30 minutos, divididos em dois tratamentos sucessivos de 15 minutos; (C) e (F) tempo de processo de 30 minutos ininterruptos.

Determinação da concentração de grupos sulfidrilas livres totais (SH):

A Figura 3 apresenta a concentração de grupos sulfidrilas livres totais em cada amostra. Nas amostras de proteínas do soro de leite, nota-se um elevado teor de grupos -SH nas amostras controle, independente de pH utilizado durante o processo, comparativamente com as amostras submetidas à microparticulação. Em decorrência do processo de microparticulação, há uma considerável redução da concentração de grupos -SH totais das amostras. Esses resultados sugerem a formação de ligações dissulfeto entre as proteínas durante o processo de microparticulação. Esses resultados explicam o comportamento de gelificação termo induzida das amostras quando submetidas a subseqüente tratamento térmico. A formação de ligações dissulfeto entre as proteínas durante o processo de microparticulação acarreta uma diminuição da reatividade das proteínas quando submetidas a tratamento térmico subseqüente, afetam a capacidade das amostras em formar géis.

No caso das proteínas de ervilha, não são observadas alterações na concentração de grupos -SH livres totais comparando as amostras microparticuladas com seus respectivos controles. Esses resultados sugerem pouca participação de ligações dissulfeto na estabilização de estruturas supramoleculares formadas entre essas proteínas. É importante frisar a baixa concentração de aminoácidos sulfurados reportada para as proteínas de ervilha.

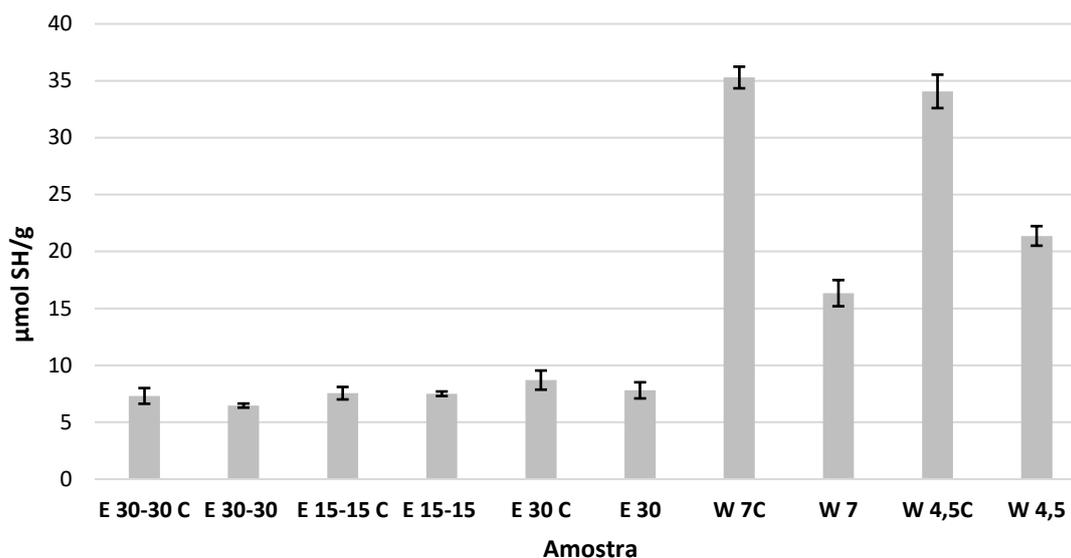


Figura 3. Concentração de grupos -SH livres totais. Amostras de proteína de ervilha (E) microparticuladas ou controle (C) submetidas a diferentes tempos de tratamento (dois tratamentos sucessivos de 15 ou 30 minutos, e tempo de tratamento de 30 minutos ininterruptos). Amostras de proteínas do soro do leite (W) microparticuladas ou controle (C) produzidas em diferentes pH (4,5 ou 7).

Eletroforese em gel de Dodecil sulfato de Sódio-Poliacrilamida (SDS-PAGE):

A Figura 4 apresenta o perfil eletroforético da porção insolúvel das diferentes amostras de proteínas de soro de leite. Percebe-se que há presença de α -lactoalbumina (14,2 kDa) e β -lactoglobulina (18,3 kDa), formando a porção insolúvel das diferentes amostras. Analisando qualitativamente, é perceptível que a intensidade da banda da β -lactoglobulina é maior, e mais intensa também nas amostras submetidas ao processo de microparticulação, o que indica uma menor solubilidade destas proteínas após o tratamento, em especial quando este é realizado em pH 4,5.

Por sua vez, a Figura 5 representa o perfil eletroforético da porção insolúvel das diferentes amostras de proteínas de ervilha. As proteínas presentes na ervilha são a lipoxigenase (90-97 kDa), subunidades da vicilina (~70-45 kDa), fração α (~40 kDa) e fração β (~20 kDa) da legumina e albumina (~10 kDa) (LAO, 2023). Há uma menor intensidade das bandas nas amostras microparticuladas (indicando maior solubilidade). Todas as bandas características das proteínas de ervilha são encontradas na porção insolúvel das amostras, o que indica que nenhuma proteína específica é mais propensa a insolubilização das condições estudadas.

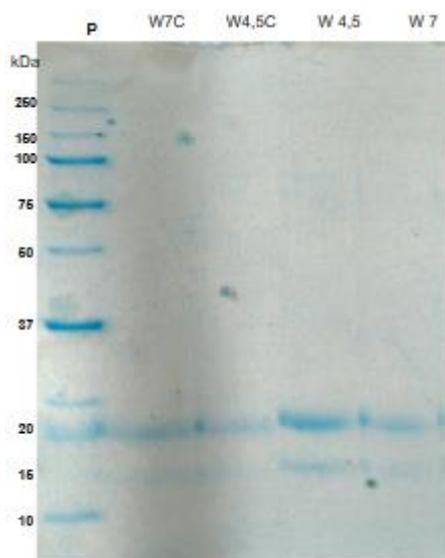


Figura 4: Perfil eletroforético da fração insolúvel das diferentes amostras de proteínas de soro de leite (W) submetidas aos processos de microparticulação em diferentes pH (4,5 e 7) e seus respectivos controles (C). (P) indica o padrão de massa molecular.

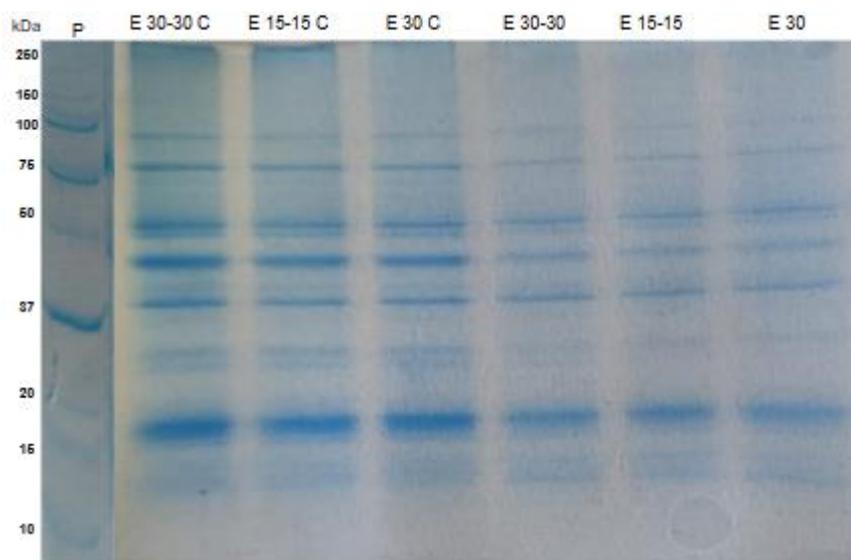


Figura 5: Perfil eletroforético da fração insolúvel das diferentes amostras de proteínas ervilha (E) submetidas aos diferentes processos de microparticulação e seus respectivos controles (C). (P) indica o padrão de massa molecular.

CONCLUSÃO

Com este trabalho, foi possível analisar o comportamento das proteínas globulares do soro do leite e da ervilha quando submetidas a um tratamento térmico simultâneo a um cisalhamento. O processo de microparticulação afetou a gelificação/agregação das diferentes proteínas testadas. A estruturação de géis formados pelas proteínas do soro de leite apresentou grande participação de ligações dissulfeto em sua estabilização. Para as proteínas de ervilha, a participação de outras interações na estabilização dos géis formados, como interações hidrofóbicas, parece ser mais relevante. Esses resultados abrem perspectivas para a concepção de processos de microparticulação adequados a proteínas vegetais.

REFERÊNCIAS

- Nunes, L., & Tavares, G. M. Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in food science & technology*, 90, 88-99. (2019).
- Tanger, C., Quintana Ramos, P., & Kulozik, U. Comparative assessment of thermal aggregation of whey, potato, and pea protein under shear stress for microparticulation. *ACS Food Science & Technology*, 1(5), 975-985. (2021).
- Wijayanti, H.B., Oh, H.E., Sharma, R., Deeth, H.C. Reduction of aggregation of beta lactoglobulin during heating by dihydrolipoic acid. *Journal Dairy Research*, 2013. 80(4): p. 383-389.
- Spiegel, T. Whey protein aggregation under shear conditions – effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure. *International Journal Food Science and Technology*, 34, p. 523-531. (1999).
- LAO, Y. et al. Quantifying the effects of pre-roasting on structural and functional properties of yellow pea proteins. *Food Research International*, v. 172, p. 113180, 1 out. 2023.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 479–488, ago. 2006.