

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de concentrado proteico de soro do leite

Development and Characterization of Whey Protein Concentrate Nanoparticles

Gabriele Paola da Silva Francisco¹, Jessica Novello Nascimento Brenag², Odinei Hess Gonçalves³

RESUMO

A nanotecnologia, um campo de pesquisa em crescimento, tem diversas aplicações potenciais no nosso cotidiano. As nanopartículas desempenham papel importante que inclui a indústria alimentícia, onde podem ser utilizadas para estabilizar óleos em alimentos, atendendo à demanda por produtos mais saudáveis com menos aditivos. Um material promissor para esse fim é o concentrado proteico do soro do leite (WPC). Desta forma, este estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas de WPC como agentes estabilizantes. Foi empregada a técnica de reticulação com dois ácidos orgânicos, ácido cítrico (ÁC) e ácido tânico (ÁT) para produzir as nanopartículas. O acompanhamento da cinética de reticulação revelou que o ácido tânico foi mais eficiente. Análises térmicas e espectroscópicas confirmaram que a reação entre as proteínas e os reticulantes ocorreu com sucesso. Esses resultados encorajam pesquisas futuras para aplicar essas nanopartículas na criação de emulsões alimentícias e na encapsulação de compostos bioativos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido Cítrico, Ácido Tânico, Concentrado proteico de Whey protein, Nanopartículas.

ABSTRACT

Nanotechnology, a growing research field, holds numerous potential applications in our daily lives. Nanoparticles play a significant role in various sectors, including the food industry, where they can be employed to stabilize oils in foods, meeting the demand for healthier products with fewer additives. A promising material for this purpose is whey protein concentrate (WPC). Thus, this study aims to develop and characterize WPC nanoparticles as stabilizing agents. Cross-linking with two organic acids, citric acid and tannic acid, was employed to produce the nanoparticles. Monitoring the cross-linking kinetics revealed that tannic acid was more efficient, leading to the formation of a higher quantity of nanoparticles. Thermal and spectroscopic analyses confirmed the successful reaction between the proteins and cross-linkers, and microscopic examinations demonstrated the formation of nanoparticles. These results encourage further research to apply these nanoparticles in the creation of food emulsions and the encapsulation of bioactive compounds.

KEYWORDS: Citric Acid, Tannic Acid, Whey Protein Concentrate, Nanoparticles.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muito tem se falado na procura por alimentos que proporcionem benefícios adicionais à saúde. Isso é resultado da conscientização das pessoas sobre o impacto da dieta em sua qualidade de vida. Com isso, os produtos alimentícios enriquecidos com aditivos que promovem a saúde estão ganhando maior popularidade. No entanto, as substâncias bioativas presentes nesses alimentos podem ser instáveis do ponto de vista químico e sensíveis à degradação. Para superar essas limitações, estão sendo desenvolvidas tecnologias que visam aumentar a aplicabilidade, estabilidade e

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: gabrielep.francisco@gmail.com. ID Lattes: 4596511525935055.

² Bolsista do Programa de Pós Graduação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: jessicanovello@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 1664836889101519.

³ Docente no Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: odinei@gmail.com. ID Lattes: 2485580934187356.

preservação da qualidade e vida útil dessas substâncias em produtos alimentícios. Uma abordagem promissora é a estabilização por meio do uso de partículas sólidas. Um exemplo disto é a estabilização de óleos com o auxílio de partículas sólidas. Essa abordagem tem apresentado resultados positivos na proteção contra a degradação de compostos sensíveis, na redução ou retardamento do processo oxidativo e na preservação das funções biológicas e das características sensoriais dos alimentos (MARTINELLI; CAVALLI, 2019, ASSIS et. al., 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter nanopartículas de proteínas do soro do leite (whey protein) utilizando os reticulantes ácido cítrico (ÁC) e ácido tânico (ÁT). A cinética de reticulação foi avaliada para os dois casos, e as nanopartículas obtidas foram caracterizadas por análises térmicas, espectroscópicas e morfológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados concentrado proteico do soro do leite (WPC, do inglês) fornecido pela indústria GSG Nutrição LTDA. ÁT (Sigma Aldrich) e ÁC (Alphatec) foram utilizados como agentes de reticulação. Azida de sódio foi acrescentada para prevenir o crescimento microbiano em concentração de 200 ppm.

A elaboração das nanopartículas sólidas foi realizada de acordo com a metodologia de Farjami et al. (2015) e de Silva et al. (2021) com adaptações. A concentração de WPC foi determinada de forma gravimétrica e em triplicata. Secou-se em placa de petri aproximadamente 1g da solução em estufa a 100°C até que não houvesse variação de massa. O cálculo foi realizado segundo a equação (1), onde C_{WPC} é a concentração de sólidos (g/mL), M_{sec} é a massa na placa de petri após a secagem, M_{placa} é a massa da placa de petri vazia e $M_{solução}$ é a massa de solução adicionada na placa antes da secagem.

$$C_{WPC} = \frac{m_{sec} - m_{placa}}{m_{solução}} \quad (1)$$

Os reticulantes foram adicionados à solução de whey protein (20g) em água destilada (500 mL) e agitou-se por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o ajuste do pH (5,8). As soluções foram aquecidas a 80°C sob agitação branda e constante por 15 minutos. Depois de atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se a azida de sódio (0,2 g/L) com o intuito de evitar o crescimento microbiano (RAMALHO; LELIS, 2021; VANCIN et al., 2020). As soluções obtidas foram submetidas ao processo de sonicação (Fischer Scientific, Sonic desembrator, 117 V, 50-60 Hz, 4 A e 400 W) por 3 minutos (30 segundos ligado/10 segundos desligados) em banho de gelo. Por fim, as soluções foram liofilizadas e armazenadas e mantidas sob refrigeração.

A formação das nanopartículas foi monitorada ao longo do tempo para as amostras com e sem reticulação. A solução de WPC feita anteriormente foi então submetida ao aquecimento. Ao atingir a temperatura de 80°C, foram retiradas amostras de aproximadamente 1,5 mL nos tempos de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos, sendo resfriadas em banho de gelo para que o processo de reticulação fosse interrompido. As amostras retiradas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi retirado e acondicionado em placas de Petri, as quais foram levadas à estufa e mantidas a 100°C até a completa secagem. Os cálculos foram realizados de acordo com as

Equações 2 e 3, onde $C_{sólidos}$ é a concentração de sólidos total, M_{sec} é a massa da placa após a secagem, M_{placa} é a massa da placa vazia, $M_{solução}$ é a massa da placa com solução de WPC, C_{WPC} é a concentração de WPC antes da reticulação, $C_{ácido}$ é a concentração de ácido adicionado.

$$C_{sólidos} = \frac{m_{sec} - m_{placa}}{(m_{solução} - m_{placa})} \quad (2)$$

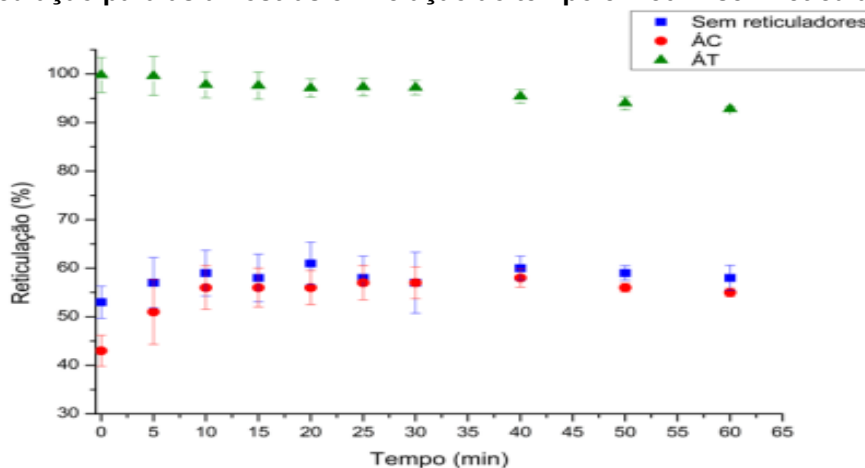
$$Reticulação (\%) = 100 \times \frac{C_{WPC}(C_{sólidos} - C_{ácidos})}{C_{WPC}} \quad (3)$$

Além disso, as amostras foram caracterizadas quanto a estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) utilizando analisador térmico simultâneo (STA 6000, Perkin Elmer), interações moleculares por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) conforme descrito por Farjami et al., (2015), imagens microscópicas através do microscópio de força atômica (Agilent SPM 5500, EUA), tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (NANO DLS Particle Size Analyzer, BrookHaven Instruments, Holtsville, New York, EUA) e potencial zeta (Particle Metrix – Stabino®, modelo PMX 400).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 estão representados os percentuais de reticulação para as amostras.

Figura 1 – Reticulação para as amostras em relação ao tempo em 80°C sem reticulantes (ÁC) e (ÁT).

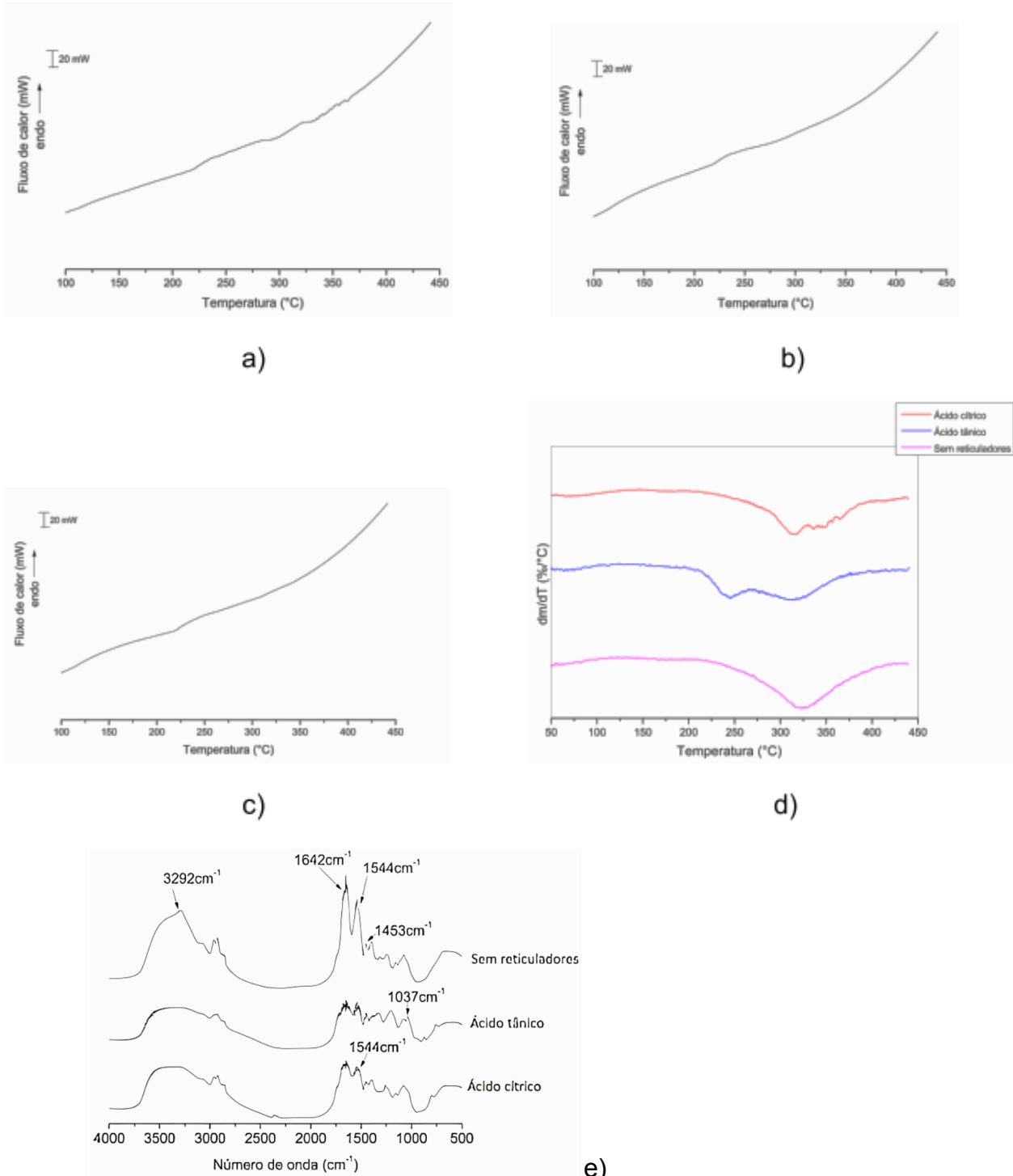


Fonte: Autoria Própria (2022)

Foi possível observar que houve formação de WPC reticulado na amostra onde não foi utilizado ácido, sendo atribuído à reticulação térmica (WU et al., 2015b). Além disso, a reticulação foi mais intensa nas amostras onde o ÁT foi utilizado como reticulante, atingindo percentuais em torno de 92%. Como não houve diferença entre a amostra de ÁC e a amostra sem ácido, o mesmo foi desconsiderado como reticulante. Assim, pode-se dizer que o grau de reticulação está relacionado com a quantidade de grupos amino livres, os quais dependem das características estruturais do composto (ESCAMILA-GARCÍA et al., 2019).

Os resultados obtidos pelo método de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram expressos em forma de curvas para as amostras: (a) WPC sem reticulante, (b) com adição de ÁC e (c) com adição de ÁT como mostra a Figura 3, onde também estão apresentados os termogramas obtidos na Análise Termogravimétrica bem como a derivada das curvas termogravimétricas e os resultados da espectroscopia no infravermelho (FTIR).

Figura 3 – Resultados para as análises de DSC, Termogravimétrico e Espectros de FTIR para as nanopartículas de concentrado proteico do soro do leite (WPC) com e sem adição de ÁC ou ÁT.



Fonte: A autoria Própria (2022)

d) Perda de massa em função da temperatura. e) Derivada da perda de massa em função da temperatura. f) Espectros de FTIR.

Com base nos resultados obtidos através das curvas de DSC, pode-se dizer que os reticulantes não influenciaram nas propriedades do WPC. Confirmando o que foi descrito por Winkler et al. (2015), que não observou pontos de fusão ou transições vítreas na segunda varredura de aquecimento para amostra de WPI. Em seguida iniciou-se a decomposição térmica acima de 225°C ocasionando na perda sucessiva de massa em todas as amostras, sendo a com ÁT a mais afetada. O pico próximo a 230°C no termograma do ÁT pode indicar a sua decomposição, que segundo Hu et al. (2020) ocorre entre 200-360°C (NAM et al., 2019). As amostras com a adição dos reticulantes apresentaram um aumento na temperatura de decomposição térmica, tendo como resultado, 66,67% para o ácido cítrico, e de 65,30% para o ÁT à 441,56°C e para WPC foi de 70,09%, indicando que sua adição melhorou a estabilidade térmica das nanopartículas.

A massa residual foi de 33,32%, 34,69% e 29,90% respectivamente, uma vez que, a massa residual encontrada em temperaturas acima de 400°C, pode estar relacionada aos compostos orgânicos não degradados, bem como, à fração inorgânica dos compostos presentes nas amostras (CASSOL; NOREÑA, 2021). Em relação às principais bandas do espectro de FTIR, a banda próxima a 3292 cm^{-1} no espectro de WPC pode ser devido ao alongamento do grupamento N-H. A intensidade diminuída da banda relacionada à amida II (1542 cm^{-1}) no espectro de ÁC pode ser devido à reação de reticulação entre os grupos N-H das proteínas do soro do leite e os grupos carboxila do ácido cítrico, que resultou na diminuição da quantidade de grupos N-H. O espectro da amostra de ÁC não mostrou muitas diferenças se comparado ao do WPC, o que sugere que a estrutura em geral das proteínas foi preservada (SILVA et al., 2021). Os picos em 1542 e 1544 cm^{-1} são devido à amida II, correspondendo à flexão de N-H acoplada com C-N, característicos das estruturas proteicas (ANVARI; CHUNG, 2016; URANGA et al., 2019). As alterações observadas nas bandas de amidas após o processo de reticulação podem estar associadas à novas ligações amidas entre o ácido cítrico e as proteínas do soro do leite resultando em características distintas se comparadas às que ocorrem de forma natural nas proteínas do soro (ABAE et al. 2017). Ainda, no espectro das amostras reticuladas, as que utilizaram ácido tânico apresentaram picos em 1037 e 760 cm^{-1} e bandas próximas de 1038 cm^{-1} podendo ser um indicativo da presença do grupo C=O (CAMPAROTTO et al., 2023). As bandas próximas a 754 cm^{-1} são atribuídas à vibração C=C em anéis benzênicos (CASTRO; RODRÍGUEZ, 2012), estando provavelmente relacionadas com a estrutura terciária associada à reação entre os grupos hidroxila do ácido tânico e os grupos amida (SILVA et al., 2021).

Diferentemente das amostras retículas, para a amostra de WPC sem processo de reticulação não foram encontradas bandas no espectro, podendo ser um indicativo para a confirmação da incorporação do ÁT na formulação das nanopartículas.

CONCLUSÕES

Nanopartículas de WPC foram obtidas utilizando ÁC e ÁT como agentes reticulantes. O acompanhamento da cinética de reticulação demonstrou que o ácido tânico foi mais eficiente, devido à maior concentração de nanopartículas formadas. As análises térmicas e espectroscópicas indicaram que a reação entre as proteínas e os

reticulantes ocorreram. Esses resultados encorajam o prosseguimento dos estudos no sentido da formação de emulsões alimentícias e da encapsulação de compostos bioativos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha instituição que me forneceu todo o suporte necessário ao seu alcance para a realização deste projeto, as universidades parceiras e a Fundação Araucária por viabilizar recursos financeiros para o incentivo a pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ASSIS, Letícia Marques de et al. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. 2011. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/bjft/a/LKt5hYRHMhgQrzHZ4WdWxCp/?lang=pt&format=pdf>.
Acesso em: 10 set. 2023.

CASSOL, L.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation and accelerated stability testing of bioactive compounds of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1599–1610, 26 abr. 2021.

ESCAMILLA-GARCÍA, M. et al. Effect of Transglutaminase Cross-Linking in Protein Isolates from a Mixture of Two Quinoa Varieties with Chitosan on the Physicochemical Properties of Edible Films. **Coatings**, v. 9, n. 11, p. 736, 6 nov. 2019.

FARJAMI, T.; MADADLOU, A.; LABBAFI, M. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159–165, 1 ago. 2015.

MARTINELLI, Suellen Secchi; CAVALLI, Suzi Barletto. Alimentação saudável e sustentável: uma revisão narrativa sobre desafios e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 4251-4262, nov. 2019. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320182411.30572017>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/csc/a/z76hs5QXmyTVZDdBDJXHTwz/?lang=pt>. Acesso em: 10 set. 2023.

NAM, S. et al. A reinforced thermal barrier coat of a Na–tannic acid complex from the view of thermal kinetics. **RSC Advances**, v. 9, n. 19, p. 10914–10926, 2019.

WINKLER, H.; VORWERG, W.; SCHMID, M. Synthesis of hydrophobic whey protein isolate by acylation with fatty acids. **European Polymer Journal**, v. 62, p. 10–18, 1 jan. 2015.

SILVA, J. T. DO P. et al. Whey Protein Isolate Microgel Properties Tuned by Crosslinking with Organic Acids to Achieve Stabilization of Pickering Emulsions. 2021.