

Comunicado 171

Técnico

ISSN 0103-5231
Dezembro, 2010
Rio de Janeiro, RJ

Metodologia de Análise de Proteínas em Torta de Gergelim por Eletroforese (SDS-PAGE)

Marilia Penteado Stephan¹
Tatiana de Lima Azevedo²
Carlos Wanderlei Piler de Carvalho³
Cristina Yoshie Takeiti⁴

As sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) apresentam uma grande quantidade de proteínas e gorduras em sua constituição, sendo muito utilizadas para a extração de seu óleo. Esse processo gera um coproduto conhecido como “torta de gergelim” que possui, em média, 50% de proteínas que se destacam pela riqueza em aminoácidos sulfurados e baixo conteúdo de lisina (ORRUÑO; MORGAN, 2007). Esta elevada concentração de proteínas na torta indica sua potencial aplicação como fonte protéica, não só pela agregação de valor nutricional a determinados produtos como também pelo seu baixo custo. Ao se fazer uso deste material, destinando-o tanto à alimentação animal quanto à humana, é necessária a garantia da qualidade do mesmo antes e após o seu processamento, tendo-se como meta a obtenção de um produto seguro e com alto valor nutritivo (SUBRAMANIAN, 1980). Para o desenvolvimento de novos alimentos derivados desse coproduto tem-se buscado seu aproveitamento através da utilização de processos industriais. Porém, ao submeter-se esse material à condições envolvendo alta temperatura e/ou pressão, devem ser consideradas as

possíveis alterações sofridas por suas macromoléculas podendo resultar não somente em sua desnaturação, como também em sua hidrólise.

As sementes de oleaginosas, como o gergelim, apresentam proteínas de armazenamento de natureza globulínica (67,3%), albumínica (8,9%), glutelínica (6,9%) e prolaminica (1,3%) tendo –se com base sua solubilidade. As duas primeiras são as principais fontes de nitrogênio para o crescimento após a germinação das sementes. Nestas sementes destacam-se a presença de uma globulina composta de subunidade ácida com massa molecular na faixa de 30-40kDa e uma subunidade básica na faixa de 20-25kDa, ligadas por pontes dissulfeto (NETO, 2007). Sabe-se também que um único gene é responsável pela síntese destas duas subunidades, que tem um precursor comum na faixa de 50-60kDa. Já as albuminas, em geral, são peptídeos que apresentam menor massa molecular (4 a 17kDa) e se destacam por serem relatadas como agentes emulsificantes (BURNETT et al., 2002) e até mesmo antifúngico (PELEGRINI; FRANCO, 2005).

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, stephan@ctaa.embrapa.br

² Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana@ctaa.embrapa.br

³ Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, cwpiler@ctaa.embrapa.br

⁴ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, cristina@ctaa.embrapa.br

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de extração, purificação e concentração de algumas proteínas da fração globulínica encontradas na torta de gergelim, visando sua caracterização através da utilização da técnica de eletroforese (SDS-PAGE). Esta purificação pode ter um papel importante para futuros estudos de integridade protéica e para a avaliação do efeito do processamento sobre a torta de gergelim.

Descrição do método de obtenção do extrato protéico parcialmente purificado

Realizou-se um estudo para avaliar duas soluções extratoras e duas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para serem utilizadas na purificação parcial das proteínas encontradas na torta de gergelim. No primeiro sistema (I), adicionou-se 50mL de tampão acetato de sódio 0,2M (pH 4,5) a 5g da torta moída, a mistura foi homogeneizada em blender por 2min e posteriormente filtrada. O filtrado foi centrifugado a 4000rpm por 15min. Uma alíquota do sobrenadante (10mL) foi utilizada para precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no valor de saturação de 70%. No segundo sistema (II), utilizou-se uma solução de NaCl (0,6M)/HCl (0,1%) e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizada para a precipitação das proteínas foi de 90%. Utilizou-se o método de Bradford (1976) para dosagem colorimétrica de proteínas totais. Os extratos foram centrifugados a 10000rpm por 10min e filtrados. O precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão fosfato de potássio na concentração de 20mM (pH 7,5) para a extração realizada com tampão acetato e 3mL para o extrato tratado com NaCl/HCl, de forma a adequar a concentração de proteína a ser aplicada no gel de poliacrilamida. No preparo da amostra para aplicação no gel de eletroforese foram utilizados 400 μL de cada um dos extratos adicionados de 200 μL do tampão fosfato de potássio.

Metodologia usada para análise do extrato protéico da torta de gergelim

Para o presente estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da marca Biorad, a metodologia de preparação dos géis foi descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e para o gel de aplicação da amostra foi utilizada a concentração de 4%. A corrida foi realizada pelo período de 7h sob uma tensão de 100v. Os marcadores de peso molecular presentes nos padrões de proteínas utilizados foram: 103,03kDa (fosforilase B); 80,66kDa (albumina); 49,49kDa (ovalbumina); 36,55kDa (anidrase carbônica); 28,83kDa (inibidor de tripsina) e 19,45kDa (lisozima). As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", durante uma noite e descoradas com uma solução contendo: 40% de metanol, 10% de

ácido acético e 50% de água destilada, por 3 horas.

Resultados da análise de proteínas totais por Bradford e proteínas extraídas por eletroforese

Os dois sistemas extratores estudados: I) solução de tampão acetato 0,2M (pH 4,5) e II) solução de NaCl 0,6M/HCl 0,1%, mostraram-se eficientes para a extração de proteínas da torta de gergelim. O sistema de extração II, realizado com as sementes inteiras, apresentou melhor resultado e maior rapidez (ORRUÑO; MORGAN, 2007). Através da utilização do método colorimétrico de dosagem de proteínas (BRADFORD, 1976) pôde-se observar maior concentração destas na amostra tratada com o sistema II (Figura 2) em relação à amostra obtida pelo sistema I (Figura 1). Portanto, foi ajustado um método que além de ser mais rápido possui maior eficácia por extrair alta concentração de proteínas. Ao se tratar os dois extratos obtidos com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para realizar a precipitação e purificação parcial das proteínas extraídas se evidenciou a maior eficiência do sistema II por apresentar maior quantidade de proteínas presentes no precipitado obtido. Logo, ao se aplicar a mesma quantidade das amostras geradas através dos dois métodos testados, observa-se que o sistema II se destacou por apresentar uma maior coloração das bandas características do gergelim, principalmente na faixa de 50kDa, indicando uma afinidade deste líquido extrator com as proteínas desta faixa de massa molecular, que deve corresponder ao precursor das globulinas ácidas presentes na faixa de 30-40kDa e das básicas presentes na faixa de 20-25kDa, como observados nas Figuras 1 e 2. No perfil eletroforético da amostra tratada pelo sistema I (Figura 1) não se observa o aparecimento de proteína na faixa de 19-20kDa, observado no perfil da amostra extraída com o sistema II (Figura 2), mostrando que o sistema II se sobressai na extração de proteínas nesta faixa de massa molecular, quando comparada ao sistema I.

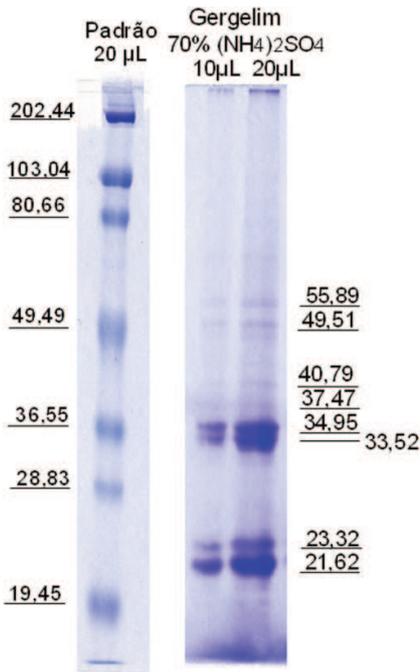


Figura 1. Perfil de migração das proteínas da torta de gergelim extraídas com solução tampão acetato de sódio 0,2M com pH=4,5 (sistema I).

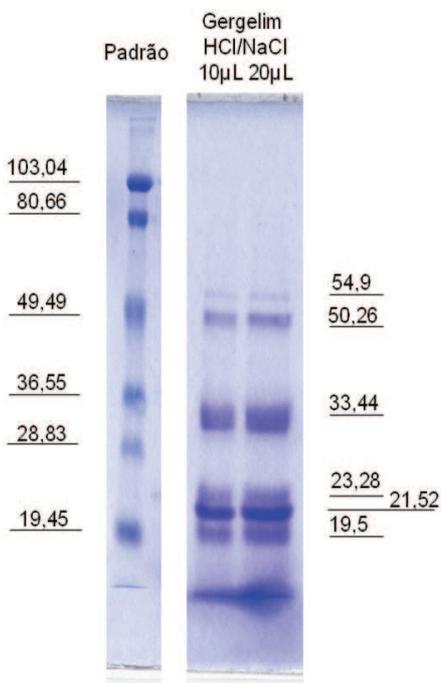


Figura 2. Perfil de migração das proteínas da torta de gergelim extraídas com solução de NaCl 0,6M/HCl 0,1%(sistema II).

Considerações Finais

O sistema II se destacou por sua eficiência na extração de proteínas a partir da torta desengordurada de gergelim e por sua maior rapidez, frente ao sistema

de extração I, resultando numa maior coloração das bandas características, principalmente na faixa de 50kDa, indicando uma afinidade desta solução extratora com as proteínas desta faixa de massa molecular. Este sistema também se mostrou eficaz na extração de moléculas na faixa de 20kDa, que deve corresponder à uma albumina, possivelmente com característica alergenicida. Esta caracterização pode ter um papel importante para futuros estudos de integridade protéica na avaliação do efeito de processamento sobre a torta de gergelim.

Referências

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURNETT, G. R.; RIGBY, N. M.; MILLS, E. N. C.; BELTON, P. S.; FIDO, R. J.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. Characterization of the emulsification properties of 2S albumins from sunflower seed. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 247, n. 1, p. 177-185, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

NETO, S. M. **Albuminas 2S bactericidas em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**: uma nova estratégia no controle de infecção hospitalar. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, 2007.

ORRUÑO, E.; MORGAN, M. R. A. Purification and characterisation of the 7S globulin storage protein from sesame (*Sesamum indicum* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 926-934, 2007.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of a multi-functional class of defense proteins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 11, p. 2239-2253, 2005.

SUBRAMANIAN, N. Technology of vegetable protein foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 17, n. 1-2, p. 71-77, 1980.

Comunicado Técnico, 171

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*

Membros: *Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela de Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Marcos Jose de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan*

Expediente

Supervisão editorial: *Renata Galhardo Borguini*

Revisão de texto: *Janine Passos Lima da Silva*

Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*

Editoração eletrônica: *Marcos Moulin e André Luis do Nascimento Gomes*