

Utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para detecção de proteína isolada de soja e de concentrado protéico de soro de leite em lombo de suíno

Marília Penteado Stephan¹
Heitor Daguer²
Arlem Viana Ross³
Luciano dos Santos Bersot⁴

Introdução

As proteínas são os principais componentes funcionais de produtos cárneos por terem a capacidade de influenciar as características sensoriais de aparência, odor, textura e sabor, além de seu potencial já conhecido em relação aos seus aspectos nutricionais, pela sua composição em aminoácidos e pelo valor econômico devido ao seu preço no mercado. As proteínas vegetais vêm despertando um alto interesse da indústria de carnes para substituir as proteínas animais de alto valor biológico, devido ao seu menor custo. Dentre estas proteínas, as de soja são as mais utilizadas, tendo estas boas propriedades emulsificante, estabilizante, texturizante e de hidratação. Com a intenção de reduzir custos de produtos embutidos, como salsicha e mortadela, nos dias de hoje são muito utilizadas proteínas de soja nos mesmos (BELLOQUE et al., 2002; CARRIÓN; VALENCIA, 1990). A proteína do leite é outra fonte protéica também muito promissora para esta adição (YUSOF; BABJI, 1996). A adição destes ingredientes não-cárneos aos produtos cárneos com diferentes funções visa não só reduzir custos, mas também, agregar os seguintes parâmetros ao mesmo: 1) aumentar a estabilidade da massa; 2) melhorar a capacidade de retenção de água; 3) melhorar a textura e o sabor; 4) reduzir o encolhimento durante o cozimento; 5) facilitar o processo de corte da carne. Estes produtos são

denominados extensores e a soja e o colágeno são usados na maioria dos produtos cárneos. Entretanto, esta adição de fontes alternativas de proteína pode causar sérios problemas de saúde, em especial, problemas oriundos de reações alérgicas a determinadas proteínas, no caso soja e leite. Portanto, a adição destas proteínas é dependente de aspectos legais podendo em alguns casos ser permitida a adição de quantidades menores ou mesmo a proibição desta adição (BELLOQUE et al., 2002). Segundo Belloque et al. (2002), vários métodos têm sido utilizados para controle da utilização de extensores em produtos cárneos. Entre eles, estão os métodos analíticos baseados na determinação de substâncias químicas também presentes em fontes alternativas de proteínas e que não estão presentes em produtos cárneos: 1) visualização microscópica de sais; 2) determinação química; 3) determinação bioquímica. Os outros métodos que estão baseados na determinação de proteínas nestas fontes alternativas são: 1) identificação eletroforética; 2) detecção imunoquímica; 3) quantificação cromatográfica. Dentre os métodos cromatográficos estão: 1) identificação de proteínas por cromatografia líquida; 2) análise de peptídeos por cromatografia de troca iônica; 3) determinação de composição em aminoácidos. Entretanto, para que haja quantificação ou até mesmo identificação destes componentes químicos é importante que haja extração e solubilização deles a partir da matriz utilizada. Para isto

¹Farmac.-bioquím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, CEP23.020-470 Rio de Janeiro - RJ, stephan@ctaa.embrapa.br

²Med. Veterinário, M.Sc., Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, heitor.daguer@agricultura.gov.br

³Aluno de graduação em Zootecnia, UFRRJ, arlemross@gmail.com

⁴Med. Veterinário, D.Sc., Professor da Universidade Federal do Paraná (UFPR), lucianobersot@ufpr.br

vários líquidos extratores têm sido testados. Dentre eles podemos destacar a uréia (GILS; HIDSKES, 1973) e a solução da mistura tris-HCl (pH 6,8), SDS e mercaptoetanol (LEE et al., 1976).

Neste trabalho teve-se como objetivo ajustar um método de análise que permita a separação de proteína de lombo de porco e dos seus extensores (isolado protéico de soja e isolados de soro de leite) de modo que as mesmas possam ser identificadas separadamente. Como inovação pode-se propor o uso de uréia 6M como solução de extração das proteínas da carne e solubilização das proteínas do isolado protéico de soja e isolado protéico de soro de leite.

Eletroforese de proteínas

Para o presente estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e 4% no gel de aplicação da amostra. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100V. Os marcadores de massa molecular foram obtidos a partir do seguinte padrão de proteínas (em kDa): 103,035- fosforilase b; 80,664-soralbumina ; 49,491-ovalbumina; 36,545-anidrase carbônica; 28,829-inibidor de tripsina de soja; 14,445-lisozima. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", durante uma noite e descoradas com solução de metanol/ácido acético/água (40/10/50), durante três horas.

Preparação de amostra de extrato protéico de lombo de suíno, isolado protéico de soja, concentrado protéico de soro de leite para análise das cadeias polipeptídicas em eletroforese (SDS-PAGE) e resultados

Para este estudo foram utilizadas amostras de lombos de suínos previamente submetidos à injeção com salmouras contendo diferentes extensores, em seis tratamentos

comparativos e um controle (tratamento 1), Tabela 1. Utilizou-se 10g deste material (previamente triturado) e 30 mL de solução extratora contendo uréia 6M para realização da extração inicial em blender durante 2 minutos e posterior aquecimento durante 2 minutos à 70°C. Após estas etapas de homogeneização e aquecimento, o extrato bruto foi centrifugado à 3000 rpm, à 40°C, durante 15 minutos. Após centrifugação, a camada superior de gordura foi retirada e 400µL do sobrenadante foi misturado com 200µL do tampão de amostra conforme descrito por Laemmli (1970). Desta amostra, foram retirados 10µL e aplicados em gel de poli-acrilamida, utilizando-se as condições e padrões conforme descrito acima. O controle positivo dos dois extensores (isolado protéico de soja e isolado protéico de soro de leite) foi feito preparando-se as seguintes misturas: 1) 600µL do extrato de lombo e 100µL isolado protéico de soja na concentração de 0,01g/ml 2) 600µL do extrato de lombo e 100µL de isolado protéico de soro de leite na concentração de 0,01g/mL. Deve-se enfatizar que em tentativas iniciais de solubilizar as proteínas na mesma solução (NaCl 5%) de preparo dos extensores foi observada uma forte insolubilidade das amostras. Portanto, introduziu-se esta alternativa de solubilização dos mesmos em uréia 6M. Na Figura 1 pode-se observar o gel de poli-acrilamida contendo as cadeias polipeptídicas provenientes das diferentes amostras de lombo de suíno. As proteínas de massas conhecidas (padrão) foram aplicadas, em paralelo, e submetidas a corrida com outros sete extratos contendo proteínas a serem identificadas (extensores e lombo). Na observação do poço 11, Figura 1, fica bem claro que é possível verificar três proteínas de soja migrando em posições bem afastadas das proteínas de lombo de porco. O mesmo é observado para as duas proteínas de soro de leite do poço 12, Figura 1. Estas últimas (soro de leite) apresentam migrações similares ao já observado em resultados anteriores (STEPHAN, 2006). Entretanto, nos tratamentos em que foram injetados os extensores (10%) não foi possível visualizar nenhuma banda seja de isolado de soja ou concentrado de soro de leite (poços 4-10).

Tabela 1. Distribuição dos tratamentos, de acordo com os ingredientes da salmoura para injeção dos lombos suínos.

Tratamento	Ingredientes da salmoura
1	Não injetado (lombo "in natura")
2	Água, sal (5%)
3	Água, sal (5%), tripolifosfato de sódio (3%)
4	Água, sal (5%), proteína isolada de soja (10%)
5	Água, sal (5%), concentrado protéico de soro de leite (10%)
6	Água, sal (5%), proteína isolada de soja (10%), tripolifosfato de sódio (3%)
7	Água, sal (5%), concentrado protéico de soro de leite (10%), tripolifosfato de sódio (5%)

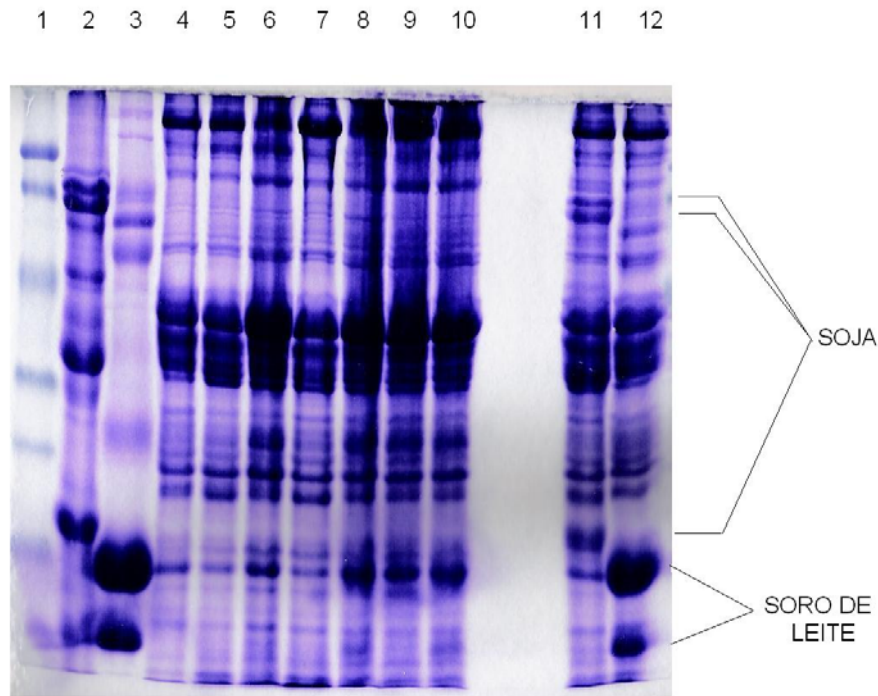


Fig. 1. Perfil eletroforético das proteínas extraídas de lombo de suíno. POÇO 1: marcador de massa molecular. POÇO 2: isolado protéico de soja (0,01g/mL). POÇO 3: concentrado protéico de soro de leite (0,1g/ mL). POÇOS 4-10: proteínas de lombo de suíno (tratamentos de 1a 7). POÇO 11: proteína de lombo de suíno + proteína de soja. POÇO 12: proteína de lombo de suíno + proteína de soro de leite.

Conclusão

Conclui-se que o método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também se diferenciou de outros descritos na literatura que utilizam outras soluções extratoras. A introdução da solução de uréia 6M permitiu uma boa extração e solubilização de proteínas. O

método se mostrou preciso e, com, isto pôde-se observar bandeamentos típicos de proteínas miofibrilares perfeitamente separáveis dos extensores isolado protéico de soja e isolado protéico de soro de leite. Estes resultados mostram-se promissores para verificação de fraude em produtos cárneos.

Referências Bibliográficas

BELLOQUE, J.; GARCIA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L. Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 507-532, 2002.

CARRIÓN, M. O.; VALENCIA, M. E. Detección y cuantificación de soja em productos cárnicos por electroforesis. I: Estudio em sistema modelo. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 509-517, 1990.

GILS, W. F. van; HIDSKEG, G. G. Detection of casein, soy proteins and coagulated egg-white in meat products by electrophoresis on cellulose acetate membranes. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung A**, v. 151, n. 3, p. 175-178, apr. 1973.

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

LEE, Y. B.; RICKANSRUD, D. A.; HAGBERG, E. C.; FORSYTHE, R. H. Detection of various nonmeat extenders in meat products. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 3, p. 589-593, 1976.

STEPHAN, M. P. Estudos iniciais de utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para avaliação de fraude em produtos comercializados como concentrado de soro de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p. 214-217, 2006.

YUSOF, S. C. M.; BABJI, A. S. Effect of non-meat proteins, soy protein isolate and sodium caseinate, on the textural properties of chicken bologna. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 323-329, 1996.

Comunicado Técnico, 134

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) 2410-1090 / 2410-9713

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

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2008): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta.*

Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Renata Torrezan, Ronel Luiz de Oliveira Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes.*

Secretária: *Renata Maria Avilla Paldês*

Expediente

Revisão de texto: *Comitê de Publicações.*

Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo.*

Edição eletrônica: *André Guimarães de Souza*