



## CARACTERIZAÇÃO DE ZEÍNA ANIÔNICA POR ESPECTROSCOPIA DE FTIR E QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS CARBOXILATOS PRESENTES

Gabriela de Vita & Maria Rafaela Lopes dos Santos

Sergio A. Yoshioka

Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo

Gabriela.vita@usp.br

### Objetivos

Este estudo visa verificar a presença da zeína aniônica extraída do farelo de glúten de milho (CGM) em relação a zeína comercial (Aldrich) e a do milho branco, através da aplicação do método Kjeldahl e de Biureto para determinar as concentrações das proteínas totais.

A zeína é uma proteína das classes das prolaminas dos cereais presente cerca de 7% no endospermas dos grãos vítreos do milho, que possui poucas quantidades de Phe e Lys, mas grandes quantidades de Pro, Leu, Gln e Asn, tornando assim insolúvel em água, mas solúvel em solução hidroalcoólica. Como o processo de extração do amido dos grãos vítreos do milho da Ingredion Inc são drásticos (autoclave na presença de  $\text{SO}_2$ ), pode ocorrer algumas desaminações dos grupos Gln e Asn pra Glu e Asp, tornando assim a molécula da zeína em meio neutro com carga negativa, o que pode ter aplicações diferentes em diversas formas.

### Métodos e Procedimentos

O processo de extração de zeína bruta foi um método desenvolvido por Yoshioka e colaboradores, onde obteve-se cerca de 35% do CGM e 7% de zeína bruta do milho canjica. As proteínas totais foram determinadas por 2 métodos e as cargas negativas por apenas 1:

**a) Método Kjeldahl-** As amostras de zeína foram digeridas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. com catalisador de  $\text{CaSO}_4$  em um tubo e colocadas num forno até  $350^\circ\text{C}$ . Após a digestão, os tubos foram resfriados, adicionados água desionizada e colocados no destilador de nitrogênio, onde  $\text{NaOH}$  a 50% é adicionada para neutralizar  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , liberando os vapores de  $\text{NH}_3$ , que são condensados em um

erlenmeyer contendo ácido bórico e titulados com  $\text{HCl}$  e fenolftaleína. A quantidade de proteína é determinada pelo método de biureto, utilizando diferentes quantidades de zeína em etanol a 75%.

**b) Método Biureto-** as soluções preparadas de gelatina(0,5%,m/v) e de Biureto, contendo sulfato de cobre, potássio de sódio tartarato, hidróxido de sódio e água destilada. Sete tubos foram usados para adicionar às amostras de zeína em álcool, água destilada, soluções variáveis de gelatina e constante de Biureto, além de um tubo com etanol 75% em vez de zeína. As misturas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min e depois levadas ao espectrofotômetro para medir a absorbância de cada tubo. Um gráfico foi plotado no aplicativo

**c) Método de diálise-** Inicialmente, 25 cm de membranas de diálise serão lavados 2 vezes em 300mL de água desionizada por 30 minutos a temperatura ambiente cada depois por etanol 75%. Em seguida, 100 mL de extrato de zeína dissolvida em EtOH (75%) serão colocados no tubo de diálise pré-tratado anteriormente de diálise e selado em ambos os lados para evitar derramamento. Após os tubos será colocado em um frasco contendo 2L de Etanol 75% com  $\text{HCl}$  ou  $\text{NaOH}$  a (0,15 mol/L). O sistema de diálise será deixado em agitação magnética e contínua por mínimo 12h a  $25^\circ\text{C}$ .

### Resultados

Segundo os experimentos, os resultados de percentuais, de proteínas totais pelo método Kjeldahl mostram que as zeínas brutas obtidas do farelo de glúten de milho da Ingredion foram cerca de 82% (m/m), igualando-se com a da Aldrich, a qual não fornece o grau de pureza.

Tabela 1: Comparação de percentual de proteínas totais pelo método Kjeldahl(\*) e Biureto (\*\*) e cargas negativas das zeínas dializadas com HCl (\*) ou NaOH (\*\*)

AMOSTRA	%	Cargas negativas
Z.CGM*	82,03	85,3
Z. Aldrich*	85,00	65,9
Z. Purificada*	95,00	89,7
Gelatina*	97,00	-
Z. Aldrich**	86,79	39,12
Z. Aniônica**	81,56	36,23
Z. Purificada**	94,99	16,19

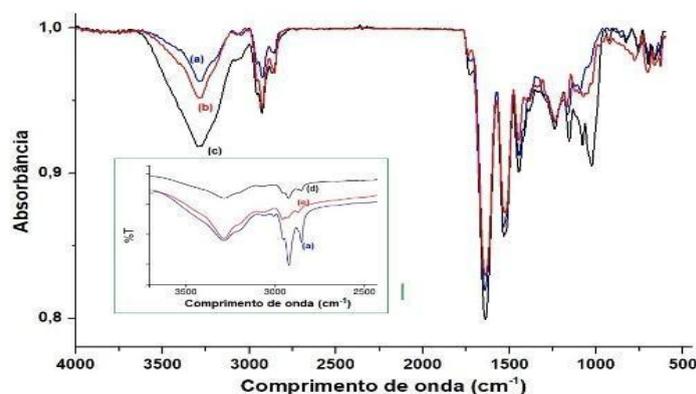
No método do Biureto, as absorvâncias de cada amostra foram coletadas e calculadas para determinar a porcentagem de proteína total em cada uma; já no kjeldahl foi possível calcular pelo volume de HCl utilizado na titulação.

No caso das cargas negativas, como não é toda a solução que reage, pois uns grupos estão mais protegidos, por isso, contém diferenças percentuais. Para achar a Carga Negativa, precisamos dessas diferenças, e multiplicar por 116, que é o máximo de carga que as zeínas podem ter para a sua identificação.

Foi obtido o gráfico do infravermelho das soluções de zeína da Aldrich (a), zeína de milho branco (b), zeína Aniônica tratada em solução de HCl(0,5 mol/L<sup>-1</sup>)(c), zeína Aniônica (d) e zeína purificada tratada com tratada em solução de HCl 0,5 mol/L<sup>-1</sup>(e).

O espectro de FTIR-ATR mostrou valores de estiramento das ligações O-H do grupo hidroxila em 3400 cm<sup>-1</sup>, estiramento das ligações CH<sub>2</sub> em torno de 300 cm<sup>-1</sup>, estiramento das ligações C-H em 2930 e 2850 cm<sup>-1</sup>, estiramento das ligações C=O em 1720 cm<sup>-1</sup> e estiramento das ligações C-O em 1170 cm<sup>-1</sup> em todas amostras de zeína (zeína tratada com HCl), contudo quando são tratadas em meio alcalino a zeína do CGM apresentou bandas diferentes em 2.930cm<sup>-1</sup>, provavelmente devido o grupo carboxilato e não carboxílico do Glu e

Asp desaminados da Gln e Asn, que não ocorra vibrações de estiramento do CH<sub>2</sub> próximos.



### Conclusão

Os resultados obtidos sobre as baixas concentrações de proteínas totais estão de acordo com o padrão ouro, indicando que nenhuma zeína é 100% pura. No entanto, os cálculos do método de diálise e titulação colorimétrica apresentaram algumas inconsistências que precisam ser analisadas detalhadamente e repetidas com mais cuidado ou com outros equipamentos. Uma tentativa foi feita substituindo HCl por NaOH no método da diálise, mas os resultados das porcentagens ainda não estão precisos. Este trabalho demonstra que a zeína aniônica pode ser usada no revestimento do papel-cartão impermeabilizado, já que usam amido catiônico.

### Agradecimentos

A Ingredion Inc. pelo CGM doado e ao Lab. de Ensino (IQSC-USP) pelo empréstimo do destilador de N e do digestor sulfúrico.

### Referências

- 1.YOSHIOKA, S.A. BR 10 2020 009163 8, protocolado no INPI em 08/05/2020.
- 2.BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A. Biomacromolecules,v.2(4), p.1074-9, 2001.
- 3.SILVA, D. J., QUEIROZ, A. C. Análise de Alimentos. Métodos químicos e biológicos. 3ª edição. Editora UFV. 235p. 2009.