

NANOESTRUTURAS DE β -LACTOGLOBULINA E SUA CAPACIDADE DE ENCAPSULAR MOLÉCULAS BIOATIVAS

R. N. DA COSTA¹, W. C. LAURINDO¹, J. S. R. COIMBRA², A. B. MAGESTE³ e I. J. B. SANTOS¹

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia em Alimentos

³ Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Química

E-mail para contato: igorboggione@ufsj.edu.br

RESUMO – As proteínas do soro do leite além de apresentar alto valor nutricional, também apresenta propriedades técnico-funcionais interessantes para a indústria de alimentos. Portanto, o presente trabalho visa otimizar a obtenção de nanoestrutura de β -lactoglobulina, proteína do soro do leite, e aplicá-la como dispositivo encapsulador das moléculas bioativas, Quercetina e Vitamina B2. Obteve-se a melhor nanoestrutura com tamanho de 109,95 nm, por conseguinte, avaliou-se a propriedades técnico-funcionais de espuma e emulsão. O primeiro mostrou que a espuma formada pela proteína nanoestruturada possui estabilidade maior que a espuma formada pela proteína pura. O mesmo foi observado no teste de emulsão. A encapsulação do bioativo Quercetina apresentou eficiência de 85,16%. Entretanto, para a vitamina B2 não se obteve eficiência na encapsulação, sugerindo a hidrofobicidade da nanoestrutura de β -lactoglobulina. De modo geral, a β -lactoglobulina mostrou-se um excelente dispositivo encapsulador da quercetina.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é um dos grandes produtores de leite no mundo, ocupando em 2014 a 5ª colocação segundo o USDA (United States Department of Agriculture). Isto deve, ao aumento populacional que acarreta o maior consumo, levando à maior produtividade. Porém, para satisfazer essa demanda, as indústrias investem em tecnologias para elevar o volume de leite produzido, sendo que no Brasil, em 14 anos, o volume de leite quase dobrou, segundo o IBGE (PRESTES; PAYES, 2012; MILKPOINT, 2016).

Paralelamente ao crescimento leiteiro, há crescimento de seus derivados, como o queijo. Contudo, esse crescimento é preocupante, uma vez que para cada 1 kg de queijo gera-se 9 kg de soro. Este é prejudicial à natureza, pois há um potencial poluidor grande, se despejado sem tratamento (MILKPOINT, 2016; OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). Apesar dessas consequências muitas indústrias ainda descartam inadequadamente esse soro (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Devido a isso, a nanotecnologia surge como uma alternativa promissora para contornar o impacto gerado (OLIVEIRA *et al.*, 2012; ZAVAREZE *et al.*, 2010; ANTUNES, 2003), uma vez que as nanoestruturas de proteínas do soro do leite são consideradas seguras e possuem o potencial transportador e protetor de substâncias funcionais, são de alto valor nutricional e

apresentam propriedades técnico-funcionais interessantes para a indústria de alimentos (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012).

Dessa forma, os nutracêuticos, moléculas bioativas com propriedades nutricionais e farmacológicas, podem ser encapsuladas nessas nanoestruturas, aumentando sua biodisponibilidade no organismo. Assim, este trabalho propõe avaliar a obtenção e caracterização de nanoestruturas de β -lg, determinação de suas propriedades técnico-funcionais sua eficiência de encapsular a Quercetina e a Vitamina B2, dois nutrientes importantes para o ser humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A β -lg foi gentilmente cedida pela Davisco Foods International (Minnesota, EUA). A Quercetina e a Vitamina B2 foram adquiridas da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). O NaCl era de grau analítico da Exodus Scientific (São Paulo, Brasil). A água destilada foi purificada por osmose inversa Hidrotek (Santa Iria de Azóia, Portugal). E os outros reagentes foram de grau analítico sem purificações adicionais.

2.2 Métodos

Delineamento Experimental: as nanoestruturas de β -lactoglobulina foram obtidas via tratamento Box-Behnken com as variáveis temperatura, NaCl e tempo de aquecimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições usadas no delineamento experimental para formação de β -lg nanoestrutura.

NPs*	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaCl (mmol. L ⁻¹)
1	62,5	120	0
2	25	60	0
3	100	60	0
4	62,5	120	50
5	62,5	60	25
6	100	120	25
7	25	60	50
8	100	10	25
9	25	120	25
10	62,5	10	50
11	62,5	60	25
12	25	10	25
13	62,5	10	0
14	62,5	60	25
15	100	60	50

Teste de Espuma: amostras de nanoestrutura foram homogeneizadas em Ultra Turrax (Biovera, Brasil), com posterior medição da altura da espuma em intervalos de tempo para calcular o aumento de volume (VI) e estabilidade da espuma (FS), pelas as equações 1 e 2.

$$VI = \left[\frac{\left(\frac{V_T}{V_E} \right) - V_T}{V_T} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$FS = \left(\frac{V_{Et}}{V_{Et0}} \right) \quad (2)$$

No qual V_t é o volume total da solução, e V_E é volume da espuma e V_{Et} e V_{Et0} são volumes de espuma correspondente ao tempo t (30, 60 e 120 min) e tempo zero, respectivamente.

Teste de Emulsão: O Índice de Atividade do Emulsionante (IAE) da proteína nativa e nanoestruturada foi determinado segundo CAMERON et al. (1991). Para isso, óleo de girassol, água destilada e dispersão de proteína foram agitados em Ultra Turrax. Em intervalos de tempo, retirou-se alíquotas do fundo de cada emulsão, diluiu-se em solução de SDS a 0,1% (m/v) e a absorvância foi medida a 500 nm em um espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology (São Paulo, Brasil). O IAE e a estabilidade da espuma (ESI) foram calculados de acordo com a Equação 3 e 4, respectivamente.

$$IAE(m^2 g^{-1}) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0 \times FD}{c \times (1 - \theta) \times 1000} \quad (3)$$

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_t} \quad (4)$$

No qual A_0 é absorvância da emulsão diluída no tempo zero, FD é fator de diluição, c é a concentração inicial da proteína (g/mL) e θ é fração do óleo para formar emulsão.

Encapsulação: adicionou-se diferentes concentrações de quercetina e vitamina B2 em microtubos previamente pesados, juntamente com a dispersão de nanoestrutura de proteína. Ressalta-se que Quercetina e Vitamina B2 foram encapsuladas separadamente. Agitou-se as amostras manualmente por 5 minutos, centrifugou-se e recolheu-se e diluiu-se o sobrenadante para leitura no espectrofotômetro UV-Vis a 373 nm (Quercetina) e 445 nm (Vitamina B2) para obtenção da eficiência da encapsulação EE (%) pela equação 5. Incubou-se o pellet em estufa a 50 ° C por 48 horas para secagem e posterior pesagem. Pela subtração da massa de cada eppendorffs obtém o valor de W_{np} na equação 6. Então, o valor da capacidade de ligação (LC) somente da quercetina na nanoestrutura foi calculado pela equação 6.

$$EE(\%) = (W_{total} - W_{livre}) 100 / W_{total} \quad (5)$$

$$C(LC(\%)) = (W_{total} - W_{livre}) 100 / W_{np} \quad (6)$$

3. RESULTADOS

3.1 Delineamento Experimental

A Tabela 2 mostra os tamanhos e o índice de polidispersividade das estruturas obtidas pelo tratamento térmico.

Tabela 2 - Valores de Tamanho (nm) e PDI (Polidispersividade) das amostras analisadas no equipamento Nanozeta Sizer Malvern (Inglaterra, Reino Unido).

NP's	Tamanho (nm) Média ± Sd	PDI Média ± Sd
1	356,62 ± 58,07	0,4315 ± 0,0319
2	285,13 ± 63,35	0,5745 ± 0,1889
3	581,70 ± 180,12	0,6203 ± 0,1261
4	416,37 ± 71,42	0,4750 ± 0,0733
5	204,40 ± 80,80	0,3422 ± 0,0451
6	105,00 ± 13,71	0,4328 ± 0,0484
7	142,52 ± 22,31	0,4308 ± 0,0542
8	159,73 ± 41,37	0,3982 ± 0,0449
9	178,78 ± 69,43	0,3412 ± 0,0488
10	274,16 ± 174,14	0,4353 ± 0,1853
11	147,24 ± 59,38	0,3093 ± 0,0353
12	363,83 ± 224,38	0,4235 ± 0,1404
13	349,47 ± 106,88	0,5662 ± 0,2079
14	177,66 ± 96,06	0,2970 ± 0,0590
15	109,95 ± 0,68	0,4062 ± 0,0539

Em acordo com USKOKOVIĆ (2007), nanoestruturas são materiais com tamanho entre 1 a 300 nm. Portanto, a melhor nanoestrutura obtida foi no tratamento 15 com o tamanho de 109,95 nm e PDI (Polidispersividade) de 0,4062. Segundo Madalena et al. (2016), o PDI próximo de 0,4 indica boa polidispersividade. Portanto, os demais testes foram realizados com a nanoestrutura do tratamento 15.

3.2 Teste de espuma

A Tabela 3 mostra a estabilidade da espuma das nanoestruturas obtidas e da proteína nativa.

Tabela 3 - Valores de VI e FS obtidos para cada amostra. Onde FS30, FS60 e FS120 são os valores de FS nos intervalos 30, 60 e 120 min, respectivamente.

	Proteína Pura	Nanoestrutura
VI	16,98 ± 0,71	21,43 ± 1,41
FS30	22,22 ± 0	66,67 ± 0
FS60	7,78 ± 0,21	50,00 ± 0
FS120	0,00 ± 0	33,33 ± 0

A nanoestrutura obteve uma melhor propriedade de espuma que a proteína nativa. Este resultado é corroborado por LEMAN; DOGA (2003), os quais constataram que o tratamento térmico da β -lactoglobulina, não nanoestruturada, provoca a diminuição da capacidade de formação de espuma, enquanto que essa característica é aumentada para a proteína nanoestruturada.

3.3 Teste de emulsão

A Tabela 4 mostra a propriedade emulsificante da nanoestrutura obtida em relação à proteína nativa.

Tabela 4 - Valores de IAE (m^2g^{-1}) e ESI para a nanoestrutura e proteína pura.

	Nanoestrutura	Proteína Pura
IAE (m^2g^{-1})	118	152,91
ESI	192	124,5

Apesar do Índice de Atividade Emulsificante (IAE) da nanoestrutura ter sido baixo se comparado ao da proteína pura, seu valor de Estabilidade da Emulsão (ESI) foi maior. O ESI é de maior interesse, pois prova que a nanoestrutura tem maior capacidade de estabilizar a emulsão ao longo do tempo.

3.3 Encapsulamento

A Tabela 5 mostra a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação da quercetina nas nanoestruturas obtidas.

Tabela 5- Eficiência de encapsulação EE(%) em função da concentração de Quercetina na dispersão de β -lg.

Concentração de Quercetina ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	EE (%)	LC (%)
25	17,13095	6,9081
50	38,7197	8,1275
100	59,022	17,7053
150	67,1004	31,78357
300	85,1651	40,7551
600	83,5386	41,6298

A nanoestrutura de β -lg foi capaz de encapsular a quercetina, composto hidrofóbico, com eficiência máxima de 85,16%, porém não encapsulou a vitamina B2, hidrofílica. Portanto, isto sugere que a β -lg nanoestruturada apresenta uma superfície hidrofóbica.

A maior eficiência de encapsulação [EE(%)] está relacionada à maior capacidade de ligação [LC(%)], pois quanto maior EE(%) maior o LC(%). Não foi possível comparar os resultados obtidos com dados disponíveis na literatura, uma vez que nenhum trabalho com este sistema foi publicado até o momento. No entanto, Souza et al. (2014) obteve EE(%) superior a 95% encapsulando quercetina com nanopartículas de lecitina/quitosana, com concentrações variadas de quercetina (50, 70 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Apesar de no presente trabalho o dispositivo encapsulador ter sido diferente (nanopartículas de β -lg), ambos resultados foram obtidos com sucesso.

4. CONCLUSÃO

Nanoestruturas de β -lactoglobulina foram obtidas sob as condições de 100°C, NaCl a 50mmol L⁻¹ por 60 minutos. As nanoestruturas possibilitaram uma eficientemente encapsulação da quercetina, 85,16%, o que sugere que a superfície da nanoestrutura é hidrofóbica. Os experimentos mostraram ainda, que as nanoestruturas de β -lg possuem significativa estabilidade de espuma e emulsão. Além disso, os resultados sugerem que a encapsulação de quercetina por nanopartículas de β -lg pode ser utilizado como uma alternativa pertinente na adição de nutracêuticos aos alimentos, como também uma maneira de proteger a molécula bioativa contra condições adversas no processamento industrial e tornar mais eficiente a sua liberação e absorção no organismo.

5. REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*, Dairy Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt, v. 65, n. 1, 2012.
- ANTUNES, A. J. *Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino*. 1. ed. 1. Barueri: Manole, p. 142, 2003.
- CAMERON, D. R.; WEBER, M.E.; IDZIAK, E.S.; NEUFELD, R.J.; COOPER, D.G. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.39, n.4, p.655-659, Apr. 1991.
- LEMAN, J.; DOGA, T. Effect of temperatura and high pressure on the foaming properties of beta-lactoglobulin salted out at pH 2. *Commun Agric Appl Biol Sci*, v. 68, n. 2, pt. B, p. 489-492, 2003.
- MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; XAVIER MALCATA, F.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. In vitro digestion and stability assessment of β -lactoglobulin/riboflavin nanostructures. *Food Hydrocolloids*, Portugal, v. 58, p. 89-97, 2016.
- MILKPOINT. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>> Acesso em: 18 de julho de 2016.
- OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Paraná*, v. 67, n. 385, p. 64-71, mar./abr., 2012.
- PRESTES, M. J.; PAYES, M. A. M. *Crescimento da indústria de laticínios no Brasil*. Sorocaba, SP, 2012. 19p.
- SOUZA, M. P.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan nanoparticles for functional food applications. *Food Bioprocess Technol*, Nova York, v. 7, p. 1149-1179, 2014.
- TAVARES, G. M.; CROGUENEC, T.; CARVALHO, A. F.; BOUHALLAB, S. Milk protein as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*, Rennes, France, v. 37, p. 5-20, 2014.
- USKOKOVIĆ, V. **Nanotechnologies: What we do not know**. *Technology in Society* v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.
- ZAVAREZE, E. R.; MORAES, K. S.; SALAS- MELLADO, M. M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.1, p.102-106, 2010.