

João Gustavo Provesi

**PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES EM  
VEGETAIS NATURALMENTE ACLIMATADOS EM URUPEMA  
(SC), E SUA APLICAÇÃO NO CONGELAMENTO DE  
CARAMBOLAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edna Regina Amante

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Provesi, João Gustavo

Prospecção de proteínas anticongelantes em vegetais naturalmente aclimatados em Urupema (SC), e sua aplicação no congelamento de carambolas / João Gustavo Provesi ; orientadora, Edna Regina Amante, 2017.

100 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Proteínas anticongelantes. 3. Congelamento de frutas. I. Amante, Edna Regina. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.





## AGRADECIMENTOS

Uma das versões da lenda grega Aquiles diz que esse logo após o nascimento foi banhado pela sua mãe, a deusa Tétis, nas águas do rio Estige. Como o calcanhar era o ponto onde a mãe o segurava, esse não foi molhado, tornando-se assim o seu ponto fraco, vulnerável. Hoje, a expressão calcanhar de Aquiles é utilizada para expressar uma dificuldade ou limitação de alguém, algo que ela tenha dificuldade de transpor.

Acho que todos temos um ou mais calcanhares de Aquiles. Confesso aqui um dos meus, trabalhar em conjunto com outras pessoas. Sempre foi uma tarefa difícil. Sou melhor em esportes individuais do que modalidades coletivas. Trabalhos escolares em grupos eram “repartidos”, não compartilhados. E até confesso certa preferência por gatos perante cães (se você estiver se perguntando como isso estaria relacionado com o assunto, deveria observar um gato por algum tempo). Nada contra outros seres humanos, claro que não, eu os adoro. A dificuldade está em confiar e depender da ação de outras pessoas para se chegar a determinado objetivo.

Poucas coisas foram mais adequadas para me ensinar a driblar essa dificuldade do que a realização dessa tese. Olhando para 3 anos e alguns meses atrás, tenho a mais absoluta certeza que esse trabalho não teria sido concluído sem todas as ajudas e cooperações que tive pelo caminho. Assim, gostaria de compartilhar minha gratidão a algumas pessoas com quem convivi nesse período.

Aos servidores do Departamento de Ciência e Tecnologia (CAL/CCA/UFSC), em especial do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PGCAL), por todo auxílio prestado. Ao secretário Sergio de Souza, que tantas vezes me forneceu orientações por email ou telefone, poupando-me de viagens até Florianópolis. Aos professores do PGCAL, que sempre demonstraram compreensão por, em muitos momentos, eu não ter sido um aluno tão participativo e atuante como gostaria. A todos os colegas com quem convivi no Laboratório de Frutas e Hortaliças, que tantas vezes me ajudaram a superar problemas de logística para execução dos experimentos. Aos professores membros da banca de avaliação dessa tese, por terem aceitado o convite para avaliar e contribuir com o trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC), pela liberação parcial das minhas atividades por três semestres, para que eu pudesse me dedicar um pouco mais ao projeto. Aos meus colegas e alunos do IFSC Campus Urupema, por toda ajuda e

incentivo. Recentemente deixei o campus Urupema para iniciar um novo caminho, mas saio carregado de lembranças positivas do período que aí fiquei.

A professora Ana Carolina Maisonnave Arisi, ao pesquisador pós-doutorando Pedro Alexandre Valentim Neto e a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Alimentar e Biologia Molecular por todas as orientações na realização das análises por eletroforese, bem como as contribuições na discussão de resultados.

A professora Edna Regina Amante, que para mim representa muito além do conceito básico de uma orientadora, que guia a execução de um trabalho. A professora Edna é uma verdadeira mentora nessa profissão que resolvi seguir. E sua influência se dá pelo mais simples e efetivo dos caminhos, o exemplo. Agora já contando com os meus primeiros orientados, tomara que eu consiga fazer por eles um pouco do que recebi da minha mentora.

Aos familiares, que sempre apoiaram e compreenderam nossa ausência em alguns momentos. A minha esposa Bruna, companheira há tantos anos. É fantástico como, mesmo com profissões diferentes, funcionamos como um casal, uma unidade, que caminha junto e equilibra suporte e alcance de objetivos. E que agora divide comigo a missão de criar e educar esses dois presentes que receberemos em breve, as nossas filhas Cecília e Helena, que foram minha fonte extra de motivação nessa etapa final.

Todos vocês também devem se sentir um pouco autores desse trabalho.

## RESUMO

O congelamento é um método de conservação amplamente utilizado pela indústria de alimentos, embora em alguns casos, os grandes cristais de gelo formados possam causar redução na qualidade sensorial e nutricional do produto. Técnicas de congelamento rápido possibilitam a obtenção de cristais de gelo menores do que os formados no processo tradicional. Contudo, as flutuações de temperatura durante o transporte e distribuição do alimento podem provocar o crescimento do cristal de gelo, no fenômeno conhecido como recristalização. Substâncias crioprotetoras sempre fazem parte de pesquisas na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Descobertas na década de 70, as proteínas anticongelantes (PACs) foram descritas para muitos organismos tolerantes ao frio, incluindo bactérias, fungos, insetos e plantas. Essas proteínas podem interferir no processo de nucleação, reduzir o ponto de congelamento da água (atividade de histerese térmica) ou especialmente inibir o processo de recristalização. Estudos com a aplicação das PACs na preservação da qualidade sensorial e nutricional de alimentos como sorvetes, carnes, massas e frutas e hortaliças têm apresentado resultados promissores. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de proteínas anticongelantes em diferentes vegetais naturalmente aclimatados ao frio e não aclimatados encontrados no município de Urupema, Santa Catarina, e selecionar a espécie que apresentasse o melhor resultado em relação a atividade de inibição da recristalização. Na primeira etapa foram avaliadas folhas de *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* e *Eucalyptus* ssp. aclimatadas e não aclimatadas ao frio. Utilizando a técnica de microscopia de sanduíche da sacarose, não foi observada atividade de inibição da recristalização para extratos apoplásticos de folhas aclimatadas e não aclimatadas de *S. icoglossus* e *Eucalyptus* ssp. O extrato de folhas aclimatadas ao frio de *D. angustifolia* apresentou concentração de proteínas de 95,17 µg/mL, quase cinco vezes maior do que as encontradas em extratos não aclimatados da mesma espécie. Além disso, esse extrato apresentou atividade de inibição da recristalização no método de sanduíche de sacarose. Pela técnica de SDS-PAGE, esse extrato apresentou uma banda logo abaixo de 37 kDa e outra, mais intensa, entre 20 e 25 kDa. Na segunda etapa desse estudo, o objetivo foi extrair PACs de folhas aclimatadas de *Drimys angustifolia*, avaliando três combinações diferentes de soluções tampão, e em seguida avaliar a aplicação no pré-tratamento por imersão ou infiltração a vácuo de carambolas (*Averrhoa carambola*) congeladas. Os extratos obtidos com os diferentes tampões

inibiram a recristalização e apresentaram perfil semelhante no SDS-PAGE. Os tratamentos por imersão e infiltração a vácuo utilizando o extrato obtido com o tampão Tris-HCl/DTT (pH 8) não afetou os valores de acidez titulável, pH, sólidos solúveis, ácido ascórbico e cor das carambolas congeladas. Contudo, apenas carambolas que foram infiltradas a vácuo com uma solução contendo PACs mantiveram constantes sua perda por gotejamento por 15 dias e sua firmeza no descongelamento após 60 dias de estocagem, indicando que a aplicação das PACs pode auxiliar na manutenção da qualidade das carambolas congeladas.

**Palavras-chave:** proteínas anticongelantes; PACs; *Drimys angustifolia*; *Senecio icoglossus*; *Eucalyptus*; aclimatação natural; inibição da recristalização; carambolas.



## ABSTRACT

Freezing is a method of conservation widely used by the food industry, although the large ice crystals can cause reduction in the sensory and nutritional quality of food products. The fast-freezing technologies lead to the formation of smaller ice crystals than the traditional process. However, the temperature fluctuations during transport and distribution can promote crystal growth, in a phenomenon known as recrystallization. The cryoprotective substances have always been topics of research in the Food Science and Technology area. Discovered in the 1970s, the antifreeze proteins (AFPs) have been more thoroughly described for many freezing-tolerant organisms, including bacteria, fungi, insects and plants. These proteins can interfere in the nucleation process, reduce the freezing point of water (thermal hysteresis activity), or inhibit the recrystallization process. Studies with application of AFPs in the preservation of sensory and nutritional quality of foods such as ice cream, meat, pasta, starch gels, and fruits and vegetables have demonstrated promising results. In this context, the initial objective of this study was to investigate the presence of antifreeze proteins in different naturally cold acclimated vegetables found in the municipality of Urupema, Santa Catarina, selecting the species that presented the best result in relation to the activity of inhibition of recrystallization. In this first stage it was evaluated leaves of cold acclimated and non-acclimated *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. No recrystallization inhibition activity was observed for the apoplastic extracts of cold acclimated and non-acclimated *S. icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. The extract of cold acclimated *D. angustifolia* contained a protein concentration of  $95.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ , almost five times higher than the extract of non-acclimated *D. angustifolia*. In addition, this extract showed inhibition activity of recrystallization in the sucrose sandwich splat assay. In the SDS-PAGE, this extract showed a protein band just below 37 kDa and another more intense band between 20 and 25 kDa. In the second stage of this study, the objective was to extract AFPs from apoplast of cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, evaluating three different combinations of buffer solutions, and subsequently to evaluate the application in the pre-treatment of frozen star fruit (*Averrhoa carambola*) by immersion or vacuum infiltration. The extracts obtained with different buffer solutions inhibited recrystallization and they presented similar SDS-PAGE profiles. The treatments by immersion or vacuum infiltration using the Tris-HCl/DTT buffer (pH 8) extract did not affect the values of titratable acidity, pH,

soluble solids, ascorbic acid content and colour of frozen star fruit. However, only star fruits that were vacuum infiltrated with AFPs retained their drip loss constant after 15 days and maintained the firmness on thawing after 60 days of storage, indicating that the application of AFPs can increase the quality of frozen star fruit.

**Keywords:** antifreeze proteins; AFPs; *Drimys angustifolia*; *Senecio icoglossus*; *Eucalyptus*; natural cold acclimation; recrystallization inhibition; star fruits.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1 - Morfologia de um cristal de gelo: três eixos a, crescendo em um plano basal, e um eixo c, crescendo em um plano prismático..... 28

Figura 2 - Morfologia do cristal de gelo em uma solução contendo proteínas anticongelantes: crescimento preferencial ao longo do eixo c, assumindo uma forma bipiramidal .....32

### Capítulo 2

Figure 1 - Daily average, maximum and minimum temperature in the municipality of Urupema, in Santa Catarina state, Brazil, in the periods preceding the collection of (a) the cold acclimated and (b) the non-acclimated samples. The samples were collected on the morning of the 15th day, indicated by the arrow ..... 63

Figure 2 - Sucrose-sandwich-splat assays to evaluate the inhibition of ice recrystallization in apoplastic extract from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. The bar represents 50  $\mu\text{m}$  ..... 65

Figure 3 – 12 % SDS-PAGE of apoplastic extracts from cold acclimated (A) and non-acclimated (NA) leaves. Lanes 1A, 2A and 3A: extracts from cold acclimated leaves of (1A) *Drimys angustifolia*, (2A) *Senecio icoglossus* and (3A) *Eucalyptus*; lanes 1NA, 2NA and 3NA: extracts from non-acclimated leaves of (1NA) *Drimys angustifolia*, (2NA) *Senecio icoglossus* and (3NA) *Eucalyptus*; lanes M: 250-10 kDa Precision Plus Protein Standards. Protein bands are indicated by arrows ..... 67

### Capítulo 3

Figure 1 - Inhibition of ice recrystallization by apoplastic extracts obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three different extraction buffers. The bar represents 50  $\mu\text{m}$  .....87

Figure 2 - SDS-PAGE profile of apoplastic extracts obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three extraction buffers: 20  $\text{mmol L}^{-1}$  of L-ascorbic acid and 20  $\text{mmol L}^{-1}$  of calcium chloride, pH 3 (lane EB1); 50  $\text{mmol L}^{-1}$  of Tris-HCl and 75  $\text{mmol L}^{-1}$  of DTT, pH 6.8 (lane EB2); 50  $\text{mmol L}^{-1}$  of Tris-HCl and 75  $\text{mmol L}^{-1}$  of DTT, pH 8 (lane EB3). Lane M - 250-10 kDa Precision Plus Protein Standards. Protein bands are indicated by arrows ..... 88

Figure 3 - Titratable acidity, pH, total soluble solids (SST), ascorbic acid (AA) and colour ( $L^*$ ,  $-a^*$  e  $b^*$ ) values for untreated star fruits and samples immersed and vacuum infiltrated with *Drimys angustifolia* AFPs and then stored under freezing for 90 days ..... 90

Figure 4 - Drip loss and firmness values for untreated star fruits and samples immersed and vacuum infiltrated with *Drimys angustifolia* AFPs and then stored under freezing for 90 days ..... 91

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 - Trabalhos envolvendo a presença de proteínas anticongelantes em plantas .....	35
--	----

### Capítulo 2

Table 1 - Apoplastic proteins levels in obtained apoplastic extract and fresh leaves of acclimated and non acclimated <i>Drimys angustifolia</i> , <i>Senecio icoglossus</i> and <i>Eucalyptus</i> ssp. ....	64
--	----

### Capítulo 3

Table 1 - Protein content of apoplastic extracts obtained from cold acclimated leaves of <i>Drimys angustifolia</i> using three extraction buffers .....	86
--	----



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO: PROTEÍNAS ANTICONGELANTES - UMA TECNOLOGIA EMERGENTE PARA O CONGELAMENTO DE ALIMENTOS</b> .....	21
Resumo .....	23
Summary .....	25
1 Introdução .....	27
2 Água e gelo .....	28
3. Proteínas anticongelantes (PACs) .....	30
3.1 PACs em vegetais .....	34
4. Uso das PACs na área de Tecnologia de Alimentos .....	37
5. Conclusões e Perspectivas Futuras .....	41
Agradecimentos .....	42
Referências .....	42
<b>3 CAPÍTULO 2 – ANTIFREEZE PROTEINS IN NATURALLY COLD ACCLIMATED LEAVES OF <i>DRIMYS ANGUSTIFOLIA</i>, <i>SENECIO ICOGLOSSUS</i>, AND <i>EUCALYPTUS</i> SSP</b> .....	51
Summary .....	53
Resumo .....	55
1 Introduction .....	57
2 Materials and Methods .....	60
2.1 Plant Material .....	60
2.2 Extraction of Apoplastic Protein .....	60
2.3 Antifreeze Activity Assay .....	61
2.4 Protein Electrophoresis .....	62
2.5 Statistical Analysis .....	62
3. Results and discussion .....	62
4 Conclusion .....	68
Acknowledgment .....	69
References .....	69
<b>4 CAPÍTULO 3 - EXTRACTION OF ANTIFREEZE PROTEINS FROM COLD ACCLIMATED LEAVES OF <i>DRIMYS</i> <i>ANGUSTIFOLIA</i> AND THEIR APPLICATION TO STAR FRUIT (<i>AVERRHOA CARAMBOLA</i>) FREEZING</b> .....	75
Abstract .....	77
1 Introduction .....	79

2 Material and methods .....	81
2.1 Plant Material .....	81
2.2 Preparation of the apoplastic extracts .....	81
2.3 Recrystallization inhibition activity .....	82
2.4 SDS-Page .....	82
2.5 Application of the extracts and freezing of star fruit .....	83
2.6 Quality analysis .....	84
2.6.1 Physicochemical analysis .....	84
2.6.2 Colour analysis .....	84
2.6.3 Drip loss .....	84
2.6.4 Firmness .....	85
2.7 Statistical Analysis .....	85
3 Results and discussion .....	85
4 Conclusion .....	93
Acknowledgments .....	93
References .....	94
<b>5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>99</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A água é o principal constituinte celular para a quase totalidade dos seres vivos. Por isso, a sobrevivência em ambientes com temperaturas médias negativas sempre está condicionada a mecanismos fisiológicos e bioquímicos para impedir o congelamento da água no espaço intracelular, que vão desde o desenvolvimento de grandes camadas de isolamento térmico até a síntese de níveis elevados de crioprotetores e a liberação ativa de nucleadores para fora da célula (WHATEN; JIA, 2005).

Em meados da década de 70 foi descoberta em peixes nototenióides da região Antártica uma classe de proteínas com a propriedade de influenciar a formação e o crescimento de cristais de gelo, sendo denominadas de proteínas anticongelantes (PACs) (CAI et al., 2011). Posteriormente, proteínas de estruturas variadas com a mesma propriedade foram descritas em bactérias, fungos, insetos e plantas. Essas proteínas podem, por exemplo, inibir a nucleação, que é a formação inicial do cristal de gelo; reduzir o ponto de congelamento da água, propriedade conhecida como histerese térmica; ou ainda, inibir o processo de recristalização do gelo, que é o crescimento dos cristais durante as variações de temperatura na faixa abaixo de zero grau (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

Na atividade de inibição da recristalização, as PACs encontradas em vegetais se destacam quando comparadas àquelas de outras fontes, como peixes e insetos, possuindo atividade a partir de concentrações como 25 µg/L (BILDANOVA et al., 2013). Desde que Griffith e colaboradores (1992) descreveram de forma pioneira a presença de proteínas anticongelantes em folhas de centeio de inverno (*Secale cereale*), PACs já foram relatadas em diversas espécies vegetais de clima temperado, na maior parte das vezes em variedade de inverno e após um período de exposição a baixas temperaturas. Isso ocorre porque a expressão das PACs em plantas requer um período de aclimação, sendo as baixas temperaturas o principal sinal para a síntese dessas proteínas. Muitas espécies em zonas temperadas passam por ciclos de aclimação e desaclimação ao longo do ano. Para algumas, um ou dois dias são suficientes para induzir a aclimação, enquanto para outras maiores concentrações de PACs só podem ser observadas após semanas (BILDANOVA et al., 2013).

É principalmente em relação à inibição da recristalização que o potencial de aplicação das proteínas anticongelantes vem sendo avaliado em diversas áreas que utilizam o congelamento como técnica de

conservação, como é o caso da Ciência e Tecnologia de Alimentos. O congelamento é um dos métodos de conservação de alimentos mais antigos empregado pelo homem, inibindo o crescimento microbiano e a atividade enzimática. Todavia, a formação de grandes cristais de gelo durante o processo e armazenamento do produto podem provocar danos a estrutura celular e consequentes alterações sensoriais no descongelamento. Ainda são poucos os trabalhos envolvendo o uso de PACs em produtos como sorvetes, carnes, massas e vegetais, mas esses apresentam resultados promissores (BILDANOVA et al., 2013; VELICKOVA et al., 2013). O mercado de frutas congeladas é um exemplo de potencial aplicação das PACs, uma vez que o consumidor busca alimentos mais saudáveis, mas sem dispensar a praticidade e a qualidade do alimento que consome.

Por isso, novos trabalhos envolvendo a pesquisa por fontes de proteínas anticongelantes em vegetais e outros seres, bem como sua aplicação na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, como no congelamento de frutas, se fazem necessários.

O município de Urupema tem temperaturas médias anuais de 12°C, uma das menores do Brasil, com diversos dias como temperaturas mínimas inferiores a 0°C (EPAGRI/CIRAM, 2016). Apesar disso, há diversas espécies vegetais na região, cultivadas ou nativas, que resistem muito bem a esse cenário e que nunca foram avaliadas em relação à presença de proteínas anticongelantes. Espécies como *Drimys angustifolia* Miers, popularmente conhecida como casca d'anta, *Senecio icoglossus* DC, uma planta encontrada em regiões de banhado com altitudes moderadas a altas, além de diversas espécies do gênero *Eucalyptus*, são exemplos de espécies adaptadas a climas temperados, com boa resistência a baixas temperaturas, e que nunca foram avaliadas em relação à presença de proteínas anticongelantes, ainda mais considerando ciclos naturais de aclimação. Ainda são poucos os trabalhos envolvendo a análise de PACs em plantas aclimatadas de forma natural (GOMEZ-GALINDO et al., 2005; SIMPSON et al., 2005; JARZABEK et al., 2009; CAI et al., 2011). Se por um lado nessas condições os resultados se referem a uma condição única de estudo em relação a temperatura, luz, umidade, entre outros fatores, que ocorreram na época da coleta de material, por outro é uma opção com maior viabilidade econômica para extração comercial dessas proteínas do que a aclimação realizada em condições artificiais.

A carambola é um exemplo de fruta onde o congelamento causa grande impacto sobre os aspectos sensoriais, com perda de líquido e amolecimento do tecido. Essa fruta cultivada em regiões tropicais e

subtropicais apresenta uma alta percibibilidade e concentração de água, com um conseqüente percentual elevado de perda pós-colheita (GOL et al., 2015). O uso do congelamento associado a técnicas de redução dos seus efeitos negativos, como aplicação das PACs, podem oferecer um método alternativo para preservar as características originais da fruta. Essa possibilidade leva a questão relacionada ao método de inserção dessas proteínas anticongelantes na matriz alimentar, seja por simples imersão ou utilizando técnicas como a infiltração a vácuo.

Assim, o objetivo geral desse trabalho foi prospectar novas fontes naturais de proteínas anticongelantes em vegetais naturalmente aclimatados no município de Urupema, Santa Catarina, e avaliar os efeitos da sua aplicação sobre a conservação da qualidade de carambolas congeladas.

Em uma primeira etapa foram obtidos os extratos apoplásticos de diferentes espécies vegetais naturalmente aclimatados e não aclimatados em Urupema/SC. Esses extratos foram caracterizados em relação à atividade de inibição do processo de recristalização e em relação ao seu perfil em SDS-PAGE. Em uma segunda etapa, a extração das proteínas anticongelantes em folhas de *Drimys angustifolia* naturalmente aclimatadas ao frio foi avaliada com diferentes tampões de extração. O extrato com maior teor de proteína apoplástica e com atividade anticongelante foi aplicado no congelamento de carambolas. Seus efeitos sobre a qualidade foram acompanhados durante o armazenamento da fruta congelada, avaliando parâmetros físico-químicos, colorimétricos, perda por gotejamento e firmeza.

O trabalho está estruturado em capítulos. No primeiro capítulo foi apresentado o artigo “Revisão: Proteínas Anticongelantes - uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos” publicado no periódico Brazilian Journal of Food Technology em 2015. O objetivo foi apresentar o atual estado da arte em relação a diferentes aspectos das PACs, como estrutura, fontes e mecanismo de ação, bem como a potencial aplicabilidade em alimentos.

O segundo capítulo envolve os resultados obtidos na prospecção de novas fontes de proteínas anticongelantes em vegetais aclimatados no município de Urupema/SC, sendo descritos no artigo “Antifreeze proteins in naturally cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus*, and *Eucalyptus* ssp.” publicado no periódico Brazilian Journal of Food Technology em 2016.

No Capítulo 3 o artigo “Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing” apresenta a extração de

proteínas anticongelantes com diferentes tampões e sua aplicação e efeitos em parâmetros de qualidade de carambolas congeladas.

## 2 CAPÍTULO 1

### **REVISÃO: PROTEÍNAS ANTICONGELANTES - UMA TECNOLOGIA EMERGENTE PARA O CONGELAMENTO DE ALIMENTOS**

**Artigo publicado:**

PROVESI, J. G.; AMANTE, E. R. Revisão: Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n.1, p. 2-13, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7714>



## **Revisão: Proteínas anticongelantes - uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos**

### **Resumo**

Um dos métodos mais tradicionais na conservação de alimentos, o congelamento também pode alterar de forma significativa as características do produto. Grandes cristais de gelo provocam alteração na textura e/ou danos a membranas e componentes celulares. As técnicas de congelamento rápido formam cristais de gelo menores do que o processo lento, porém as flutuações de temperatura durante a distribuição e transporte podem promover o crescimento dos cristais. Esse processo é conhecido como recristalização e é uma barreira na utilização do congelamento como método de conservação em muitos casos. O uso de crioprotetores tradicionais, como a sacarose, é uma alternativa limitada, uma vez que concentrações elevadas são requeridas. Na década de 1970, foi descrita em peixes de águas frias uma classe de proteínas que, em baixa concentração, pode interagir e influenciar o crescimento do cristal de gelo. Elas foram chamadas de proteínas anticongelantes (PACs), sendo encontradas também em plantas, animais e micro-organismos ambientados a baixas temperaturas. Essas proteínas podem intervir no processo de formação do núcleo inicial do gelo, reduzir o ponto de congelamento da água, ou, ainda, inibir a recristalização, principalmente para PACs de vegetais. Há diversos trabalhos publicados e algumas patentes registradas para o uso de PACs em alimentos, como lácteos, carnes, massas, frutas e hortaliças, conservando de melhor forma as características originais do alimento. Atualmente, o custo ainda é uma barreira para utilização comercial das PACs. Contudo, a descoberta de novas fontes pode reduzir seu custo e tornar essas proteínas uma ferramenta efetiva na manutenção da textura de alimentos congelados. Baseada em trabalhos que avaliaram aspectos químicos das PACs e exemplos de sua aplicação, esta revisão tem como objetivo principal apresentar as características gerais das PACs e discutir sobre sua utilização.

**Palavras-chave:** proteínas anticongelantes; gelo; congelamento; recristalização.





## **Review: Antifreeze proteins - an emerging technology for freezing foods**

### **Summary**

Although it is one of the traditional methods of food preservation, freezing can also significantly change the product characteristics. Large ice crystals cause changes in the texture and damage cell membranes and components. The quick freezing techniques form smaller ice crystals than the slow process, but temperature fluctuations during transport and distribution can promote crystal growth. This process is known as recrystallization and is a barrier to the use of freezing as a preservation method in many cases. The use of traditional cryoprotectants such as sucrose is a limited alternative since high concentrations are required. In the 70's a cold water fish class of proteins was described that could interact and influence ice crystal growth even at low concentrations. They were denominated antifreeze proteins (AFPs) and are also found in plants, animals and microorganisms acclimatized to low temperatures. These proteins can interfere in the formation of the initial stable ice crystal nucleus, reduce the freezing point of water, or even inhibit the recrystallization process, especially in the case of plant AFPs. Several papers have been published and some patents registered on the use of antifreeze proteins in several foods such as dairy and meat products, pasta, fruits and vegetables, preserving the original characteristics of the products in a better way. Currently the cost is still a barrier to the commercial use of AFPs but the discovery of alternative sources could reduce the costs and make them an effective tool in the maintenance of the texture of frozen foods. Based on studies that evaluated the chemical aspects of antifreeze proteins and examples of their application, this review aims to present the general characteristics of AFPs and discuss their use.

**Keywords:** freezing proteins; ice; freezing; recrystallization.



## 1 Introdução

O congelamento é um dos métodos mais antigos e tradicionais utilizado pelo homem para conservação de alimentos. Atualmente, mesmo com uma cadeia logística que torna seu custo mais elevado frente a outros métodos de conservação, os alimentos congelados ainda possuem um amplo mercado, principalmente devido à sua praticidade de consumo.

Contudo, se, por um lado, as baixas temperaturas e a formação dos cristais de gelo reduzem o crescimento de micro-organismos e a atividade enzimática, por outro, quando grandes cristais de gelo são formados, pode ocorrer danos à integridade de componentes celulares, alterando de forma significativa as características originais do alimento. Sem dúvida, a taxa ou velocidade de congelamento é um aspecto importante, uma vez que leva à formação de cristais de gelo menores e, conseqüentemente, menores os impactos sobre a qualidade do produto. Ainda assim, é preciso considerar que o crescimento dos cristais de gelo é um processo dinâmico, que se mantém mesmo durante o armazenamento em baixas temperaturas.

A possibilidade de exercer um controle sobre o comportamento do gelo após a sua formação sempre foi um desafio para pesquisadores de diversas áreas. O uso de aditivos crioprotetores é facilmente encontrado na literatura, porém normalmente é necessário que essas substâncias estejam presentes em concentrações elevadas, o que inviabiliza seu emprego na maior parte dos alimentos.

Efetivas mesmo em baixas concentrações, uma classe de proteínas descritas, inicialmente, em peixes de águas frias surgiu como uma alternativa para a área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, demonstrando a propriedade de influenciar o crescimento do cristal de gelo e o seu crescimento em alimentos congelados. Essas proteínas foram chamadas de proteínas anticongelantes (PACs) e, posteriormente, descritas também em plantas, animais, fungos e bactérias que vivem em ambientes de baixas temperaturas. Embora ainda em pequeno número, já existem alguns trabalhos envolvendo o uso das PACs em produtos lácteos, carnes, massas e vegetais, com resultados promissores, conforme será apresentado no decorrer deste trabalho. Também já foram registradas patentes com esse mesmo prospecto.

Sendo assim, considerando a relevância do tema e o caráter de inovação dessa emergente tecnologia, este trabalho tem como objetivo apresentar diferentes aspectos das PACs, como estrutura, fontes e

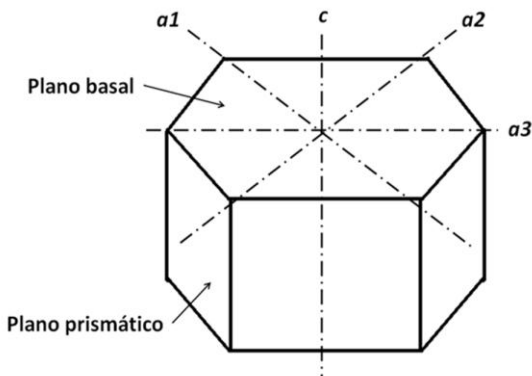
mecanismo de ação, bem como discutir a sua aplicabilidade como aditivo da indústria alimentícia.

## 2 Água e gelo

Uma das substâncias mais abundantes do nosso planeta, a água apresenta uma importância primordial para qualquer forma de vida, participando ou servindo como meio para diversas reações químicas que ocorrem em nível celular. Sua molécula não possui diretamente uma carga positiva ou negativa, contudo as ligações entre seus hidrogênios e o átomo de oxigênio conferem a ela um caráter essencialmente polar. Essa característica possibilita o alinhamento espontâneo de diversas moléculas de água, por meio de interações do tipo ligação de hidrogênio, refletindo na coesão da água no estado líquido (WHATEN; JIA, 2005).

Em um sistema com energia reduzida, cada molécula de água forma quatro ligações de hidrogênio com moléculas mais próximas, em um arranjo de conformação tetraédrica. Sem energia para romper essas ligações, a água assume sua forma sólida. A forma hexagonal do cristal de gelo é a única estável a pressão atmosférica normal e temperaturas entre 0 e -60 °C. Nessa forma, os cristais de gelo possuem três eixos  $a$ , crescendo em um plano basal, e outro eixo  $c$ , crescendo em um plano prismático, perpendicular ao plano basal (Figura 1) (GRIFFITH; EWART, 1995).

Figura 1 - Morfologia de um cristal de gelo: três eixos  $a$ , crescendo em um plano basal, e um eixo  $c$ , crescendo em um plano prismático.



Fonte: Adaptado de Griffith e Ewart (1995).

Os dois planos possuem taxas de crescimento distintas, sendo que as do plano prismático acontecem de forma mais rápida do que as do plano basal. A temperatura é um fator chave na velocidade e na forma de crescimento dos cristais de gelo. Tanto que, em temperaturas logo abaixo de 0 °C, os cristais têm uma morfologia circular, como discos, e, em temperaturas ainda menores, como -10 °C, eles possuem uma forma mais irregular, como agulhas (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

É interessante observar que, embora se considere 0 °C como o ponto de congelamento da água, isso não quer dizer que ao atingir essa temperatura a água, necessariamente, iniciará o processo de solidificação. Quando a água ou qualquer outro líquido é resfriado, os movimentos das moléculas diminuem, mas a solução pode permanecer na fase líquida mesmo com a temperatura inferior ao ponto de congelamento. Esse estado é conhecido como sobrefrefecimento ou, no termo utilizado na língua inglesa, *supercooling state* (GOFF, 2005). Isso é possível porque a formação do gelo, ou cristalização, ocorre em duas etapas.

A etapa inicial é a nucleação, na qual ocorre a formação de um pequeno cristal de gelo inicial que, como o nome da etapa já sugere, servirá como um núcleo para a propagação do cristal, que é a segunda etapa do processo. Como a nucleação não é uma etapa energeticamente favorável, o processo não se inicia de modo espontâneo na faixa de temperatura logo abaixo a 0 °C. O mais comum é a ocorrência de uma nucleação heterogênea, com a presença de uma molécula externa servindo como núcleo. A nucleação homogênea, de forma espontânea, ocorre somente em baixas temperaturas, como no caso da água ultrapura. Após a formação do núcleo inicial, o crescimento do cristal de gelo ocorre espontaneamente em temperaturas pouco abaixo de 0 °C (WHATEN; JIA, 2005).

Se o calor for removido de uma forma mais rápida, há formação de um maior número de núcleos, mais estáveis, o que reflete em um número maior de cristais, com tamanho reduzido. Uma taxa mais lenta de retirada de calor leva à formação de um menor número de cristais, mas com maior tamanho (GOFF, 2005).

Em uma fase posterior, após a formação dos cristais, é possível ainda a ocorrência do processo de recristalização, que corresponde à reestruturação dos cristais de gelo nas variações de temperatura na faixa abaixo de zero, levando sempre à formação de cristais maiores (GRIFFITH; EWART, 1995; CRUZ et al., 2009). Diversos mecanismos são propostos para o processo de recristalização, como a conversão de

cristais de superfície irregular nos de superfície lisa, mais estáveis; ou a fusão entre dois cristais vizinhos, resultando em outros maiores; ou, ainda, um processo de migração de moléculas de água entre cristais, formando-os em tamanho maior às custas da redução ou desaparecimento dos menores. Nesse caso, a variação de temperatura leva à fusão parcial de cristais pequenos, mais instáveis devido à sua alta energia de superfície, e as moléculas de água livres tendem a se depositar nos cristais grandes, aumentando seu tamanho. Todos esses mecanismos acontecem de forma simultânea e em diferentes graus no sistema, diminuindo o número de cristais, mas aumentando o tamanho médio (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

Levando esse cenário para a água presente em organelas, células ou tecidos, quanto maior o cristal de gelo formado, maior a possibilidade de dano físico a membranas biológicas. Por isso o processo de recristalização é sempre uma preocupação, em áreas que veem no congelamento uma alternativa de método de conservação, como é o caso da criopreservação de órgãos e tecidos na área médica, do congelamento de sementes e espécies vegetais na agricultura e também no congelamento de produtos alimentícios na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

### **3 Proteínas anticongelantes (PACs)**

Apesar do cenário desfavorável que a formação de gelo dentro da célula pode causar a qualquer forma de vida, existem inúmeros exemplos de seres vivos que têm seu habitat em ambientes de frio intenso, com temperaturas inferiores ao ponto de congelamento da água. Os peixes e os outros seres marinhos que habitam as águas dos oceanos Ártico e Antártico, por exemplo, convivem com temperaturas que chegam a  $-2^{\circ}\text{C}$ . Também existem diversas espécies de insetos e de vegetais que sobrevivem a invernos rigorosos em diferentes partes do planeta.

Esses seres desenvolveram ao longo de sua evolução uma série de mecanismos que permitem sua sobrevivência a esse tipo de ambiente. Uma das estratégias possíveis envolvendo a tolerância ao congelamento, adotada por alguns desses organismos, é a liberação ativa de nucleadores para o espaço extracelular, promovendo o congelamento fora da célula. A pressão osmótica resultante atrai a água também para o meio extracelular, o que leva a uma redução do ponto de congelamento dentro da célula. Isso é possível para algumas espécies que possuem

elevados níveis de crioprotetores, como glicerol ou glicose (WHATEN; JIA, 2005).

Há ainda organismos que conseguem manter seus fluidos corporais em um estado de sobrearrefecimento, por meio de mecanismos que impedem o processo de nucleação. Em baixas temperaturas, eles cessam a produção de potenciais substâncias nucleadoras e eliminam aquelas ingeridas durante a alimentação. Além disso, protegem a abertura de poros que serviriam de entrada para nucleadores (WHATEN; JIA, 2005; BILDANOVA et al., 2013).

Em muitos casos, contudo, essas estratégias por si só não seriam suficientes para garantir a sobrevivência desses seres em ambientes de frio tão intenso. Em meados da década de 1970, foi descoberta em peixes de águas frias uma classe de proteínas com a capacidade de influenciar o crescimento de cristais de gelo por meio da interação com a sua superfície. Devido a essa propriedade, foram denominadas proteínas anticongelantes (PACs). Posteriormente, proteínas de tamanhos e estruturas variadas, mas com a mesma propriedade, também foram encontradas e descritas em vegetais, insetos, fungos e bactérias, sempre em espécies e variedades expostas a baixas temperaturas (EWART et al., 1999; CAI et al., 2011).

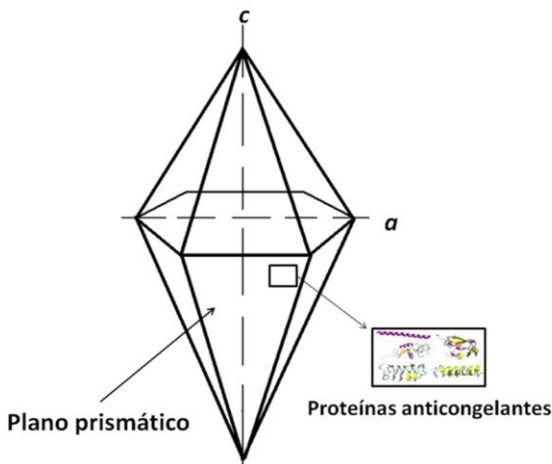
Há basicamente três formas de interação entre as PACs e os cristais de gelo. A primeira é por meio da interferência no processo de nucleação, que ocorre pela ligação de algumas PACs a substâncias nucleadoras, impedindo o início do processo de formação do gelo (GRIFFITH; EWART, 1995; HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012). A segunda forma é por intermédio da redução da temperatura de congelamento de líquidos corporais por uma via não coligativa, sem alterar significativamente o ponto de fusão, em uma propriedade conhecida como histerese térmica (PUDNEY et al., 2003; QIU et al., 2012). Algumas PACs, por exemplo, provocaram a redução do ponto de congelamento da água em até 3 °C. Esse efeito normalmente está ligado a uma maior concentração dessas substâncias (GRIFFITH; YAISH, 2004).

Outro grupo de PACs, entretanto, possui a capacidade de inibir o processo de recristalização. Essa propriedade não depende de elevadas concentrações de proteínas na matriz, com efetiva inibição da recristalização em concentrações menores do que 100 µg/L. É interessante destacar que as PACs de plantas se mostram ainda mais efetivas na inibição da recristalização do que proteínas de insetos e de peixes, com ação a partir de 25 µg/L (ZHANG et al., 2004).

Embora ainda não tenham sido completamente elucidadas as bases químicas para o mecanismo de ação das PACs na inibição da recristalização, é certo que seus efeitos ocorrem devido à adsorção dessas proteínas a diferentes partes da superfície do cristal de gelo, em locais específicos, por uma ou mais forma de interações, como ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals (CRUZ et al., 2009). O crescimento do cristal continua em menor grau nas regiões sem proteínas. Mas, em um segundo momento, a alteração na curvatura da superfície do cristal, provocada por esse crescimento irregular, leva à relação área superficial/volume muito além do ponto em que seria termodinamicamente favorável para o crescimento do gelo, o que o faz cessar. Esse mecanismo é conhecido como Efeito de Kelvin (Gibbs-Thomson), sendo o mais utilizado para explicar o mecanismo geral de ação das PACs, embora apresente limitações em alguns casos (FEENEY; YEH, 1998; KONTOGIORGOS et al., 2008).

Assim, enquanto que na ausência dessas proteínas o crescimento do cristal de gelo ao longo do eixo *a* resulta em uma expansão do plano basal, na presença das PACs o crescimento ocorre predominantemente ao longo do eixo *c*, dando origem a um prisma de faces perpendiculares. A morfologia do cristal resultante é similar a pirâmides hexagonais ou agulhas (Figura 2).

Figura 2 - Morfologia do cristal de gelo em uma solução contendo proteínas anticongelantes: crescimento preferencial ao longo do eixo *c*, assumindo uma forma bipiramidal.



Fonte: Adaptado de Griffith e Ewart (1995) e Hassas-Roudsari e Goff (2012).



Não é consenso se as ligações entre as PACs e os cristais são reversíveis ou não. Alguns autores defendem a ideia de que a ligação precisaria ser irreversível para que a inibição pudesse ocorrer, enquanto outros pesquisadores alegam que uma ligação irreversível causaria um estado de “superaquecimento”, e, assim, os cristais de gelo seriam estáveis durante horas em temperaturas acima do seu ponto de fusão, o que não é observado (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

É certo apenas que ainda restam muitos detalhes sobre os mecanismos de ação das PACs a serem desvendados. Vários estudos foram realizados com a finalidade de esclarecer melhor a estrutura, o mecanismo de ação e a relação desses mecanismos nas PACs de peixes, insetos e plantas (BAARDSNES et al., 1999; MADURA; WIERZBICKI, 1999; ANTSON et al., 2001; TSVETKOVA et al., 2002; PUDNEY et al., 2003; LIU et al., 2005; SALVAY et al., 2010; MIDDLETON et al., 2012). Porém, essa não é uma tarefa simples, ainda mais considerando a quantidade de estruturas diferentes encontradas nas diversas espécies e variedades estudadas, criando inúmeras e complexas interações. Uma abordagem mais detalhada sobre o mecanismo de ação das PACs, relacionando estrutura da proteína com os diferentes tipos de atividade anticongelantes, pode ser encontrada na revisão realizada por Davies (2014).

As diferentes PACs glicosiladas, ligadas a uma molécula de açúcar, encontradas em peixes possuem tamanho semelhante e têm como característica as várias repetições do tripeptídeo Ala-Ala-Thr, além da presença de moléculas do dissacarídeo galactose-N-acetilgalactosamina. Já as PACs não glicosiladas dessas espécies são subdivididas em quatro grupos, sequencialmente numeradas na ordem que foram descobertas (I, II, III, IV), variando em relação ao tamanho, composição e fonte (BAARDSNES et al., 1999). A PAC tipo I é mais frequentemente encontrada em linguados e são ricas em alanina (Ala). A PAC tipo II também tem sua composição majoritária de Ala, mas possui uma quantidade de cisteína (Cys) e alguns aminoácidos aromáticos (Phe, Trp e Tir). No tipo III, descrita em peixe-carneiro, não há predominância de aminoácidos, tendo uma estrutura mais balanceada. A última PAC descoberta, tipo IV, em peixe-escorpião tem a estrutura altamente helicoidal e bem diferente das outras, com predominância de glutamina (Gln) e ácido glutâmico (Glu) (LILLFORD; HOLT, 1994; VIEIRA, 2011).

As PACs também já foram descritas em vários artrópodes, como aranhas, ácaros, gafanhotos e mais de 50 espécies de insetos (DUMAN et al., 2004; BILDANOVA et al., 2013). As PACs encontradas em

insetos são de 10 a 100 vezes mais ativas do que as proteínas de peixes, provavelmente devido às temperaturas mais extremas enfrentadas no meio terrestre. Além disso, elas possuem menos açúcares e um percentual mais alto de aminoácidos hidrofílicos (GRIFFITH; EWART, 1995; WHARTON et al., 2009). Qiu et al. (2012) relataram que, curiosamente, proteínas com propriedades anticongelantes também foram encontradas em situações de calor acentuado, como no besouro do deserto (*Microdera punctipennis*), possivelmente como mecanismo da espécie para conservação da água nessas condições.

Ao projetar a aplicação prática das PACs, é preciso, porém, pensar em uma fonte abundante dessas moléculas, para que o custo de obtenção não seja elevado e inviabilize sua utilização. Nesse sentido, as PACs de vegetais têm merecido grande atenção, uma vez que sua presença já foi relatada em diversas espécies de inverno, expostas e tolerantes a baixas temperaturas, além de apresentarem uma capacidade de inibir o processo de recristalização superior às proteínas de peixes e de insetos.

### 3.1 PACs em vegetais

No início da década de 1990, Griffith et al. (1992) descreveram de forma pioneira a presença de PACs em vegetais, em um trabalho com folhas de centeio (*Secale cereale*) de variedade de inverno. Atualmente, já foi relatada a presença de PACs em diversas espécies vegetais, como trigo, centeio, cenoura, azevém, canola, entre tantas outras, abrangendo gimnospermas e angiospermas, mono e dicotiledôneas (Tabela 1) (GRIFFITH; EWART, 1995; GRIFFITH; YAISH, 2004). As PACs foram descritas em diferentes partes desses vegetais, como sementes, talos, nós, córtex, pecíolos, folhas, flores, frutos, raízes, rizomas e tubérculos (BILDANOVA et al., 2013), sendo localizadas, principalmente, nos espaços intercelulares, conhecidos como apoplastos (JARZABEK et al., 2009).

De um modo geral, as PACs em vegetais são peptídeos de tamanho pequeno, com baixa massa molecular. Em estudos com extratos de variedades de centeio de inverno, Hon et al. (1994) encontraram cinco PACs em uma faixa entre 19 a 36 kDa. Smallwood et al. (1999) relataram a presença predominante de uma PAC de massa molecular de 36 kDa em cenouras (*Daucus carota*). Huang e Duman (2002) isolaram três PACs das folhas da espécie *Solanum dulcamara* com massas moleculares de 67, 47 e 29 kDa.

Tabela 1 - Trabalhos envolvendo a presença de proteínas anticongelantes em plantas

<b>Espécie</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Autor</b>
<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	-	Yong et al. (2000) Wang e Wei (2003)
<i>Avena sativa</i>	Aveia (folha)	Antikainen e Griffith (1997)
<i>Daucus carota</i>	Cenoura	Worrall et al. (1998) Smallwood et al. (1999) Meyer et al. (1999) Wang et al. (2002) Zhang et al. (2004) Gomez Galindo et al. (2005) Ding et al. (2014)
<i>Forsythia suspensa</i>	Forsythia	Simpson et al. (2005)
<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada (folha)	Antikainen e Griffith (1997) Ding et al. (2015)
<i>Lolium perene</i>	Azevém	Pudney et al. (2003) Sidebottom et al. (2000) Lauersen et al. (2011) Middleton et al. (2012)
<i>Picea abies</i> e <i>Picea pungens</i>	Píceia europeia e Píceia azul	Jarzabek et al. (2009)
<i>Prunus persica</i>	Pêssego	Wisniewski et al. (1999)
<i>Secale cereale</i>	Centeio (folha)	Griffith et al. (1992) Marentez et al. (1993) Hon et al. (1994) Antikainen e Griffith (1997) Griffith et al. (1997) Vieira (2011) Lim et al. (2013)
<i>Solanum dulcamara</i>	Dulcamara (folha)	Urrutia et al. (1992) Duman (1994) Huang e Duman (2002)
<i>Solanum tuberosum</i>	Batata (folha)	Urrutia et al. (1992)
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo (folha)	Antikainen e Griffith (1997) Zhang et al. (2007a) Vieira (2011)

Hassas-Roudsari (2011) descreveu a presença de PACs de tamanhos entre 14 a 43 kDa em extratos de folhas de trigo de variedade de inverno (*Triticum aestivum* cv. Vienna). Ding et al. (2015) relataram uma maior concentração de proteínas entre 31 e 43 kDa em amostras de cevada. Sidebottom et al. (2000) analisaram a principal PAC presente em amostras de azevém (*Lolium perenne*), chegando a um peptídeo de aproximadamente 12 kD, composto por 118 aminoácidos, rico em asparagina (25 %), valina (16 %), serina (15%) e treonina (10 %).

Um ponto interessante é que diversas dessas PACs descritas foram identificadas como isoformas de classes de proteínas relacionadas a respostas da planta contra patogenicias vegetais, como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase e taumatina. Apesar da composição semelhante, nem sempre elas apresentaram a mesma atividade presente nas proteínas de defesa (ATICI, NALBANTOGLU, 2003; GRIFFITH; YAISH, 2004).

As PACs são encontradas somente em variedades vegetais de inverno, expostas e tolerantes às baixas temperaturas. O estado de frio, ou, ainda, a desidratação causada por ele, constitui um sinal que induz a expressão dessas proteínas (ATICI; NALBANTOGLU, 2003; HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012). Assim, é necessário um período de aclimação ao frio para que essas proteínas sejam expressas (BILDANOVA et al., 2013). Esse processo ocorre durante o outono ou nas primeiras semanas de inverno. Com a chegada da primavera, ocorre a desaclimação, ou seja, sua tolerância ao frio volta a cair (JARZABEK et al., 2009). Embora existam outras condições ambientais que influenciem a aclimação, como iluminação, quantidade de água, nutrição e presença de doenças, a temperatura é sem dúvida o principal fator na indução da resposta vegetal e expressão das PACs (GOMEZ GALINDO et al., 2005).

Ainda não são conhecidos todos os detalhes de como ocorre essa transmissão de sinais, entre a percepção do frio pela planta até a expressão das proteínas. É certo que o cátion  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um importante papel entre a percepção da temperatura e a transdução do sinal; além disso, também é provável a ação de substâncias como etileno e ácido abscísico (ABA). Em algumas espécies, os níveis máximos de PACs são atingidos após alguns dias de exposição ao frio, enquanto em outros podem chegar a um máximo após quatro ou cinco semanas (BILDANOVA et al., 2013).

Gomez Galindo et al. (2005) acompanharam o efeito da temperatura na concentração de PACs em cenouras durante o cultivo em dois anos diferentes. No primeiro ano, no qual foram registrados diversos dias com temperaturas inferiores a 6 °C, as concentrações de

PACs foram superiores quando comparadas às cenouras cultivadas no segundo ano, no qual as temperaturas mínimas diárias foram mais altas, raramente ultrapassando 6 °C. Os autores ressaltam ainda que os vegetais do primeiro ano mantiveram, de forma mais satisfatória, sua qualidade durante o armazenamento em temperaturas de refrigeração do que as cenouras do segundo ano.

Em relação ao tipo de ação das PACs de vegetais, a atividade de histerese térmica observada nesse grupo normalmente é baixa ou insignificante. Enquanto em PACs de insetos esse valor pode variar entre 3 a 5 °C, nas proteínas encontradas em plantas normalmente se encontram na faixa de 0,1 a 0,6 °C (GRIFFITH; YASH, 2004). Por exemplo, a histerese térmica observada em proteínas no extrato apoplástico de folhas de trigo da variedade de inverno variou de 0,4 a 0,6 °C (HASSAS-ROUDSARI, 2011).

No entanto, as PACs de vegetais se destacam pela ação de inibição do processo de recristalização, mesmo em baixas concentrações (< 25 µg/L). Isso ocorre, possivelmente, porque essas proteínas interagem com os cristais de gelo em múltiplos locais (GRIFFITH; YASH, 2004). As PACs extraídas da espécie *Lolium perenne*, por exemplo, demonstraram uma forte inibição do crescimento de cristais de gelo em soluções de 30 % de sacarose, em concentrações inferiores a 10 µg/mL, o que é cerca de 200 vezes menor do que a concentração necessária para que a proteína tipo III encontrada em peixe-carneiro (*Macrozoarces americanus*) tenha o mesmo efeito (SIDEBOTTOM et al., 2000). Por serem concentrações normalmente insignificantes para provocar alterações sensoriais em produtos alimentícios, elas despontam como uma alternativa interessante para minimizar os impactos sobre a textura após o descongelamento e para expandir a vida útil de produtos congelados.

#### **4 Uso das PACs na área de Tecnologia de Alimentos**

O congelamento é um método bem-sucedido para a preservação por longo tempo dos atributos naturais de qualidade de alimentos perecíveis. Entretanto, para produtos formados por células, como carnes e vegetais, os cristais de gelo que são formados podem também causar considerável perda por exsudação, perda de textura, cor e modificações sensoriais após descongelamento (TALENS et al., 2003; VELICKOVA et al., 2013).

Embora ainda em pequeno número, diversos estudos têm apontado a possibilidade da aplicação das PACs na preservação da

qualidade sensorial e nutricional de alimentos durante o processamento e o armazenamento; isso considerando concentrações cerca de 300 a 500 vezes menores do que as de outras substâncias crioprotetoras, como a sacarose e o sorbitol (BILDANOVA et al., 2013).

Em alimentos consumidos ainda congelados, como sorvetes e sobremesas lácteas, o processo de recristalização durante o armazenamento pode provocar importante alteração sensorial, com crescimento dos cristais de gelo (WHATEN; JIA, 2005). Feeney e Yeh (1998) relataram o crescimento de cristais de gelo em amostras controle após 1 hora de armazenamento a  $-6$  e  $-8$  °C, enquanto que, em amostras contendo PACs, esse crescimento não existiu. Gaukel et al. (2014) utilizaram soluções de sacarose como modelo simplificado para sorvetes, relatando efeitos sinérgicos para inibição da recristalização nessas amostras com misturas de PACs diferentes, ou, ainda, de PACs com outros coloides, como alginato de sódio e k-carragena. Nesse tipo de produtos, inclusive já foram registradas patentes para a utilização de alguns tipos de PACs (CLEMMINGS et al., 1997; UNILEVER, 2001).

Payne et al. (1994) verificaram que baixas concentrações de PACs reduziram os danos causados pelo congelamento de carnes, conservando de melhor forma as características do produto original. A adição de PACs à carne de cordeiro também apresentou a formação de cristais de gelo menores, com conseqüente redução na perda de líquido no descongelamento (PAYNE; YOUNG, 1995). Amostras de carne congeladas tratadas com PAC produzida por *Lactococcus lactis* demonstraram menor gotejamento e perda de proteína no descongelamento, com conseqüente melhora na avaliação sensorial (YEH et al., 2009). Boonsupthip e Lee (2003) também relataram a funcionalidade do uso das PACs na conservação de géis formados com proteínas da carne em condições de congelamento, tendo um desempenho melhor do que o crioprotetor formado por uma mistura de sacarose e de sorbitol.

O congelamento também seria uma alternativa para aumentar a curta vida útil de massas frescas, se isso não causasse diversos problemas tecnológicos. A adição de um extrato proteico concentrado obtido de cenouras aumentou significativamente a capacidade de fermentação de massas congeladas, bem como o volume do pão obtido ao final, sem nenhum prejuízo em relação à textura ou a outro aspecto da qualidade sensorial (ZHANG et al., 2007b; ZHANG et al., 2008).

Ding et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de PACs extraídas de cenouras sob diversas propriedades termofísicas, de textura, de cozimento e na microestrutura de *noodles* congelados. Os resultados

obtidos após a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) demonstraram que a presença das PACs reduziu o conteúdo de água congelável na amostra. Além disso, melhoraram as propriedades de textura e de cozimento dos *noodles*. As imagens obtidas por microscopia eletrônica sugerem que o efeito das proteínas sobre a formação dos cristais de gelo protege a rede do glúten de danos causados pelo congelamento e pela flutuação de temperatura durante a estocagem sob congelamento. A adição de 0,5 % (m/m) de PACs em géis de amido de milho e trigo também aumentou a estabilidade durante o congelamento (LI et al., 2010).

As frutas e as hortaliças também teriam no congelamento uma opção interessante para sua conservação, sobretudo em pedaços prontos para o consumo, uma vez que o consumidor busca alimentos mais saudáveis e práticos, mas sem abdicar da qualidade sensorial. Nesse tipo de alimento, o congelamento normalmente provoca alterações importantes, como amolecimento do tecido vegetal e excessiva perda de líquido.

Velickova et al. (2013) avaliaram o efeito da infusão de crioprotetores, como a trealose, extrato de trigo-grama (PACs) ou a mistura de ambos, na qualidade de morangos congelados. A perda de líquido em amostras tratadas com crioprotetores foi significativamente menor do que em amostras controle. Isso refletiu também em uma menor alteração na textura dos morangos após o descongelamento. Embora o uso conjunto seja uma possibilidade, é importante destacar que esse efeito foi observado para o extrato vegetal mesmo em baixas concentrações.

No trabalho realizado por Cruz et al. (2009), também foi observada uma menor alteração na textura de agriões congelados, tratados previamente com uma solução de PACs do tipo I (peixes), quando comparadas a amostras controle. A amostra tratada com a PAC apresentou também uma coloração mais uniforme após o descongelamento.

A avaliação do efeito das PACs em determinado alimento se inicia com a difícil tarefa da seleção da proteína a ser utilizada. Diversos tipos de proteínas estão disponíveis em peixes, insetos, plantas e bactérias. Algumas proteínas possuem características que podem beneficiar ou limitar seu uso em determinado tipo de alimento. A PAC tipo I, extraída de peixes, não é estável em temperaturas próximas a 20 °C; logo não pode ser utilizada em produtos que são aquecidos antes do congelamento. Já a PAC extraída de variedades de centeio de inverno é similar a taumatina, uma proteína com poder adoçante. Por isso o uso

desse tipo de proteína está limitado a produtos que normalmente são adoçados durante a preparação (GRIFFITH; EWART, 1995).

A elaboração de peptídeos com propriedade anticongelante, obtidos a partir da hidrólise de proteínas, também é uma opção emergente. Wang et al. (2014), por exemplo, avaliaram peptídeos obtidos a partir da hidrólise de colágeno de pele de tubarão como protetores ao congelamento de *Lactobacillus bulgaricus*, amplamente utilizado em produtos fermentados. A taxa de sobrevivência do *L. bulgaricus* na amostra controle, com água esterilizada, foi de apenas 0,44 %, aumentando para 12,4 % para a hidrolisado bruto e para mais de 90 % após as etapas de purificação desses peptídeos, sempre em concentrações de 250 µg/mL.

Ainda é possível a utilização de combinações de diferentes proteínas, com efeitos complementares, para se alcançar um melhor resultado na conservação.

O próximo ponto é a inserção da proteína à matriz alimentar. Para alimentos que produzem naturalmente essas proteínas, a questão se limita ao estímulo na sua produção. Para outros alimentos, a adição pode se dar por diferentes métodos físicos, como mistura, injeção, imersão, revestimento, pulverização ou impregnação a vácuo, dependendo do alimento em questão (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012). Para proteger tecidos vegetais do congelamento, por exemplo, é crucial que as PACs alcancem o apoplasto, uma vez que o gelo se forma preferencialmente nesse local (CRUZ et al., 2009).

A modificação genética pela introdução de genes de expressão das PACs também é avaliada. Em modelos de plantas transgênicas de tabaco, a inserção do gene de uma PAC de 36 kD de cenouras aumentou a tolerância dessa espécie ao frio (WEN-LI et al., 2005). Naturalmente que essa não é uma tarefa das mais fáceis, pois envolve uma série de fatores no material transgênico obtido e há diversos pontos a serem ainda investigados para essa possibilidade (WHATEN; JIA, 2005). Uma revisão mais detalhada sobre o assunto, envolvendo a transformação com diferentes genes de peixes, insetos e plantas, pode ser encontrada no trabalho de Duman e Wisniewski (2014).

Em relação à toxicidade e à segurança de consumo das PACs em outras matrizes alimentares, vale lembrar que elas já são rotineiramente consumidas na dieta humana, uma vez que são encontradas em várias plantas e peixes de água fria (CREVEL et al., 2002). Estudos realizados *in vitro* demonstraram ausência de toxicidade em concentrações maiores que 5 µg/mL, superiores às necessárias para se obter o efeito de inibição da recristalização (WANG et al., 2002).



## 5 Conclusões e perspectivas futuras

As PACs podem, em um futuro não tão distante, representar uma ferramenta importante de controle sobre o crescimento do cristal de gelo, propriedade que interessa a diversas áreas científicas e tecnológicas. Apesar de inúmeros estudos acerca de seus aspectos químicos, é certo que ainda restam muitos detalhes sobre os mecanismos de ação das PACs a serem desvendados. A maior dificuldade para obter uma explicação mais detalhada é a impossibilidade de se visualizar diretamente as interações moleculares entre as PACs e o gelo, uma vez que o complexo é instável até mesmo em técnicas como a cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear (NMR). Pesquisas utilizando técnicas como a mutagênese e a modelagem computacional podem ser úteis nesse sentido, aumentando o conhecimento sobre os detalhes da relação entre a estrutura da proteína e seu mecanismo de ação.

A discussão sobre a aplicabilidade das PACs na área de Tecnologia de Alimento não é inédita, mas relativamente recente. Atualmente, o custo ainda é um dos maiores entraves para utilização dessas proteínas pela indústria de alimentos. O potencial mercado para as PACs, junto com a limitada disponibilidade em poucas espécies selvagens, criou a necessidade de se buscar fontes alternativas. Há uma grande diversidade de espécies de peixes, insetos, micro-organismos e, principalmente, plantas de clima frio que ainda não foi explorada e pode constituir em novas fontes desse material, reduzindo seu custo comercial.

O Brasil, em suas regiões serranas, como a de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, apresenta diversas espécies vegetais que resistem muito bem ao frio intenso e à geada, especialmente plantas nativas, mas que nunca foram avaliadas em relação à presença de PACs. As condições climáticas nessa região também limitam as oportunidades de cultivo de plantas tradicionais; portanto a valorização das espécies nativas pode representar importantes alternativas futuras para a agricultura local.

Uma vez disponíveis em abundância, seguras e com baixo custo, não há dúvidas em afirmar que essas proteínas podem representar uma nova ferramenta na conservação da qualidade de alimentos congelados.

## Agradecimentos

Projeto apoiado com recursos do Edital Universal 14/2014/PROPI do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFSC) e Edital Universal CNPq 443244-2014-6.

## Referências

ANTIKAINEN, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 99, n. 3, p. 423-432, 1997.

ANTSON, A. A.; SMITH, D. J.; ROPER, D. I.; LEWIS, S.; CAVES, L. S. D.; VERMA, C. S.; BUCKLEY, S. L.; LILLFORD, P. J.; HUBBARD, R. E. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 305, n. 4, p. 875-889, 2001.

ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 7, p. 1187-1196, 2003.

BAARDSNES, J.; KONDEJEWSKI, L. H.; HODGES, R. S.; CHAO, H.; KAY, C.; DAVIES, P. L. New ice-binding face for type I antifreezing protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 463, n. 1-2, p. 87-91, 1999.

BILDANOVA, L. L.; SALINA, E. A.; SHUMNY, V. K. Main properties and evolutionary features of antifreeze proteins. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, Moscou, v. 3, n. 1, p. 66-82, 2013.

BOONSUPTHIP, W.; LEE, T. Application of antifreeze protein for food preservation: effect of type III antifreeze protein for preservation of gel forming of frozen and chilled actomyosin. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 1804-1809, 2003.

CAI, Y.; LIU, S.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J.; DABING, Z. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. **Food and Bioproducts Processing**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 98-102, 2011.

CLEMMINGS, J. F.; ZOERB, H. F.; ROSENWALD, D. R.; HUANG, V. T. Ice cream containing antifreeze protein. New Patents. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 12, p. 425, 1997.

CREVEL, R. W. R.; FEDYK, J. K.; SPURGEON, M. J. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 7, p. 899-903, 2002.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: effect of an antifreeze protein type I. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 339-345, 2009.

DAVIES, P. L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 39, n. 11, p. 548-555, 2014.

DING, X.; ZHANG, H.; CHEN, H.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Extraction, purification and identification of antifreeze proteins from cold acclimated malting barley (*Hordeum vulgare* L.). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 74-81, 2015.

DING, X.; ZHANG, H.; LIU, W.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white salted noodles. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 3, p. 842-852, 2014.

DUMAN, J. G.; BENNETT, V.; SFORMO, T.; HOCHSTRASSER, R.; BARNES, B. M. Antifreeze proteins in Alaska insects and spiders. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 50, n. 4, p. 259-266, 2004.

DUMAN, J. G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bitter-sweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1206, n. 1, p. 129-135, 1994.

DUMAN, J. G.; WISNIEWSKI, M. J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 60-69, 2014.

EWART, K. V.; LIN, Q.; HEW, C. L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 55, n. 2, p. 271-283, 1999.

FEENEY, R. E.; YEH, Y. Antifreeze proteins: current status and possible food uses. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 102-106, 1998.

GAUKEL, V.; LEITER, A.; SPIEB, W. E. L. Synergism of different fish antifreeze proteins and hydrocolloids on recrystallization inhibition of ice sucrose solutions. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 141, n. 1, p. 44-50, 2014.

GOFF, H. D. Food at subzero temperatures. In: DUTCHER, J. R.; MARANGONI, A. G. **Soft materials structure and dynamics**. New York: Marcel Dekker Inc., 2005. cap. 12, p. 229-320.

GOMEZ GALINDO, F.; ELIAS, L.; GEKAS, V.; HERPPICH, W. B.; SMALLWOOD, M.; SOMMARIN, M.; WORRAL, D.; SJOHOLM, I. On the induction of cold acclimation in carrots (*Daucus carota* L.) and its influence on storage performance. **Food Research International**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 29-36, 2005.

GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D. S. C.; HON, W. C.; MOFFATT, B. A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, n. 2, p. 593-596, 1992.

GRIFFITH, M.; ANTIKAINEN, M.; HON, W.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; YU, X.; CHUN, J. U.; YANG, D. S. C. Antifreeze proteins in winter rye. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 100, n. 2, p. 327-332, 1997.

GRIFFITH, M.; EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. **Biotechnology Advances**, Londres, v. 13, n. 3, p. 375-402, 1995.

GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 399-405, 2004.

HASSAS-ROUDSARI, M. **Extraction, purification and study of the mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves.** 2011. Ph.D. dissertation - University of Guelph, Guelph. Disponível em: <<https://dspace.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/2987/Fina%20Thesis.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, D. Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application. **Food Research International**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 425-436, 2012.

HON, W.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D. S. C. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 104, n. 3, p. 971-980, 1994.

HUANG, T.; DUMAN, J. G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet night-shade, *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 339-350, 2002.

JARZABEK, M.; PUKACKI, P. M.; NUC, K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 268-274, 2009.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H. D.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice-structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixtures. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 1135-1147, 2008.

LAUERSEN, K. J.; BROWN, A.; MIDDLETON, A.; DAVIES, P. L.; WALKER, V. K. Expression and characterization of an antifreeze protein from the perennial rye grass, *Lolium perenne*. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 194-201, 2011.

LI, L.; KIM, Y.; HUANG, W.; JIA, C.; XU, B. Effects of ice structuring proteins on freeze-thaw stability of corn and wheat starch gels. **Cereal Chemistry**, Amsterdam, v. 87, n. 5, p. 497-503, 2010.

LILLFORD, P. J.; HOLT, C. B. Antifreeze proteins. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 22, n. 1-4, p. 475-482, 1994.

LIM, Z. L.; LOW, N. H.; MOFFATT, B. A.; GRAY, G. R. Gelation in protein extracts from cold acclimated and non-acclimated winter rye (*Secale cereale* L. cv Musketeer). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 156-166, 2013.

LIU, K.; JIA, Z.; CHEN, G.; TUNG, C.; LIU, R. Systematic size study of an insect antifreeze protein and its interaction with Ice. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 88, n. 2, p. 953-958, 2005.

MADURA, J. D.; WIERZBICKI, A. Modeling of antifreeze proteins. In: LESZCZYNSKI, J. **Computational Molecular Biology**. v. 8. Amsterdam: Elsevier B. V., 1999. cap. 14, p. 537-568.

MARENTEZ, E.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A.; BRUSH, R. A. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 87, n. 4, p. 499-507, 1993.

MEYER, K.; KEIL, M.; NALDRETT, M. J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 447, n. 2-3, p. 2-3, 1999.

MIDDLETON, A. J.; MARSHALL, C. B.; FAUCHER, F.; BARDOLEV, M.; BRASLAVSKY, I.; CAMPBELL, R. L.; WALKER, V. K.; DAVIES, P. L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 416, n. 5, p. 713-724, 2012.

PAYNE, S. R.; SANDFORD, D.; HARRIS, A.; YOUNG, O. A. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. **Meat Science**, Londres, v. 37, n. 3, p. 429-438, 1994.

PAYNE, S. R.; YOUNG, O. A. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality. **Meat Science**, Londres, v. 41, n. 2, p.147-155, 1995.

PUDNEY, P. D. A.; BUCKLEY, S. L.; SIDEBOTTOM, C. M.; TWIGG, S. N.; SEVILLA, M. P.; HOLT, C. B.; ROPER, D.; TELFORD, J. H.; MCARTHUR, A. J.; LILLFORD, P. J. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a

perennial grass (*Lolium perenne*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 410, n. 2, p. 238-245, 2003.

QIU, L.; MAO, X.; HOU, F.; MA, J. A novel function: thermal protective properties of an antifreeze protein from the summer desert beetle *Microdera punctipennis*. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 60-68, 2012.

SALVAY, A. G.; GABEL, F.; PUCCI, B.; SANTOS, J.; HOWARD, E. I.; EBEL, C. Structure and interactions of fish type III antifreeze protein in solution. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 99, n. 2, p. 609-618, 2010.

SIDEBOTTOM, C.; BUCKLEY, S.; PUDNEY, P.; TWIGG, S.; JARMAN, C.; HOLT, C.; TELFORD, J.; McARTHUR, A.; WORRALL, D.; HUBBARD, R.; LILLFORD, P. Heat-stable antifreeze protein from grass. **Nature**, New York, v. 406, p. 256, 2000.

SIMPSON, D. J.; SMALLWOOD, M.; TWIGG, S.; DOUCET, C. J.; ROSS, J.; BOWLES, D. J. Purification and characterization of an antifreeze protein from *Forsythia suspensa* (L.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 230-234, 2005.

SMALLWOOD, M.; WORRALL, D.; BYASS, L.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; DOUCET, C. J.; HOLT, C.; TELFORD, J.; LILLFORD, P.; BOWLES, D. J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). **Biochemical Journal**, Londres, v. 340, n. 2, p. 385-391, 1999.

TALENS, P.; ESCRICHE, I.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; CHIRALT, A. Influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of kiwi fruit. **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 635-642, 2003.

TSVETKOVA, N. M.; PHILLIPS, B. L.; KRISHNAN, V. V.; FEENEY, R. E.; FINK, W. H.; CROWE, J. H.; RISBUD, S. H.; TABLIN, F.; YEH, Y. Dynamics of antifreeze glycoproteins in the presence of ice. **Biophysical Journal**, Maryland, v. 82, n. 1, p. 464-473, 2002.

UNILEVER N. V. (Rotterdam, Holanda). Adrian Daniel, Ian Lacy, Jon Richard Oldroyd. **Uso de proteínas anticongelantes en productos de confitura helada**. Espanha n. 2 187 459, 02 mar. 2000, 05 dez. 2001.

URRUTIA, M. E.; DUMAN, J. G.; KNIGHT, C. A. Plant thermal hysteresis proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1121, n. 1-2, p. 199-206, 1992.

VELICKOVA, E.; TYLEWICZ, U.; DALLA ROSA, M.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; GÓMEZ GALINDO, F. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 146-150, 2013.

VIEIRA, C. R. **Proteína estruturadora de gelo em cultivares brasileiras de trigo e centeio: ocorrência, caracterização e aplicação em massas congeladas**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

WANG, L. H.; WUSTEMAN, M. C.; SMALLWOOD, M.; PEGG, D. E. The stability during low-temperature storage of an antifreeze protein isolated from the roots of cold-acclimated roots. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 307-310, 2002.

WANG, W.; WEI, L. Purification of a boiling-soluble antifreeze protein from the legume *Ammopiptanthus mongolicus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 67-80, 2003.

WANG, S.; ZHAO, J.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; WU, J. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark collagen. **LWT**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 210-217, 2014.

WEN-LI, X.; MEI-QIN, L.; XIN, S.; CUN-FU, L. Expression of a carrot 36 kD antifreeze protein gene improves cold stress tolerance in transgenic tobacco. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 7, n. 4, p. 11-15, 1998.

WHARTON, D. A.; POW, B.; KRISTENSEN, M.; RAMLOV, H.; MARSHALL, C. J. Ice-active proteins and cryoprotectants from the New Zealand alpine cockroach, *Celoblatta quinqueculata*. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 27-31, 2009.



WHATEN, B.; JIA, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In: SUN, D. **Emerging Technologies for Food Processing**. London: Elsevier Academic Press, 2005. cap. 25, p. 653-673.

WISNIEWSKI, M.; WEBB, R.; BALSAMO, R.; CLOSE, T. J.; YU, X.; GRIFFITH, M. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 105, n. 4, p. 600-608, 1999.

WORRALL, D.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; SMALLWOOD, M.; SIDEBOTTOM, C.; LILFORD, P.; TELFORD, J.; HOLT, C.; BOWLES, D. A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. **Science**, Washington, v. 282, n. 5386, p. 115-117, 1998.

YEH, C. M.; KAO, B. Y.; PENG, H. J. Production of a recombinant type 1 antifreeze protein analogue by *Lactococcus lactis* and its application on frozen meat and frozen dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 14, p. 6216-6223, 2009.

YONG, J.; FEI, Y.; WEI, L. Purification and identification of an antifreeze protein from the leaves of *Ammopiptanthus mongolicus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2000.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, n. 6, p. 763-769, 2007b.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; ZHANG, J.; YAO, H. Purification of antifreeze protein from wheat bran (*Triticum aestivum* L.) based on its hydrophilicity and ice-binding capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 19, p. 7654-7658, 2007a.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. **LWT**, Amsterdam, v. 41, n. 6, p. 1029-1036, 2008.

ZHANG, D.; LIU, B.; FENG, D.; HE, Y.; WANG, J. Expression, purification and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 257-263, 2004.

### 3 CAPÍTULO 2

**ANTIFREEZE PROTEINS IN NATURALLY COLD ACCLIMATED LEAVES OF *DRIMYS ANGUSTIFOLIA*, *SENECIO ICOGLOSSUS*, AND *EUCALYPTUS* SSP.**

**Artigo publicado:**

PROVESI, J. G.; VALENTIM NETO, P. A.; ARISI, A. C. M.; AMANTE, E. R. Antifreeze proteins in naturally cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus*, and *Eucalyptus* ssp. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, e20166110, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.11016>



## **Antifreeze proteins in naturally cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus*, and *Eucalyptus* ssp.**

### **Summary**

Antifreeze proteins (AFPs) present in plants may inhibit ice recrystallization even at low concentrations, and show potential application to many frozen foods. This study evaluated the presence of antifreeze proteins in naturally cold acclimated and non-acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. No proteins were detected in apoplastic extracts of *Eucalyptus* ssp. Extracts of cold acclimated and non-acclimated *S. icoglossus* showed protein concentrations of 42.89 and 17.76  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , both with bands between 25 and 37 kDa in the SDS-PAGE. However, they did not inhibit recrystallization. The extract of cold acclimated *D. angustifolia* contained a protein concentration of 95.17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , almost five times higher than the extract of non-acclimated *D. angustifolia*. In the extract of cold acclimated *D. angustifolia*, there was presence of ice recrystallization inhibitors. This extract showed a protein band just below 37 kDa and another more intense band between 20 and 25 kDa. It is the first time that the presence of antifreeze proteins in this species is being described.

**Keywords:** antifreeze protein; *Drimys angustifolia*; *Senecio icoglossus*; *Eucalyptus*; natural cold acclimation; recrystallization inhibition.



## **Avaliação de proteínas anticongelantes em folhas de *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* e *Eucalyptus* ssp. naturalmente aclimatadas ao frio**

### **Resumo**

Proteínas anticongelantes (PACs) de plantas podem inibir a recristalização do gelo mesmo em baixas concentrações, tendo potencial para aplicação em diversos alimentos congelados. Esse trabalho avaliou a presença de proteínas anticongelantes em folhas naturalmente aclimatadas ao frio e folhas não aclimatadas de *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* e *Eucalyptus* ssp. Não foram detectadas proteínas nos extratos de *Eucalyptus* ssp. Os extratos de folhas aclimatadas e não aclimatadas de *S. icoglossus* apresentaram concentrações de proteína de 42,89 e 17,76 µg/mL, ambos com bandas entre 25 e 37 kDa no SDS-PAGE. Contudo, eles não apresentaram atividade de inibição da recristalização. O extrato de folhas de *D. angustifolia* aclimatadas ao frio apresentou concentração de proteína de 95,17 µg/mL, cinco vezes maior do que extrato não aclimatado dessa espécie. O extrato aclimatado de *D. angustifolia* apresentou atividade de inibição da recristalização. Esse extrato apresentou uma banda logo abaixo de 37 kDa e outra mais intensa entre 20 e 25 kDa no SDS-PAGE. É a primeira vez que a presença de proteínas anticongelantes nessa espécie é descrita.

**Palavras-chave:** proteína anticongelante; *Drimys angustifolia*; *Senecio icoglossus*; *Eucalyptus*; aclimação natural; inibição da recristalização.





## 1 Introduction

First described in the early 70s in cold-water fish, antifreeze proteins (AFPs) comprise the survival strategy of a large group of organisms whose habitat is located in cold places, where temperatures reach below the freezing point of their fluids. During the last two decades, different AFPs have been more thoroughly described in animals, insects, fungi, bacteria and plants and always in species and varieties that were exposed to low temperature (CAI et al., 2011).

This group of proteins has various shapes and sizes and both can modify the water freezing process. This modification may occur essentially in three ways. The first is by interfering with the nucleation process, which is the initial stage of ice formation, by binding to nucleating substances. The second is by reducing the freezing temperature of the body fluid in a non-colligative manner without causing any effect on the melting point. This property is known as thermal hysteresis (HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012). The third is by inhibiting ice recrystallization, which is a capacity of another group of AFPs.

Recrystallization is the process that occurs after the formation of ice crystals when the temperature changes within a range just above the freezing point. Ice recrystallization is the growth of large ice crystals at the expense of smaller ones. Although the chemical basis for the mechanism of action of AFPs in the inhibition of recrystallization has not yet been fully elucidated, it is certain that its effects occur through adsorption of these proteins to different parts of the surface ice crystal through one or more forms of interaction, such as hydrogen bonds or Van der Waals interactions (CRUZ et al., 2009; HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012).

The larger the ice crystals formed during recrystallization, the greater the possibility of there being physical damage to cells and tissues. Therefore, the recrystallization process is always a concern in sectors that use freezing as a conservation method, such as the food technology industry. Freezing is a method of conservation widely used by the food industry, even though it can cause a reduction in the sensory and nutritional quality of food products. Foods that are formed by cells, such as meat and vegetables, for example, can lose some of their nutrients and have low water retention after thawing. Products that are consumed while still frozen, such as ice cream, may have their sensory quality reduced due to the formation of larger ice crystals (WHATEN; JIA, 2005; PROVESI; AMANTE, 2015).

Although still few in number, studies conducted on the application of AFPs in the preservation of sensory and nutritional quality during processing and storage of foods such as ice cream (FEENEY; YEH, 1998), meat and its proteins (PAYNE et al., 1994, BOONSUPTHIP; LEE, 2003; YEH et al., 2009), breads and pasta (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2008; DING et al., 2014; DING et al., 2015), starch gels (LI et al., 2010) and fruits and vegetables (CRUZ et al., 2009; VELICKOVA et al., 2013) have shown promising results. Some AFPs may exhibit an effective activity of recrystallization inhibition even at low concentrations as  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Although they usually perform low or insignificant thermal hysteresis activity, AFPs from plants are much better at inhibiting recrystallization than AFPs from insects or fishes, besides being effective from concentrations as low as  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (ZHANG et al., 2004; HASSAS-ROUDSARI; GOFF, 2012), which is an effective concentration that is 300-500 times lower than other antifreeze substances. It is insignificant to cause sensory changes while sufficient to provide cryoprotection (BILDANOVA et al., 2013).

Since Griffith et al. (1992) described, in a pioneering way, the presence of AFPs in winter rye leaves (*Secale cereale*), which were later studied by Hon et al. (1994), Antikainen and Griffith (1997) and Lim et al. (2013), the presence of AFPs with different characteristics have been detected in wheat (*Triticum aestivum*) (ANTIKAINEN; GRIFFITH, 1997; ZHANG et al., 2007), carrots (*Daucus carota*) (SMALLWOOD et al., 1999; WANG et al., 2002; ZHANG et al., 2004; GOMEZ GALINDO et al., 2005; DING et al., 2014), ryegrass (*Lolium perenne*) (SIDEBOTTOM et al., 2000; PUDNEY et al., 2003; MIDDLETON et al., 2012), *Solanum tuberosum* (URRUTIA et al., 1992), *Solanum dulcamara* (URRUTIA et al., 1992; HUANG; DUMAN, 2002), *Forsythia suspensa* (SIMPSON et al., 2005), *Picea abis* and *Picea pungens* (JARZABEK et al., 2009), among many others.

In order for the expression of AFPs to occur, plants need to undergo a process of cold acclimation. The cold acclimation of a plant is a multigenic process, which is associated with numerous biochemical and physiological changes that culminate in increased expression of AFPs. It is a process whose details are not yet fully understood; however, it is likely that it involves hundreds of genes, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and substances such as ethylene and abscisic acid (ATICI; NALBANTOGLU, 2003; DUMAN; WISNIEWSKI, 2014). Anatomically, antifreeze proteins are located mainly in the intercellular space known as apoplast (JARZABEK et al., 2009). Besides the cold,

other environmental factors may also be involved in acclimation process, such as lightings, water, nutritional status, presence of diseases and others (GOMEZ-GALINDO et al., 2005).

Several plant species, especially in temperate zones, routinely have cycles of acclimation and deacclimation. For some species, one or two days are enough to induce cold acclimation while for other species higher concentrations of AFPs are only observed after some weeks. The increase to milder temperatures leads to rapid loss of this ability (QURESHI et al., 2007, BILDANOVA et al., 2013). In cold regions, where minimum temperatures are below 0 °C, this process occurs during the fall or in the first weeks of winter. With the onset of spring, there occurs the process of deacclimation and the tolerance of plants to cold drops (JARZABEK et al., 2009). There are few studies involving AFPs in naturally acclimated plants (GOMEZ-GALINDO et al., 2005; SIMPSON et al., 2005; JARZABEK et al., 2009; CAI et al., 2011).

Today, a major obstacle to the commercial use of AFPs still is the cost of extraction. The potential market for AFPs creates the need to find alternative sources of fish, insect and, especially, of cold climate plants, whether the AFPs are to be used in an isolated form or as an extract. In temperate regions of several countries, including Brazil, there are plant species that resist very well to cold and frost; however, the presence of AFPs in these plant species has never been investigated. Within this context, it is important that this assessment be conducted with a naturally occurring acclimation process. Most studies involve artificial acclimation of the plants in chambers with controlled conditions. While providing more controlled and reproducible results for other researches, this option probably would raise the cost of cultivation, thus making it too expensive.

There are several species of the *Drimys* genus. Three species grow wild in Brazil, namely, *Drimys angustifolia* Miers, *D. brasiliensis* Miers and *D. roraimensis*, the first two of which occur in southern Brazil. The *D. angustifolia* species is popularly known as “casca d’anta” or “cataia”, and occurs more restrictively at high altitudes (SANTOS et al., 2013). The *Senecio icoglossus* DC. species is popularly known by several different names, the most common is “margarida do banhado”, and it is usually found in wet or marshy areas in regions of moderate or high altitudes in the southeast and south of Brazil as well as throughout Argentina and Paraguay (TELES, 2008). *Eucalyptus* is a large genus of the Myrtaceae family, which includes 900 species and subspecies and is widely grown in many countries all over the world, including Brazil. Its leaf extract has been approved as a food additive mainly because of its

antioxidant property (TYAGI; MALIK, 2011). All of these species are adapted to temperate climates.

Therefore, considering all the aforementioned, the purpose of this study was to investigate the presence of AFPs and of any recrystallization inhibition activity in plant extracts obtained from naturally cold acclimated and non-acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus*, and *Eucalyptus* ssp.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Plant Material**

In this study, leaves of the species *Drimys angustifolia* Miers, *Senecio icoglossus* DC. and *Eucalyptus* ssp. were analyzed. The plant material was collected from plants grown under natural conditions at different rural units in the municipal district of Urupema (27°57'10'' South, 49°52'23'' West, 1,350 m altitude), in Santa Catarina state, Brazil.

Samples considered naturally cold acclimated and samples without acclimation period (non-acclimated) were collected from all species. The temperature range proposed by Gomez-Galindo et al. (2005) was adopted as a parameter. For the cold acclimated samples, the collection was carried out in June 2015, after a period of five consecutive days of average temperature below 6 °C and minimum temperature near or below 0 °C. Meanwhile, the collection for the non-acclimated samples occurred after a sequence of five days with average temperatures close to 10 °C and minimum temperatures equal to or greater than 6 °C. The climate data that preceded the two sample collections were provided to us as a courtesy of the EPAGRI (Santa Catarina State Agency for Agricultural Research and Rural Extension).

The samples were collected in the morning, washed in cold water and stored in a thermal box and then taken to the laboratory where the preparation of the extracts was carried out. All the reagents used in the preparation of the extracts and subsequent analysis were of analytical grade.

### **2.2 Extraction of Apoplastic Proteins**

The extraction of apoplastic proteins was performed using a modification of the method proposed by Hon et al. (1994). The leaves were cut into pieces measuring 3 cm (with an approximate area of 9

cm<sup>2</sup>) and then thoroughly rinsed with distilled water to wash off cellular proteins from the cut ends. After each rinse, the water was evaluated spectrophotometrically (Hitachi, U-1800, Japan) at 280 nm as an indicator of residues of cellular proteins. In general, four cycles of washing were sufficient to substantially reduce the residues.

The leaves were then vacuum-infiltrated with a pH 3 buffer solution that contained 20 mmolL<sup>-1</sup> of L-ascorbic acid and 20 mmolL<sup>-1</sup> of calcium chloride using an aspirator vacuum pump. During the process, the vacuum was ceased every 10 min for a few seconds to facilitate the infiltration of the buffer. After 40 minutes, the vacuum was ceased and the leaves were carefully blotted dry between two layers of paper towels.

The dried leaves were placed in 50 mL centrifuge bottles and the centrifugation was performed at ~3800 x g for 30 min. The apoplastic extract was then collected from the bottom of the tubes using an automatic pipette.

The concentrations of apoplastic proteins in the extracts of the acclimated and of the non-acclimated leaves were determined according to the methodology proposed by Bradford (1976), i.e., using a UV-Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800, Japan) (695 nm) and BSA (bovine serum albumin) as a standard.

### **2.3 Antifreeze Activity Assay**

The antifreeze activity was determined by measuring ice recrystallization inhibition, using the sucrose sandwich splat assay proposed by Smallwood et al. (1999) with modifications. In the methodology used, about 5 µL of the solution under investigation in 30 % (w/w) sucrose was compressed between two microscope slides. The 'sandwich' was flash frozen at -40 °C in an ultra freezer (Klimaquip, UK-05, Brazil). Then the temperature was increased to -10 °C and the samples were incubated for 60 to 120 min. After incubation, the growth of ice crystal was observed in an optical microscope (Kozo, XJS900, China), with 20x objective, coupled to a digital photography camera and using image processing software (ToupTek, ToupView, China).

A visual assessment to detect any degree of recrystallization was made by comparing the size of the ice crystals of the test sample with those of a control sample (without plant extract) (WANG et al., 2002).

## 2.4 Protein Electrophoresis

The apoplast protein extracts were analysed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) carried out in 4% (w/v) polyacrylamide-stacking gel and a 12% (w/v) polyacrylamide-resolving gel, in accordance with standard protocols using a Bio-Rad Mini-PROTEAN system (Mini-Protean II; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), and 250 kD - 10 kD Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) as molar mass markers. 200  $\mu$ L of the extracts were centrifuged for 20 min at 20000  $\times g$  at 4 °C, the supernatant was discarded, then the resulting pellets were suspended in 300  $\mu$ L of rehydration solution (7 mol/L Urea, 2 mol/L Thiourea, 0.3 g L<sup>-1</sup> CHAPS, 0.15 g L<sup>-1</sup> DTT) and heated at 96°C for 5 min. 15  $\mu$ L of the solution cooled to room temperature (20°C) was loaded into the gel at 15 mA/gel free voltage for 15 min, followed by 30 mA/gel free voltage for 1 h. The 5x SDS-running buffer (distilled water, 0.12 mol/L Tris pH 8.3, 7.2 % glycine, 0.5% SDS) was diluted to 1x with distilled water. The gels were stained for 1 h with 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in methanol/acetic acid/water (25:10:65, v/v).

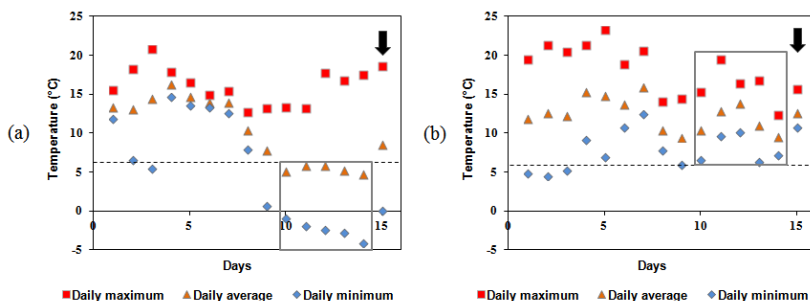
## 2.5 Statistical Analysis

All the analyses were performed in triplicate. The results of the protein concentration in the extracts were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. They were submitted to analysis of variance (ANOVA) and mean separations using Tukey's multiple-range test ( $P \leq 0.05$ ) for comparison between the acclimated and the non-acclimated extracts of each of the plant species. In all the statistical analyses, ANOVA assumptions, such as independence and normal distribution of the residues and homogeneity of variances, were observed.

## 3 Results and discussion

Figure 1 shows the climate data on the days previous to the material collection. The collections of the acclimated samples were carried out on the days following a minimum period of 5 days with an average temperature below 6 °C and minimum temperatures near or below 0 °C (Figure 1a). The non-acclimated samples were collected after a minimum of 5 days with average and minimum temperatures above 6 °C (Figure 1b).

Figure 1 - Daily average, maximum and minimum temperature in the municipality of Urupema, in Santa Catarina state, Brazil, in the periods preceding the collection of (a) the cold acclimated and (b) the non-acclimated samples. The samples were collected on the morning of the 15th day, indicated by the arrow.



There are basically two ways to extract antifreeze proteins from plants. In the conventional AFPs extraction method, grinding and stirring are adopted. This method performs the complete extraction of the AFPs; however, the analysis of these proteins would be masked by other intracellular proteins, and thus requiring many subsequent purification steps. Meanwhile, by the infiltration-centrifugation method, it is possible to collect the apoplastic fluid from plants with less plasmic contamination, especially Rubisco. Although this method has a lower protein extraction rate, it is more specific to apoplastic proteins (HON et al., 1994; DING et al., 2015). Table 1 shows the concentrations of apoplastic proteins (in the extract and leaf) for the acclimated and the non-acclimated samples with the proposed methodology of extraction.

Apoplastic proteins were not detected in the acclimated and non-acclimated *Eucalyptus* ssp. leaves. For cold acclimated *Drimys angustifolia* and *Senecio icoglossus* leaves the concentration of apoplastic proteins increased 4.9 and 2.4 fold, respectively, compared with non-acclimated samples of the same species. Similar relationships, 3.1 and 2.3 fold, were described for acclimated and non-acclimated samples of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and blue spruce (*Picea pungens* Engelm), respectively (JARZABEK et al., 2009). Antikainen and Griffith (1997) evaluated twelve herbaceous plants for 7 weeks of cold acclimation and also described a considerable increase in the apoplastic protein concentration for most species.

Table 1 - Apoplastic proteins levels in obtained apoplastic extract and fresh leaves of acclimated and non acclimated *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp.

Plant	Apoplastic Extract ( $\mu\text{g}$ proteins / mL extract)		Leaves ( $\mu\text{g}$ proteins / g fresh leaves)	
	Acclimated	Non acclimated	Acclimated	Non acclimated
<i>Drimys angustifolia</i>	95.17 $\pm$ 4.72 <sup>a</sup>	23.19 $\pm$ 5.93 <sup>b</sup>	19.03 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	3.86 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>
<i>Senecio icoglossus</i>	42.89 $\pm$ 4.02 <sup>a</sup>	17.76 $\pm$ 3.87 <sup>b</sup>	5.36 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	2.22 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
<i>Eucalyptus</i> ssp.	nd	nd	nd	nd

The data are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 3). The values on the same line with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ), according to Tukey's test. nd, not detected.

In relation to the protein concentrations, comparisons with other studies are difficult to make due to many factors that may cause variations in the concentrations of proteins, like variation of species and different conditions of acclimation, extraction, purification method, among other factors.

Hon et al. (1994) described concentrations ranging from 320 to 660  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in extracts of the same samples of winter rye leaves (*Secale cereale* L.) depending only on the buffer used for infiltration. The concentrations of AFPs were much higher than those observed in this present study; however, it is important to note that the authors used artificial acclimation and the cultivation time was of 7 or 8 weeks. Plant seedlings usually have higher concentrations of antifreeze protein because plants at this stage are sensitive and more prone to be cold acclimated (DING et al., 2015). In another research involving mature and naturally cold acclimated plants, the concentrations observed were  $4.7 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $4.4 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$  for fresh needles Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and blue spruce (*Picea pungens* Engelm), respectively. For plants collected in the summer (non-acclimated) these values were lower,  $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh needles, respectively (JARZABEK et al., 2009).

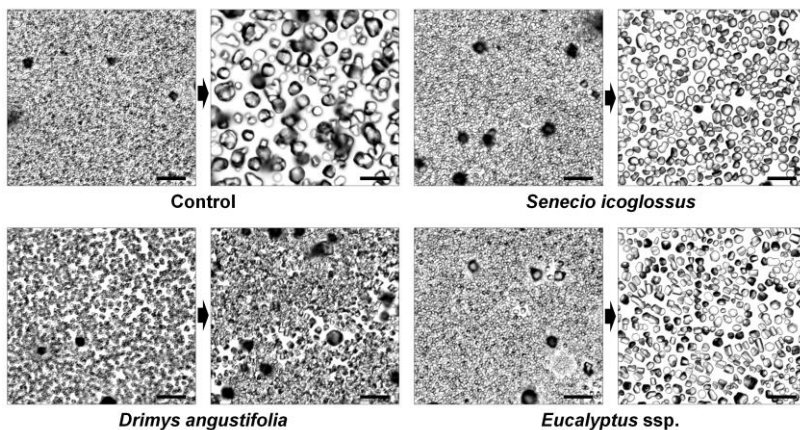
The plant extracts were then evaluated for their antifreeze activity, more specifically their activity on the recrystallization inhibition (RI). The assessment of RI activity involves monitoring the



rate of recrystallization of ice by flash-freezing a solution to obtain small ice crystals, maintaining the sample at temperatures just below 0 °C (-6 to -10 °C), and observing changes in crystal size. As recrystallization may be affected by solutes other than AFPs, recrystallization experiments are generally conducted at high solute concentrations to minimize nonspecific effects (GRIFFITH; YAISH, 2004). The modified sucrose-sandwich-splat assay proposed by Smallwood et al. (1999) allows for unequivocal identification of RI activity in plant extracts using high levels of sucrose as solute.

Figure 2 shows a sucrose-sandwich-splat microscopy for extracts of acclimated *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. before and after the incubation period. It is possible to clearly observe that the ice crystals in the control solution and acclimated *Eucalyptus* ssp. extract have grown significantly. The same happened with cold acclimated *Senecio icoglossus* extract, in which apoplastic proteins were detected in spite of showing no RI activity in the evaluated concentrations. Only the ice crystals of the cold acclimated *Drimys angustifolia* extract the remained small after the incubation period, indicating the presence of inhibitors of ice recrystallization in the analyzed concentrations.

Figure 2 - Sucrose-sandwich-splat assays to evaluate the inhibition of ice recrystallization in apoplastic extract from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. The bar represents 50 µm.



The microscopy of the non-acclimated extracts are not shown; however, growth of ice crystals was observed in all of them, as occurred with the control group and with the acclimated *Senecio icoglossus* and *Eucalyptus* ssp. extracts.

Other authors have also reported RI activity in plant extract in similar or even lower concentrations. RI activity was detectable in cold-acclimated carrot root homogenates with concentrations as low as 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , but for purified protein this activity could still be detected at a concentration of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (SMALLWOOD et al., 1999). The apoplastic extract is an intermediate form between the plant homogenates and purified protein. For *Lolium perenne* AFPs, a high specific activity in the ice recrystallization inhibition was described with a concentration of less than 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (SIDEBOTTOM et al., 2000; PUDNEY et al., 2003).

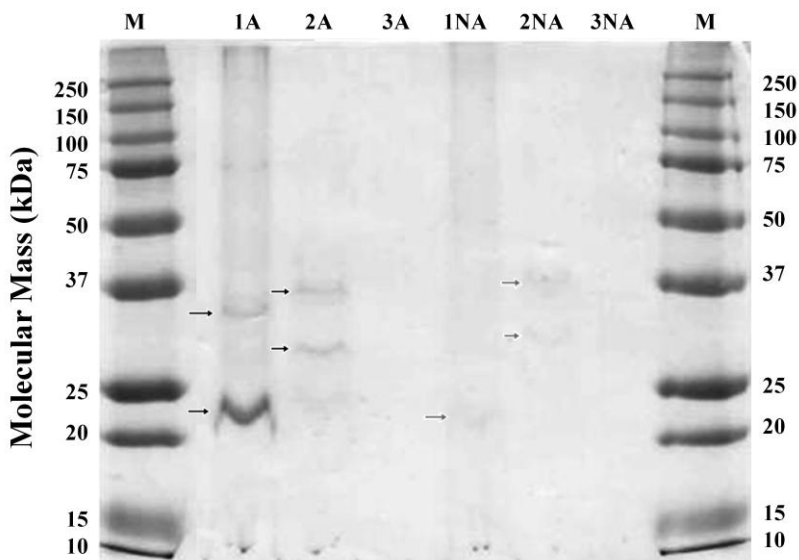
The plant extracts were analyzed in relation to their electrophoretic profile (Figure 3). Despite only the cold acclimated *Drimys angustifolia* extract having been submitted to antifreeze activity, the other extracts were also analyzed for comparison and confirmation.

The *Senecio icoglossus* extract showed two bands, between 25 and 37 kDa markers, both of which are present in the acclimated and non-acclimated samples (2A and 2NA slots); however, with more intensity in the first group. In the concentrations evaluated in this study, the extract of acclimated *Senecio icoglossus* leaves showed no RI activity. The apoplastic extract of acclimated and non-acclimated *Eucalyptus* ssp. (3A and 3NA slots), as expected, showed no bands in the gel.

The SDS-PAGE analysis of the apoplastic extract of cold acclimated *Drimys angustifolia* (1A slot) showed two different bands, a less intense band just below 37 kDa and a more intense band between 20 and 25 kDa. For the non-acclimated sample of this species (1NA slot), only the second band was observed in a lower intensity.

For bark and leaves of *Forsythia suspensa*, also cold-acclimated under natural conditions, for example, the antifreeze activity was observed in a single protein with apparent molecular mass of 20 kDa (SIMPSON et al., 2005). Kontogiorgos et al. (2006) reported that apoplastic extract of the cold-acclimated winter wheat grass contained only heat-stable RI protein with a molecular weight below 40 kDa.

Figure 3 - 12% SDS-PAGE of apoplastic extracts from cold acclimated (A) and non-acclimated (NA) leaves. Lanes 1A, 2A and 3A: extracts from cold acclimated leaves of (1A) *Drimys angustifolia*, (2A) *Senecio icoglossus* and (3A) *Eucalyptus*; lanes 1NA, 2NA and 3NA: extracts from non-acclimated leaves of (1NA) *Drimys angustifolia*, (2NA) *Senecio icoglossus* and (3NA) *Eucalyptus*; lanes M: 250-10 kDa Precision Plus Protein Standards. Protein bands are indicated by arrows.



Needles of *Picea abies* and *Picea pungens* showed 5 - 9 peptides ranging from 7 to 80 kDa. A 16 kDa polypeptide played an important role in the cryoprotective activity (JARZABEK et al., 2009). A fraction containing protein of 27 kDa with antifreeze activity was analyzed and it showed a significant difference in the concentration in the plant material collected in the winter compared with the samples collected in the summer.

The extract of acclimated barley seeds (*Hordeum vulgare* L.) obtained by the infiltration-centrifugation method was abundant in proteins between 20.1 and 31 kDa and proteins around 14.4 kDa (DING et al., 2015). Apoplastic extract from acclimated winter rye (*Secale cereale* L.) leaves contains five polypeptides, with molecular weights of 19, 26, 32, 34 and 36 kDa and with a high degree of antifreeze activity (HON et al., 1994). The main AFP extracted from carrot (*Daucus*

*carota*) showed values close to 36 kDa (SMALLWOOD et al., 1999; ZHANG et al., 2008). Huang and Duman (2002) isolated three AFPs from *Solanum dulcamara* leaves with molecular weights of 29, 47 and 67 kDa. The AFP isolated from *Lolium perenne* showed an apparent molecular weight of 29 kDa (PUDNEY et al., 2003).

Therefore, the proteins detected in the apoplastic extract of *Drimys angustifolia* follow the general pattern of plant AFPs, which are generally small peptides that have low molecular weight. This is the first time that the presence of antifreeze proteins with recrystallization inhibition activity is being described in samples of naturally acclimated leaves of this species.

#### **4 Conclusion**

Several studies have demonstrated that antifreeze proteins may represent an important alternative for controlling ice crystal growth, which is interesting to several fields of knowledge. For the Food Technology field, many studies have demonstrated the application of these proteins in various foods, although the cost is still a major obstacle to their commercial use.

This study evaluated apoplastic extracts from leaves of three plants in relation to their recrystallization inhibition activity and one of them, the *Drimys angustifolia* extract, showed this activity at a relative low concentration. This species is widely found in southern Brazil, principally in areas of higher altitude and lower daily temperature. It is important to note that this activity was observed only in acclimated samples, showing the importance of the cold period for a higher expression of these proteins. The acclimation process was carried out naturally and, therefore, the cultivation of this plant under controlled conditions is not a precondition for the expression of AFPs.

Clearly, there is a need for further researches, involving the characterization of these proteins, the details of their action mechanism and their application in various food matrices, such as pasta, fruit, and ice-cream. In addition to the application AFPs itself, the appreciation of native species may represent an important future alternative for local agriculture.

Once available in abundance, in a safe manner and at low cost, these proteins may represent a new alternative to minimize impacts on texture after thawing and to extend the shelf life of frozen food products.

## Acknowledgment

We are thankful to the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) for Contract 443244/2014-6.

## References

- ANTIKAJINEN, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 99, n. 3, p. 423-432, 1997. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb00556.x>
- ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 7, p. 1187-1196, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00420-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00420-5)
- BILDANOVA, L. L.; SALINA, E. A.; SHUMNY, V. K. Main properties and evolutionary features of antifreeze proteins. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, Moscow, v. 3, n. 1, p. 66-82, 2013. <http://dx.doi.org/10.1134/S207905971301005X>
- BOONSUPTHIP, W.; LEE, T. Application of antifreeze protein for food preservation: effect of type III antifreeze protein for preservation of gel forming of frozen and chilled actomyosin. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 1804-1809, 2003. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12333.x>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- CAI, Y.; LIU, S.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J.; DABING, Z. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. **Food and Bioproducts Processing**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 98-102, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.002>
- CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: effect of an antifreeze protein type I. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 339-345, 2009.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.05.013>

DING, X.; ZHANG, H.; LI, W.; QIAN, H.; QI, X.; XIAO, J. Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 32-40, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.025>

DING, X.; ZHANG, H.; LIU, W.; WANG, L.; QIAN, H.; QI, X. Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white salted noodles. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 3, p. 842-852, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1101-0>

DUMAN, J. G.; WISNIEWSKI, M. J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 60-69, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1101-0>

FEENEY, R. E.; YEH, Y. Antifreeze proteins: current status and possible food uses. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 102-106, 1998.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00025-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00025-9)

GOMEZ GALINDO, F.; ELIAS, L.; GEKAS, V.; HERPPICH, W. B.; SMALLWOOD, M.; SOMMARIN, M.; WORRAL, D.; SJOHOLM, I. On the induction of cold acclimation in carrots (*Daucus carota* L.) and its influence on storage performance. **Food Research International**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 29-36, 2005.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.004>

GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D. S. C.; HON, W. C.; MOFFATT, B. A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 100, n. 2, p. 593-596, 1992.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.100.2.593>

GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 399-405, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2004.06.007>

HASSAS-ROUDSARI, M.; GOFF, D. Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application. **Food Research International**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 425-436, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.018>

HON, W.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D. S. C. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 104, n. 3, p. 971-980, 1994. <http://www.jstor.org/stable/4275713>

HUANG, T.; DUMAN, J. G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet night-shade, *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 339-350, 2002. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1014062714786>

JARZABEK, M.; PUKACKI, P. M.; NUC, K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 268-274, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.01.007>

KONTOGIORGOS, V.; REGAND, A.; YADA, R. Y.; GOFF, H. D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 31, n. 2, p. 139-160, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00112.x>

LI, L.; KIM, Y.; HUANG, W.; JIA, C.; XU, B. Effects of ice structuring proteins on freeze-thaw stability of corn and wheat starch gels. **Cereal Chemistry**, Amsterdam, v. 87, n. 5, p. 497-503, 2010. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM-01-10-0013>

LIM, Z. L.; LOW, N. H.; MOFFATT, B. A.; GRAY, G. R. Gelation in protein extracts from cold acclimated and non-acclimated winter rye (*Secale cereale* L. cv Musketeer). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 156-166, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.01.001>

MIDDLETON, A. J.; MARSHALL, C. B.; FAUCHER, F.; BARDOLEV, M.; BRASLAVSKY, I.; CAMPBELL, R. L.; WALKER, V. K.; DAVIES, P. L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a

beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 416, n. 5, p. 713-724, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.032>

PAYNE, S. R.; SANDFORD, D.; HARRIS, A.; YOUNG, O. A. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. **Meat Science**, London, v. 37, n. 3, p. 429-438, 1994. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90058-2](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(94)90058-2)

PROVESI, J. G.; AMANTE, E. R. Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 2-13, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.7714>

PUDNEY, P. D. A.; BUCKLEY, S. L.; SIDEBOTTOM, C. M.; TWIGG, S. N.; SEVILLA, M. P.; HOLT, C. B.; ROPER, D.; TELFORD, J. H.; MCARTHUR, A. J.; LILLFORD, P. J. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 410, n. 2, p. 238-245, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00697-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00697-5)

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 164, n. 10, p. 1239-1260, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.013>

SANTOS, T. G.; DOGNINI, J.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; VERDI, M.; GASPER, A. L.; DALMARCO, E. M. Chemical characterization of essential oils from *Drimys angustifolia* Miers (*Winteraceae*) and antibacterial activity of their major compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 164-170, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013000100020>.

SIDEBOTTOM, C.; BUCKLEY, S.; PUDNEY, P.; TWIGG, S.; JARMAN, C.; HOLT, C.; TELFORD, J.; McARTHUR, A.; WORRALL, D.; HUBBARD, R.; LILLFORD, P. Heat-stable antifreeze protein from grass. **Nature**, New York, v. 406, p. 256, 2000. <http://dx.doi.org/10.1038/35018639>



SIMPSON, D. J.; SMALLWOOD, M.; TWIGG, S.; DOUCET, C. J.; ROSS, J.; BOWLES, D. J. Purification and characterization of an antifreeze protein from *Forsythia suspensa* (L.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 230-234, 2005.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.06.005>

SMALLWOOD, M.; WORRALL, D.; BYASS, L.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; DOUCET, C. J.; HOLT, C.; TELFORD, J.; LILLFORD, P.; BOWLES, D. J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). **Biochemical Journal**, London, v. 340, n. 2, p. 385–391, 1999.

<http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3400385>

TELES, A. M. Contribuição ao estudo taxonômico das tribos Asteraceae no Brasil e Senecioneae (Asteraceae) no estado de Minas Gerais. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 5, n. 1, p. 71-72, 2008.

<http://dx.doi.org/10.5216/rbn.v5i1.5630>

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 228-235, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.002>

URRUTIA, M. E.; DUMAN, J. G.; KNIGHT, C. A. Plant thermal hysteresis proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1121, n. 1-2, p. 199-206, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90355-H](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(92)90355-H)

VELICKOVA, E.; TYLEWICZ, U.; DALLA ROSA, M.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; GÓMEZ GALINDO, F. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 146-150, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.013>

WANG, L. H.; WUSTEMAN, M. C.; SMALLWOOD, M.; PEGG, D. E. The stability during low-temperature storage of an antifreeze protein isolated from the roots of cold-acclimated roots. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 307-310, 2002.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00036-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00036-6)

WHATEN, B.; JIA, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In: SUN, D. **Emerging Technologies for Food Processing**. London: Elsevier Academic Press, 2005. cap. 25, p. 653-673.

YEH, C. M.; KAO, B. Y.; PENG, H. J. Production of a recombinant type 1 antifreeze protein analogue by *Lactococcus lactis* and its application on frozen meat and frozen dough. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 14, p. 6216-6223, 2009. <http://dx.doi.org/10.1021/jf900924f>

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. **Food Research International**, Amsterdam, v. 40, n. 6, p. 763-769, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.006>

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. **LWT**, Amsterdam, v. 41, n. 6, p. 1029-1036, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.010>

ZHANG, M.; DUAN, Z.; ZHANG, J.; PENG, J. Effects of freezing conditions on quality of areca fruits. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 393-397, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00146-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00146-8)

## 4 CAPÍTULO 3

### **EXTRACTION OF ANTIFREEZE PROTEINS FROM COLD ACCLIMATED LEAVES OF *DRIMYS ANGUSTIFOLIA* AND THEIR APPLICATION TO STAR FRUIT (*AVERRHOA CARAMBOLA*) FREEZING**

#### **Artigo submetido:**

PROVESI, J. G.; VALENTIM NETO, P. A.; ARISI, A. C. M.; AMANTE, E. R. Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing. **Artigo submetido para publicação no periódico Journal of Food Science and Technology**, Springer International Publishing<sup>©</sup>



## **Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing**

### **Abstract**

Antifreeze proteins (AFPs) have the ability to modify ice crystal growth and thus there is great interest in identifying new sources of these compounds, especially those involving natural cold acclimation processes. In this study, apoplastic extracts were obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* with three different combinations of buffer solutions. All extracts obtained inhibited recrystallization and they presented similar SDS-PAGE profiles, with bands close to 20 and 37 kDa. The extract obtained using Tris-HCl/DTT buffer (pH 8) was used in the pre-treatment of frozen star fruit (*Averrhoa carambola*) by immersion or vacuum infiltration. The treatments did not affect the titratable acidity, pH, soluble solids, ascorbic acid content and colour. However, only star fruits that were vacuum infiltrated with AFPs retained their drip loss constant after 15 days. Moreover, with this treatment the star fruit firmness was maintained on thawing after 60 days of storage. The vacuum infiltration of *Drimys angustifolia* AFPs into the star fruit allowed an initial cryoprotection, indicating that the application of AFPs can increase the quality of frozen star fruit.

**Keywords:** antifreeze proteins; *Drimys angustifolia*; Recrystallization inhibition; Freezing; Star fruits.



## 1 Introduction

Antifreeze proteins (AFPs) have the ability to influence the formation or growth of ice crystals. Discovered in the 1970s in Antarctic Notothenioid fish species, different AFPs have been described for many freezing-tolerant organisms, including fishes, insects, bacteria, fungi and plants (Cai et al. 2011).

It has been proposed that the mechanism of action of AFPs involves adsorption onto the surface of ice crystals via Van der Waals interactions and hydrogen bonds (Davies 2014). Extensive studies have been conducted in order to better understand this mechanism, but many details still need to be clarified (Pudney et al. 2003; Kar and Bhunia 2015).

However, there is a consensus that three mechanisms are related to AFPs. The first involves interference with the nucleation process, that is, the initial stage of ice formation, by binding to nucleating substances. The second is related to thermal hysteresis activity, especially in the case of insect AFPs. These proteins cause a reduction in the freezing temperature in a non-colligative manner, without changing the melting point of the solution. A third group of AFPs has the ability to inhibit the process of recrystallization of the ice crystals (Hassas-Roudsari and Goff 2012; Davies 2014). The recrystallization process occurs after the formation of ice crystals, when the temperature changes within a range just above the freezing point. Ice crystals tend to increase in size due to the migration of water molecules from the surface of small crystals. This process can result in physical damage to cells (Duman and Wisniewski 2014). Although AFPs from plants have lower thermal hysteresis activity, they have a higher recrystallization inhibition activity than the AFPs of fish and insects (Cai et al. 2011).

Plants require an acclimation period to cold temperature for AFPs expression. This inducible process can take days or weeks, it requires low temperature (below 10 °C) and moderate to high light (Duman and Wisniewski 2014). Since extracellular fluid has a higher freezing point than intracellular fluid, when temperatures drop below 0 °C ice formation starts in the extracellular space, apoplast. Most AFPs are secreted in this space, which can be confirmed by the analysis of guttation fluid (Griffith et al. 2005; Jarzabek et al. 2009).

The first AFP described in plants was found in winter rye leaves (*Secale cereale*) by Griffith et al. (1992). Since then, different AFPs have been identified for many different plant species, including wheat (*Triticum aestivum* L.) (Antikainen and Griffith 1997), oat (*Avena sativa*

L.) (Zhang et al. 2016), carrot (*Daucus carota*) (Smalwood et al. 1999; Ding et al. 2014) and ryegrass (*Lolium perenne*) (Pudney et al. 2003). Recently, our research group described the presence of AFPs in extracts of cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*. This species is widely distributed in several countries, and in Brazil it is popularly known as “casca d’anta” (Provesi et al. 2016).

Because they exhibit recrystallization inhibition activity at very low concentrations, plant AFPs offer potential as an alternative to minimize the impact of freezing on the texture and other characteristics of frozen foods. Certainly fast-freezing technologies represent a major advance in this regard, since they lead to the formation of smaller ice crystals, which cause less damage to the cellular structure (Xin et al. 2015). Nevertheless, the temperature fluctuations that occur during the distribution and storage of frozen food can cause product deterioration and reduce its quality, due to the phenomenon of recrystallization (Cruz et al. 2009). Alternatives such as pre-treatments involving sucrose, sorbitol and calcium salts generally produce satisfactory results, maintaining the texture, firmness and colour (Siramard and Charoenrein 2014), but this requires higher concentrations of these substances, which can alter the sensory properties of the food during pre-treatment.

In this context, studies have demonstrated the successful application of AFPs in the preservation of the sensory and nutritional quality of certain foods, notably ice cream and dairy products (Regand and Goff 2006; Zhang et al. 2016), meat (Yeh et al. 2009) and frozen dough (Ding et al. 2014).

Freezing is also potentially an important alternative for the conservation of fruits and vegetables. However, freezing generally causes major changes in these food products, such as tissue softening and excessive fluid loss. This is the case, for instance, with the star fruit (*Averrhoa carambola*), a popular fruit cultivated in tropical and subtropical regions, which has remarkable nutritional value due to its antioxidants such as ascorbic acid, carotenoids and phenolic compounds (Gol et al. 2015). This fruit shows extensive postharvest losses, mainly due to the high degree of degradability and high moisture content. Freezing associated with a technique that reduces its adverse effect, such as the application of antifreeze proteins, could offer an alternative method of preserving the original characteristics. There are few studies involving the application of AFPs to fruits and vegetables (Cruz et al. 2009; Velickova et al. 2013), and none at all on star fruit in particular.

An important factor in the application of AFPs to food products is the selection of the technique used for protein addition to food matrix.



Depending on the nature of the product, the proteins can be added using different methods, such as mixing, injection, immersion, coating, spraying or vacuum infiltration, (Hassas-Roudsari and Goff 2012). Vacuum infiltration is widely applied to introduce other additives directly into the food matrix as a pre-treatment prior to freezing, drying or thermal treatment. Due to the very porous structure of the matrix, most fruits and vegetables are suitable for the infiltration of different solutes (Cruz et al. 2009; Dymek et al. 2015).

The objective of this study was to extract AFPs from apoplast of cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, evaluating three different combinations of buffer solutions, and subsequently to evaluate the application and the effect of these antifreeze proteins on the quality of frozen star fruit.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Plant Material**

Leaves of the *Drimys angustifolia* Miers were collected from plants grown under natural conditions in the municipal district of Urupema (27°57'10" South, 49°52'23" West, 1,350 m altitude), in Santa Catarina state, Brazil. The leaves of 10 different trees were collected at different points of the plant to form a single sample. The collection was performed after a cold acclimation period of the plant, adopting the temperature range proposed by Gómez Galindo et al. (2005) as a parameter. The collection was carried out after a period of seven consecutive days at an average temperature below 6 °C and minimum temperature near or below 0 °C, in June 2016. The climate data for the period that preceded the collections were provided by EPAGRI (Santa Catarina State Agency for Agricultural Research and Rural Extension). The star fruits used in this study were purchased from local supermarkets. All of the reagents used in the experiments were of analytical grade.

### **2.2 Preparation of the apoplastic extracts**

The preparation of the apoplastic extracts was performed using a modification of the method proposed by Hon et al. (1994). The leaves were cut into squares with 3 cm sides and then thoroughly rinsed with distilled water to wash off cellular proteins from the cut ends. To detect cellular protein residues, the water was analysed by spectrophotometry

(Hitachi, U-1800, Japan) at 280 nm after each rinse. In general, three or four cycles of washing were sufficient to reduce substantially the residues.

The leaves were then vacuum infiltrated with a buffer solution for 40 min, using an aspirator vacuum pump. Three different combinations of extraction buffers were evaluated: 20 mmol L<sup>-1</sup> of L-ascorbic acid and 20 mmol L<sup>-1</sup> of calcium chloride (pH 3); 50 mmol L<sup>-1</sup> of Tris-HCl and 75 mmol L<sup>-1</sup> of DTT (dithiothreitol) (pH 6,8); and 50 mmol L<sup>-1</sup> of Tris-HCl and 75 mmol L<sup>-1</sup> DTT (pH 8). During the process, the vacuum was ceased every 10 min for a few seconds to facilitate the infiltration of the buffer. At the end of the procedure, the leaves were carefully blotted dry between two layers of paper towels. The leaves were placed in 50 mL centrifuge bottles and the centrifugation was performed at ~3800 x g for 30 min. The apoplastic extract was then collected from the bottom of the tubes.

The concentrations of proteins in the different extracts were determined using the classic method proposed by Bradford (1976), on a UV-Vis spectrophotometer (Hitachi, U-1800, Japan) (695 nm) with BSA (bovine serum albumin) as the standard.

### **2.3 Recrystallization inhibition activity**

The recrystallization inhibition activity was determined using the sucrose sandwich splat assay proposed by Smallwood et al. (1999). Around 5 µL of the solution under investigation in 30 % (w/w) sucrose was compressed between two microscope slides. The 'sandwich' was flash frozen at - 40 °C in an ultra-freezer (Klimaquip, UK-05, Brazil). The temperature was increased to -10 °C and the samples were incubated for 60 min. After incubation, the growth of ice crystal was observed under an optical microscope (Kozo, XJS900, China), with a 20x objective, coupled to a digital camera and image processing software was used (ToupTek, ToupView, China).

A visual assessment was carried out to detect whether any recrystallization took place, as proposed by Wang et al. (2002), by comparing the size of the ice crystals of the test sample with those of a control sample (without plant extract).

### **2.4 SDS-Page**

The apoplastic protein extracts were analysed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) carried out in 4

% (w/v) polyacrylamide-stacking gel and a 12 % (w/v) polyacrylamide-resolving gel, using a Bio-Rad Mini-PROTEAN system (Mini-Protean II; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), and 250 kD - 10 kD Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) as molecular mass markers. The extracts (200  $\mu\text{L}$ ) were centrifuged for 20 min at 20000  $\times g$  at 4  $^{\circ}\text{C}$  and the supernatant was discarded. The resulting pellets were suspended in 300  $\mu\text{L}$  of rehydration solution (7 mol  $\text{L}^{-1}$  urea, 2 mol  $\text{L}^{-1}$  thiourea, 0.3 g  $\text{L}^{-1}$  CHAPS, 0.15 g  $\text{L}^{-1}$  DTT) and then heated (96 $^{\circ}\text{C}$ ) for 5 min. In the next step, 10  $\mu\text{L}$  of the solution, cooled to room temperature (20 $^{\circ}\text{C}$ ), was loaded into the gel at 15 mA/gel free voltage for 15 min, followed by 30 mA/gel free voltage for 1 h. The 5x SDS-running buffer (distilled water, 0.12 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris pH 8.3, 7.2 % glycine, 0.5% SDS) was diluted (1x) with distilled water. The gels were stained for 1 h with 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in methanol/acetic acid/water (25:10:65, v/v).

## 2.5 Application of the extract and freezing of star fruit

Star fruits that were visually similar in terms of size, firmness and maturation were selected, washed and cut into slices approximately 2 cm thick. The fruits were separated into three groups for different treatments: without additional treatment, i.e., frozen directly (untreated sample); immersion in AFPs solution (immersed samples); and vacuum infiltration with a solution of AFPs (vacuum infiltrated sample).

For treatments with AFPs of *Drymis angustifolia* by immersion and vacuum infiltration, solutions with protein concentration of 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  were prepared. This concentration is ten times higher than that used by Cruz et al. (2009) (0.01 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) for the vacuum infiltration of type I AFPs in watercress samples. The extract obtained with the buffer comprised of 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  of Tris-HCl and 75 mmol  $\text{L}^{-1}$  DTT (pH 8) was used in the preparation of the AFP solution, using distilled water for dilution.

The vacuum impregnation system was composed of a vacuum pump (Primatec, 132 model, Brazil), a vacuum glass desiccator and a ceramic support to maintain the fruits submersed (Cruz et al., 2009). Preliminary tests were performed to find the conditions that provided the maximum mass gain of the fruits. The vacuum infiltration was carried out at 525 a 550 mmHg (around 70 to 73 kPa), for 15 min. A 5 min intervals the vacuum was briefly interrupted in order to increase the infiltration of the solution into the fruit matrix. For the immersion treatment the application time was also 15 min. The moisture content of

the samples before freezing was determined for each of the groups by gravimetry (AOAC, 2005).

After treatment, the fruits underwent rapid freezing in a deep freezer (Klimaquip, UK-05, Brazil). They were then packed in polyethylene bags and stored at  $-20 \pm 2$  °C, simulating the storage conditions found in the distribution and commercialization of frozen products. On days 0, 7, 15, 30, 60 and 90, frozen samples were taken from each group for quality evaluation (except for colour analysis, which was not performed on day 7). For comparison, at day 0, the analyses were also carried out on raw fruits before freezing (except the colour analysis).

## **2.6 Quality analysis**

### **2.6.1 Physicochemical analysis**

The pH value was determined using a pH meter (MS Tecnonon, mPA 210, Brazil). To determine the total titrable acidity, the sample was macerated in distilled water (1:50 v/v), filtered and the mixture titrated with  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH in the presence of phenolphthalein. The results were expressed as % NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Total soluble solids (TSS) were measured using a refractometer and expressed as °Brix (g sucrose per 100 g on a fresh basis) (AOAC, 2005). The ascorbic acid (AA) content was measured applying the classical titration method using DCPIP (2,6-dichlorophenol-indophenol dye) proposed by Ranganna (1977).

### **2.6.2 Colour analysis**

Colour measurements were performed with a CR-400 colorimeter (Konica Minolta, Osaka, Japan) using D65 illuminant and CIEL\*a\*b\* colour space, where L\* represents lightness and darkness, a\* indicates chromaticity on a green (-a\*) to red (+a\*) axis and b\* chromaticity on a blue (-b\*) to yellow (+b\*) axis. The colorimeter was calibrated with a standard white board ( $Y = 93.5$ ;  $x = 0.3164$ ;  $y = 0.3325$ ) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). Each analysis was performed in triplicate, with three measurements in each sample unit.

### **2.6.3 Drip loss**

The drip loss was determined by recording the weight change before and after thawing, as proposed by Velickova et al. (2013). After

removal from the freezer, the fruits were weighed on an analytical balance (Shimadzu, ATX 224, Japan), kept at room temperature for two hours, allowed to drip at 4 °C overnight using a funnel covered with plastic film to avoid evaporation loss, and then weighed again. The drip loss can be calculated from the relation  $m_{\text{loss}} = [(m_1 - m_2)/m_1] * 100$ , where  $m_1$  is the mass of frozen fruits,  $m_2$  is the mass of the fruit after thawing and  $m_{\text{loss}}$  (%) is the percentage lost during thawing.

#### **2.6.4 Firmness**

To determine the firmness, samples were thawed at room temperature for approximately 1 h and then the firmness measurements were performed with a penetrometer (Instrutherm, PRT-300, Brazil) fitted with a 8 mm diameter cylindrical probe. The measurements were conducted with five replications for each treatment. The firmness was reported as peak force and expressed in newtons (N).

#### **2.7 Statistical Analysis**

Except where otherwise cited, all the analyses were performed in triplicate. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. They were submitted to analysis of variance (ANOVA) and mean separations using Tukey's multiple-range test ( $P \leq 0.05$ ) for comparison between the treatment groups – raw fruit, untreated, immersed and vacuum infiltrated samples. In all of the statistical analysis, ANOVA assumptions, such as independence and normal distribution of the residues and homogeneity of variances, were observed.

### **3 Results and discussion**

Apoplastic proteins were extracted from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three different extraction buffers (Table 1).

Concerning protein content of the extracts, extraction buffer containing Tris-HCl and DTT (pH 8) showed a substantially higher protein yield compared to other solutions. In another study, although the difference was proportionately less, the highest concentration of apoplastic proteins were obtained using Tris-HCl buffer among the tested solutions, which included solutions of ascorbic acid alone or in combination with EDTA, calcium chloride and magnesium sulphate (Hon et al. 1994). The authors reported that extracts containing Tris-HCl buffer presented a higher amount of Rubisco, which in this case can be

considered a contaminant of the apoplastic extract. This was observed due to the presence of a band in the region of 54 kDa, which would represent a large subunit of Rubisco. In this study, bands in this region were observed for all extracts, regardless of the extraction solution used. Even though the infiltration-centrifugation method is more specific for apoplastic proteins (Ding et al. 2015), the possibility of a small degree of contamination of the intracellular material should not be disregarded.

Table 1 - Protein content of apoplastic extracts obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three extraction buffers.

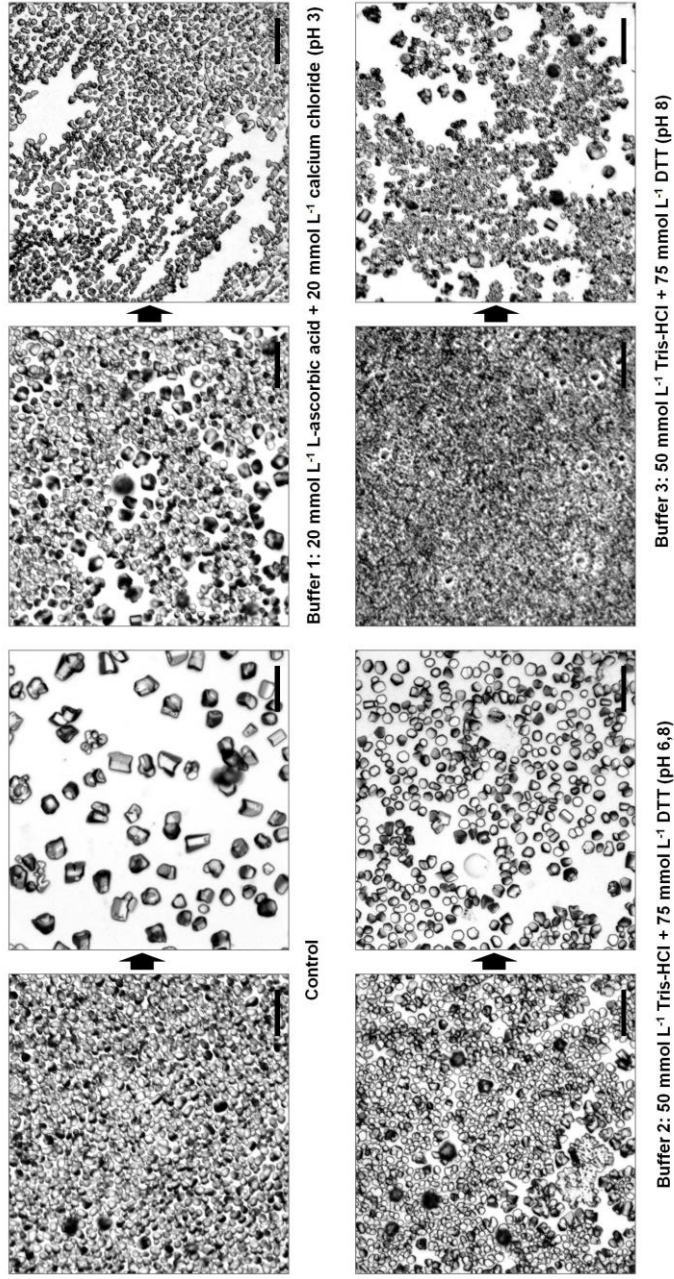
<b>Extraction buffer</b>	<b>Apoplastic protein content</b> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
20 mmol L <sup>-1</sup> L-ascorbic acid + 20 mmol L <sup>-1</sup> calcium chloride (pH 3)	105.38 $\pm$ 2.74 <sup>b</sup>
50 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl + 75 mmol L <sup>-1</sup> DTT (pH 6.8)	90.76 $\pm$ 4.57 <sup>c</sup>
50 mmol L <sup>-1</sup> Tris-HCl + 75 mmol L <sup>-1</sup> DTT (pH 8)	194.52 $\pm$ 6.28 <sup>a</sup>

Data are presented as means  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 3). Values in the same column with different superscript letters are significantly different (P < 0.05), according to the Tukey test.

In a previous study on apoplastic proteins obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, only the combination of ascorbic acid and calcium chloride (pH 3) was used as the extraction solution (Provesi et al. 2016). The concentrations obtained with this solution on both studies were very similar. It is important to note that the variations in the concentrations of these proteins are greater than expected. In addition to being plant material, which in itself is a source of variation, this can be attributed to the fact that the acclimatization to the cold is a natural process, that is, each year the conditions of temperature, humidity, luminosity, among others, are different.

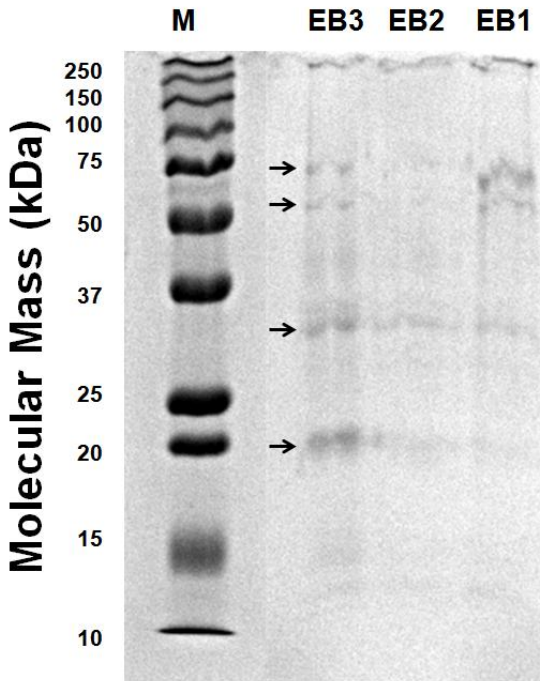
The three extracts showed recrystallization inhibition activity at the concentrations evaluated, which can be observed by the maintenance of small crystals after the incubation period (Figure 1).

Figure 1 - Inhibition of ice recrystallization by apoplastic extracts obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three different extraction buffers. The bar represents 50  $\mu\text{m}$ .



Other authors have reported recrystallization inhibition activity for higher or lower concentrations of antifreeze proteins in extracts of different plant species (Smallwood et al. 1999; Pudney et al. 2003). Also confirming previous results, in the SDS-PAGE the extracts of the cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* showed a less intense band just below 37 kDa and a more intense band near 20 kDa (Figure 2). These bands were absent or present with very low intensity in the extracts of non-acclimated leaves of this species, which showed no recrystallization inhibition activity (Provesi et al. 2016).

Figure 2 - SDS-PAGE profile of apoplasmic extracts obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* using three extraction buffers: 20 mmol L<sup>-1</sup> of L-ascorbic acid and 20 mmol L<sup>-1</sup> of calcium chloride, pH 3 (lane EB1); 50 mmol L<sup>-1</sup> of Tris-HCl and 75 mmol L<sup>-1</sup> of DTT, pH 6.8 (lane EB2); 50 mmol L<sup>-1</sup> of Tris-HCl and 75 mmol L<sup>-1</sup> of DTT, pH 8 (lane EB3). Lane M - 250-10 kDa Precision Plus Protein Standards. Protein bands are indicated by arrows.





The AFPs observed in the cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* follow the trend of AFPs from plants, which generally have a molecular mass in the range of 10-60 kDa (Hon et al. 1994; Smallwood et al. 1999; Huang and Duman 2002; Ding et al. 2015).

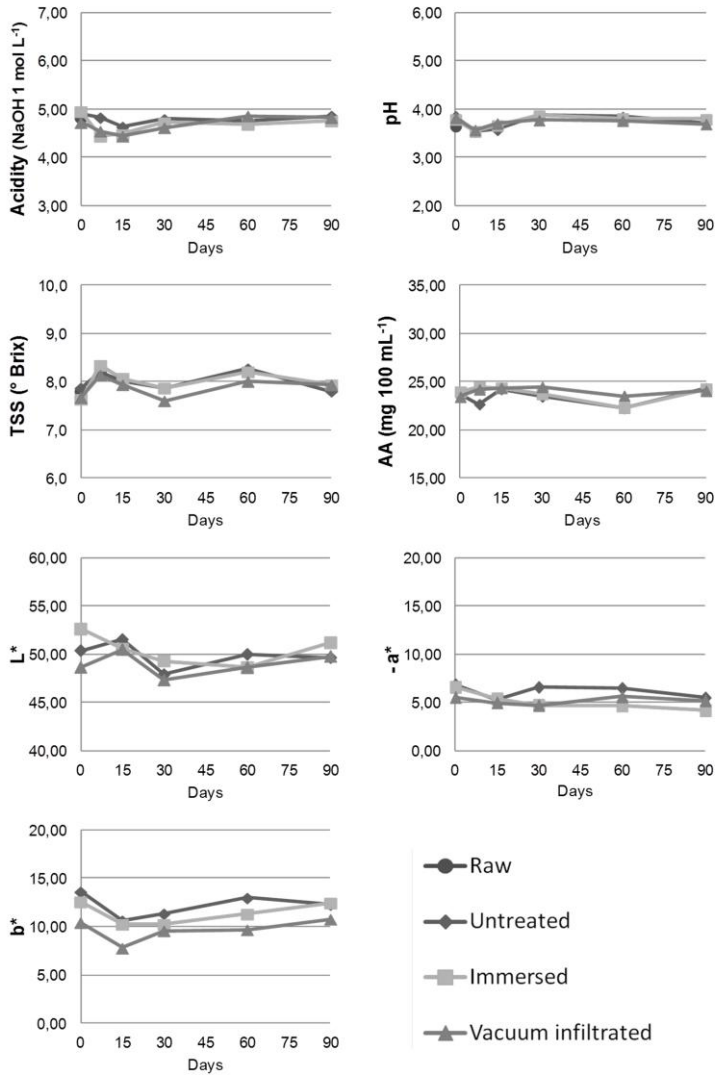
The extract obtained with Tris-HCl/DTT buffer (pH 8) was used in the preparation of immersion and vacuum infiltration solutions of *Drimys angustifolia* AFPs for the pre-treatment applied prior to star fruit freezing. It is important to note that dithiothreitol (DTT) is a potent reducing agent with high toxicity. Therefore its use in the obtaining of the apoplasmic extract and application in the freezing of carambolas is a proof of concept, since it can not be applied in food.

The samples vacuum infiltrated with the AFP solution had a moisture content of  $92.94 \pm 0.66$  %, that is, slightly higher than those observed for untreated and immersed samples of  $90.19 \pm 0.73$  % and  $90.86 \pm 0.94$  %, respectively. This slight increase in the moisture content has been previously observed for vacuum infiltration treatment applied in different studies for the impregnation of AFPs and other solutes into a food matrix (Cruz et al. 2009; Velickova et al. 2013; Dymek et al. 2015).

Some of the quality parameters of frozen fruits obtained after different treatments were monitored during their subsequent storage. Figure 3 shows the titratable acidity, pH, total soluble solids (SST), ascorbic acid (AA) content and colour ( $L^*$ ,  $-a^*$  and  $b^*$ ) values for untreated star fruit as well as samples pre-treated by immersion or vacuum infiltration. Except for the colour data, the values determined for the raw fruit (before freezing) are also presented. For a better visualization of the data, the standard deviation bars were not inserted, but these were considered in the statistical analysis.

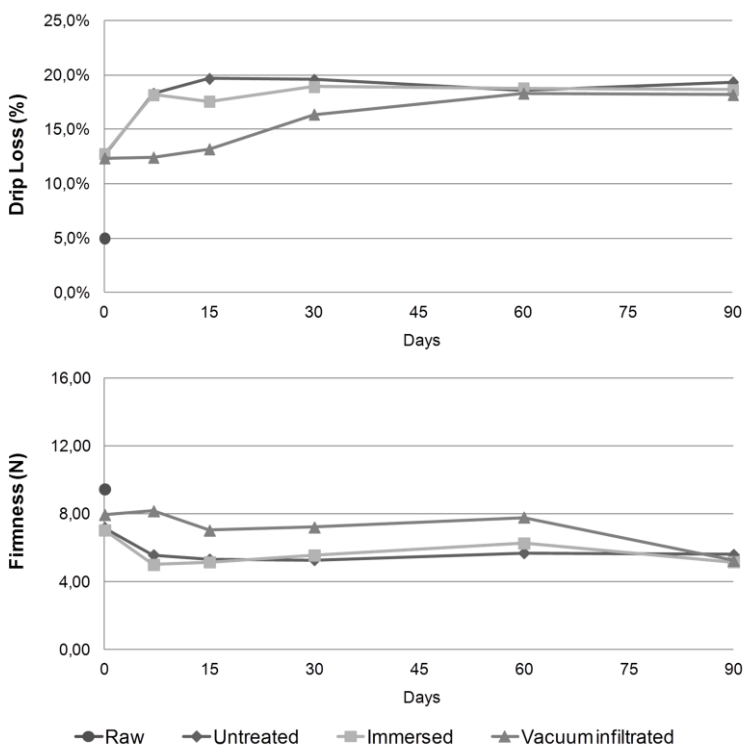
No significant differences between the raw, untreated, immersed and vacuum infiltrated star fruit samples were observed in terms of any of the parameters monitored ( $P \leq 0.05$ ). Although variations can be expected in relation to fruit cultivars and cultivation conditions, the values obtained for titratable acidity, pH, TSS and AA are similar to those reported for other studies on star fruit (Gol et al. 2015; Mustafa et al. 2016). For all of the treatments applied, the parameters analysed did not show significant variation on storing the fruits for 90 days  $-20$  °C.

Figure 3 - Titratable acidity, pH, total soluble solids (SST), ascorbic acid (AA) and colour (L\*, -a\* e b\*) values for untreated star fruits and samples immersed and vacuum infiltrated with *Drimys angustifolia* AFPs and then stored under freezing for 90 days.



The effect of the treatments on the drip loss and firmness values was evident (Figure 4). All frozen samples showed significantly higher values for drip loss than the raw star fruit, demonstrating the effect of the freezing process on the fruit tissue. Even the small crystals formed by rapid freezing can cause some damage to the cellular structure and, consequently, increase the loss of liquid during thawing. The initial firmness of untreated, immersed and vacuum infiltrated star fruit was not statistically different from that determined for raw star fruit ( $P \leq 0.05$ ).

Figure 4 - Drip loss and firmness values for untreated star fruits and samples immersed and vacuum infiltrated with *Drimys angustifolia* AFPs and then stored under freezing for 90 days.



Prior to freezing (day 0), the untreated, immersed and vacuum infiltrated star fruits did not differ in relation to drip loss and firmness.

In fact, the inhibition of ice crystal nucleation by plant AFPs does not appear to be reported in the literature. In addition, low thermal hysteresis activity has been reported for these proteins, especially when compared to fish and insect AFPs, and therefore, they tend to interfere less in the ice crystal formation. However, in general, plant AFPs have high rates of inhibition of the recrystallization process (Cai et al. 2011). As explained above, during storage at low temperatures, recrystallization may lead to an increase in the size of ice crystals, increasing the damage to the cellular structure (Duman and Wisniewski 2014).

After 7 and 15 days of storage, the drip loss of star fruits vacuum infiltrated with the AFP solution remained constant, while the values for untreated or immersed samples increased significantly. However, after 30 days, the drip loss of the vacuum infiltrated star fruits did not differ from that of samples subjected to the other treatments ( $P \leq 0.05$ ), as also verified after 60 and 90 days.

Similar behaviour was observed for firmness, that is, the star fruit sample vacuum infiltrated with the AFPs solution showed no significant difference in relation to raw star fruit for up to 60 days of storage. In contrast, for the untreated and immersed star fruits the firmness values after 7 days were lower ( $P \leq 0.05$ ).

No studies on the quality of frozen star fruit were found for comparison purposes. Gol et al. (2015) evaluated the effect of edible coatings on the postharvest quality aspects of star fruit, but the fruits were not subjected to freezing. The chitosan, gum arabic and alginate coatings were effective for preserving the star fruit quality for 12 days while the raw star fruits quality deteriorated after 7 days of storage. In that study, the firmness was not evaluated. In experiments carried out by study Velickova et al. (2013), AFPs were applied by vacuum infiltration to fruits and vegetables subjected to freezing and the authors found that the use of cryoprotectant trehalose alone or, more successfully, in combination with a cold-acclimated winter wheat grass (AFP source) significantly reduced the drip loss after strawberry thawing. The authors concluded that the combined effects of trehalose and AFP significantly improved the freezing tolerance of strawberry fruits. Cruz et al. (2009) reported that the vacuum infiltration of type I AFPs, from fish, was important in maintaining the quality of frozen watercress, since it reduced the size of the ice crystals formed. The authors also suggested that vacuum infiltration could be applied to incorporate valuable compounds to increase the quality of the final product. However, none

of the cited authors evaluated the effect of AFPs on the inhibition of recrystallization during storage of the frozen product.

The ability of the AFPs to inhibit recrystallization is related to their binding at different sites on the ice crystals, preventing their growth (Hassas-Roudsari and Goff, 2012). With the concentration of AFPs used for the vacuum infiltration, the data obtained for drip loss and firmness indicate that this process was partially, but not totally, inhibited. The results demonstrate that the vacuum infiltration of *Drimys angustifolia* AFPs into the fruit, under the conditions and concentrations used, provides cryoprotection in the initial storage period, retarding the ice recrystallization process in these samples.

#### **4 Conclusions**

In this study, apoplastic extracts were obtained from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*. The extraction buffer used is an important factor, as higher concentration of AFPs were obtained using Tris-HCl/DTT (pH 8) buffer. Confirming previous results, two bands with approximate molecular masses of 20 and 37 kDa were observed by SDS-PAGE. The vacuum infiltration of *Drimys angustifolia* AFPs showed positive effects on the quality of frozen star fruit, especially in relation to drip loss and firmness. The vacuum infiltration of these proteins apparently hinders the recrystallization process, resulting in lower drip loss and increased firmness after a few days of storage. It is now necessary to evaluate the use of higher concentrations of AFPs and investigate further the infiltration conditions in order to provide the cryoprotection over a longer period.

The results reported herein corroborate others that have demonstrated the potential application of antifreeze proteins in the freezing of food. It is important to highlight that this study is one of the few that involve the natural cold acclimation of the plant used as the AFP source, an important point in relation to commercial exploitation and cost reduction. Given its well-established properties, low cost and safe application, AFPs represent a valuable additional tool for the food industry, aimed at increasing the quality of frozen products.

#### **Acknowledgments**

This work was financially supported by the Brazilian governmental agency National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, contract 443244/2014-6).

## References

- Antikainen M, Griffith M (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol Plantarum* 99:423-432. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00556.x
- AOAC (2005) Official Methods of the Analysis of AOAC, 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. doi: 10.1016/0003-697(76)90527-3
- Cai Y, Liu S, Liao X, Ding Y, Sun J, Zhang D (2011) Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. *Food Bioprod Process* 89:98-102. doi: 10.1016/j.fbp.2010.04.002
- Cruz RMS, Vieira MC, Silva CLM (2009) The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I. *J Food End* 95:339-345. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.05.013
- Davies PL (2014) Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem Sci* 39:548-555. doi: 10.1016/j.tibs.2014.09.005
- Ding X, Zhang H, Wang L, Qian H, Qi X, Xiao J (2015) Effect of barley antifreeze protein on thermal properties and water state of dough during freezing and freeze-thaw cycles. *Food Hydrocolloid* 47:32-40. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.025
- Ding X, Zhang H, Liu W, Wang L, Qian H, Qi X (2014) Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen white salted noodles. *Food Bioprocess Technol* 7:842-852. doi: 10.1007/s11947-013-1101-0
- Duman JG, Wisniewski M (2014) The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Environ Exp Bot* 106:60-69. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.01.001

Dymek K, Dejmek P, Gómez Galindo F, Wisniewski M (2015) Influence of vacuum impregnation and pulsed electric field on the freezing temperature and ice propagation rates of spinach leaves. *LWT* 64:497–502. doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.016

Gol NB, Chaudhari ML, Rao TVR (2015) Effect of edible coatings on quality and shelf life of carambola (*Averrhoa carambola* L.) fruit during storage. *J Food Sci Tech* 52:78-91. doi: 10.1007/s13197-013-0988-9

Gómez Galindo F, Elias L, Gekas V, Herppich WB, Smallwood M, Sommarin M, Worrall D, Sjöholm I (2005) On the induction of cold acclimation in carrots (*Daucus carota* L.) and its influence on storage performance. *Food Res Int* 38:29-36. doi: 10.1016/j.foodres.2004.07.004

Griffith M, Ala P, Yang DSC, Hon WC, Moffatt BA (1992) Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol* 100:593-596. doi: 10.1104/pp.100.2.593

Griffith M, Lumb C, Wiseman SB, Wisniewski M, Johnson RW, Marangoni AG (2005) Antifreeze proteins modify the freezing process. *Plant Physiol* 138:330-340. doi: 10.1104/pp.104.058628.330

Hassas-Roudsari M, Goff HD (2012) Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. *Food Res Int* 46:425-436. doi: 10.1016/j.foodres.2011.12.018

Hon W, Griffith M, Chong P, Yang DSC (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol* 104:971-980. doi: 10.1104/pp.104.3.971

Huang T, Duman JG (2002) Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol* 48:339–350. doi: 10.1023/A:1014062714786

Jarząbek M, Pukacki PM, Nuc K (2009) Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). *Cryobiology* 58:268-274. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.01.007

Kar RK, Bhunia A (2015) Biophysical and biochemical aspects of antifreeze proteins: Using computational tools to extract atomistic information. *Progr Biophys Mol Bio* 119:194-204. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.09.001

Mustafa MA, Ali A, Seymour G, Tucker G (2016) Enhancing the antioxidant content of carambola (*Averrhoa carambola*) during cold storage and methyl jasmonate treatments. *Postharvest Biol Tec* 118:79-86. doi: 10.1016/j.postharvbio.2016.03.021

Provesi JG, Valentim Neto PA, Arisi ACM, Amante ER (2016) Antifreeze proteins in naturally cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia*, *Senecio icoglossus* e *Eucalyptus* ssp. *Braz J Food Technol* 19:e2016110. doi: 10.1590/1981-6723.11016

Pudney PDA, Buckley SL, Sidebottom CM, Twigg SN, Sevilla MP, Holt CB, Roper D, Telford JH, McArthur AJ, Lillford PJ (2003) The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). *Arch Biochem Biophys* 410:238-245. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00697-5

Ranganna, S (1977) *Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*. Tata McGraw-Hill, New Delhi.

Regand A, Goff HD (2006) Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. *J Dairy Sci* 89:49-57. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72068-9

Siramard S, Charoenrein S (2014) Effect of ripening stage and infusion with calcium lactate and sucrose on the quality and microstructure of frozen mango. *Int J Food Sci Tech* 49:2136-2141. doi: 10.1111/ijfs.12553

Smallwood M, Worrall D, Byass L, Elias L, Ashford D, Doucet CJ, Holt C, Telford J, Lillford P, Bowles DJ (1999) Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). *Biochem J* 391:385-391. doi: 10.1042/bj3400385.

Velickova E, Tylewicz U, Dalla Rosa M, Winkelhausen E, Kuzmanova S, Gómez Galindo F (2013) Effect of vacuum infused cryoprotectants



on the freezing tolerance of strawberry tissues. *LWT* 52:146-150. doi: 10.1016/j.lwt.2011.09.013

Wang L H, Wusteman MC, Smallwood M, Pegg DE (2002) The stability during low-temperature storage of an antifreeze protein isolated from the roots of cold-acclimated carrots. *Cryobiology* 44:307-310. doi: 10.1016/S0011-2240(02)00036-6

Xin Y, Zhang M, Xu B, Adhikari B, Sun J (2015) Research trends in selected blanching pretreatments and quick freezing technologies as applied in fruits and vegetables: A review. *Int J Refrig* 57:11-25. doi: 10.1016/j.ijrefrig.2015.04.015

Ye, CM, Kao BY, Peng HJ (2009) Production of a recombinant type 1 antifreeze protein analogue by *Lactococcus lactis* and its application on frozen meat and frozen dough. *J Agr Food Chem* 57:6216-6223. doi: 10.1021/jf900924f

Zhang Y, Zhang H, Ding X, Cheng L, Wang L, Qian H, Qi C, Song C (2016) Purification and identification of antifreeze protein from cold-acclimated oat (*Avena sativa* L.) and the cryoprotective activities in ice cream. *Food Bioprocess Technol* 9:1-10. doi: 10.1007/s11947-016-1750-x



## 5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por uma nova fonte de proteínas anticongelantes, avaliando extratos apoplásticos obtidos em vegetais naturalmente aclimatados a baixas temperaturas e não aclimatados, foi o primeiro objetivo proposto por esse trabalho. Os extratos apoplásticos obtidos com folhas aclimatadas de *Drimys angustifolia* tiveram concentração de proteína superior aos extratos de folhas não aclimatadas da mesma espécie. Além disso, somente o extrato de folhas aclimatadas apresentou uma alta atividade de inibição da recristalização, sugerindo então a expressão e atividade de proteínas anticongelantes nessa espécie que é amplamente distribuída nas regiões serranas do Sul do Brasil. Esses extratos apresentaram bandas próximas a 37 kDa e entre 20 e 25 kDa na análise de SDS-PAGE.

As análises realizadas no ano seguinte confirmaram os resultados da primeira etapa, além de mostrar a importância do tampão de extração na obtenção dessas proteínas. Embora não tenha alterado parâmetros físico-químicos e colorimétricos, a aplicação desse extrato por infiltração a vácuo em um pré-tratamento ao congelamento de carambolas apresentou efeitos positivos na redução da perda por gotejamento e manutenção da firmeza da fruta após o descongelamento.

Esse trabalho representa apenas um primeiro passo nessa linha de pesquisa. Bons trabalhos devem trazer nos seus resultados algumas respostas, mas principalmente levantar novas e numerosas questões. Sem dúvida, há uma diversidade de pontos relacionados a química e aplicação das proteínas anticongelantes que ainda não são respondidos pela literatura atual. A ciência deve ser vista como um campo aberto e colaborativo, onde a construção do conhecimento realizada por diferentes atores não é uma concorrência, mas sim uma possibilidade de sinergia. Sendo assim, é importante listar sugestões para futuros trabalhos com proteínas anticongelantes e aplicação em alimentos envolvendo:

- A busca por novas fontes de proteínas anticongelantes, tanto em plantas, como peixes e insetos, principalmente em resíduos de processo e/ou espécies de já possuem uma cadeia produtiva organizada;
- Compreensão da relação que envolve os diversos fatores de condições naturais de aclimação e a expressão das proteínas anticongelantes em diferentes vegetais;
- Estudo da aclimação de vegetais em condições artificiais, controladas, com uma avaliação financeira relacionando uma maior

expressão e atividade das proteínas anticongelantes e o custo financeiro decorrente dessa alternativa;

- Relação entre a estrutura das proteínas anticongelantes e sua atividade de histerese térmica e inibição da recristalização;

- Análise da estabilidade dos extratos apoplásticos e/ou das proteínas anticongelantes isoladas durante o seu armazenamento;

- Avaliação de aplicações no congelamento de outros vegetais, com diferentes concentrações e parâmetros para a infiltração a vácuo;

- Aplicações em outras matrizes alimentares, como massas e sorvetes, onde a inserção das proteínas anticongelantes é mais simples;

- Estabilidade das proteínas anticongelantes durante o processamento de alimentos, em especial tratamentos térmicos;

- Avaliações relacionadas a segurança de consumo das proteínas anticongelantes, mesmo que as fontes sejam alimentos consumidos regularmente na dieta da população, uma vez que as concentrações e a matriz alimentar de aplicação podem ser diferentes;

- Relações sinérgicas com outros crioprotetores, ou substâncias relacionadas a firmeza de vegetais, como sais de cálcio;

- Obtenção e avaliação da atividade anticongelante de hidrolisados proteicos obtidos de substâncias como o colágeno;

Como já exposto nas conclusões dos capítulos desta tese, com o aumento do conhecimento acerca do seu mecanismo, estabilidade e segurança de consumo, as proteínas anticongelantes podem representar uma ferramenta adicional importante sobre o controle do crescimento do cristal de gelo, o que é interessante para a área de tecnologia de alimento ou para qualquer outra que utilize o congelamento como um método de conservação.