

ANÁLISE DAS ZEÍNAS γ NOS CORPOS PROTÉICOS DOS MILHOS POZA RICA E BR473 POR RMN EM ESTADO SÓLIDO E FTIR

Tatiana de C. Bicudo¹, Lucimara A. Forato², **Luiz A. R. Batista³**, Luiz A. Colnago^{*1,2}

1 Universidade São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Av. Trabalhador São Carlense, 400, Centro, São Carlos, SP, CEP:13560-970

2 Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro, 1452, Centro, São Carlos, SP, CEP 13560-970, e-mail*: colnago@cnpdia.embrapa.br

3. Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234 – CEP 13560-970, São Carlos, SP

Keywords: γ ZEIN; SECONDARY STRUCTURES; SOLID STATE NMR

A zeína γ é uma das proteínas de reserva do milho e é solúvel em água somente após a redução das ligações de dissulfeto, que é um processo desnaturante. Com isso, os estudos de sua estrutura em solução não refletem seu estado nativo. Assim, está se analisando sua estrutura secundária dentro dos corpos protéicos dos milhos poza rica e BR 473, nos quais essa proteína representa mais de 90% das proteínas totais, determinada por SDS/PAGE.

Neste trabalho analisou-se essa proteína nos corpos protéicos em estado sólido, por RMN e FTIR. Os espectros de RMN foram obtidos num espectrômetro de RMN Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 T. Os espectros de ¹³C em estado sólido, foram adquiridos com a técnica de VACP/MAS. Usou-se um pulso de $\pi/2$ de 4 μ s, tempo de contato de 1ms, tempo de aquisição de 12,8 ms, tempo de repetição de 3s, desacoplador com banda de 60 KHz, janela espectral de 40 KHz e 1024 pontos. As amostras (200 mg) foram empacotadas em rotores de zircônia de 5 mm e submetidas a uma rotação no ângulo mágico de 7 KHz. As estruturas secundárias (ES) foram analisadas pelos deslocamentos químicos dos carbonos α (C α) e das carbonilas (C=O), que são sensíveis ao tipo de ES presente na amostra ¹. Em geral, picos em 56 e 53 ppm correspondem à hélices α e folhas β , respectivamente. No caso das carbonilas, sinais em 176, 174 e 172 ppm correspondem às hélices α , estruturas desordenadas e folhas β ¹.

Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrômetro de FTIR Perkin Elmer, modelo Paragon 1000 e as ES foram determinadas por método de reconhecimento de padrões ².

Na figura 1-A estão espectros de RMN em estado sólido (VACP/MAS) dos corpos protéicos purificados dos milhos *poza rica* e BR 473, ambos com 21 dias após polinização. Como as C=O apresentam sinais em 175 ppm e os C α centrados em 56 ppm, concluiu-se que as zeínas γ nesses dois corpos protéicos têm estrutura predominante do tipo hélices α . Este resultado foi confirmado pela quantificação das ES por FTIR. Para os corpos protéicos do milho BR 473 obteve-se 44% de hélices α e 25% de folhas β ; para os corpos protéicos do milho *poza rica* obteve-se 39% de hélices α e 28% de folhas β . Os sinais em 72 ppm são devido à presença de amido ¹. O sinal proeminente em 30ppm, é devido à presença de ácidos graxos livres nos corpos protéicos ³. Para confirmar a presença dos ácidos graxos livres foram obtidos espectros (figura 1-B) dos mesmos corpos protéicos com a técnica de um pulso ("single pulse technique") e rotação da amostra no ângulo mágico. Com esta técnica é possível detectar substâncias com mobilidade. O sinal largo em 172 ppm pode ser atribuído às carboxilas, os sinais em 130 e 128 ppm aos carbonos insaturados dos ácidos oléico e linoléico, os sinais entre 45 e 20 ppm aos metilenos e em 14 ppm ao grupo metila terminal. A possibilidade desses sinais serem devido a triglicerídeos ou fosfolípidos é eliminada pela ausência de sinais em 62 e 69 ppm, característicos do

glicerol. Com a presença desses lipídeos em grande quantidade nos corpos protéicos, sugere que a zeína γ seja uma proteína que se liga a ácido graxo, como as zeínas α^3 .

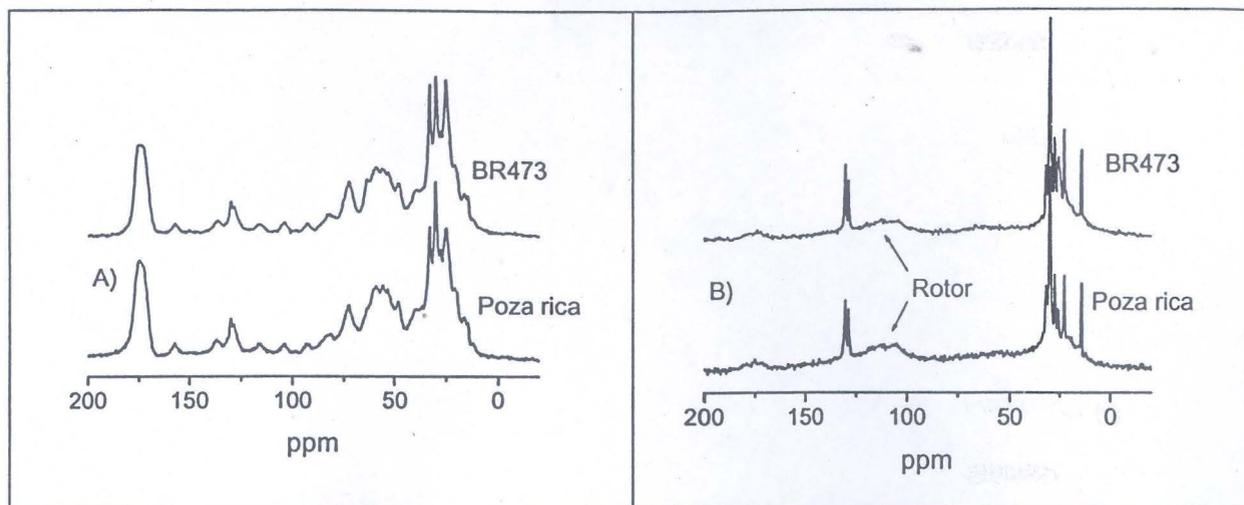


Figura 1. Espectros de RMN em estado sólido dos corpos protéicos dos milhos BR473 e poza rica, com 21 dias após polinização. A) Espectros obtidos com VACP/MAS e B) Espectros obtidos com um pulso e rotação da amostra no ângulo mágico.

REFERÊNCIAS

1. Duodu, K.G., Tang, H., Grant, A., Wellner, N., Belton, P.S., Taylor, R.N. *J. of Cereal Science* 2001, 33, 261
2. Forato, L.A.; Bernardes Filho, R.; Colnago, L.A. *Anal. Biochem.*, 1998, n. 259, p. 136
3. Forato, L.A., Colnago, L.A. Garratt, R.C., Lopes-Filho, M..A. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1543, 106

FAPESP (Processo nº 00/14896-6), CNPq