

FERNANDA LOPES DA SILVA

**EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE
CRESCIMENTO TGF BETA EM LÁCTEOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T

S586e
2015
Silva, Fernanda Lopes da, 1989-
Efeito do processamento na concentração do fator de
crescimento TGF beta em lácteos / Fernanda Lopes da Silva. –
Viçosa, MG, 2015.
xvi, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Leite cru. 3. Proteínas.
4. Caseína. 5. Crescimento. 6. Microfiltração. 7. Tratamento
térmico. 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. 664

FERNANDA LOPES DA SILVA

**EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE
CRESCIMENTO TGF BETA EM LÁCTEOS**

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

APROVADA: 07 de agosto de 2015.

Rodrigo Stephani

Michele da Silva Pinto
(Coorientadora)

Prof. Ítalo Tuler Perrone
(Coorientador)

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

Com enorme gratidão e carinho à minha família que amo:

Meus pais Daniel e Carminha

Meu irmão Lucas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades e desafios que me foram dados durante a vida, por sempre estar ao meu lado iluminando os meus caminhos e me dando força nos momentos difíceis. Nada foi ao acaso, obrigada Senhor fonte de força para superar os obstáculos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso. E à FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao meu orientador Prof. Antônio Fernandes de Carvalho por acreditar em mim, pela orientação e dedicação durante todo o trabalho e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Ítalo Tuler Perrone, não somente por orientar meus passos acadêmicos, mas pelo zelo, pela amizade, pelo companheirismo e apoio.

À Michele da Silva Pinto pelas valiosas sugestões e ensinamentos compartilhados.

Ao Rodrigo Stephani pela contribuição e receptividade ao convite.

Ao pesquisador Pierre Schuck pelas sugestões e participações ao trabalho.

Ao Laticínio Funarbe, por disponibilizar a indústria nos dias de realização dos experimentos.

Aos meus pais, Daniel e Carminha, por me terem dado a vida, além de todo o amor e carinho incondicional. Por me darem todo apoio e me motivarem a seguir em frente e por serem exemplos de caráter, transmitindo assim os valores que carregarei para o resto da minha vida. Ao meu irmão, Lucas, pelo companheirismo e pelos momentos vividos juntos.

Às amigas, Isabelle e Daniela, pelo companheirismo e amizade durante os momentos de alegria e de tristeza. Por estarem sempre dispostas a me ouvir e me dar suporte para continuar. Sem vocês o mestrado não seria o mesmo.

Ao meu namorado, Felipe, grande companheiro de todos os momentos e grande incentivador em cada conquista.

Às minhas eternas amigas da turma EAL 2008, Hiani, Samira e Jamille, pelos anos de carinho e amizade, nunca deixando de me apoiar, mesmo não estando sempre por perto.

A todos os meus grandes amigos, que me acompanham desde a infância, e que de alguma forma, fizeram parte destes anos de trabalho, especialmente, Camila, Wanderson, Isabela (Belinha), Larissa, Izabela e Rafael (Bolinha).

Aos amigos de laboratório, Cleuber, Moises, Guilherme, Ariel, Angélica, Déborah, Jane e Ezequiel, que me ajudaram na execução do trabalho, pois sem eles nada disso seria possível.

Aos demais amigos do Laboratório de Pesquisa de Leite e Derivados: Márcio, Mayra, Maura, Rosângela, Tatiana, Gleiser, Michele, Federico, André, Thamires, Luiza, Camila, Paulete, Beatriz, Débora, Iara e Andreza. Aos amigos que já deixaram o Laboratório: Larissa, Paulo Henrique e Rafael. Pela amizade durante esses 3,5 anos vividos nesse laboratório.

Ao amigo Jansen pelas conversas e troca de conhecimento.

Aos meus familiares, avós, tios, primos, por não terem medido esforços e carinho para que eu chegasse até aqui, principalmente, aos meus padrinhos Rita e Marcos pela presença constante e incentivo.

Ao Paulo Alexandre, pela ajuda com o experimento de calorimetria, por toda a paciência e troca de conhecimento e auxílio.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada.

“Dai graças ao Senhor, eterna é a sua misericórdia!”

(Salmo 118).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá).

BIOGRAFIA

Fernanda Lopes da Silva, filha de Daniel Correa da Silva e Maria do Carmo Lopes da Silva, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 15 de agosto de 1989.

Em março de 2008, iniciou o curso de Graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa e graduou-se em julho de 2013. Em agosto deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos, submetendo-se à defesa de dissertação em agosto de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Leite e soro	3
2.2. Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)	4
2.2.1. Separação, isolamento e concentração	6
2.2.2. Ativação	9
2.2.3. Quantificação	11
2.3. Análises térmicas	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo geral	23
4.2. Objetivos específicos	23
Capítulo 1 - Aplicação de diferentes tecnologias para concentração do fator de crescimento TGF- β 2 em lácteos	24
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Preparo das amostras	27
2.2. Utilização das técnicas de membrana	27
2.3. Utilização de tratamento térmico	28
2.3.1. Pasteurização do leite	28
2.3.2. Produção de queijo	28
2.4. Quantificação do TGF beta	29
2.5. Calorimetria de titulação isotérmica	29
2.6. Análise estatística	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

3.1. Quantificação do TGF- β 2	30
3.2. Estudo das interações do TGF- β 2 com as frações das proteínas do leite.....	34
4. CONCLUSÃO	37
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	38
Capítulo 2 - Efeito do processamento na concentração do TGF- β 2	41
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Preparo das amostras.....	43
2.2. Microfiltração.....	44
2.2. Pasteurização.....	44
2.3. Evaporação a vácuo.....	45
2.4. Secagem	45
2.5. Composição das amostras	45
2.6. Análise estatística	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. Composição centesimal das amostras	46
3.2. Efeito da pasteurização sobre o leite, soro e caseína	48
3.3. Efeito da concentração por evaporação a vácuo e secagem por spray dryer	50
3.4. Simulação de rotas de processamento.....	52
4. CONCLUSÃO	53
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	54
5. CONCLUSÃO GERAL	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do TGF- β 2 baseado no banco de dados de proteínas. Fonte: PDB (2015).....	6
Figura 2 - Ilustração esquemática da distribuição por massa molar (MW) e ponto isoelétrico de proteínas e os fatores de crescimento presentes no leite. Fonte: Pouliot e Gauthier (2006).....	7
Figura 3 - Distribuição da concentração total e ativada do TGF- β 2 na fração de caseína ácida (a), fração de caseína ultracentrifugada (b), fração de soro ácido (c) e fração de soro ultracentrifugado (d) após tratamentos térmicos. Barras pretas mostram a concentração do TGF- β 2 e barras cinzas a concentração de TGF- β 2 ativado. Fonte: Ollikainen (2011).	11
Capítulo 1 - Aplicação de diferentes tecnologias para concentração do fator de crescimento TGF-β2 em lácteos	
Figura 1 - Concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral, com a utilização de técnicas de membrana (esquerda) ou tratamento térmico (direita).	27
Figura 2 - Curvas de ITC (topo) e isotermas de ligação (parte inferior) correspondentes à titulação da solução de TGF- β 2 (26 nM) nas soluções de (A) α -caseína (26 μ M), (B) β -caseína (26 μ M), (C) k-caseína (26 μ M), (D) α -lactoalbumina (26 μ M) e (E) β -lactoglobulina (26 μ M) à 25 °C. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. 35	
Capítulo 2 - Efeito do processamento na concentração do TGF-β2	
Figura 1 - Concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral, com a utilização de técnicas de membrana ou tratamento térmico, evaporação a vácuo e secagem por spray dryer.....	43
Figura 2 - Relação da porcentagem de proteína com a concentração de TGF- β 2 encontrada em cada uma das amostras (n=3).	48
Figura 3 – Rotas de produção de concentrados proteicos, onde é apresentado os fatores de concentração a cada etapa e foi atribuído um valor para a concentração inicial de TGF- β 2 no leite cru.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações na concentração dos fatores de crescimento reportados para colostro e leite bovino.....	5
Capítulo 1 - Aplicação de diferentes tecnologias para concentração do fator de crescimento TGF-β2 em lácteos	
Tabela 1 - Concentração do TGF- β 2 nas amostras, de acordo com a aplicação do tratamento térmico ou não e taxa de recuperação de componente (Tr) do TGF- β 2 em cada uma das etapas do processamento (n=3).....	30
Capítulo 2 - Efeito do processamento na concentração do TGF-β2	
Tabela 1 - Composição centesimal das amostras (n=3).	477
Tabela 2 - Efeito da pasteurização no conteúdo de TGF- β 2 no leite, soro e caseína (n=3).	49
Tabela 3 – Fator de concentração do TGF- β durante o processo de evaporação a vácuo e secagem por spray dryer para o leite, soro, soro ideal e caseína (n=3).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- ΔG – Energia Livre de Gibbs.
- ΔH – Variação de entalpia.
- ΔS – Variação de entropia.
- ANOVA – Análise de variância.
- AOAC – Association of Oficial Analytical Chemists.
- CAS – Caseína.
- CMP – Caseína micelar em pó.
- CLE – Concentrado leite.
- CSO – Concentrado soro.
- CSI – Concentrado soro ideal.
- DF – Diafiltração.
- FC – Fator de concentração.
- IN – 62 – Instrução Normativa nº 62.
- ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica.
- LC1 – Leite cru estábulo UFV.
- LC2 – Leite cru laticínios UFV.
- LEM – Leite microfiltrado.
- LEP – Leite pasteurizado (72 °C/15 s).
- LPL – Leite pasteurizado (65 °C/ 30 minutos).
- LPO – Leite em pó.
- MF – Microfiltração.
- MW – Massa molar.
- pH – Potencial hidrogeniônico.
- pI – Ponto Isoelétrico.
- QUE – Queijo.
- RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade.
- SIP – Soro ideal em pó.
- SOR – Soro.
- SPO – Soro em pó.

SRI – Soro ideal em pó.

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta.

UF – Ultrafiltração.

UFV – Universidade Federal de Viçosa.

UHT – Ultra alta temperatura.

RESUMO

SILVA, Fernanda Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Efeito do processamento na concentração do fator de crescimento TGF beta em lácteos.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Ítalo Tuler Perrone e Michele da Silva Pinto.

Este trabalho teve como objetivos desenvolver um concentrado de proteínas lácteas em pó com alta concentração do fator de crescimento TGF- β e verificar como o processamento afeta a concentração do TGF- β , bem como analisar a interação que ocorre entre o TGF- β e as proteínas presentes no leite. Primeiramente, procedeu-se ao desenvolvimento do concentrado proteico, empregando técnicas de membrana (microfiltração) e dois tipos de tratamento térmico (pasteurização lenta e pasteurização rápida), e etapas de concentração a vácuo e secagem em spray dryer foram aplicadas. Foi utilizado no processamento leite cru integral proveniente de duas fontes distintas, sendo o primeiro deles obtido no estabulo da UFV e o segundo obtido no tanque de refrigeração do laticínios escola da UFV. A cada etapa do processamento foram retiradas amostras para verificar a composição centesimal e quantificar o TGF- β presente. Além disso, análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi empregada para avaliar a interação que ocorre entre o TGF- β e as proteínas do soro e caseínas. A composição centesimal das amostras (proteínas, cinzas, extrato seco, gordura e lactose) estava dentro do previsto pelos regulamentos técnicos de identidade e qualidade (IN-62 e RTIQ – soro de leite). Os valores encontrados para o teor de TGF- β presente no leite cru está dentro do descrito na literatura, mas houve diferença na concentração do TGF- β nos leites crus empregados, sendo que o leite cru refrigerado (23,60 ng·mL⁻¹) apresentou valores maiores em relação ao leite cru recém ordenhado (17,43 ng·mL⁻¹), possivelmente pela ativação do TGF- β pela plasmina e enzimas proteolíticas presentes no leite. O TGF- β não é degradado pela pasteurização, no entanto a pasteurização rápida foi mais eficiente em recuperar esse componente em relação à pasteurização lenta, devido a maior degradação dos componentes que ocorrem nesta o que afeta a concentração do TGF- β . A pasteurização afeta a distribuição do TGF- β nas frações de proteínas do soro e caseína, o que pode ser observado na redução do teor de TGF- β 2 no soro quando foi aplicado um tratamento térmico. Diferentemente de quando se aplicou a microfiltração e o

TGF- β 2 distribuiu-se igualmente entre a caseína e o soro. A concentração por evaporação a vácuo apresentou fator de concentração menor que 1 na concentração do TGF- β , pois observou-se maior concentração dos demais constituintes em relação ao TGF- β . Diferentemente da secagem em spray dryer que apresentou um fator de concentração maior que 1, mostrando que TGF- β 2 é concentrado em maior quantidade que os demais constituintes sólidos das amostras. O uso das técnicas de membrana foi mais eficiente em concentrar o TGF- β 2 tanto para o soro quanto para a caseína, quando comparado com as frações obtidas com o uso de tratamento térmico. A caseína micelar em pó (253,07 ng·mL⁻¹) foi o concentrado proteico que obteve maiores valores para a concentração do TGF- β 2 nas condições estudadas, seguido pelo leite em pó (132,60 ng·mL⁻¹). TGF- β 2 apresentou forte correlação (0,95) com o teor de proteína presente nas amostras. Na análise de ITC observou-se que a interação do TGF- β com as proteínas presentes no soro é exotérmica, além disso, TGF- β 2 interagiu preferencialmente com as caseínas em relação as proteínas do soro, pois foi observado valores maiores de energia na primeira injeção.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Effect of processing in the concentration of TGF beta growth factor in milk.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Ítalo Tuler Perrone and Michele da Silva Pinto.

This study aimed to develop a concentrated milk protein powder enriched with TGF- β growth factor and verify how processing affects the concentration of TGF- β , as well as analyzing the interaction that occurs between TGF- β and the proteins in milk. First, it proceeded to the development of the protein concentrate using membrane techniques (microfiltration) and two types of thermal treatment (slow pasteurization and pasteurization), and vacuum concentration and spray drying step were applied. It was used in processing raw milk from two distinct sources, the first obtained in the stables of UFV and the second obtained in the refrigeration tank dairy school UFV. Every step of processing samples was taken to check the chemical composition and quantify the TGF- β . Also, calorimetric isothermal titration was employed to evaluate the interaction that occurs between TGF- β and whey proteins and caseins. The chemical composition of the samples (protein, ash, dry matter, fat and lactose) was within the expected technical regulations for identity and quality (IN-62 and RTIQ – whey). The values found for TGF- β content present in the raw milk are described in the literature, but difference was observed in TGF- β concentration in raw milk employed, and the refrigerated raw milk ($23.60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed higher values compared to raw milk recently milked ($17.43 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), possibly by TGF- β activation by plasmin and proteolytic enzymes present in milk. TGF- β is not degraded by pasteurization, however the pasteurization was more efficient in recovering this component in relation to slow pasteurization due to higher degradation of this component occurring which affects the concentration of TGF- β . Pasteurization affects the distribution of TGF- β in the whey proteins and casein fractions which can be observed in the reduction of TGF- β 2 content in whey when a heat treatment was applied. Differently from when applied to microfiltration and TGF- β 2 was equally distributed between the casein and whey. The concentration by vacuum evaporation presented lower ratio to 1 in the concentration of TGF- β , as there was higher concentration of other constituents in relation to the TGF- β . Differently from the spray drying showed that a ratio greater than 1, showing that TGF- β 2

is concentrated in greater amounts than the other solid constituents of the sample. The use of membrane techniques was more effective to concentrate TGF- β 2 for both, whey and casein, as compared with the fractions obtained with the use of heat treatment. The micellar casein powder (253.07 ng·mL⁻¹) was the protein concentrate that had higher values for the concentration of TGF- β 2 under the conditions studied, followed by milk powder (132.60 ng·mL⁻¹). TGF- β 2 showed a strong correlation (0.95) with the protein present in the samples. In ITC analysis showed that the interaction of TGF- β with the proteins present in whey is exothermic, furthermore, TGF- β 2 preferably interacted with casein in relation to the whey proteins, it was observed higher energy values in the first injection.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite é objeto de estudo científico há muitos anos e pode ser classificado e definido quanto a sua função nutricional ao neonatal, quanto à sua complexa estrutura e composição química, quanto à sua aptidão ao processamento industrial e quanto aos atributos impostos pelos órgãos de normatização e fiscalização (Sgarbieri, 1996). Os benefícios do consumo de leite de vaca e seus derivados lácteos pelos humanos estão associados principalmente à quantidade e biodisponibilidade do cálcio, de aminoácidos e de ácidos graxos essenciais. Recentemente muitos estudos enfatizam a importância das proteínas e dos peptídeos bioativos presentes no leite, bem como mecanismos para a sua utilização na formulação de novos produtos lácteos (Ollikainen & Muuronen, 2013; Tung et al., 2013; Chen, Jheng & Shyu, 2013; Nagpal et al., 2012; Smithers, 2008).

Os fatores de crescimento presentes no leite tem atraído interesse da comunidade científica como potenciais ingredientes bioativos para a indústria de alimentos, podendo ser explorados na produção de alimentos funcionais para crianças ou para administração em terapias contra doenças intestinais (Smithers, 2004). O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) estimula o crescimento de células, especialmente do tecido conectivo, participa na formação de ossos e cartilagens, no controle do sistema imune e na cicatrização de feridas (Gauthier, Pouliot & Maubois, 2006). Na literatura científica estão associados ao TGF- β o controle da inflamação intestinal, como a doença de Crohn (Oz, Ray, Chen & McClain, 2004; Fell et al., 2000; Fell et al., 1999; Howarth, 1996).

Os fatores de crescimento TGF- β compreendem uma família de proteínas que incluem os TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, possuindo a função de regular o desenvolvimento do tecido mamário (Vries, Casey, Dover, Vanderhaar & Plaut, 2011). A forma predominante no leite é a TGF- β 2 (85%), apresentando-se após ativação ácida, ligado a uma proteína, na forma de dímeros e com massa molar de 25 kDa (Michaelidou & Steijins, 2006).

Muitas formas de isolamento do TGF- β já foram elucidadas, no entanto, pouco se sabe ainda, sobre mecanismos que possibilitem o isolamento em altas concentrações desse fator de crescimento a partir do leite e soro, dificultando assim a obtenção desses concentrados proteicos com alto teor de TGF- β . Isso porque embora se saiba que há uma grande relação sobre o histórico de tratamento térmico com a quantidade presente de TGF- β e o seu isolamento nas diferentes frações de proteínas do leite, pouco se sabe ainda sobre

quais são as interações intra e intermoleculares que regem essas interações do TGF- β com as frações de proteínas do leite de acordo com o tipo de tratamento térmico utilizado.

Assim, diante do exposto o objetivo geral deste trabalho foi estudar a melhor forma de concentrar o TGF- β presente no leite e soro e desenvolver um concentrado proteico em pó com uma concentração elevada desse fator de crescimento TGF- β . Para o melhor entendimento esse trabalho foi dividido em 2 capítulos, a saber:

Capítulo 1 - Aplicação de diferentes tecnologias para concentração do fator de crescimento TGF- β 2 em lácteos.

Capítulo 2 - Efeito do processamento na concentração do TGF- β 2.

No capítulo 1 determinou-se a melhor forma de obter um concentrado proteico com alta concentração do fator de crescimento TGF- β 2 obtido a partir de leite bovino. Para tanto se utilizou técnicas de membranas para fracionar o leite em caseína e proteínas do soro; fabricação de queijo; pasteurização do leite; e evaporação e secagem por spray dryer para obter produtos em pó. Neste capítulo ainda foi apresentado o estudo da interação do TGF- β 2 com as proteínas do soro e as caseínas utilizando calorimetria de titulação isotérmica. No capítulo 2 avaliou-se como os diferentes processamentos mostrados no capítulo 1 afetaram o fracionamento do TGF- β 2 nas frações de caseína e de proteínas do soro, assim como no leite em pó.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite e soro

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias é um sistema coloidal, formado por uma fase contínua que é constituída por água, lactose e alguns sais solúveis, e várias fases dispersas, que são glóbulos de gordura, micelas de caseínas, proteínas do soro etc. Possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie (Sgarbieri, 1996).

O leite é um alimento complexo que contém água ($87,30 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$); carboidratos, basicamente lactose ($4,90 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$); gorduras ($3,8 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$); proteínas ($3,3 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$), principalmente caseína; minerais ($0,72 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e vitaminas. Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1952), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Existem vários fatores que afetam a composição do leite tais como: espécie, raça, indivíduo, idade da vaca, estágio de lactação, alimentação, estações do ano, estado de saúde da vaca, dentre outros.

O leite bovino é comercializado em sua forma líquida integral ou desengordurado e pasteurizado ou esterilizado. Essas mesmas formas são também comercializadas desidratadas, como leite em pó.

O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios que representa a porção aquosa do leite que se separa em coágulo durante a fabricação de queijo ou da caseína, apresentando-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (Guimarães, Teixeira & Domingues, 2010; Giraldo-Zuñiga, 2004).

O soro pode ser obtido por três processos principais: pelo processo de coagulação enzimática (quimosina), resultando no coágulo de caseínas, matéria-prima para a produção de queijos e no soro “doce”; por meio de precipitação ácida no pH isoeletrico (pI), resultando na caseína isoeletrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido; ou por separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado proteico (Sgarbieri, 2004).

Os conhecimentos sobre os mecanismos de ação fisiológica das proteínas do soro de leite são ainda muito incompletos, particularmente pouco se conhece sobre as funções e os benefícios de inúmeros componentes menores (natureza proteica ou não proteica) presentes no soro e recuperados em maior ou menor proporção nos isolados proteicos.

No conjunto, essas substâncias têm sido chamadas de fatores de crescimento celular, incluindo neste grupo, além da lactoferrina, uma série de polipeptídios, incluindo os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II), fatores ácidos e básicos de estímulo ao crescimento de fibroblastos (aFGF, bFGF), fatores de crescimento transformador beta (TGF- β 1 e TGF- β 2), além de vários outros (Sgarbieri, 2004).

Fatores de crescimento derivados do leite são hoje em dia cada vez mais usados em produtos relacionados à saúde, tais como no tratamento de pele, distúrbios e doenças gastrointestinais. Estes fatores de crescimento podem ser extraídos a partir de leite, colostro ou soro e diferentes abordagens tecnológicas já foram desenvolvidas.

2.2. Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)

O leite bovino é uma rica fonte de proteínas. Além dos grandes componentes, ou seja, proteínas do soro (principalmente α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e as caseínas, o leite contém também um grande número de pequenos componentes que têm vários tipos de atividades biológicas (Pakkanen & Aalto, 1997). Estes incluem os fatores de crescimento, dos quais, os mais abundantes no leite bovino e no colostro são: o IGF-I, TGF- β 2, alguns membros do fator de crescimento epidérmico (EGF) e da família dos fatores de crescimento fibroblasto básico (bFGF). A Tabela 1 resume os dados experimentais disponíveis sobre o conteúdo desses fatores de crescimento em colostro e leite.

Tabela 1 - Variações na concentração dos fatores de crescimento reportados para colostro e leite bovino.

Fatores de crescimento	Concentração (ng·mL ⁻¹)	
	Colostro	Leite
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	4-325	1-150
Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)	100-2000	5-100
Fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II)	150-600	5-100
Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1)	10-50	< 5
Fator de crescimento transformador beta 2 (TGF-β2)	150-1150	10-70
Fator de crescimento do fibroblasto (FGF)	NA	< 1
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	NA	NA

NA: presente, mas não há dados de concentração disponível.

FONTE: Gauthier et al. (2006).

Fator de crescimento transformador beta é o nome genérico para uma família de polipeptídios com diversos tipos de funções biológicas. A família do TGF-β é composta pelo TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, sendo que a isoforma TGF-β2 é a principal presente no leite bovino e a isoforma TGF-β3 não é encontrada neste substrato. Os TGF-βs desempenham um papel importante na embriogênese, na reparação de tecidos, na formação de ossos e cartilagem e no controle do sistema de resposta imune. Eles são conhecidos por estimular a proliferação de algumas células, especialmente em tecidos conjuntivos, enquanto agem como inibidores de outras células, tais como linfócitos e células epiteliais (Massaque, 1990; Pouliot & Gauthier, 2006). Todas as três isoformas apresentam mais que 97% de homologia na sequência de aminoácidos e exibem um elevado grau de atividade cruzada entre as espécies (Massaque, 1990; Meager, 1991).

A molécula de TGF-β2 é um homodímero constituído por 68 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 25 kDa, sendo que quatro ligações dissulfeto estabilizam cada monômero e uma ligação dissulfeto estabiliza o dímero. TGF-β1 é o único outro membro da família TGF-β encontrado no leite, mas ocorre em concentrações muito menores (Ginjala & Pakkanen, 1998; Montoni et al., 2009).

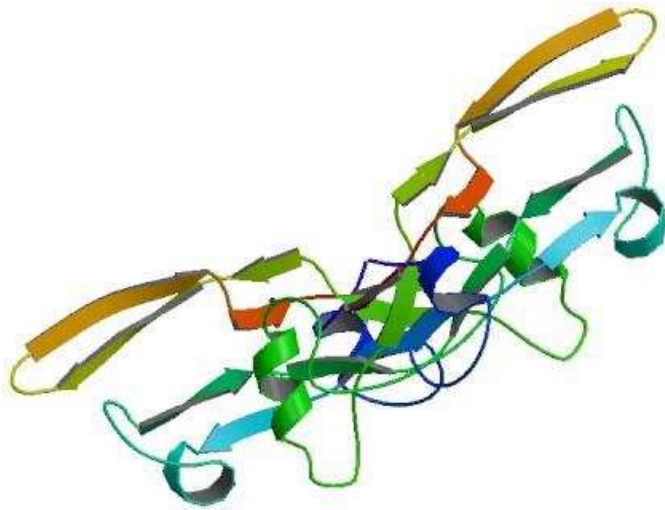


Figura 1 – Estrutura do TGF- β 2 baseado no banco de dados de proteínas. Fonte: PDB (2015).

Fatores de crescimento transformador beta são secretados a partir de células como um latente complexo contendo TGF- β e seu propeptídeo, LAP (peptídeo latente associado). Na maioria das células, o LAP está ligado de forma covalente a uma proteína adicional, a proteína de ligação latente do TGF- β (LTBP) por ponte dissulfeto, formando um grande complexo latente. A ativação desse complexo envolve perturbação da interação não covalente entre o LAP e o TGF- β (Gleizes et al., 1997; Saharinen, Taipale & Keski-Oja, 1999). A estrutura cristalina do TGF- β 2 está apresentada na Figura 1.

2.2.1. Separação, isolamento e concentração

O fracionamento dos fatores de crescimento a partir do leite ou colostro envolve as diferentes massas molares (MW) e os pontos isoelétrico (pI) dos fatores de crescimento em relação aos demais constituintes do leite, sendo importante a compreensão desses fatores para que ocorra a separação. A Figura 1 ilustra a heterogeneidade dos elementos constitutivos em termos de MW e pI utilizando dados publicados a partir de Farrell et al. (2004) e de Gauthier et al. (2006). As MW médias dos fatores de crescimento situa-se entre $6400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (EGF) a $30000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PDGF). No entanto, estes valores de MW não levam em conta a ocorrência de proteínas de ligação, tais como as proteínas de ligação latente ao TGF- β . Desta forma, o uso de técnicas de exclusão de tamanho para separação desses fatores de crescimento se torna difícil.

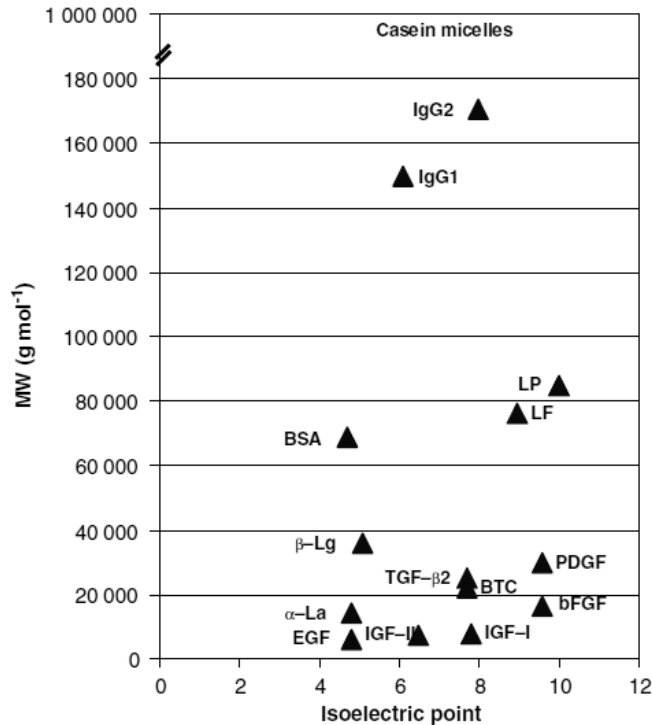


Figura 2 - Ilustração esquemática da distribuição por massa molar (MW) e ponto isoelétrico de proteínas e os fatores de crescimento presentes no leite. Fonte: Pouliot e Gauthier (2006).

Os valores de pI dos fatores de crescimento presentes no leite estão em um intervalo entre 6,5 (IGF-II) e 9,6 (bFGF e PDGF), exceto para EGF, que tem seu pI de 4,8. Estes valores de pI neutro-alcalino encontrados para os fatores de crescimento são uma das suas características mais importantes no que diz respeito a sua extração a partir do leite. Espera-se que os fatores de crescimento sejam separados a partir de proteínas do soro do leite, que possuem um pI em torno de 4,8-5,1, o que favorece a separação destes fatores de crescimento a partir do soro (Pouliot & Gauthier, 2006).

Alguns métodos têm sido utilizados para realizar o fracionamento dos fatores de crescimento, entre eles a cromatografia de troca catiônica e técnicas de membrana, que envolvem a microfiltração e a ultrafiltração.

O uso de membranas possibilita a extração dos fatores de crescimento a partir do leite, colostro e soro, no entanto, é importante salientar que tanto o colostro quanto o leite devem ser submetidos a um tratamento térmico mínimo a fim de minimizar as interações proteína-lipídeo na superfície do glóbulo de gordura, de forma que a extração seja facilitada (Pouliot & Gauthier, 2006).

A obtenção do creme de leite pode ser conseguida por métodos convencionais por centrifugação ou por meio da microfiltração (MF) utilizando membrana com poro de 1,4

μm . A remoção de caseína pode ser conseguida por precipitação ácida, coagulação ou MF. A separação dos fatores de crescimento pode ser realizada em colostro desengordurado e descaseinado (serocolostrum) ou de soro de leite por meio de cromatografia de troca catiônica ou pela combinação de microfiltração/ultrafiltração e diafiltração (Pouliot & Gauthier, 2006).

O primeiro fracionamento utilizando abordagens de cromatografia de troca catiônica foi relatado para a extração de fatores de crescimento de plaquetas bovina (Van den Ejinden- van Raaij, Koorneef & van Zoelen, 1988), neuroblastos de ratos (Van den Ejinden- van Raaij et al., 1989), tecido ósseo (Junker, Lewis & Nelson, 2002) e do útero de porco (Brigstock, Heap, Barker & Brown, 1990). A cromatografia de troca catiônica também foi utilizada por vários autores para extrair os fatores de crescimento a partir do colostro (Tokuyama & Tokuyama, 1993), leite (Cox & Burk, 1989, 1991; Jin, Cox, Knecht, Raschdorf & Cercetti, 1991; Kivits, Hendricks & Mallee, 2001) e de soro de leite (Ballard, Francis & Regester, 1999; Belford et al., 2001; Kivits et al., 2001).

Francis, Regester, Webb e Ballard (1995) elaboraram o primeiro processo baseado no uso de cromatografia de troca catiônica para extrair fatores de crescimento a partir de soro de leite. Este processo foi ainda aprimorado por Roggers e Goddard (1996) e Ballard et al. (1999). Tipicamente, o soro é primeiro clarificado por MF, utilizando membranas com poros de 0,1 ou 0,8 μm . O soro clarificado é então passado através de uma coluna de troca catiônica. O material adsorvido que consiste em fatores de crescimento, proteínas básicas e imunoglobulinas é eluída a um pH alcalino. O eluato é em seguida concentrado por ultrafiltração (UF) /diafiltração (DF) e uma filtração estéril final é aplicada antes de congelar ou secar por atomização. Os chamados extratos dos fatores de crescimento de soro de leite (WGFE) contêm 5% de proteínas do soro inicial, mas 90% de sua atividade mitogênica está presente. No caso do soro de leite, Francis et al. (1995) claramente demonstraram que as membranas de UF 3-100 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de massa molar de corte não conseguia concentrar com sucesso a atividade mitogênica do soro de leite. Maubois, Fauquant, Jouan e Borturault (2003) propuseram uma combinação de tratamentos de acidificação e calor para precipitar uma fração rica em TGF- β 2 a partir do soro de leite. Este material precipitado foi ainda concentrado utilizando uma membrana de MF 0,1 μm e foi caracterizada por um teor predominante de α -lactoalbumina com 15% da proteína inicial e 70% do TGF- β 2 inicial.

A recuperação direta de fatores de crescimento a partir de leite ou colostro por

membranas de UF ou MF é dificultada pela presença das micelas de caseína. A principal abordagem utilizada para separação dos fatores de crescimento a partir de colostro tem sido remover as caseínas por tratamento ácido ou coalho (Lefranc-Milot, Canivez & Quinque, 1996). Esta abordagem ainda não foi aplicada para o leite, mas outros autores (Elfstrand, Lindmark-Mansson, Paulsson, Nyberg & Akesson, 2002; Piot Fauquant, Madec & Maubois, 2004) realizaram a remoção de caseínas por meio de MF a partir de colostro diluído.

Akbache, Lamiot, Moroni, Turgeon, Gauthier e Pouliot (2009) concentraram TGF- β 2 a partir de leite bovino e soro usando MF e UF. Em seu processo, soro de leite foi clarificado por MF e ocorreu subsequente concentração com utilização da UF e DF. Eles propuseram que a UF do soro de leite pode ser adequada para concentrar os fatores de crescimento enriquecendo com elevados teores de TGF- β 2, e o concentrado mantinha sua bioatividade, que foi indicado por ensaio de proliferação por linfócitos (Akbache et al., 2009).

2.2.2. Ativação

A ativação do TGF- β latente é bem conhecida *in vitro*. Métodos de ativação de formas latentes do TGF- β incluem a exposição a pH ácido ou básico, tratamento térmico e o uso de agentes desnaturantes, como uma solução 8 mol·L⁻¹ de ureia (Brown, Wakefiels, Levinson & Sporn, 1990; Lawrence, Pircher & Jullien, 1985). A ativação por proteólise é também possível, a proteólise mediada por plasmina é o mecanismo mais conhecido (Lyons, Purchio & Moses, 1990). A maioria do TGF- β está em sua forma latente, e é necessário que a forma latente seja convertida para a forma ativa *in vivo* para exercer o seu efeito biológico (Lyons et al., 1990).

O leite pode ser submetido a diferentes tipos de tratamentos térmicos dependendo das normas de higiene dos produtos em que é utilizado. O efeito dos tratamentos térmicos nos fatores de crescimento no leite bovino ainda não foi estudado sistematicamente, embora muitas observações individuais tenham sido relatadas. Ginjala e Pakkanen (1998) constataram que a pasteurização não afeta os TGF- β s. A mesma observação foi feita por Elfstrand et al. (2002). Lawrence et al. (1985) relataram que o TGF- β a partir de fibroblastos de embrião de galinha foi resistente a um tratamento térmico a 121 °C durante 3 minutos, em um meio de cultura isento de soro. Roggers et al. (1996) também estudaram a estabilidade do TGF- β 2 e descobriram que o fator de crescimento era estável após fervura numa solução tampão durante 2 minutos. Ozawa, Miyata, Ando, Ouyang e Ohba (2009)

estudaram leite bovino comercial e observaram que o leite continha de 0,3-3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de TGF- β 2, sendo que cerca de metade dessa quantidade estava na forma ativa e propuseram que o motivo para a ativação foi a pasteurização.

As variações foram observadas em vários estudos não somente em relação ao efeito da pasteurização, como também sobre a distribuição do TGF- β entre o leite e o soro de leite, o que levanta a hipótese de que esta molécula pode interagir com as micelas de caseína durante a pasteurização do leite.

Sabe-se que o leite aquecido a temperaturas acima de 70 °C desnatura as proteínas do soro de leite e induz a sua interação com as micelas de caseína (Vasbinder, Alting & De Kruif, 2003). E tem sido demonstrado que a reatividade do grupo tiol livre da Cys-121 da β -lactoglobulina aumenta devido ao seu desdobramento, e que esta promove as interações intra e intermoleculares por meio de interações SH/SS (Sava, Van der Plancken, Claeys & Hendrickx, 2005).

Ye, Singh, Taylor e Anema (2004) forneceram evidências de interações entre a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e a membrana dos glóbulos de gordura do leite a temperaturas inferiores (60-65 °C) aquelas necessárias para desnaturar a proteína do soro do leite. Interações induzidas pelo calor podem envolver o TGF- β , uma vez que esta molécula tem um caráter hidrofóbico forte, o que favorece a sua polimerização e a interação não específica com outras proteínas. TGF- β 2 também contém um grupo tiol livre na Cis-77 (Daopin, Piez, Ogawa & Davis, 1992) o que favorece interações com a β -lactoglobulina, e, também com a α -lactoalbumina, micelas de caseína e os componentes da membrana do glóbulo de gordura do leite. Portanto, é provável que o TGF- β 2 é distribuído entre a superfície do glóbulo de gordura, as micelas de caseína e as proteínas do soro de leite, e que esta distribuição é fortemente dependente dos tratamentos térmicos dados ao leite (Akbache et al., 2011).

Ollikainen (2011) demonstrou que o leite aquecido a 65 °C ou o leite cru apresentam concentração maior de TGF- β 2 na fração das proteínas do soro, enquanto que ao aumentarmos essa temperatura para acima de 65 °C essa maior concentração de TGF- β 2 está presente na fração das caseínas, no entanto, quando se aplica a temperatura de 135 °C a concentração presente de TGF- β 2 reduz significativamente, mostrando que o TGF- β 2 não é muito estável em temperaturas maiores, como pode-se notar nos dados da Figura 2. Esse autor ainda mostrou (Figura 2) a influência do tratamento térmico conjuntamente com o pH na ativação do TGF- β 2, sendo que quanto maior a temperatura aplicada maior é a

quantidade de TGF- β 2 ativada presente, sendo maior ainda quando o pH utilizado é ácido.

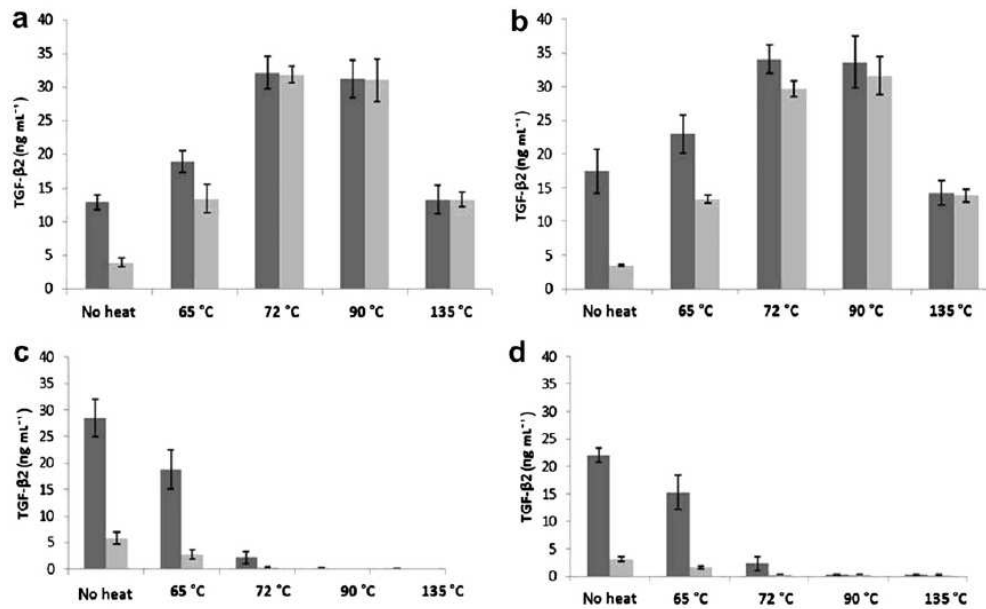


Figura 3 - Distribuição da concentração total e ativada do TGF- β 2 na fração de caseína ácida (a), fração de caseína ultracentrifugada (b), fração de soro ácido (c) e fração de soro ultracentrifugado (d) após tratamentos térmicos. Barras pretas mostram a concentração do TGF- β 2 e barras cinzas a concentração de TGF- β 2 ativado. Fonte: Ollikainen (2011).

Presume-se que ocorra a ativação da forma latente quando exposto ao baixo pH do estômago. Nakamura et al. (2009) observaram que a forma latente de TGF- β administrado por via oral era ativada pelo ácido gástrico em ratos e eles sugeriram que isto poderia também ser o caso no leite humano in vivo. Ozawa et al. (2009) mostraram que as amostras de leite bovino comerciais que continham o TGF- β ativo em imunoenaios, também mantinham sua atividade biológica, que era fornecer proteção contra a inflamação em camundongos. Donnet-Hudges, Duc, Serrant, Vidal e Schiffrin (2000) discutiram a função do fator de crescimento transformador beta na saúde e na doença, especialmente como um tratamento para a doença de Crohn. Diversos autores apontam que os fatores de crescimento podem não resistir ao processamento tecnológico, como, por exemplo, em fórmulas infantis. Devido a isso, os recém-nascidos podem não obter todos os benefícios dessas fórmulas.

2.2.3. Quantificação

A quantificação desses fatores de crescimento presentes no leite envolvem alguns métodos entre os quais, pode-se citar: teste de ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”), teste de RIA (Radioimunoensaio) e os bioensaios, sendo que a

concentração de TGF- β 2 aparentemente varia de acordo com o método utilizado (Meager, 1991; Pakkanen, 1998; Van Waarde, Van Assen, Kampinga, Konings & Vujaskovic, 1997). O bioensaio fornece, geralmente, concentrações mais baixas do que os métodos imunquímicos. Pakkanen (1998) concluiu que utilizando o teste ELISA é possível obter concentrações que são cerca de oito vezes mais elevadas do que aqueles medidos por bioensaios. O ensaio de células epiteliais de pulmão de vison é um bioensaio comum para TGF- β 2 (Abe et al., 1994).

Roggers et al. (1996) estudaram a concentração e estabilidade do TGF- β em leite e soro bovino pasteurizado usando ensaios biológicos e as concentrações relatadas foram de 4,3 e 0,8 ng·ml⁻¹ e 3,7 e 0,7 ng·ml⁻¹, no leite e no soro de leite, respectivamente.

A vantagem do método de ELISA sobre os bioensaios e ensaios com radio receptores é que distingue entre os diferentes subtipos de TGF- β e permite sua quantificação separada (Magro, 1991).

2.3. Análises térmicas

Os protocolos calorimétricos possuem uma importante relevância para a maioria dos processos que envolvem a conservação de alimentos visto que muitos dos métodos de processamento empregados envolvem tratamento térmico (aquecimento, resfriamento e congelamento). As caracterizações térmicas dos sistemas alimentares e seus componentes conduzem a dados que podem ser diretamente relacionados com os protocolos de processamento (Kaletunç, 2009). Dentre as análises térmicas, as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) são as mais empregadas.

A calorimetria de titulação isotérmica permite obter, em um único experimento, parâmetros termodinâmicos como Energia Livre de Gibbs, Entalpia e Entropia para a interação entre um ligante e seu receptor, sendo possível, ainda determinar a estequiometria do sistema formado. Isso porque o ITC utiliza uma sonda para os processos de complexação fornecendo uma medida direta do fluxo de calor envolvido na reação. Uma vez que qualquer processo reacional envolve a quebra e formação de interações intermoleculares e que a estes fenômenos associa-se uma variação no fluxo de calor, logo o ITC se torna uma importante ferramenta para o estudo deste tipo de reação em solução (Turnbull & Daranas, 2003). Esta técnica tem sido amplamente utilizada para sistemas biológicos que envolvem interações entre proteínas-ligantes (Yuksel, Avci & Erdem, 2010),

proteínas-ácidos nucleicos (Rafols, Zarza & Bosch, 2014) e proteína-proteína (Pierce, Raman & Nall, 1999); e pode auxiliar no entendimento do tipo de interações que ocorrem entre as diferentes frações de proteínas presentes no leite e a molécula do TGF- β 2.

O calorímetro é composto, basicamente, de uma célula de referência e uma célula de amostra. Pequenas alíquotas do composto de interesse são injetadas através de uma seringa à célula de amostra, medindo-se a energia liberada ou absorvida em função do tempo (Heerklotz & Seelig, 2000). Cada medida de fluxo de energia gera um pico que representa a energia associada à injeção de um volume da solução da seringa na solução presente na célula de amostra. À medida que a solução presente na célula de amostra vai atingindo a saturação, o sinal de energia vai diminuindo até atingir a saturação completa. No momento antes do início da titulação, as células da referência e da amostra permanecem na mesma temperatura. Durante as titulações, a célula de referência é mantida na temperatura inicial do experimento. Quando uma injeção é realizada, ocorre uma variação de temperatura da célula de amostra e, conseqüentemente, há um fornecimento ou uma remoção de energia do sistema no sentido de reestabelecer o equilíbrio térmico entre as células (De Freitas, 2009).

A partir da curva obtida é possível determinar a variação de ΔH (em unidade de Joules por mol do componente) resultando do processo de mistura a ser estudado. A partir dessa informação chega-se aos outros parâmetros termodinâmicos desejados no estudo em questão, tais como a constante de ligação (K_a), a variação da entropia (ΔS) e a variação da energia de Gibbs (ΔG) (Gomes 2009). Por meio dos dados coletados, o ΔG é calculado usando a conhecida relação descrita pela Equação 1.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

O ΔS é calculado usando a Equação 2.

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} (C_p/T) dT \quad (2)$$

Quando há variação de temperatura no sistema estudado, a capacidade calorífica (ΔC_p) pode ser calculada a partir das entalpias de ligação ΔH_m , utilizando a Equação 3 (Aberkane et al., 2012).

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H_m)}{dT} \quad (3)$$

A análise de titulação isotérmica é muito utilizada para avaliar a interação entre duas moléculas (Al-Kaddha et al., 2010). Além disso, é uma valiosa ferramenta para o entendimento das forças que estabilizam as conformações de dobramento das proteínas

(Pierce, Raman & Nall, 1999).

A partir dos dados coletados e analisados é possível determinar qual o tipo de mudança entálpica ou entrópica é predominante no tipo de interação estudada (TGF- β 2-caseína ou TGF- β 2-proteína do soro), podendo dessa forma, ajudar no entendimento de quais fatores influenciam nessas interações.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; HARPEL, J.; METZ, C.; NUNES, I.; LOSKUTOFF, D.; RIFKIN, D. (1994). An assay for transforming growth factor- β using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Analytical Biochemistry*, 216, 276-284.

ABERKANE, L.; JASNIEWSKI, J.; GAIANI, C.; HUSSAIN, R.; SCHER, J.; SANCHEZ, C. (2012). Structuration mechanism of β -lactoglobulin e acacia gum assemblies in presence of quercetin. *Food Hydrocolloids*, 29, 9-20.

AKBACHE, A.; LAMIOT, E.; MORONI, O.; TURGEON, S.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. (2009). Use of membrane processing to concentrate TGF- β 2 and IGF-I from bovine milk and whey. *Journal of Membrane Science*, 326, 435-440.

AL-KADDAHA, S.; REDER-CHRIST, K.; KLOCEK, G.; WIEDEMANN, I.; BRUNSCHWEIGER, M.; BENDAS, G. (2010). Analysis of membrane interactions of antibiotic peptides using ITC and biosensor measurements. *Biophysical Chemistry*, 152, 145-152.

BALLARD, F.J.; FRANCIS, G.L.; REGESTER, G.O. (1999). Milk protein mixture for promoting growth of animal cells or treating wounds and a method of making and methods employing the mixture. US Patent No. 5866418.

BELFORD, D.A.; ROGERS, M.L.; FRANCIS, G.L.; PAYNE, C.; BALLARD, F.J.; GODDARD, C. (1997). Platelet-derived growth factor, insulin-like growth factors, fibroblast growth factors and transforming growth factor β do not account for the cell growth activity present in bovine milk. *Journal of Endocrinology*, 154, 45-55.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Pescados e Derivados, C.7, seção 1. Brasília, 1952.

BRIGSTOCK, D.R.; HEAP, R.B.; BARKER, P.J.; BROWN, K.D. (1990). Purification and characterization of heparin-binding growth factors from porcine uterus. *Biochemical*

Journal, 266, 273-282.

BROWN, P.; WAKEFIELD, L.; LEVINSON, A.; SPORN, M. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, 3. *Growth Factors*, 3, 35-43.

CHEN, T.T.; JHENG, C.L.; SHYU, F.C. (2013). Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin of its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 96, 1436-1446.

COX, D.A.; BURK, R. (1989). A polypeptide growth factor from milk. Patent European No. 0313515.

COX, D.; BURK, R. (1991). Isolation and characterization of milk growth factor, a transforming-growth-factor- β 2-related polypeptide, from bovine milk. *European Journal of Biochemistry*, 197, 353-358.

DAOPIN, S.; PIEZ, K.A. OGAWA, Y.; DAVIS, D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unusual fold of the superfamily. *Science*, 257(5068), 369-373.

De FREITAS, R.F. (2009). Integração de Métodos em Quiminformática e Biocalorimetria para o Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de *Trypanossoma cruzi*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP.

DONNET-HUDGES, A.; DUC, N.; SERRANT, P.; VIDAL, K.; SCHIFFRIN, E. (2000). Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor β . *Immunology and Cell Biology*, 78, 74-79.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. (2002). Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effect of processing. *International Dairy Journal*, 12, 879-887.

FARRELL, H.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K. (2004). Nomenclature of the proteins of cow's milk-Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

FELL, J.M.; PAINTIN, M.; DONNET-HUGHES, A.; ARNAUD-BATTANDIER, F.; MACDONALD, T.T.; WALKER-SMITH, J.A. (1999). Remission Induced by a new specific oral polymeric diet in children with Crohn's disease. Nestle Nutritional Workshop Ser. Clin. Perform. Programme 2, 187-198.

FELL, J.M.; PAINTIN, M.; ARNAUD-BATTANDIER, F.; BEATTIE, R.M.; HOLLIS, A.; KITCHING, P.; DONNET-HUGHES, A.; MACDONALD, T.T.; WALKER-SMITH, J.A. (2000). Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specif oral polymeric diet in pediatric Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology e Therapeutics*, 14, 281-289.

FRANCIS, G.L.; REGESTER, G.O.; WEBB, H.A.; BALLARD, F.J. (1995). Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *Journal of Dairy Science*, 78, 1209-1218.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; MAUBOIS, J.L. (2006). Review: Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Le Lait*, 86, 99-125.

GINJALA, V.; PAKKANEN, R. (1998). Determination of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunoassay*, 19, 195-207.

GIRALDO-ZUÑIGA, A.D. (2008). Applications of membrane separation. In: BRITZ, T.J.; ROBINSON, R.K. *Advanced dairy science and technology*. London: Blackwell Publishing, 35-74.

GLEIZES, P.; MUNGER, J.; NUNES, I.; HARPEL, J.; MAZZIERI, R.; NOGUERA, I. (1997). TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*, 15, 190-197.

GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28 (3), 375-384.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. (2000). Titration calorimetry of surfactant-membrane

partitioning and membrane solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508, 69-85.

HOWARTH, G.S.; FRANCIS, G.L.; COOL, J.C.; ROGER, X.U.; BYARD, R.W.; READ, L.C. (1996). Milk Growth Factors Enriched from Cheese Whey Ameliorate Intestinal Damage by Methotrexate When Administered Orally to Rats. *The Journal of Nutrition*, 126, 2519-2530.

JIN, Y.; COX, D.; KNECHT, R.; RASCHDORF, F.; CERLETTI, N. (1991). Separation, purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from bovine milk. *Journal of Protein Chemistry*, 10, 565-575.

JUNKER, L.; LEWIS, M.; NELSON, R. (2002). Isolation of purified TGF- β 1 and TGF- β 2 from bone tissue. Patent US No. 6492327.

KALENTUNÇ. (2009). *Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems*. IA: Wiley Blackwell.

KIVITS, M.G.C.; HENDRICKS, A.W.J.; MALLE, L.F. (2001). Process for obtaining growth factor preparations (TGF- β and IGF-I) from milk products having low mutual cross-contamination. Patent WO No. 01/25276A1.

LAWRENCE, D.; PIRCHER, R.; JULLIEN, P. (1985). Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133, 1026-1034.

LEFRANC-MILOT, C.; CANIVEZ, O.; QUINQUE, B. (1996). Fraction sérocolostrale à forte activité anticorps, utilisation et procédé de fabrication d'une telle fraction. EP 0 722 952 A1.

LYONS, R.; PURCHIO, A.; MOSES, H. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *Journal of Cell Biology*, 110:1361-1367.

MASSAQUE, J. (1990). The transforming growth factor- β family. *Annual Review of Cell Biology*, 6, 597-641.

MAUBOIS, J.L. (1991). New applications of membrane technology in the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46, 91-95.

MAUBOIS, J.; FAUGUANT, J.; JOUAN, P.; BOURTOURAUULT, M. (2003). Method for obtaining a TGF-beta enriched protein fraction in activated form, protein fraction and therapeutic applications. Patent US No. 7141262B2.

MEAGER, A. (1991). Assays for transforming growth factor beta. *Journal of Immunological Methods*, 14, 1-14.

MICHAELIDOU, A.; STEIJNS, J. (2006). Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. *International Dairy Journal*, 16, 1421-1426.

NAGPAL, R.; BEHARE, P.V.; KUMAR, M.; MOHANIA, D.M.; YADAV; JAIN, S.; MENON, S.; PARKASH, O.; MAROTTA, F.; MINELLI, E.; HENRY, C.J.K.; YADAV, H. (2012). Milk, Milk Products, and Disease Free Health: An Updated Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 321-333.

NAKAMURA, Y.; MIYATA, M.; ANDO, T.; SHIMOKA, N.; OHNUMA, Y.; KATOH, R. (2009). The latent form of transforming growth factor-beta administered orally is activated by gastric acid in mice. *Journal of Nutrition*, 139, 1463-1468.

OLLIKAINEN, P.; MUURONEN, K. (2013). Determination of insulin-like growth factor-1 and bovine insulin in raw milk and its casein and whey fractions after microfiltration and ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 28, 83-87.

OLLIKAINEN, P. (2011). Activation of transforming growth factor- β 2 in bovine milk during indirect heat treatments. *International Dairy Journal*, 21, 921-925.

OZ, H.S.; RAY, M.; CHEN, T.S.; McCLAIN, C.J. (2004). Efficacy of a transforming growth factor beta 2 containing nutritional support formula in a murine model of inflammatory bowel disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 220-226.

OZAWA, T.; MIYATA, M.; ANDO, T.O.; OUYANG, Y.; OHBA, T. (2009). Transforming growth factor-beta activity in commercially available pasteurized cow milk provides

protection against inflammation in mice. *Journal of Nutrition*, 139, 69-75.

PAKKANEN, R. (1998). Determination of transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunoassay*, 19, 23-37.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.

PDB - Protein Data Bank (2015). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold the superfamily. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2TGI>>. Acesso em: 10 de agosto de 2015.

PIERCE, M.M.; RAMAN, C.S.; NALL, B.T. (1999). Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*, 19, 213-221.

PIOT, M.; FAUQUANT, J.; MADEC, M.N.; MAUBOIS, J.L. (2004). Preparation of serocolostrum by membrane filtration. *Lait*, 84, 333-341.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. (2006). Milk growth factors as health products: some technological aspects. *International Dairy Journal*, 16, 1415-1420.

RAFOLS, C.; ZARZA, S.; BOSCH, E. (2014). Molecular interactions between some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). *Talanta*, 130, 241-250.

ROGGERS, M.L.; GODDARD, S. (1996). Transforming growth factor β in bovine milk: concentration, stability and molecular mass forms. *Journal of Endocrinology*, 151, 77-86.

SAHARINEN, J.H.; TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. (1999). Latent transforming growth factor- β binding proteins (LTBSs) - structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- β action. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 10, 99-117.

SAVA, N.; VAN der PLANCKEN, I.; CLAEVS, W.; HENDRICKX, M. (2005). The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1646-1653.

SGARBIERI, V.C. (1996). Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradações-modificações. São Paulo: Varela, 517.

SGARBIERI, V.C. (2004). Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. Revista de nutrição, 17(4), 397-409.

SMITHERS, G.W. (2008). Whey and whey proteins - From “gutter-to-gold”. International Dairy Journal, 18, 695-704.

SMITHERS, G.W. (2004). Isolation of growth factors from whey and their application in the food and biotechnology industries - a brief review. Bulletin of the International Dairy Federation, 389, 16-19.

TOKUYAMA, T.; TOKOYAMA, H. (1993). Purification and identification of TGF- β 2 related growth factor from bovine colostrum. Journal of Dairy Research, 60, 99-109.

TUNG, Y.T.; CHEN, H.L.; YEN, C.C.; LEE, P.Y.; TSAI, H.C.; LIN, M.F.; CHEN, C.M. (2013). Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor. Journal of Dairy Science, 96, 2095-2106.

TURNBULL, W.B.; DARANAS, A.H. (2003). On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? Journal of the American Chemical Society, 125(48), 14859-14866.

VAN den EIJDEN-VAN RAAIJ, A.J.; KOORNNEEF, I.; VAN OOSTWAARD, T.M.; FEYEN A.; KRUIJER, W.; DE LAAT, S.W. (1989). Purification of growth factor related to platelet-derived growth factor and a type beta transforming growth factor secreted by mouse neuroblastoma cells. A general strategy for the purification of basic polypeptide growth factors. Biochemical Journal, 257, 375-382.

VAN den EIJDEN-VAN RAAIJ, A.J.; KOORNEEF, I.; VAN ZOELLEN, E.J. (1988). A new method for high yield purification of type beta transforming growth factor from human platelet. Biochemistry and Biophysics Research Communications, 157, 16-23.

Van WAARDE, M.; van ASSEN, A.; KAPINGA, H.; KONINGS, A.; VUJASKOVIC, Z.

(1997). Quantification of transforming growth factor- β in biological material using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Analytical Biochemistry*, 247, 45-51.

VASBINDER, A.J.; ALTING, A.C.; de KRUIF, K.G. (2003). Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 31(1-4), 115-123.

VRIES, L.D.; CASEY, T.; DOVER, H.; VANDEHAAR, M.J.; PLAUT, K. (2011). Effects of transforming growth factor- β on mammary remodeling during the dry period of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96, 6036-6046.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M.W.; ANEMA, S. (2004). Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Le Lait*, 84(3), 269-283.

YURSEL, Z.; AVCI, E.; ERDEM, Y.K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*, 121, 450-456

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar o efeito do processamento na concentração do fator de crescimento TGF- β em lácteos.

4.2. Objetivos específicos

- Aplicar as técnicas de membrana para a concentração do TGF- β a partir do leite e do soro;
- Quantificar o TGF- β em todas as etapas tecnológicas visando determinar as taxas de rendimento industrial e de perda deste constituinte por meio de um teste imunoenzimático;
- Determinar a composição dos pós obtidos;
- Estudar as interações que envolvem a molécula de TGF- β com as frações de proteínas presentes no leite.

Capítulo 1 - Aplicação de diferentes tecnologias para concentração do fator de crescimento TGF- β 2 em lácteos

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a melhor forma de obter um concentrado proteico com alta concentração de TGF- β 2 a partir do leite, empregando tratamento térmico (TT) ou as técnicas de membrana. Além de estudar as interações que ocorrem entre o TGF e as proteínas do leite com a utilização de ITC. O leite refrigerado apresentou maior teor de TGF- β 2 que o leite cru recém-ordenhado, devido à ativação pela plasmina. A pasteurização lenta foi menos eficiente em recuperar TGF- β 2 que a pasteurização rápida, devido a maior desnaturação das proteínas do soro. O uso das técnicas de membrana foi mais eficiente em concentrar o TGF- β 2 tanto para o soro quanto para a caseína, quando comparado com as frações obtidas com o uso de TT. A utilização de membranas e separação da caseína foi a mais eficiente em concentrar TGF- β 2 a partir de leite. A α -caseína possivelmente é a proteína associada ao TGF- β 2.

Palavras-chave: fator de crescimento, concentrado proteico, leite bovino, tratamento térmico, técnicas de membrana.

1. INTRODUÇÃO

O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) faz parte de uma família de fatores de crescimento multifuncional que atua na diferenciação e na fase de proliferação da maioria dos tipos de células (Massague, 1990). Três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são conhecidas em seres humanos, mas o TGF- β 2 é a forma mais abundante no colostro e leite bovinos, sendo um dos mais abundantes fatores de crescimento em leite (Cox & Burk, 1991; Jin, Cox, Knecht, Raschdorf & Cerletii, 1991).

A forma ativa é um homodímero com massa molecular de aproximadamente 25 kg·mol⁻¹. Cada subunidade consiste de 112 aminoácidos (Daopin, Piez, Ogawa & Davies, 1992). A molécula consiste em duas cadeias polipeptídicas. Cada cadeia polipeptídica tem

nove cisteínas ligadas por ligações dissulfeto, que são invariáveis entre as isoformas. Essa forma conservada na sequência do TGF- β sugere um papel importante na sua estrutura e função (Gauthier, Pouliot & Maubois, 2006).

Roggers e Goddard (1996) demonstraram que TGF- β derivado do leite existe predominantemente como um pequeno complexo latente. E para ser biologicamente ativo é necessária sua dissociação do complexo do peptídeo latente associado (LAP). O mecanismo de ativação *in vivo* não é claro, mas pode envolver o contato direto célula-célula e a ação de proteases (principalmente a plasmina). Os métodos de ativação da forma latente *in vitro* incluem pH ácido (pH 2) ou básico (pH 11), tratamento térmico (por exemplo, ebulição por 2 s) e diferentes agentes caotrópicos (entre eles, solução de ureia 8M). Em muitos procedimentos de purificação uma ou mais dessas condições listadas são usadas, e dessa forma, TGF- β purificado é frequentemente obtido em seu estado ativo (Saharinen, Hyytiainen, Taipale & Keski-Oja, 1999).

A função fisiológica de TGF- β 2 em leite é desconhecida mas pode ser um mediador da imunidade das mucosas ou da diferenciação do tecido epitelial do intestino de recém-nascidos. TGF- β s são reconhecidos por estimular a proliferação de algumas células, especialmente no tecido conjuntivo, além de agirem como inibidores de algumas outras células, tais como linfócitos e células epiteliais. TGF- β desempenha um papel importante na embriogênese, reparação de tecidos, formação de ossos e cartilagens e no controle do sistema imunológico (Gauthier et al., 2006).

O TGF- β 2 tem caráter hidrofóbico forte e desta forma é uma molécula susceptível a interações induzidas pelo calor, assim como a polimerização e a interação não específica com outras proteínas. TGF- β 2 também contém um grupo tiol livre em Cys-77 (Daopin, Piez, Ogawa & Davies, 1992), o que permite interações com β -lactoglobulina, e, possivelmente também com α -lactoalbumina, micelas de caseína e componentes do glóbulo de gordura. Dessa forma, é provável que o TGF- β 2 está distribuído entre a superfície dos glóbulos de gordura, as micelas de caseína e a as proteínas do soro de leite, e que esta distribuição é fortemente dependente da história térmica do leite (Akbache et al., 2011).

Akbache, Lamiot, Moroni, Turgeon, Gauthier e Pouliot (2009) concentraram TGF- β 2 a partir de leite bovino e soro de leite utilizando microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF). Em seu processo, o soro de leite foi clarificado por MF e a concentração subsequente foi realizada por UF e diafiltração. Eles propuseram que a ultrafiltração do soro de queijo pode ser adequada para aumentar a concentração do TGF- β 2, e além disso o concentrado

produzido preserva a bioatividade do TGF, o que foi mostrado por meio de ensaio de proliferação de linfócitos (Akbache et al., 2009). Não há estudos que utilizam evaporador a vácuo para concentrar fatores de crescimento e nem a secagem em spray dryer como forma de concentrar e armazenar o TGF- β 2 concentrado a partir de leite ou soro de leite.

A utilização das técnicas de microfiltração ou aquecimento, conjuntamente com evaporação a vácuo e secagem por spray dryer, permite a fabricação de concentrados proteicos de soro e de leite em pó, que são produtos com elevado valor de mercado. Estes podem ser empregados como ingredientes nobres nas indústrias de aditivos e ingredientes, nas indústrias de alimentos e na elaboração de dietas nutricionalmente elaboradas para pessoas com necessidades especiais em nutrientes.

Várias são as propostas para utilização destes fatores de crescimento encontrados no leite, em aplicações relacionadas à saúde, porém o número de produtos reais no mercado ainda é limitado. Fatores de crescimento de leite têm sido utilizado para desenvolver composições terapêuticas para a cura de feridas (Ballard et al., 1999; Rayner et al., 2000) e para tratamento de perturbações gastrointestinais (Huggett, Hughes & Schiffin, 1993; Johnson & Playford, 1998; Playford, MacDonald & Johnson, 2000).

Diante do exposto o objetivo desse estudo foi avaliar a melhor forma de concentrar TGF- β 2 a partir do leite, utilizando microfiltração ou pasteurização e produção de queijo, para o fracionamento das proteínas do leite. As etapas de evaporação a vácuo e secagem por spray dryer foram acrescidas, de forma a obter um concentrado proteico com maior concentração desse fator de crescimento. Além disso, objetivou-se avaliar as interações que ocorrem entre o TGF e as proteínas do soro utilizando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG. A análise de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi realizada no Laboratório de Enzimologia e Físico Química de Proteínas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - MG.

2.1. Preparo das amostras

A Figura 1 mostra as etapas que foram utilizadas para a concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral. Sendo que no fluxograma à esquerda partiu-se de um leite cru recém ordenhado obtido da fazenda da UFV, e empregou-se a utilização das técnicas de membranas, sem a utilização de um tratamento térmico; no fluxograma à direita partiu-se de um leite cru refrigerado obtido no laticínio escola, e utilizou-se tratamento térmico (pasteurização). A cada etapa foi retirada uma amostra para posteriores análises, sendo mantidas congeladas (-20 ± 2 °C) até o momento da análise. Os pós foram embalados a vácuo e mantidos sobre o abrigo da luz. Os experimentos foram realizados em três repetições.

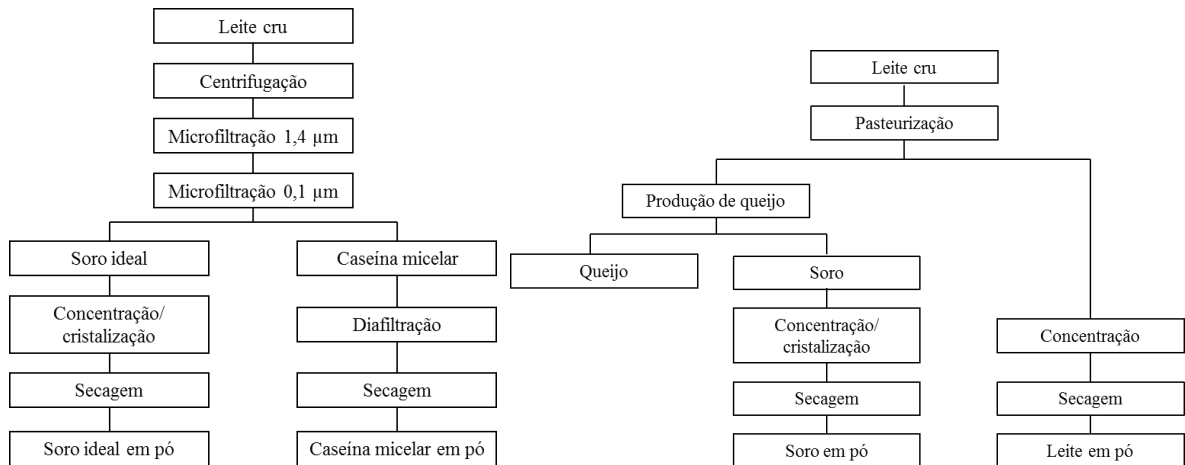


Figura 1 - Concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral, com a utilização de técnicas de membrana (esquerda) ou tratamento térmico (direita).

2.2. Utilização das técnicas de membrana

O leite cru foi coletado no estábulo da UFV, em seguida, passou por centrifugação $3625 \times g$ na temperatura em que chegou do estábulo para obtenção de leite desnatado a $0,1 \text{ g} \cdot 100\text{g}$ de gordura. Após a retirada da gordura, o leite desnatado foi encaminhado para a microfiltração.

A microfiltração foi realizada em equipamento do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, construído pela empresa Tetra Pak© Processing, França. Foi realizada uma filtração tangencial através de membranas de cerâmica tubular “Membralox®” com poros de tamanho de $1,4 \mu\text{m}$ para remoção de gordura e dos micro-organismos e $0,1 \mu\text{m}$ para obtenção do soro ideal. A filtração foi feita com velocidade de permeação de $7,2 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$,

sistema com área total de membrana 0,24 m² e com pressão transmembrana de 0,5 bar. Para obtenção do soro ideal utilizou-se o permeado da microfiltração em membrana com poros de 0,1 µm e um fator de concentração de 3x. Em seguida, o soro ideal foi transferido para um evaporador a vácuo (Modelo 70049 - Treu®, Brasil) até concentração de sólidos solúveis em 55 °Brix. Foi realizada ainda a cristalização em tacho aberto de camisa dupla (Inoxul®, Brasil) com resfriamento até 30 °C, até atingir taxa de cristalização próxima a 70%. Logo após foi realizada secagem em spray dryer (Production Minor, GEA-NIRO, Alemanha).

O retentado da microfiltração em membrana de 0,1 µm é a caseína que foi submetida à diálise, com água destilada pasteurizada, até obtenção de uma concentração de sólidos solúveis de 0,0 °Brix, medido em refratômetro digital Biobrix®, modelo 2WAJ-D. Em seguida, foi realizada a secagem em spray dryer (Production GEA-NIRO, Alemanha).

2.3. Utilização de tratamento térmico

O leite cru integral foi coletado no laticínios escola para a pasteurização do leite e produção de queijo. Este leite foi mantido refrigerado por pelo menos 48 horas, o que está de acordo com a norma estabelecida pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011).

2.3.1. Pasteurização do leite

O leite cru foi pasteurizado a 72 °C por 15 segundos em pasteurizador de placas (Fischer Term, Brasil). O leite pasteurizado foi concentrado em evaporador a vácuo de único efeito até concentração de sólidos solúveis a 42 °Brix medidos em refratômetro digital (Biobrix®, modelo 2WAJ-D, Brasil). O leite concentrado foi seco em spray dryer semi-industrial de único estágio, com atomizador de disco da marca Production GEA-NIRO.

2.3.2. Produção de queijo

O leite cru foi pasteurizado a 65 ± 1 °C por 30 minutos em tanque de queijo de camisa dupla (Biasinox, Brasil), em seguida foi resfriado para 36 °C e ocorreu a adição de 0,02 g·100g de ácido láctico (Macalé, Brasil), 0,04 g·100g de cloreto de cálcio (Macalé, Brasil) e 0,015 g·100g de coalho (Clerici, Brasil). Logo após a formação da coalhada realizou-se o corte da massa e retirada do soro. A massa foi adicionada de cloreto de sódio (2 g·100g) para produção de queijo Minas Frescal.

O soro obtido a partir da fabricação do queijo foi evaporado em evaporador a vácuo

até concentração de sólidos solúveis a 55 °Brix medidos em refratômetro digital (Biobrix®, modelo 2WAJ-D, Brasil). O soro concentrado foi cristalizado em tacho aberto de camisa dupla com resfriamento até 30 °C até obter cristalização de 70%. O soro concentrado foi seco em spray dryer com atomizador de disco da marca GEA-NIRO.

2.4. Quantificação do TGF beta

A quantificação de TGF- β 2 foi determinada por meio de kit de ensaio imunoenzimático ELISA (Quantikine, R&D Systems, Inc., USA). Outros reagentes utilizados foram N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) - ácido livre (Sigma, USA), HCl e NaOH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). As amostras líquidas foram diluídas em Calibrator diluent, presente no kit, após ativação ácida do TGF- β 2 latente para a forma imunorreativa, e as análises foram realizadas segundo a metodologia proposta pelo fabricante do kit. As amostras em pó foram diluídas na proporção de 1:4 para a amostra de soro, soro ideal e leite e 1:6 para a caseína. Após essa diluição seguiu-se o mesmo protocolo descrito para as amostras líquidas. A leitura foi realizada em absorbância de 450 nm em espectrofotômetro com leitor de placa (Multiskan GO - Thermo Scientific, USA). A análise foi realizada em duplicata.

2.5. Calorimetria de titulação isotérmica

Para estudar as interações que ocorrem entre o TGF- β 2 e as proteínas do soro e caseínas foi utilizada a análise de calorimetria de titulação isotérmica em equipamento VP-ITC (Microcal GE Inc., EUA). Foi injetado sequencialmente 25 alíquotas de 5 μ L da solução de TGF- β 2, na concentração de 26 nM, em 2,0 mL da solução das frações de proteínas do leite (proteínas do soro ou caseína) em concentrações de 0,26 mM, contida na célula de titulação. As soluções foram diluídas em tampão fosfato de 50 mM em pH 6,8.

Cada injeção teve uma duração de 6 s e um intervalo de 150 s entre as sucessivas injeções. A temperatura da solução da célula de titulação foi 25 °C e a solução foi agitada a 310 rpm em todos os experimentos para assegurar a homogeneização do sistema durante as titulações. As medidas de ITC foram conduzidas em duplicata e os resultados foram reportados como a média das titulações. O calor de diluição da titulação do branco com TGF- β 2 e a solução tampão foram subtraída dos dados brutos. O software Microcal ORIGIN 7.0 ® do ITC foi utilizado para o tratamento dos dados coletados.

2.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada usando o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. As análises foram realizadas usando Excel software (Excel versão 2010, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Quantificação do TGF- β 2

A Tabela 1 mostra os resultados encontrados para a quantificação de TGF- β 2 nas amostras. Nessa tabela também é possível ver a taxa de recuperação de componente, que foi calculada pela Equação 1. Na tabela letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Concentração do TGF- β 2 nas amostras, de acordo com a aplicação do tratamento térmico ou não e taxa de recuperação de componente (Tr) do TGF- β 2 em cada uma das etapas do processamento ($n = 3$).

Uso de membrana		
Amostra	Concentração TGF- β 2 (ng/mL)	Tr (%)
LC2	17,430 \pm 0,08 ^{cd}	100,0 ^c
LEM	17,889 \pm 0,15 ^{cd}	118,4 ^c
CAS	20,241 \pm 0,40 ^{cd}	654,4 ^c
CMP	253,071 \pm 64,55 ^a	923,9 ^a
SRI	8,637 \pm 1,35 ^d	31,6 ^c
CSI	0,899 \pm 1,65 ^d	5,5 ^c
SIP	1,005 \pm 0,04 ^d	3,7 ^c
Uso de tratamento térmico		
LC1	23,602 \pm 0,70 ^{cd}	100,0 ^c
LEP	23,172 \pm 1,05 ^{cd}	97,3 ^c
CLE	29,627 \pm 0,09 ^{cd}	132,2 ^c
LPO	132,603 \pm 0,07 ^b	593,3 ^b
SOR	5,743 \pm 1,55 ^d	22,7 ^c
CSO	21,711 \pm 0,23 ^{cd}	90,4 ^c
SPO	63,769 \pm 1,06 ^c	256,6 ^c
LPL	18,827 \pm 2,78 ^{cd}	88,3 ^c
QUE	8,376 \pm 4,28 ^d	30,4 ^c

Onde: LC1 - leite cru laticínios escola; LC2 - leite cru estabulo; LEP - leite pasteurizado (72 °C/15 s); LPL - leite pasteurizado (65 °C/30 minutos); SOR - soro; SRI - soro ideal; LEM - leite microfiltrado; CAS - caseína; CLE - concentrado leite; CSO - concentrado soro; CSI - concentrado soro ideal; LPO - leite em pó; SPO - soro em pó; SIP - soro ideal em pó; CMP - caseína micelar em pó; QUE - queijo. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

$$Tr = \left(\frac{C}{C_0} \right) \times 100$$

Equação (1)

Os valores de TGF- β 2 encontrados no leite cru estão dentro dos valores descritos por Pouliot e Gauthier (2006), que descrevem que em leite cru se encontra uma concentração de 10 a 70 ng·mL⁻¹ de TGF- β 2. Valores semelhantes são descritos por Gauthier et al. (2006) que mostraram que um leite cru após 3 dias de lactação possui 13 a 71 ng·mL⁻¹ de TGF- β 2, enquanto que um leite após 51 a 80 horas de lactação apresenta 66 ng·mL⁻¹ desse fator de crescimento. É possível observar valores distintos da concentração de TGF- β 2 do leite recém ordenhado, obtido no estábulo da UFV, e do leite cru refrigerado coletado no tanque de refrigeração do laticínios.

Essa diferença se deve a atuação de enzimas proteolíticas, dentre elas a plasmina, uma enzima endógena termoestável presente no leite. Na literatura a plasmina é descrita por atuar, principalmente, sobre as caseínas, degradando a β , α_{s1} e α_{s2} e é responsável por cerca de 90% da proteólise em leite (Fox & McSweeney, 1998; Fernandes & Oliveira, 2007; Corassin, Rosim & Kobashigawa, 2013). Lyons, Purchio e Moses (1990) relataram que enzimas proteolíticas, como a plasmina, ativam fatores de crescimento. Estes relatos e o fato de que o kit de ELISA só quantificar TGF- β 2 ativo permitem afirmar que a maior concentração de TGF- β 2 (26,15%) presente no leite cru refrigerado resulta da ativação no leite pela plasmina. Ollikainen (2011) observou que 16% do TGF- β 2 presente no leite cru recém ordenhado foi ativado por essa enzima. No leite cru refrigerado, o leite só é processado com no mínimo 48 horas após a ordenha, neste caso, a plasmina tem um maior tempo de atuação e consequentemente, maior quantidade de TGF- β 2 foi ativado.

É importante estudar os efeitos do tratamento térmico sobre a concentração do TGF- β 2. Como já estudado por Ginjala e Pakkanen (1998) o TGF- β 2 não é degradado pela pasteurização, mas o tratamento térmico pode ativar os fatores de crescimento (Brown, Wakefield, Levinson & Sporn, 1990).

Os nossos resultados mostraram uma Tr de 97,3% para o leite pasteurizado (LEP) o que indica que não houve grande variação no teor de TGF após a pasteurização. Resultado semelhante foi obtido por Akbache et al. (2011) que obteve uma recuperação de 96% após a pasteurização do leite cru integral. A resistência relativa do fator de crescimento ao aquecimento e a valores extremos de pH é explicado pelas ligações dissulfeto que

apresentam. O TGF- β 2 possui 9 ligações dissulfeto (Gauthier et al., 2006).

No entanto, a utilização da pasteurização lenta - LPL (65 °C/30 minutos) não apresentou a mesma efetividade quanto à recuperação desse composto (Tr de 88,3%).

Ao analisar o leite microfiltrado (LEM) observou-se uma maior concentração de TGF- β 2 com uma Tr de 118,4% (Tabela 1), esse resultado nos mostra que diferentemente do que é imaginado a concentração do TGF- β não está tão diretamente relacionada com o teor de gordura do leite, pois ao retirar a gordura do leite ocorreu um aumento relativo da concentração desse constituinte.

O conhecimento do histórico de aquecimento do leite utilizado para produzir soro de leite é de grande importância, sobretudo quando se deseja utilizar o soro como matéria-prima, visto que o rendimento do fator de crescimento pode ser afetado pelos tratamentos térmicos empregados previamente (Ollikainen, 2011). Dessa forma, ao se comparar os valores da concentração de TGF- β 2 do soro ideal (SRI) com a do soro (SOR) é possível notar que houve uma maior concentração no SRI, sendo que este apresentou uma Tr de 31,6% enquanto que o SOR possui uma Tr de 22,7%. Akbache et al. (2011) indica que a diminuição do teor de TGF- β 2 no soro, começa logo que a temperatura ultrapassa os 60 °C, sendo que a maior mudança ocorre numa faixa de 66 a 76 °C, muito próxima da temperatura utilizada para a produção de queijo (65 °C). Essa diminuição se deve as interações induzidas pelo calor que ocorrem com as proteínas do soro em temperaturas acima de 60 °C, que leva ao desdobramento das proteínas e exposição dos grupos SH/SS (Vasbinder, Alting & De Kruif, 2003). O TGF- β 2 apresenta um grupo tiol livre (Daopin et al., 1992) sendo possível que ocorram interações com a β -lactoglobulina e também, α -lactoalbumina quando estas estão desnaturadas. Assim, as interações induzidas pelo calor com as proteínas do soro explicam a queda de 33,5% no conteúdo de TGF- β no SOR quando comparado com o SRI. Resultados observados por Akbache et al. (2011) mostraram um decréscimo de 50% no soro termizado (68 °C/20 s) e de 90% no soro pasteurizado (72 °C/20 s), quando comparado com um soro que não sofreu tratamento térmico.

Quando não há tratamento térmico, o TGF- β 2 se concentra na fração rica em caseína (CAS). Ollikainen, Muuronen e Tikanmaki (2012) ao utilizar MF/UF também observaram um conteúdo maior de TGF- β 2 na fração de caseína (717 μ g) obtido de um leite não pasteurizado quando comparado com a fração de soro (486 μ g). Diferente do que foi observado por Ollikainen (2011), que utilizou precipitação ácida ou ultracentrifugação para

separar as frações de proteínas e mostrou que um leite aquecido a 65 °C ou leite cru apresentou maior concentração de TGF- β 2 na fração das proteínas do soro, enquanto que ao aumentar essa temperatura acima de 65 °C, a maior concentração de TGF- β 2 estava presente na fração de caseínas. Essa diferença se deve aos diferentes tipos de métodos de separação utilizados em cada estudo. Dessa forma, ao comparar-se a concentração do TGF nas frações de caseína e nas proteínas do soro, observou-se que ao utilizar as técnicas de membrana obteve-se uma maior recuperação na caseína (58,6%) em comparação com o queijo, no qual utilizou tratamento térmico. No queijo (QUE) foi possível obter uma concentração de 8,376 ng·mL de TGF- β 2, com uma recuperação de componente de 30,4% (Tabela 1). Não há na literatura trabalho que quantifique TGF- β 2 em queijo Minas Frescal, mas em um trabalho realizado por Ollikainen (2011) que estudou a produção de queijo utilizando culturas mesofílicas e termofílicas com o uso de leite pasteurizado, ocorreu uma recuperação de 75-91% no caso dos mesófilos e 95-106% para os termófilos. Mas no estudo de Ollikainen (2011) foi realizado com culturas de micro-organismos que durante o seu desenvolvimento produzem ácido, que é originado da fermentação que ocorre da lactose gerando ácido láctico, que tem o efeito de abaixar o pH muito maior em relação ao ácido láctico adicionado na produção de queijo Minas Frescal (Paula, Carvalho & Furtado, 2009). Além disso, essas culturas podem produzir proteases (Souza, 2009) também que irão ativar o TGF- β presente nesses queijos, gerando uma maior recuperação quando utilizamos esses tipos de culturas em produções de queijos.

Nos concentrados e nos pós observou-se um aumento da concentração do TGF- β 2, como era de se esperar, uma vez que o uso dessas tecnologias objetiva concentrar os compostos do produto de interesse. Valores de Tr maiores que 100% para a caseína micelar em pó (MCP), para o concentrado de leite (CLE) e para o leite em pó (LPO) foram observados. No entanto, no caso dos soros, a taxa de recuperação maior que 100% não foi observada, principalmente no SRI, onde quase não se encontra mais TGF- β 2 no soro ideal em pó (SIP). A concentração do soro ideal é dificultada, pois a etapa de concentração do produto envolve tratamento térmico, o que leva a precipitação das proteínas no evaporador a vácuo e que pode ter gerado a diminuição da concentração do TGF- β 2. Essa menor concentração do fator de crescimento na fração de soro ao sofrer um tratamento térmico, durante a concentração a vácuo ou durante a secagem por spray dryer, se deve como já mencionado e observado por Akbache et al. (2011) à redução da concentração que ocorre entre as temperaturas de 66 a 76 °C, devido a desnaturação das proteínas do soro e a

associação do TGF- β 2 a essas proteínas. Na literatura não há descrição de quantificação desse fator de crescimento em concentrados de leite ou soro, nem em produtos em pó obtidos por secagem em spray dryer.

Com a tecnologia utilizada nesse trabalho foi possível observar que o melhor tratamento para concentrar o TGF- β 2 foi com a separação de caseína por meio de microfiltração, seguida por secagem em spray dryer, obtendo no final uma concentração de 253,071 ng/mL (Tabela 1).

3.2. Estudo das interações do TGF- β 2 com as frações das proteínas do leite

O propósito das análises do ITC foi procurar entender as interações que ocorrem entre as proteínas presentes no leite e o fator de crescimento TGF- β . A Figura 2 mostra os resultados obtidos nas análises para cada fração de proteína. Sendo que no topo das figuras se observa a curva referente ao calor (μ cal/seg.) liberado após a injeção do TGF- β 2 na célula contendo as proteínas. A parte inferior da figura refere-se à variação de entalpia (ΔH) que envolve a formação dos complexos.

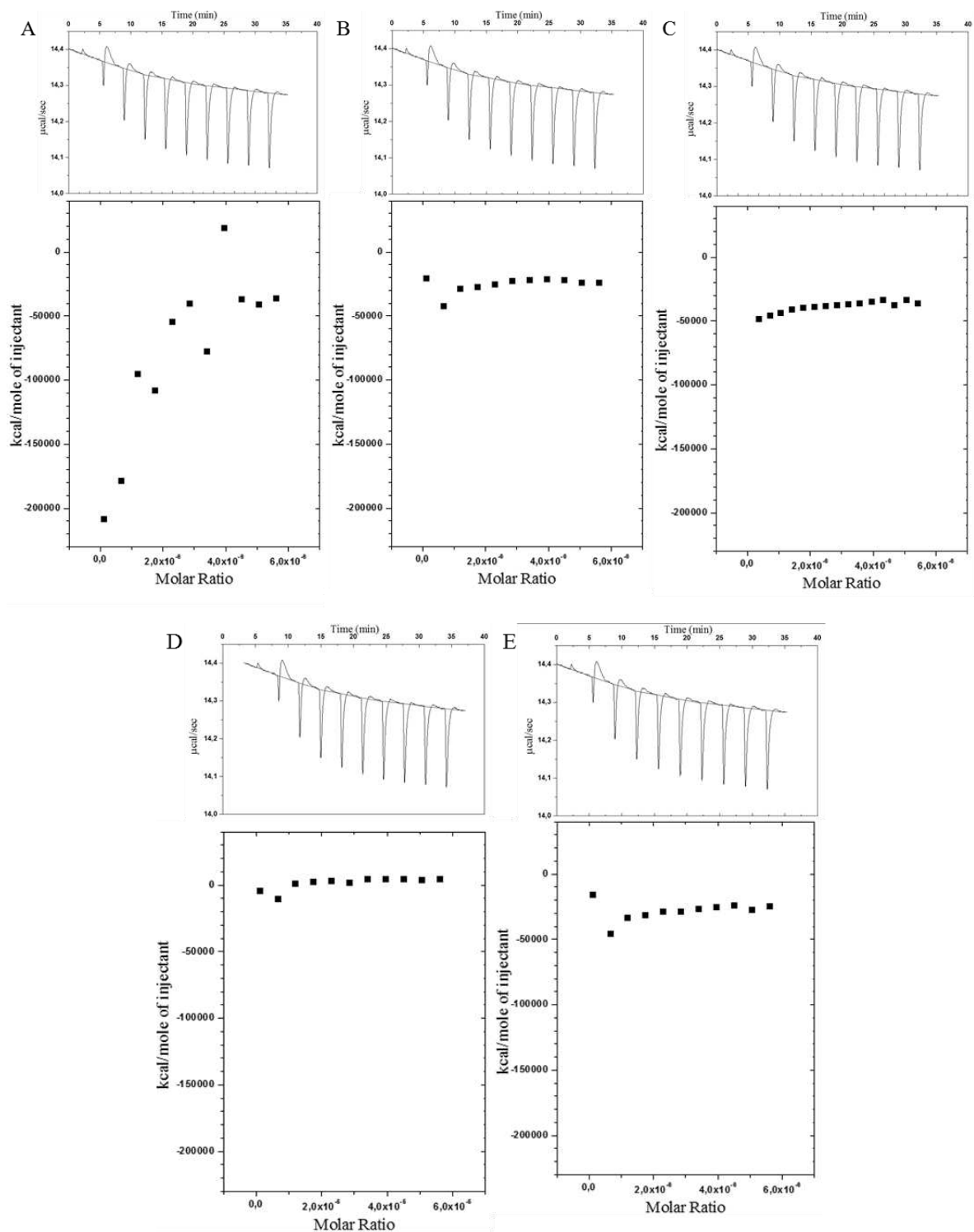


Figura 2 - Curvas de ITC (topo) e isotermas de ligação (parte inferior) correspondentes à titulação da solução de TGF- β 2 (26 nM) nas soluções de (A) α -caseína (26 μM), (B) β -caseína (26 μM), (C) k-caseína (26 μM), (D) α -lactoalbumina (26 μM) e (E) β -lactoglobulina (26 μM) à 25 °C. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os resultados revelaram que a complexação das proteínas com o polipeptídeo é exotérmica porque em todos os experimentos foi observada a liberação de energia ($\Delta H < 0$)

após cada injeção. No entanto, não é uma complexação típica uma vez que inicialmente ocorre um leve aumento da energia e depois essa energia se estabiliza a cada injeção, diferentemente do que ocorre normalmente, onde essa energia tende a diminuir a cada injeção até atingir a saturação do sistema, que é o primeiro ponto da curva onde a energia liberada na célula é igual à zero ($\Delta H = 0$) (Girard, Turgeon & Gauthier, 2003). Dessa forma, não foi possível obter os parâmetros termodinâmicos com esse estudo.

No entanto, é possível observar um comportamento diferente entre a α -caseína e o TGF- β 2 (Figura 2A), onde de acordo com os resultados obtidos apresentou as maiores variações de entalpias de ligação, observado pela maior diferença entre o máximo e o mínimo dessa curva, isso pode indicar uma maior afinidade entre o TGF e α -caseína. Essa observação nos leva a acreditar que a α -caseína tenha maior possibilidade de ser a proteína latente que se associa ao TGF- β formando o complexo latente, nas condições estudadas. Pois entre as proteínas utilizadas foi a que apresentou maior entalpia negativa na primeira injeção com uma variação de cerca de $-210000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, seguido da κ -caseína com $-50000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, β -caseína com $-30000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, β -lactoglobulina com $-15000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e α -lactoalbumina com $-5000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Essa tendência mostra ainda a maior afinidade que ocorre entre o TGF- β 2 e as caseínas preferencialmente quando não ocorre nenhum tipo de tratamento térmico, pois encontra-se maiores valores para as caseínas.

Esse resultado explica a diferença encontrada entre o leite cru recém ordenhado e o leite cru refrigerado, pois como descrito por Roggers e Goddards (1996) para se tornar ativo é necessário que o TGF- β esteja dissociado da proteína e dessa forma, se torne imunorreativo e exerça sua função biológica. Uma das prováveis formas de dissociação desse complexo formado entre α -caseína com o TGF- β 2 é pela presença da plasmina que é uma enzima endógena do leite classificada como uma proteinase alcalina, que encontra-se associada às frações de caseína no leite, sendo responsável por aproximadamente 90% da proteólise total que ocorre no leite (Fernandes & Oliveira, 2007). Ou por outras enzimas proteolíticas presentes no leite cru refrigerado que é obtido do armazenamento do mesmo em tanques de refrigeração. Isto é ainda favorecido pelo tempo de armazenamento, o que aumenta as chances de multiplicação de bactérias psicotróficas proteolíticas, que se desenvolvem em baixas temperaturas ($0 \text{ }^\circ\text{C}$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$) (Nornberg, Tondo & Brandelli, 2009).

A plasmina degrada β -, α_{s1} - e α_{s2} -caseína, diferente das proteases produzidas por micro-organismos psicotróficos que causam proteólise com maior intensidade nas frações β - e κ -, seguidas da α_{s1} -caseína (Ismail & Nielsen, 2010; Fernandes et al., 2008; Bastian &

Brown, 1996).

Então é provável que a presença de maiores quantidades de plasmina e enzimas proteolíticas no leite cru obtido nos tanques refrigeradores, possibilite uma maior ativação do TGF- β 2, devido a maior degradação que ocorre na α -caseína, possivelmente impossibilitando que essa se mantenha associada ao TGF- β .

4. CONCLUSÃO

Dentre as tecnologias estudadas a utilização das técnicas de membrana com a separação da caseína, seguida por secagem em spray dryer, se mostrou mais efetiva na obtenção de um concentrado de proteínas com alta concentração de TGF- β 2. Além disso, a não utilização de tratamento térmico possibilitou a maior concentração desse fator de crescimento nas frações das proteínas do soro e as caseínas em comparação com as proteínas obtidas com tratamento térmico. Dessa forma, a concentração do TGF- β é dependente da histórica térmica do leite.

O TGF- β 2 apresenta uma maior afinidade com a α -caseína nas condições estudadas, sendo esta possivelmente a proteína associada para a formação do complexo latente. Além de demonstrar uma maior afinidade que ocorre entre o TGF- β 2 e as caseínas preferencialmente em relação às proteínas do soro. Todavia maiores estudos devem ser realizados para afirmar que esta caseína seja a única a se associar ao TGF- β 2.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKBACHE, A.; ROCAFI, A.; SAFFON, M.; LAMIOT, E.; MORONI, O.; TURGEON, S.; RICHARD, C.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. (2011). Effect of heating on the distribution of transforming growth factor- β 2 in bovine milk. *Food Research International*, 44, 28-32.

BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, 6, 5, 435-457.

BRASIL. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n °62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislação>>. Acesso em: 23 de julho de 2015.

BROWN, P.; WAKEFIELD, L.; LEVINSON, A.; SPORN, M. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, 3. *Growth Factors*, 3, 35-43.

COX, D.; BURK, R. (1991). Isolation and characterization of milk growth factor, a transforming-growth-factor- β 2-related polypeptide, from bovine milk. *European Journal of Biochemistry*, 197, 353-358.

DAOPIN, S.; PIEZ, K.A. OGAWA, Y.; DAVIS, D.R. (1992). Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unusual fold of the superfamily. *Science*, 257(5068), 369-373.

FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A. (2007). Atividade enzimática relacionada às células somáticas no leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 62, 356, 17-25.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORRETI, T.S.; ROSIM, R.E.; LIMA, C.G.; OLIVEIRA,

C.A.F. (2008). Casein fractions of ultra high temperature milk with different somatic cell counts. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 1, 149-152.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry* (1st ed.). London, UK: Blackie Academic & Professional.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; MAUBOIS, J.L. (2006). Review: Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Le Lait*, 86, 99-125.

GINJALA, V.; PAKKANEN, R. (1998). Determination of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunoassay*, 19, 195-207.

GIRARD, M.; TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F. (2003). Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin-pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4450-4455.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S.S. (2010). Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93, 11, 4999-5009.

JIN, Y.; COX, D.; KNECHT, R.; RASCHDORF, F.; CERLETTI, N. (1991). Separation, purification, and sequence identification of TGF- β 1 and TGF- β 2 from bovine milk. *Journal of Protein Chemistry*, 10, 565-575.

LYONS, R.; PURCHIO, A.; MOSES, H. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *Journal of Cell Biology*, 110, 1361-1367.

MASSAQUE, J. (1990). The transforming growth factor- β family. *Annual Review of Cell Biology*, 6, 597-641.

MAUBOIS, J.; FAUGUANT, J.; JOUAN, P.; BOURTOURAUULT, M. (2003). Method for obtaining a TGF-beta enriched protein fraction in activated form, protein fraction and therapeutic applications. Patent US No. 7141262B2.

NORNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. (2009). Bactérias psicrotróficas

e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37, 157-163.

OLLIKAINEN, P. (2011). Activation of transforming growth factor- β 2 in bovine milk during indirect heat treatments. *International Dairy Journal*, 21, 921-925.

OLLIKAINEN, P.; MUURONEN, K.; TIKANMAKI, R. (2012). Effect of pasteurization on the distribution of bovine milk transforming growth factor- β 2 in casein and whey fractions during micro- and ultrafiltration processes. *International Dairy Journal*, 26, 141-146.

PAULA, J.C.J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M. (2009). Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 64, 367/368, 19-25.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. (2006). Milk growth factors as health products: some technological aspects. *International Dairy Journal*, 16, 1415-1420.

ROGGERS, M.L.; GODDARD, S. (1996). Transforming growth factor β in bovine milk: concentration, stability and molecular mass forms. *Journal of Endocrinology*, 151, 77-86.

SAHARINEN, J.H.; TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. (1999). Latent transforming growth factor- β binding proteins (LTBSs) - structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- β action. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 10, 99-117.

SOUZA, S.S. (2009). Efeito da adição de culturas lácticas mesofílicas sobre a qualidade do queijo de coalho. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Pará, 34-37.

VASBINDER, A.J.; ALTING, A.C.; de KRUIF, K.G. (2003). Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 31(1-4), 115-123.

Capítulo 2 - Efeito do processamento na concentração do TGF- β 2

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito do processamento na concentração do TGF- β 2, avaliando pasteurização lenta e rápida, e as técnicas de membrana, além da evaporação à vácuo e secagem por spray dryer. Foi quantificado o teor de TGF- β em cada uma das amostras retiradas após cada etapa do processamento do leite. Além disso, foram realizadas análises de composição centesimal nas mesmas. TGF- β 2 apresentou forte correlação (0,95) com o teor de proteína presente nas amostras. Não há influência da pasteurização na concentração do TGF- β 2, embora a pasteurização afete a distribuição do TGF- β 2 nas frações de proteínas do soro e da caseína, o que pode ser observado na redução do teor de TGF- β 2 no soro quando um tratamento térmico foi aplicado. Diferentemente de quando aplicou-se a microfiltração e observou-se que TGF- β 2 estava distribuído igualmente entre a caseína e o soro. A concentração por evaporação a vácuo apresentou fator de concentração menor que 1 na concentração do TGF- β 2, pois concentra-se mais os demais constituintes do que o TGF- β 2. Diferentemente da secagem em spray dryer que apresentou valores maiores que 1, mostrando que TGF- β 2 é concentrado em maior quantidade que os demais constituintes sólidos das amostras.

Palavras-chave: fator de crescimento, processamento térmico, proteína do soro, caseína, técnicas de membrana.

1. INTRODUÇÃO

Leite e colostro bovino contêm certo número de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. A distribuição entre essas moléculas não é clara, uma vez que todos eles podem ser envolvidos na proliferação e diferenciação celular (Gauthier, Pouliot & Maubois, 2006). Os mais abundantes fatores de crescimento presentes no colostro e leite bovino são fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), fatores de crescimento transformador beta

(TGF- β), alguns membros da família dos fatores de crescimento epidérmico (EGF) e fibroblasto básico (bFGF) ou fibroblasto (FGF) (Grosvenor, Picciano & Baumrucker, 1993; Pakkanen & Aalto, 1997).

A família do TGF- β desempenha um papel importante na embriogênese, reparação de tecidos, formação de ossos e cartilagens e no controle do sistema imune. TGF- β 2 é a forma predominante dos membros da família do TGF encontrado em produtos lácteos (Pouliot & Gauthier, 2006).

As abordagens desenvolvidas para a extração e a concentração de fatores de crescimento a partir do leite são baseadas em sua massa, carga ou afinidade de ligação (Pouliot & Gauthier, 2006). Os processos em grande escala desenvolvidos para a extração e a concentração desses fatores de crescimento a partir do soro de leite são baseados em cromatografia de troca catiônica. Por exemplo, Francis, Register, Webb e Ballard (1995) desenvolveram uma mistura de fatores de crescimento usando como base o processo de extração por troca catiônica. Por outro lado, Maubois, Fauquant, Jouan e Bourtorault (2003) propuseram uma combinação de tratamento de calor e acidificação para preparar uma fração de proteína com maior concentração de TGF- β 2 a partir do uso de microfiltração usando membrana com poros de 0,1 μ m.

A aplicação de tratamento térmico afeta a separação e concentração do TGF- β nas frações de proteínas do leite, em relação à caseína e às proteínas do soro, mas não afeta a concentração no leite (Ginjala & Pakkanen, 1998), sendo que o uso da pasteurização do leite, para a separação do soro, diminui o rendimento do fator de crescimento no concentrado de proteínas do soro (Ollikainen, Muuronen & Tikanmaki, 2012). Rocafi, Lamiot, Moroni, Turgeon, Gauthier e Pouliot (2011) separaram caseína por separação ácida, em seguida, concentrou o soro usando ultrafiltração e diafiltração. Após isso, eles usaram diferentes tratamentos térmicos e valores de pH para estudar TGF- β na fração das proteínas do soro. Eles propuseram então que a melhor forma de concentrar o TGF a partir do soro é utilizando um leite não pasteurizado e realizando a pasteurização do soro, dessa forma, o rendimento encontrado foi de 2,6 pg/mg de proteína.

Ollikainen et al. (2012) observaram que se o leite é pasteurizado e o soro é usado para concentrar fatores de crescimento, menos de 10% do TGF é concentrado, mas se é usado leite não pasteurizado, consegue-se recuperar 40% do TGF no soro. Nesse estudo a concentração de TGF- β 2 foi de 3,5 μ g/g de proteína usando membranas para a separação das proteínas do soro. Os autores observaram que se a pasteurização é utilizada antes da

separação é possível obter uma fração de caseína rica em TGF- β . Sendo que a fração de caseína tem sido usada com sucesso em crianças com doença de Crohn (Fell, 2005).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a influência do calor sobre a concentração do TGF- β 2 no leite bovino. Foi avaliado o efeito da microfiltração (ausência de tratamento térmico), da pasteurização rápida (72 °C por 15 s), da pasteurização lenta (65 °C por 30 minutos), da concentração a vácuo e da secagem por spray dryer na concentração do TGF- β 2. Por fim, objetivou-se relacionar o teor de TGF- β 2 com o teor de proteínas em cada uma dessas etapas, bem como avaliar qual a melhor rota de produção de um concentrado proteico para a maior concentração de TGF- β 2 no produto final.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG.

A Figura 1 mostra as etapas que foram utilizadas para a concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral. A cada etapa foi retirada uma amostra para posteriores análises, sendo mantidas congeladas (-20 ± 2 °C) até o momento da análise. Os pós foram embalados a vácuo e mantidos sobre o abrigo da luz. Foram realizadas três repetições.

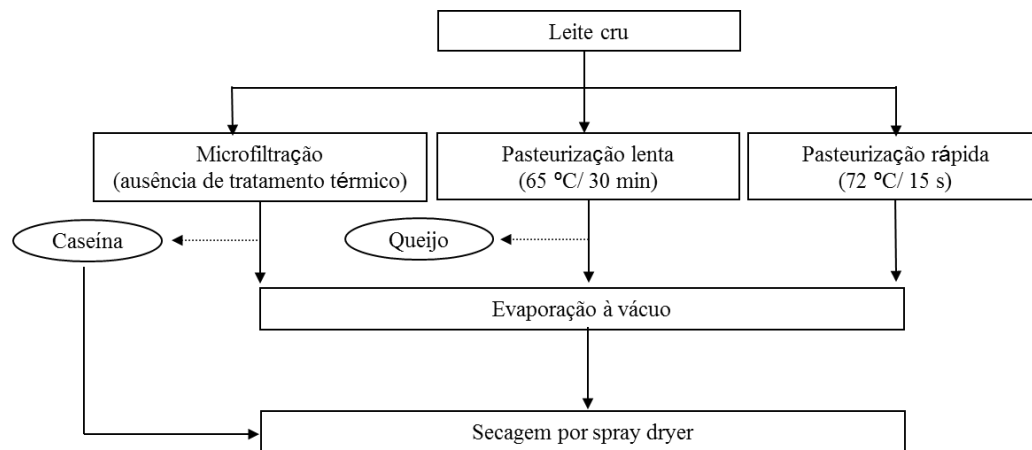


Figura 1 - Concentração do TGF- β 2 a partir do leite cru integral, com a utilização de técnicas de membrana ou tratamento térmico, evaporação a vácuo e secagem por spray dryer.

2.1. Preparo das amostras

Nesse estudo houve duas fontes distintas de leite cru, sendo a primeira obtida no estábulo da UFV, essa amostra de leite foi utilizada na microfiltração; e a segunda foi

obtida no laticínios da UFV, proveniente de tanques de refrigeração, este leite foi utilizado nas etapas de pasteurização.

2.2. Microfiltração

A microfiltração foi realizada em equipamento construído pela empresa Tetra Pak® Processing, França, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, por meio de uma filtração tangencial através de membranas de cerâmica tubular “Membralox®” com poros de tamanho de 0,1 µm e 1,4 µm.

A microfiltração em membrana com poros de 1,4 µm ocorreu com fluxo de permeação médio de 145 L·h⁻¹, sistema com área total de membrana 0,24 m² e com pressão transmembrana de 0,5 bar. Com uma temperatura média durante o processo de 38 °C.

A microfiltração em membrana com poros de 0,1 µm ocorreu com fluxo de permeação médio de 35 L·h⁻¹, sistema com área total de membrana de 0,24 m² e com pressão transmembrana de 0,5 bar. Foi utilizado um fator de concentração de 3x para a obtenção do soro ideal. Com uma temperatura média durante o processo de 45 °C. Ao retirar o soro ideal iniciou-se a diálise da caseína utilizando água destilada pasteurizada até obtenção de uma concentração de sólidos solúveis de 0,0 °Brix, medido em refratômetro digital Biobrix®, modelo 2WAJ-D.

Nesse processo foi obtido soro ideal (SRI) e caseína (CAS) que não sofreram tratamento térmico.

2.2. Pasteurização

Para avaliar o efeito da pasteurização foram utilizados dois tratamentos térmicos: pasteurização rápida (72 °C/ 15 s) e pasteurização lenta (65 °C/30 minutos). Na pasteurização rápida 50 litros de leite cru foram pasteurizados em pasteurizador de placas (Fischer Term, Brasil), enquanto que na pasteurização lenta 100 L de leite foram pasteurizados em tanque de aço inox com camisa dupla (Biasinox, Brasil).

Nesse processo foram obtidos leite pasteurizado (LEP) e leite pasteurizado lentamente (LPL). O LPL foi utilizado para a produção de queijo Minas Frescal com adição de 0,02 g·100g de ácido láctico (Macalé, Brasil), 0,04 g·100g de cloreto de cálcio (Macalé, Brasil) e 0,015 g·100g de coalho (Clerici, Brasil). Obteve-se ao final soro (SOR) e queijo (QUE).

2.3. Evaporação a vácuo

Na evaporação a vácuo foi utilizado um evaporador a vácuo de único estágio Modelo 70049 (Treu®, Brasil). O LEP foi concentrado até um valor de sólidos solúveis de 42 °Brix medido em refratômetro digital (Biobrix®, modelo 2WAJ-D, Brasil), o SOR foi concentrado até 55 °Brix e o SRI até 51 °Brix, apresentando um tempo médio para a concentração de 80, 90 e 110 minutos, respectivamente. Além disso, a temperatura média utilizada foi de 60 a 70 °C.

Uma etapa adicional foi realizada na concentração dos soros com o objetivo de facilitar a secagem, que foi a realização da cristalização até uma taxa de 70%, que foi efetuado em tacho aberto com camisa dupla (Inolux, Brasil) e com resfriamento até 30 °C.

Nessa etapa foram obtidos concentrado de leite (CLE), concentrado de soro (CSO) e concentrado de soro ideal (CSI).

2.4. Secagem

Na secagem do CSO e CSI foi utilizado spray dryer Production Minor (GEA-NIRO, Alemanha) com atomizador de disco. Os parâmetros de secagem foram temperatura de entrada de 170 °C para ambos os soros, temperatura de saída de 90-100°C para o SOR e 85-95 °C para SRI.

Na secagem do CLE e CAS foi utilizado spray dryer Production (GEA-NIRO, Alemanha) com atomizador de disco. Os parâmetros de secagem foram temperatura de entrada de 180 °C para ambos e a temperatura de saída variou de 75 a 90 °C para o LEP e 85-90 °C para CAS.

2.5. Composição das amostras

A cada etapa dos diferentes processamentos foi retirada uma amostra e foram realizadas as seguintes análises de composição: gordura, proteína, cinzas, umidade e lactose que foi calculado por diferença.

Os teores de gordura foram avaliados em duplicata, pelo método volumétrico de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os teores de nitrogênio total para as amostras foram determinados em duplicata pelo método de Kjeldhal, sendo os teores de nitrogênio multiplicados pelo fator de conversão 6,38 para obtenção dos valores equivalentes de proteína (AOAC, 1995).

Os teores de cinzas foram determinados em duplicata segundo métodos descritos pela

AOAC (1995).

Os teores de umidade das amostras foram determinados em duplicata segundo método número 12 do Instituto Adolfo Lutz (2008).

A concentração de TGF- β foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático ELISA (Quantikine, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) utilizando a metodologia proposta pelo fabricante.

2.6. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise estatística usando o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. As análises foram realizadas usando Excel software (Excel versão 2010, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal das amostras

A Tabela 1 resume os resultados encontrados para a composição centesimal das amostras, bem como os valores encontrados para a concentração do TGF- β 2 em relação ao extrato seco.

Tabela 1 - Composição centesimal das amostras (n = 3).

Amostra	Extrato seco (g·100g ⁻¹)	Proteína (g·100g ⁻¹)	Gordura (g·100g ⁻¹)	Cinzas (g·100g ⁻¹)	Lactose * (g·100g ⁻¹)	TGF-β2 (ng·g ⁻¹ sólidos)
LC1	10,37 ± 3,68	3,2 ± 0,0	3,2 ± 0,5	0,76 ± 0,02	3,26 ± 2,86	2,30 ± 0,52
LC2	10,46 ± 4,35	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,1	0,80 ± 0,05	2,98 ± 1,08	1,65 ± 0,06
LEP	10,10 ± 3,12	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	0,72 ± 0,14	2,52 ± 2,82	2,31 ± 0,79
LPL	11,08 ± 0,98	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,0	0,81 ± 0,00	4,49 ± 2,12	1,70 ± 0,00
LEM	7,98 ± 2,49	3,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	1,35 ± 1,22	3,14 ± 3,05	2,22 ± 0,11
SOR	5,79 ± 3,01	1,0 ± 0,7	0,4 ± 0,0	0,55 ± 0,01	3,83 ± 3,17	0,84 ± 1,17
SRI	4,91 ± 3,00	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,46 ± 0,01	3,59 ± 0,96	1,77 ± 0,04
CAS	10,30 ± 2,65	9,1 ± 2,0	0,0 ± 0,0	1,32 ± 0,01	0,09 ± 0,05	1,65 ± 0,00
QUE	34,90 ± 3,68	14,9 ± 2,2	15,2 ± 5,3	3,80 ± 0,04	2,26 ± 0,84	0,24 ± 0,00
CLE	42,72 ± 12,07	12,4 ± 1,1	11,9 ± 2,2	2,76 ± 0,02	15,62 ± 2,94	0,70 ± 0,07
CSO	55,64 ± 9,03	7,9 ± 3,7	0,7 ± 0,6	5,41 ± 2,15	39,79 ± 7,47	0,39 ± 0,18
CSI	48,17 ± 5,49	5,7 ± 1,2	0,0 ± 0,0	4,22 ± 0,24	37,90 ± 3,58	0,02 ± 0,00
LPO	96,13 ± 2,01	26,8 ± 5,9	26,0 ± 7,8	6,02 ± 0,08	37,27 ± 0,95	1,38 ± 0,05
SPO	93,74 ± 5,62	11,4 ± 4,8	5,7 ± 2,5	8,42 ± 0,69	68,24 ± 0,13	0,68 ± 0,80
SIP	94,12 ± 5,69	9,9 ± 3,0	0,0 ± 0,0	8,71 ± 0,84	75,50 ± 6,75	0,01 ± 0,00
CMP	92,38 ± 0,42	74,8 ± 6,3	0,0 ± 0,0	10,46 ± 2,09	7,08 ± 1,04	2,74 ± 0,01

Onde: LC1 - leite cru laticínios UFV; LC2 - leite cru estábulo UFV; LEP - leite pasteurizado (72 °C/15 s); LPL - leite pasteurizado (65 °C/30 minutos); SOR - soro; SRI - soro ideal; LEM - leite microfiltrado; CAS - caseína; CLE - concentrado leite; CSO - concentrado soro; CSI - concentrado soro ideal; LPO - leite em pó; SPO - soro em pó; SIP - soro ideal em pó; CMP - caseína micelar em pó; QUE – queijo. * Dados calculados.

Os dados da tabela 1 para leite cru e leite pasteurizado estão dentro dos padrões e requisitos de qualidade previstos na Instrução Normativa n °62 (Brasil, 2011). Os dados obtidos para soro, soro ideal, concentrado de soro e soro em pó estão conforme ao regulamento técnico de identidade e qualidade de soro de leite (Brasil, 2010). Não há regulamento técnico para as demais amostras.

As concentrações encontradas para o TGF-β2 para o leite cru (LC1, LC2) estão de acordo com valores descritos na literatura, que descrevem valores de 1,0 a 7,0 ng/g de sólidos (Pouliot & Gauthier, 2006; Gauthier, 2006), assim como o leite pasteurizado (LEP) e leite pasteurizado lentamente (LPL) (Ollikainen, 2011). Não há relatos na literatura para leite microfiltrado (LEM), queijo Minas Frescal (QUE), caseína (CAS), concentrado de leite (CLE), soro (CSO) ou soro ideal (CSI), nem para os produtos em pó, como leite em pó (LPO), soro em pó (SPO), soro ideal em pó (SIP) e caseína micelar em pó (CMP).

A concentração do TGF-β2 está fortemente relacionada com o teor de proteína presente em cada amostra, pois ao aplicar o coeficiente de correlação linear de Pearson foi

obtido uma correlação de 0,95, correlação essa positiva mostrando que ao aumentar-se o teor de proteína na amostra, aumenta-se consequentemente a concentração do TGF- β 2, ou vice-versa, como pode-se observar na Figura 2.

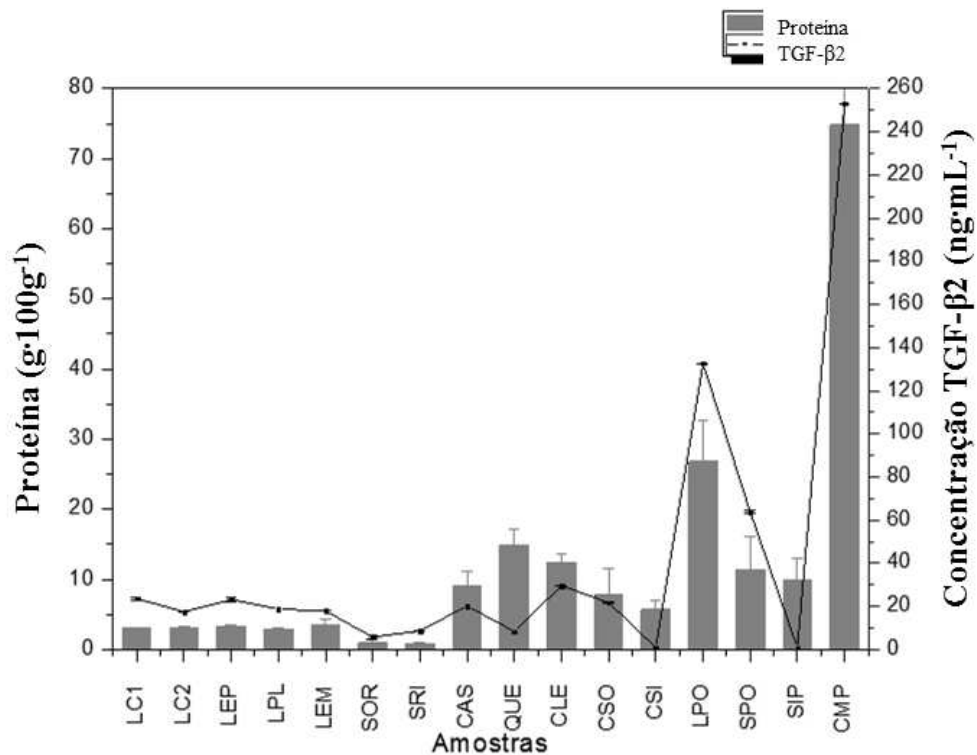


Figura 2 - Relação da porcentagem de proteína com a concentração de TGF- β 2 encontrada em cada uma das amostras (n = 3). Onde: LC1 - leite cru laticínios UFV; LC2 - leite cru estábulo UFV; LEP - leite pasteurizado (72 °C/15 s); LPL - leite pasteurizado (65 °C/30 minutos); SOR - soro; SRI - soro ideal; LEM - leite microfiltrado; CAS - caseína; CLE - concentrado leite; CSO - concentrado soro; CSI - concentrado soro ideal; LPO - leite em pó; SPO - soro em pó; SIP - soro ideal em pó; CMP - caseína micelar em pó; QUE – queijo.

Muitas observações neste e em outros estudos (Ollikainen et al., 2012; Ollikainen, 2011; Akbache et al., 2011) sugerem essa interação entre o TGF- β e as proteínas do leite, o que explicaria em muitos estudos a distribuição desse fator de crescimento entre as frações de caseína e proteínas do soro dependendo do tipo de tratamento térmico que o leite sofreu anteriormente. Estudos sugerem que esta molécula possa interagir com as micelas de caseína durante a pasteurização (Ollikainen, 2011; Akbache et al., 2011). O tratamento térmico pode favorecer a polimerização e a interação não específica do TGF- β 2 com outras proteínas, devido ao seu caráter hidrofóbico.

3.2. Efeito da pasteurização sobre o leite, soro e caseína

A Tabela 2 mostra o efeito da pasteurização rápida e pasteurização lenta em

comparação com a microfiltração na concentração (ng/g de matéria seca) do TGF- β 2 no leite, soro e caseína. Observa-se que a concentração do TGF- β aumenta ao aplicar-se uma pasteurização rápida e diminui na pasteurização lenta, embora não tenha diferença significativa ($p < 0,05$) entre os leites, mostrando que a pasteurização não afeta a concentração do TGF- β 2 no leite, como observado também por Ginjala e Pakkanen (1998) e Elfstrand et al. (2002). O mesmo resultado foi observado por Akbache et al. (2011) que ao pasteurizar (72 °C/ 20s) um leite integral encontrou resultados similares para o leite cru (33 pg/mg sólidos) e o leite pasteurizado (32 pg/mg sólidos). A resistência relativa desse fator de crescimento ao aquecimento é explicada pelas 9 ligações dissulfeto que apresenta (Gauthier et al., 2006).

Tabela 2 - Efeito da pasteurização no conteúdo de TGF- β 2 no leite, soro e caseína (n=3).

Amostra	Concentração TGF- β 2 (ng/g matéria seca)		
	Microfiltrado	Pasteurização lenta	Pasteurização Rápida
Leite	2,221 \pm 0,11 ^a	1,699 \pm 0,00 ^a	2,308 \pm 0,79 ^a
Soro	1,186 \pm 0,04 ^b	0,840 \pm 1,17 ^{ab}	-
Caseína	1,652 \pm 0,01 ^b	0,240 \pm 0,01 ^b	-

Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Houve uma diminuição da concentração do TGF- β 2 quando aplicamos a pasteurização lenta em relação a pasteurização rápida. Na pasteurização o objetivo principal é a destruição de células vegetativas dos micro-organismos que apresentam diferenças bem grandes nos valores de Z, que é a elevação de temperatura necessária para aumentar em 10 vezes a velocidade da reação de degradação, em relação aos nutrientes, apresentando valores de 8-12 °F e 45-80 °F, respectivamente. O parâmetro Z é utilizado na otimização de tratamentos térmicos aplicados aos alimentos na indústria. Por isso, os tratamentos em temperaturas mais altas por tempos mais curtos, no caso a pasteurização rápida, apresentam reais vantagens e dão melhores resultados quando comparados com a pasteurização lenta, pois ocorre menor degradação dos nutrientes e conseqüentemente do TGF- β (Sgarbieri, 1996).

É possível notar também que não ocorre diferença significativa ($p < 0,05$) quando são comparadas a distribuição de TGF- β 2 nas proteínas do soro e nas caseínas em ambos os tratamentos (pasteurização e microfiltração). Embora ocorra uma grande redução do teor de TGF- β 2 nas frações das proteínas do soro e caseína na pasteurização.

A distribuição do fator de crescimento entre as frações das proteínas do soro e

caseína são fortemente dependentes do TGF- β estar na forma ativa ou não. Quando não há tratamento térmico ou temperaturas inferiores a 65 °C, a distribuição da forma latente ou ativa no soro e caseína não é muito específica (Ollikainen, 2011). No presente estudo, o teor de TGF- β 2 medido no soro microfiltrado veio de um volume de 50 litros e na caseína de 10 litros, ou seja, 20% do volume de soro, sendo que a diferença dos teores encontrados foi de 28,2%. Então, provavelmente a diferença de valores encontrados se deve a maior concentração da caseína em relação ao soro, uma vez que como observado por Ollikainen et al. (2012) o processo de diálise que foi adicionado a produção da caseína micelar não diminui a concentração do TGF, mas somente diminui o teor de lactose e lava parte da β -lactoglobulina.

No entanto, ao compararem-se os teores de TGF- β presentes no soro ou caseína microfiltrado com o soro ou caseína que foram obtidos pela produção de queijo, ou seja, com a pasteurização do leite, é possível notar uma redução em ambos. Resultado semelhante foi observado por Akbache, Lamiot, Moroni, Turgeon, Gauthier e Pouliot (2009) que ao compararem um soro produzido por microfiltração de leite cru com o soro de cheddar e mussarela obtidos usando leite pasteurizado observaram que o primeiro apresenta valores mais elevados de TGF- β . Outros autores também observaram que a pasteurização do leite diminui o rendimento do fator de crescimento nas frações das proteínas do soro (Rocafi et al., 20011; Akbache et al., 2011; Ollikainen et al., 2012).

3.3. Efeito da concentração por evaporação a vácuo e secagem por spray dryer

O processo de evaporação a vácuo e secagem por spray dryer possibilita a concentração dos constituintes do alimento, devido à remoção de parte da água existente no mesmo. No entanto na evaporação o processo de remoção de água é lento, pois ocorre uma troca de calor indireta e na secagem tem-se uma remoção de água praticamente instantânea, uma vez que a partícula entra em contato direto com o ar quente. O efeito desses processamentos na concentração do TGF- β 2 não é reportado na literatura. Desta forma, é importante saber como essas etapas do processamento afetam a concentração de TGF- β 2 no leite, soro, soro ideal e caseína.

A Tabela 3 apresenta o fator de concentração do TGF- β 2 em relação aos sólidos presentes nas amostras de leite, soro, caseína e soro ideal encontrados no processo de evaporação e secagem. O fator de concentração foi calculado pela diferença dos valores da concentração do TGF- β 2 (ng/g de matéria seca) obtidos na etapa anterior em relação à

etapa de interesse. Nota-se que o processo de evaporação a vácuo apresenta um fator menor que 1 em todas as amostras, o que mostra que a evaporação apresenta um efeito negativo na concentração do TGF-β2, uma vez que conseguiu-se concentrar em maior quantidade os demais sólidos presentes em relação ao TGF-β2. Diferentemente do que é observado quando se realiza a secagem, que apresenta valores maiores que 1, exceto para o soro ideal, então no processo de secagem por spray dryer consegue-se concentrar em maior quantidade o TGF em relação aos demais constituintes sólidos.

Tabela 3 – Fator de concentração do TGF-β durante o processo de evaporação a vácuo e secagem por spray dryer para o leite, soro, soro ideal e caseína (n=3).

Amostra	Fator de concentração	
	Evaporação	Secagem
Leite	0,302 ± 0,00 ^{ab}	2,038 ± 0,21 ^a
Soro	0,715 ± 0,43 ^a	1,381 ± 1,18 ^{ab}
Soro ideal	0,013 ± 0,00 ^b	0,250 ± 0,02 ^b
Caseína	-	1,659 ± 0,13 ^a

Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

As diferenças observadas no fator de concentração ao efeito da evaporação a vácuo e a secagem se devem ao efeito principalmente da temperatura. Na concentração vários efeitos podem ser observados nas propriedades do leite e/ou soro, como o aumento das interações, sendo suscetíveis também a danos nas proteínas, causados pela alteração brusca de pressão (Silva, Pereira, Oliveira & Costa, 1997; Coelho, 2002). Esses efeitos são mais pronunciados na concentração a vácuo, pois os produtos são submetidos a altas temperaturas (em torno de 60-70 °C) por longos períodos de tempo (cerca de 2 horas), diferentemente da secagem onde a partícula é submetida a uma elevação de temperatura durante um curto espaço de tempo, minimizando os danos térmicos ao produto.

O maior dano térmico é observado no soro ideal que apresentou valor próximo a 0 no processo de concentração e muito abaixo na secagem em relação aos demais. Essa maior sensibilidade do soro ideal a mudanças de temperatura, provavelmente se deve ao fato do primeiro tratamento térmico ocorrer no evaporador a vácuo, pois anteriormente não há nenhum tratamento térmico, assim as proteínas que estão em sua forma nativa começam a desnaturar, e como no caso do soro ideal não há as micelas de caseínas, essas proteínas começam a formar um aglomerado entre elas, o que levou a precipitação das mesmas no evaporador a vácuo durante o experimento, e conseqüentemente resultou no baixo fator de

concentração encontrado, uma vez que como evidenciado na figura 2, a concentração de TGF- β é fortemente dependente do teor de proteínas.

3.4. Simulação de rotas de processamento

A Figura 3 apresenta as quatro possíveis rotas de produção dos concentrados lácteos estudadas, onde temos na rota 1, a produção de caseína micelar em pó; rota 2, a produção de leite em pó; rota 3 – a produção de soro em pó e rota 4 – a produção de soro ideal em pó. Nessa figura temos os valores dos fatores de concentração calculados no item anterior bem como alguns fatores de transmissão de componente para as etapas de microfiltração e pasteurização, que foram calculados da mesma forma que os fatores de concentração. Foi atribuído uma concentração de TGF- β_2 para o leite cru, sendo esse valor de $2,0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, valor este utilizado em todas as rotas.

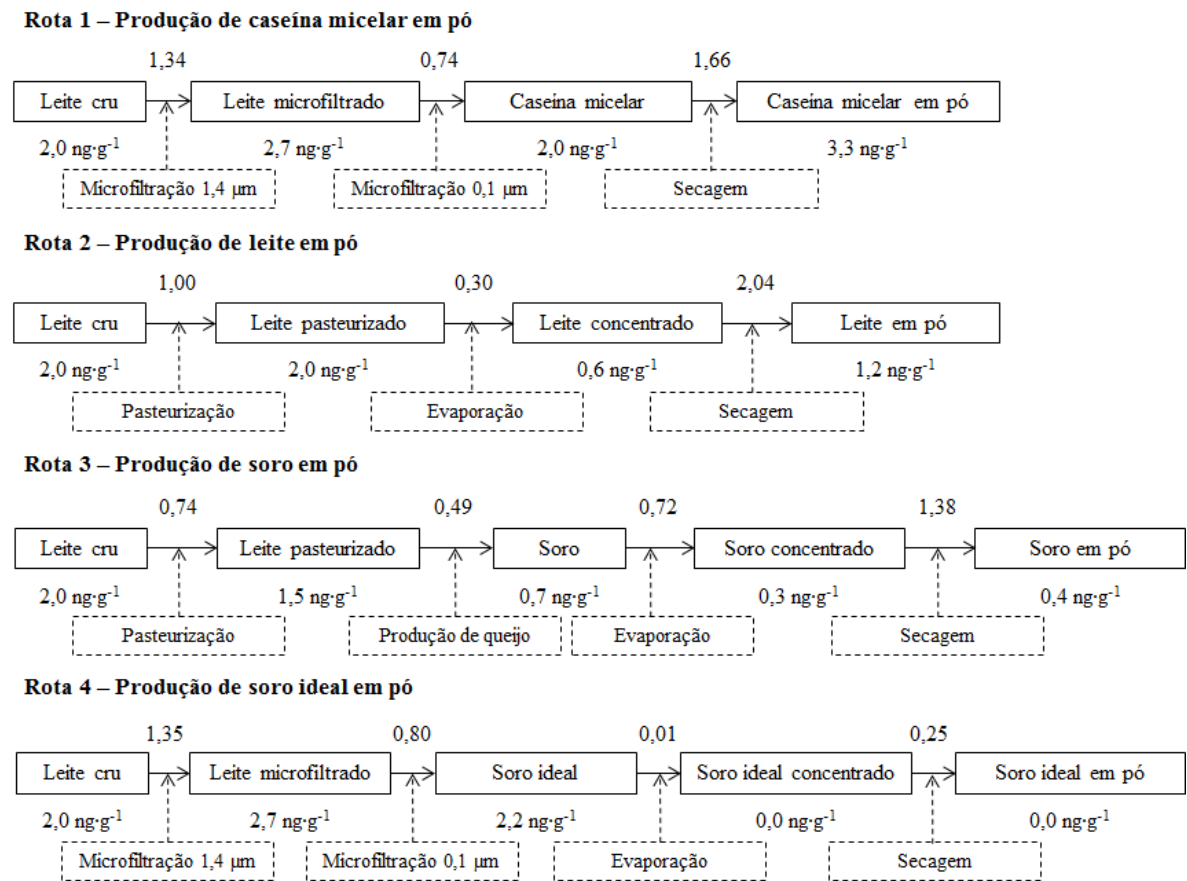


Figura 3 – Rotas de produção de concentrados proteicos, onde são apresentados os fatores de concentração a cada etapa e foi atribuído um valor para a concentração inicial de TGF- β_2 no leite cru.

Ao traçar essas rotas é possível notar que partindo de um leite com a mesma concentração de TGF- β_2 temos que a melhor rota para a produção de um concentrado

proteico com maior concentrações de TGF- β 2 é a rota 1, com produção de caseína micelar em pó, sem aplicação de tratamento térmico e utilização apenas da etapa de secagem, pois nessa rota foi possível obter uma caseína micelar em pó com 3,3 ng·g⁻¹ de TGF- β 2. Seguido pela produção de leite em pó (rota 2) com um concentrado proteico com 1,2 ng·g⁻¹ de TGF- β , sendo que nessa rota foi empregado tratamento térmico, evaporação a vácuo e secagem. Mais uma vez fica evidente que a produção de um concentrado proteico com maior teor de TGF- β 2 não é possível quando ocorre o fracionamento das proteínas do soro, pois com a produção de soro em pó (rota 3) e soro ideal em pó (rota 4) não é possível obter valores elevados de TGF- β 2.

4. CONCLUSÃO

TGF- β apresenta forte correlação (0,95) com o teor de proteína presente na amostra, o que explica a diferença de distribuição do TGF- β 2 nas proteínas do soro e na caseína, quando um tratamento térmico prévio no leite é aplicado, pois mudanças que ocorrem na proteína irão afetar diretamente o TGF- β 2.

A pasteurização não afeta a concentração do TGF- β 2 no leite, diferentemente do que ocorre no soro e na caseína, uma vez que a pasteurização reduz a proporção de TGF- β 2 presente no soro. Mas quando não ocorre tratamento térmico o TGF- β 2 é distribuído igualmente entre o soro e a caseína.

A evaporação a vácuo afeta negativamente a concentração do TGF- β 2, pois apresenta fator de concentração menor que 1 quando comparado com a concentração nos demais constituintes da amostra. Por outro lado, a secagem por spray dryer afeta positivamente a concentração do TGF- β 2, pois este é concentrado em maior proporção que os demais constituintes sólidos de cada amostra.

A melhor forma de obtenção de um concentrado de proteínas com maior concentração de TGF- β 2 é através da produção de caseína micelar em pó, onde não foi aplicado nenhum tipo de tratamento térmico prévio ao leite e somente a secagem foi utilizada como forma de concentração dos constituintes.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKBACHE, A.; LAMIOT, E.; MORONI, O.; TURGEON, S.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. (2009). Use of membrane processing to concentrate TGF- β 2 and IGF-I from bovine milk and whey. *Journal of Membrane Science*, 326, 435-440.

AKBACHE, A.; ROCAFI, A.; SAFFON, M.; LAMIOT, E.; MORONI, O.; TURGEON, S.; RICHARD, C.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. (2011). Effect of heating on the distribution of transforming growth factor- β 2 in bovine milk. *Food Research International*, 44, 28-32.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. (1995). *Official methods of analysis*. (16 ed.). Washington: AOAC.

BRASIL. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n °62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislação>>. Acesso em: 23 de julho de 2015.

BRASIL. (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária. Sem data. Regulamento técnico de identidade e qualidade de soro de leite. Disponível em: <<http://www.terraViva.com.br/clique/minuta.html>>. Acesso em: 23 de julho de 2015.

COELHO, G.L.V. (2002). Effects of high hydrostatic pressure on foods: physical chemistry features. *Revista Universidade Rural*, 21, 105-110.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; AKESSON, B. (2002). Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effect of processing. *International Dairy Journal*, 12, 879-887.

FELL, J.M.E. (2005). Control of systemic and local inflammation with transforming

growth factor β containing formulas. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 29, S126-S188.

FRANCIS, G.L.; REGESTER, G.O.; WEBB, H.A.; BALLARD, F.J. (1995). Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. *Journal of Dairy Science*, 78, 1209-1218.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; MAUBOIS, J.L. (2006). Review: Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Le Lait*, 86, 99-125.

GINJALA, V.; PAKKANEN, R. (1998). Determination of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in bovine colostrum samples. *Journal of Immunoassay*, 19, 195-207.

GROSVENOR, C.E.; PICCIANO, M.F.; BAUMRUCKER, C.R. (1993). Hormones and growth factors in milk. *Revista Endocrine*, 14, 710, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea – São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

MAUBOIS, J.; FAUGUANT, J.; JOUAN, P.; BOURTOURAUULT, M. (2003). Method for obtaining a TGF-beta enriched protein fraction in activated form, protein fraction and therapeutic applications. Patent US No. 7141262B2.

OLLIKAINEN, P.; MUURONEN, K.; TIKANMAKI, R. (2012). Effect of pasteurization on the distribution of bovine milk transforming growth factor- β 2 in casein and whey fractions during micro- and ultrafiltration processes. *International Dairy Journal*, 26, 141-146.

OLLIKAINEN, P. (2011). Activation of transforming growth factor- β 2 in bovine milk during indirect heat treatments. *International Dairy Journal*, 21, 921-925.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. (2006). Milk growth factors as health products: some

technological aspects. *International Dairy Journal*, 16, 1415-1420.

ROCAFI, A.; LAMIOT, E.; MORONI, O.; TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y. (2011). Effect of milk thermal history on the recovery of TGF- β 2 by acid precipitation of whey protein concentrates. *Dairy Science and Technology*, 91, 615-627.

SGARBIERI, V.C. (1996). Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. (1 ed.). 388-391. São Paulo: Varela.

SILVA, H.F.S.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA Jr., L.C.G. (1997). Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, 190.

5. CONCLUSÃO GERAL

Dentre as tecnologias estudadas a utilização das técnicas de membrana com a separação da caseína, seguida por secagem em spray dryer, mostrou-se mais efetiva na obtenção de um concentrado de proteínas com elevada concentração de TGF- β 2. Além disso, a ausência de tratamento térmico possibilitou a maior concentração deste fator de crescimento nas frações das proteínas do soro e as caseínas em comparação com as proteínas obtidas com tratamento térmico.

A concentração do TGF- β é dependente da história térmica do leite. Sendo que a pasteurização não afeta a concentração do TGF- β 2 no leite, diferentemente do que ocorre no soro e na caseína, uma vez que a pasteurização reduz a proporção de TGF- β 2 presente no soro. Mas quando não ocorre tratamento térmico TGF- β 2 é distribuído igualmente entre o soro e a caseína.

A evaporação a vácuo afeta negativamente a concentração do TGF- β 2, pois apresenta fator de concentração menor que 1 quando comparamos com a concentração que ocorre com os demais constituintes da amostra. Enquanto que a secagem por spray dryer afeta positivamente a concentração do TGF- β 2, pois este é concentrado em maior proporção que os demais constituintes sólidos de cada amostra.

TGF- β apresenta forte correlação (0,95) com o teor de proteína presente na amostra, explicando por que ocorre diferença de distribuição do TGF- β 2 nas proteínas do soro e na caseína, quando é aplicado um tratamento térmico prévio no leite, pois mudanças que ocorrem nas proteínas irão afetar diretamente o TGF- β 2. Além disso, o estudo de ITC mostrou que o TGF- β 2 apresenta uma maior afinidade com a α -caseína nas condições estudadas, sendo esta possivelmente a proteína associada à formação do complexo latente. Além de demonstrar uma maior afinidade que ocorre entre o TGF- β 2 e as caseínas preferencialmente em relação às proteínas do soro.