

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**MARINA VIAN OSSICK**

**EMPREGO DE UM BIOSSENSOR PARA AVALIAR A  
FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM BATATA E SUA  
REDUÇÃO COM ASPARAGINASE DE *BACILLUS  
AMYLOLIQUEFACIENS* 0G: UM ESTUDO DE  
BIOPROSPECÇÃO**

**CAMPINAS**

**2017**

MARINA VIAN OSSICK

EMPREGO DE UM BIOSSENSOR PARA AVALIAR A  
FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM BATATA E SUA  
REDUÇÃO COM ASPARAGINASE *DE BACILLUS*  
*AMYLOLIQUEFACIENS 0G*: UM ESTUDO DE  
BIOPROSPECÇÃO

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Etchegaray Júnior

PUC-CAMPINAS

2017

Ficha Catalográfica  
Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas e  
Informação - SBI - PUC-Campinas

t664.0286 O84e Ossick, Marina Vian.  
Emprego de um biossensor para avaliar a formação de acrilamida em batata e sua redução com asparaginase de *Bacillus Amyloliquefaciens* 0G: um estudo de bioproteção / Marina Vian Ossick. - Campinas: PUC-Campinas, 2016.  
82p.

Orientador: Augusto Etcheagaray Júnior.  
Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Centro de Ciências da Vida, Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. 2. Acrilamida. 3. Ação de alimentos. 4. Toxinas. 5. Alimentos consumo. 6. Nutrição e saúde pública. 7. Levantamentos nutricionais. 8. Batata - Indústria. I. Etcheagaray Júnior, Augusto. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências da Vida. Pós-Graduação em Ciência da Saúde. III. Título.

Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Centro de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

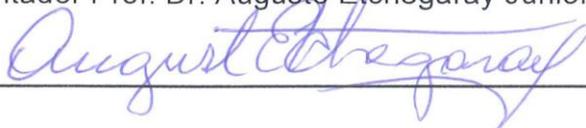
**Autora:** Ossick, Marina Vian

**Título e subtítulo:** Emprego de um biossensor para avaliar a formação de acrilamida em batata e sua redução com asparaginase de *Bacillus Amyloliquefaciens* OG: um estudo de bioprospecção

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde

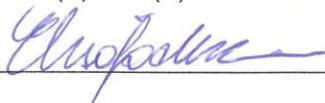
**BANCA EXAMINADORA**

Presidente e Orientador Prof. Dr. Augusto Etchegaray Júnior



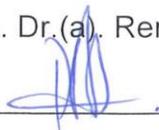
---

1º Examinador Prof.(a). Dr.(a).Elisa de Almeida Jackix



---

1º Examinador Prof.(a). Dr.(a). Renata Aparecida Soriano Sancho



---

Campinas, 14 de fevereiro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Augusto Etchegaray Júnior, pela orientação, dedicação, amizade e aprendizado ao longo desse período;

Ao Mário Henrique Moreno, químico do Laboratório de pesquisa, por todo o suporte e aprendizagem e ao grupo de pesquisa que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus pais que me apoiaram e me deram todo o suporte nesta jornada.

E aos meus amigos e pessoas que, de alguma forma, colaboraram e caminharam junto comigo para a realização dessa dissertação.

## RESUMO

OSSICK, Marina Vian. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2017.

O processamento térmico em alimentos ricos em açúcares redutores e com altos teores do aminoácido L-asparagina tem sido avaliado com cautela nos últimos anos devido à possível formação de acrilamida (AA), uma toxina que pode ser produzida a partir da reação de Maillard. A presença de AA em alimentos processados é motivo de preocupação, pois ela apresenta propriedades neurotóxicas, cancerígenas e genotóxicas. Em anos recentes, observa-se um efeito global particularmente por países em desenvolvimento, em que vemos um processo de transição nutricional, caracterizado pelo alto consumo de alimentos industrializados e o aumento do índice de obesidade e de outras doenças. Verifica-se que alguns alimentos são mais consumidos como a batata, que é o quarto alimento mais consumido do mundo. Ela pode vir de várias formas, mas a predominância se dá aos preparos fritos, o que caracteriza um risco de contaminação pois a batata é um dos alimentos que atende todas as características iniciais para a formação de AA. Os níveis de AA em batatas que sofreram algum tipo de cocção acima de 180°C podem ser reduzidos por diversos tratamentos, entre eles o emprego da enzima L-asparaginase, que converte o aminoácido asparagina em ácido aspártico, o qual não forma AA. Para análise dos níveis de AA em alimentos, existem métodos químicos e bioquímicos, como por exemplo, aqueles baseados em biossensores. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e utilizar um biossensor eletroquímico para avaliar a formação de AA em batata e sua redução pelo pré-tratamento com asparaginase de *Bacillus amyloloquefaciens* 0G, contendo asparaginase (0,4 UI / mL) e outras enzimas como proteases, esterases e glucanases. Verificamos que o extrato possui a capacidade de reduzir em 50% a formação de AA para batata aquecida em air fryer a 180 °C por 10 min. Os resultados foram semelhantes ao tratamento com ácido cítrico a 2%, demonstrando que *B. amyloliquefaciens* 0G possui uma hidrolase (asparaginase) com potencialidades para utilização na indústria de alimentos. Este dado é relevante, considerando-se que a produção de enzimas para a indústria de alimentos pode diminuir os custos da produção de biossurfactantes empregando-se uma estratégia de coprodução (biossurfactantes e enzimas), agregando valor ao extrato de *B. amyloliquefaciens*.

Palavras-chaves: Acrilamida, *Bacillus amyloloquefaciens*, mitigação de acrilamida, biossensor.

# ABSTRACT

OSSICK, Marina Vian. 2017. Dissertation (Master in Health Sciences) - Post-Graduate Program in Health Sciences. Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2017.

Thermal processing of food that are rich in reducing sugars and contain high levels of the aminoacid L-asparagine has been carefully evaluated in recent years due to the possible formation of acrylamide (AA), a toxin that can be produced through the Mailard's reaction. The presence of AA in processed food is a matter of concern as it presents neurotoxic as well as carcinogenic and genotoxic properties. In recent years, it is possible to observe a global effect, especially in developing countries, in which one can see a process of nutritional transition that is characterized by high intake of industrialized food and an increase in obesity rates and other diseases. It is possible to see also that some kinds of food products have higher intake, for instance potato, which is the fourth source of food consumed in the world. Potato can be consumed in various forms, however in most of the cases intake is predominantly derived from frying, thus leading to a risk of contamination with AA as this feed has all the initial characteristics described so far to produce this toxin. Reduction of AA levels in potato that has suffered some kind of heating in temperatures that are higher than 180°C can be obtained by some mitigation methods, among them is the enzyme L-asparaginase that converts the aminoacid asparagine in aspartic acid, which does not produce AA. In order to detect acrylamide levels in food there are chemical and biochemical methods, for instance, those that are based in biosensors. The present work aimed to produce an electrochemical biosensor that is based on hemoglobin denaturation by the action of AA, and to use this device to evaluate comparatively the formation of AA in potato with and without pre-treatment with a hydrolase extract from *Bacillus amyloliquefaciens* 0G containing asparaginase (0.4 IU/mL) and additional hydrolases such as proteases, esterases and glucanases. The results have shown that the hydrolase extract has the ability of reducing in 50% the formation of acrylamide for potato that was heated in air fryer at 180 °C for 10 min. Similar results were obtained for citric acid treatment at 2 % w/v, thus demonstrating that *B. amyloliquefaciens* 0G has a hydrolase (asparaginase) with potential applications in the food industry. This is an important result considering that the production of hydrolases for the food industry could help to reduce the costs of biosurfactant production when a coproduction strategy (biosurfactants and enzymes) is used, thus adding value to the extract of *B. amyloliquefaciens*.

Keywords: Acrylamide, *Bacillus amyloloquefaciens*, acrylamide mitigation, biosensors.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> Voltamogramas medidos com o biossensor, mostrando o efeito de diminuição de corrente devido à formação de adutos. ....	56
<b>Gráfico 2 a)</b> Voltamogramas medidos com o biossensor contendo diferentes concentrações de AA em solução tampão acetato pH 5,0. <b>b)</b> Curva de calibração para AA .....	57
<b>Gráfico 3</b> Voltamogramas da amostra de batata crua.....	58
<b>Gráfico 4</b> Voltamogramas da amostra de batata controle .....	59
<b>Gráfico 5</b> Voltamogramas da amostra de batata tratada com ácido cítrico. ....	60
<b>Gráfico 6</b> Voltamogramas da amostra de batata tratada com L-asparaginase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OG. ....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Vendas da indústria alimentícia no mercado interno brasileiro.....	17
<b>Figura 2</b> Estrutura fisiológica da batata .....	20
<b>Figura 3</b> Composição química da batata.....	21
<b>Figura 4</b> Estrutura molecular da AA .....	24
<b>Figura 5</b> A reação de Maillard está envolvida na formação de AA.....	30
<b>Figura 6</b> Caminhos para a formação de AA nos alimentos. (A) Percurso principal de formação de AA. (B) Via de formação de AA secundária.....	31
<b>Figura 7</b> Reação da hidrólise do aminoácido asparagina.....	41
<b>Figura 8</b> Micropotenciostato - ATOLAB PGSTAT 101 .....	46
<b>Figura 9</b> Fluxograma do processo da obtenção das amostras de AA .....	49
<b>Figura 10</b> Esquema geral do biossensor apresentando detalhes da sua confecção e do tipo de resultado obtido. ....	51
<b>Figura 11</b> Métodos de secagem (dessecador e estufa).....	54
<b>Figura 12</b> Potenciostato conectado ao biossensor e cela contendo tampão acetato pH 5,0.....	55
<b>Figura 13</b> Resultados preliminares da análise de proteínas da construção de 16 contigs do genoma de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 0G para a presença de clusters de genes da biossíntese de metabólitos secundários utilizando AntiSmash. ....	63
<b>Figura 14</b> Resultados da análise da sequência de aminoácidos da asparaginase tipo II de <i>B. amyloliquefaciens</i> 0G utilizando programa específico do sítio pfam. ....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Faturamento dos principais setores alimentícios em bilhões de reais. ....	17
<b>Tabela 2</b> Composição de alimentos por 100g de parte comestível: centesimal, minerais, vitaminas e colesterol. ....	23
<b>Tabela 3</b> Grupo de alimentos e os teores de AA avaliados pela FAO/OMS e pelo JECFA .....	28
<b>Tabela 4</b> Ingestão potencial diária de AA em diferentes países. ....	32
<b>Tabela 5</b> Valores médios de variação de corrente obtidos para os tratamentos. ....	59
<b>Tabela 6</b> Quantidade de AA encontrada em 1g de batata. ....	62
<b>Tabela 7</b> Resultados da previsão de epitopo para a asparaginase periplasmática de Bacillus amyloliquefaciens 0G (asparaginase tipo II). ....	66
<b>Tabela 8</b> Resultados da previsão de epitopo para a asparaginase periplasmática de E. Coli (asparaginase tipo II). ....	67
<b>Tabela 9</b> Resultados da previsão de epitopo para a asparaginase periplasmática de E. Chrysanthemi (asparaginase tipo II). ....	68

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Sequência de aminoácidos da AnsA.....	64
<b>Quadro 2</b>	Sequência de aminoácidos do <i>B. amyloliquefaciens</i> .....	64
<b>Quadro 3</b>	Sequência de aminoácidos da Asparaginase do tipo II de <i>E. coli</i> .....	67
<b>Quadro 4</b>	Sequência de aminoácidos da Asparaginase do tipo II de <i>E. Chrysanthemi</i> ...	68

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2. 1 OBJETIVO GERAL .....	15
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
3. 1 TRANSIÇÃO NUTRICIONAL.....	16
3. 1. 1 Evolução da indústria no Brasil.....	16
3. 1. 2 Transição nutricional e o consumo de industrializados .....	17
3. 3 ACRILAMIDA .....	24
3. 3. 1 Aspectos toxicológicos.....	24
3. 3. 1. 1 Características indesejáveis relacionadas à saúde .....	26
3. 3. 2 AA em alimentos .....	28
3. 3. 3 Estimativa de ingestão .....	32
3. 3. 4 Variáveis envolvidas na formação de AA em batatas .....	33
3. 3. 4. 1 Precursores .....	33
3. 3. 4. 2 Condições de processamento.....	34
3. 4 MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AA EM ALIMENTOS.....	35
3. 4. 1 Biossensor eletroquímico.....	38
3. 5 ESTRATÉGIAS PARA A REDUZIR A FORMAÇÃO AA EM ALIMENTOS .....	39
3. 5. 1 Aplicações da enzima Asparaginase para a saúde .....	40
3. 5. 2 Produção de asparaginase por Bacillus sp.....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
4. 1 MATERIAL .....	46
4. 1. 1 Matéria prima .....	46
4. 1. 2 Equipamentos .....	46
4. 1. 3 Reagentes .....	46
4. 1. 4 Materiais.....	47
4. 1. 5 Instrumentos.....	47
4. 2 MÉTODOS .....	47
4. 2. 1 Pré-tratamentos.....	47
4. 2. 2 Preparo das soluções .....	48
4. 2. 3 Extração da AA .....	49
4. 2. 4 Construção do biossensor voltamétrico.....	50
4. 2. 5 Teste imunoenzimático - ELISA.....	51
4. 2. 6 Estudo de bioprospecção.....	51

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5. 1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	53
5. 2 OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA AA .....	55
5. 3 ANÁLISE DO EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A FORMAÇÃO DE AA .....	58
5. 4 VALIDAÇÃO COM TESTE IMUNOLÓGICO .....	62
5. 5 EXPLORANDO AS POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DO <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> 0G .....	62
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>