

Foto: Fabiano Marques Dourado Bastos

COMUNICADO
TÉCNICO

239

Rio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2019

Embrapa

Nova Estratégia Metodológica para Análise Eletroforética (Tricina-SDS-PAGE), visando à Identificação Peptídeo-proteica em Soja

Marilia Penteado Stephan¹
Ilana Felberg²
Alexsandro Araújo dos Santos³
Tatiana de Lima Azevedo⁴
Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi⁵

Nova Estratégia Metodológica para Análise Eletroforética (Tricina-SDS-PAGE), visando à Identificação Peptídeo-proteica em Soja¹

¹ Farmacêutica-bioquímica, Doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Farmacêutica-bioquímica, Doutora em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Técnico em Alimentos, técnico da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Engenheira em Alimentos, Doutora em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Introdução

Existem, na literatura científica, dados de caracterização molecular da hidrólise de isolados de proteínas de soja amarela por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Mora-Escobedo et al., 2009). Entretanto, não foram encontrados, na literatura, resultados de parâmetros moleculares de caracterização peptídico-proteico na soja preta. A técnica eletroforética de SDS-PAGE permite a visualização de proteínas na faixa entre 19,2 e 200 kDa. No entanto, há uma limitação analítica para a identificação de bandas referentes a peptídeos menores, importante de serem estudadas em diferentes tipos de matrizes alimentares, como no caso da soja, seja ela preta ou amarela. Dessa forma, foi escolhida a técnica

eletroforética tipo Tricina-SDS-PAGE, descrita por Schägger e Jagow (1987), que permite a visualização de peptídeos entre 10 kDa e 1 kDa. Esta técnica pode ser aplicada a todos os alimentos proteicos. Entretanto, se fazem necessárias ações diferenciadas de preparo de amostras. Os dois tipos de eletroforese exigem a obtenção de um extrato proteico purificado que permita a visualização de géis límpidos e ausentes de imagens distorcidas.

Stephan et al. (2013a) e Azevedo et al. (2019) mostraram a eficácia da utilização dessa técnica para estudo tanto da qualidade de pescado quanto para avaliação da formação de peptídeos durante o processamento térmico de alimentos e maturação de queijo produzido na região do Serro no Brasil, respectivamente.

Teve-se como objetivo, neste trabalho, implantar e adaptar a técnica de eletroforese Tricina-SDS-PAGE para estudo concomitante, num mesmo gel de poliacrilamida, de peptídeos e proteínas extraídos de farinha de soja preta ou amarela. Desta forma, é apresentada uma nova estratégia, simples e econômica, de extração da gordura de farinha de soja preta para obtenção de um extrato proteico semi-purificado.

Parte experimental

Foram analisadas três amostras de farinha de soja preta (linhagem BRM09-50901 e duas adquiridas no comércio varejista do Rio de Janeiro).

Dois tipos de técnica eletroforética foram utilizados neste estudo: o tipo SDS-PAGE 12% (Mora-Escobedo et al., 2009) e o tipo Tricina-SDS-PAGE (Schägger; Jagow, 1987) utilizado para outras matrizes. O primeiro (SDS-PAGE) foi utilizado como base de dados para análise molecular e o método Tricina SDS-PAGE para ser implantado e adaptado, visando à identificação concomitante de proteína e peptídeos de soja no mesmo gel de eletroforese. Neste trabalho, teve-se como objetivo a caracterização do “fingerprint” peptídico e proteico apenas de soja preta.

Alguns parâmetros foram estudados visando estabelecer procedimentos mais adequados do ponto de vista econômico e ambiental, tais como: retirada de gordura das farinhas por um

método rápido e econômico, agitando, durante 1 hora, 1 g de farinha e 10 mL de acetona; secagem das amostras em capela de exaustão de gases ao invés de liofilização e extração das proteínas com solubilização direta da farinha de soja desengordurada no próprio tampão de amostra da eletroforese.

Mais detalhadamente, os procedimentos foram realizados seguindo as etapas mostradas na Figura 1 e descritos a seguir: 1 g de farinha de soja foi colocado em 10 mL de acetona sob agitação durante 1 hora, visando a retirada da gordura. Os dois terços superiores do volume de acetona, contendo a gordura presente nas farinhas, foram retirados com pipeta Pasteur e o um terço inferior foi transferido para uma Centrífuga modelo Mini Spin (Eppendorf AG) e centrifugado durante cinco minutos a uma velocidade de $12.045 \times g$. Os precipitados obtidos foram deixados no próprio tubo Eppendorf, durante uma noite, em câmara de exaustão de gases, para total secagem e evaporação da acetona. A solubilização das proteínas purificadas foi feita diretamente no tampão de amostras da eletroforese. Foram utilizadas massas de 3 a 5 mg/mL de extratos proteicos desengordurados e purificados. Essas duas massas foram testadas de modo a verificar a concentração ideal a ser aplicada no gel. A solubilização desses extratos foi feita com 1 mL do tampão de amostra (pH 6,8 com 4% SDS, 12% glicerol, 2% mercaptoetanol e 0,01% corante coomassie blue G250) e aplicados no gel (20 μ L).

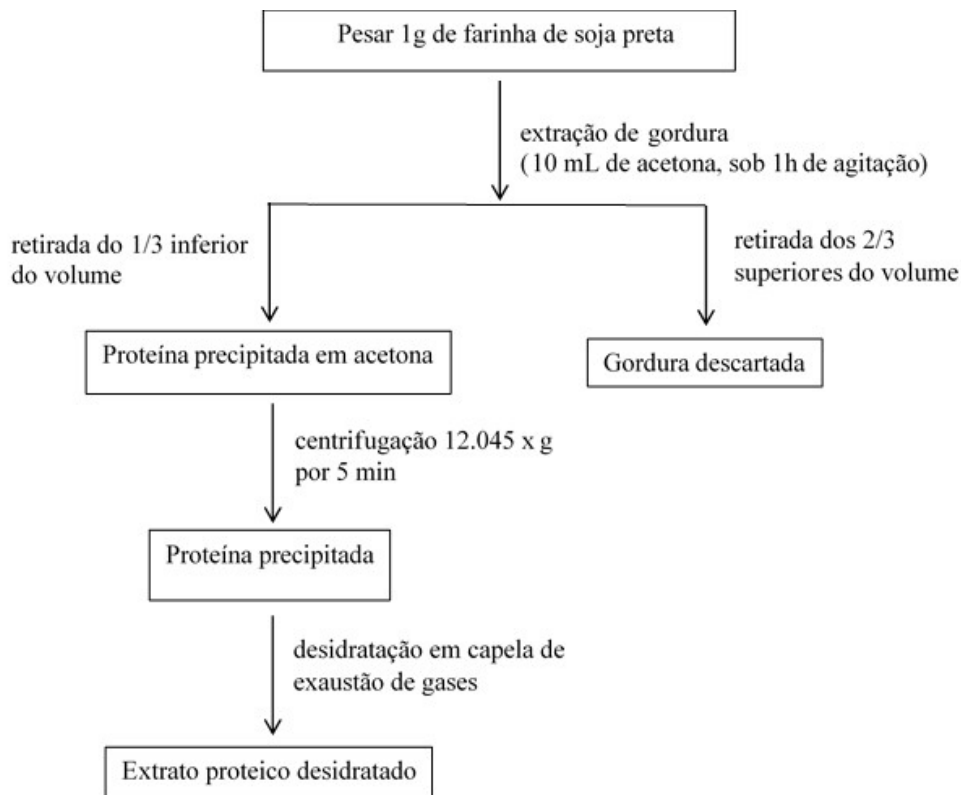


Figura 1. Rota metodológica de extração das proteínas de soja, a partir de farinhas cruas.

Resultados

O gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrado na Figura 2, e o gel da eletroforese Tricina-SDS-PAGE (Figura 3) retratam que o tratamento alternativo de obtenção de extratos desengordurados e purificados resultou na obtenção de géis límpidos, com cadeias polipeptídicas bem separadas.

Resultados similares foram obtidos para as duas concentrações de extratos proteicos de soja preta, de 3 e 5 mg/mL. Entretanto, a concentração de 5 mg/mL mostrou-se melhor pelo fato de apresentar maior intensidade de coloração, tanto das bandas proteicas quanto das bandas peptídicas.

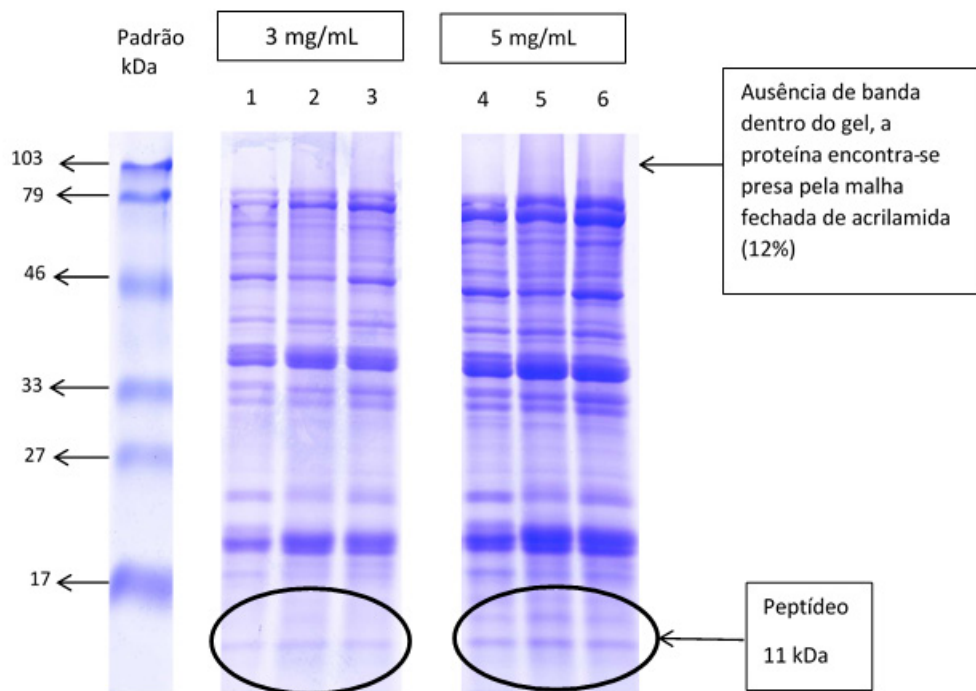


Figura 2. Eletroforese do tipo SDS-PAGE, visando identificação de proteínas extraídas de três diferentes amostras de soja preta. Foram realizadas extrações de 3 mg/ mL e 5 mg/ mL (1 e 4, linhagem BRM09-50901 e 2, 3, 5 e 6, amostras comerciais).

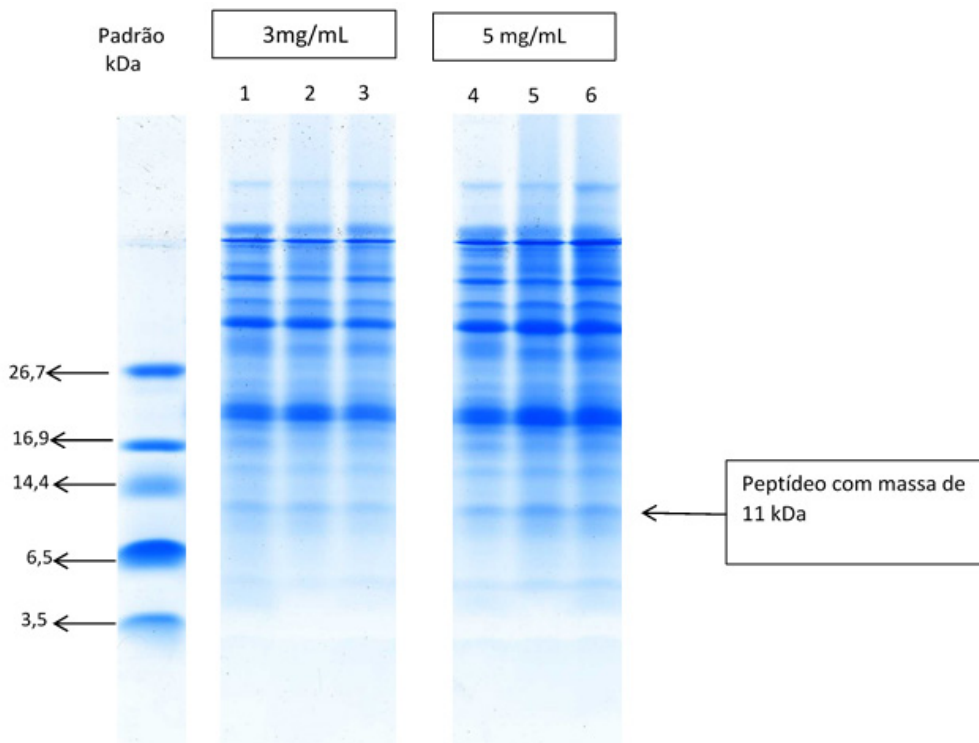


Figura 3. Eletroforese do tipo Tricina-SDS-PAGE, visando identificação de peptídeo e proteína extraídos de três diferentes amostras de soja preta. Foram realizadas extrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL (1 e 4, linhagem BRM09-50901 e 2, 3, 5 e 6, amostras comerciais).

A utilização dos dois tipos de eletroforese (SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE) permitiu verificar a adequação do gel de Tricina-SDS-PAGE para caracterização concomitante de proteína e peptídeo. Apesar do objetivo do presente trabalho não ter sido caracterizar peptídeos de soja que possam ter atividade bioativa, tem-se como meta utilizar esta marcha analítica

para futuros estudos de sequenciamento. Além disso, pretende-se fazer uma prospecção sobre possíveis novas proteínas e peptídeos de natureza endógena de soja. De uma forma sintética, da leitura visual dos géis foram observadas, nos dois géis, múltiplas bandas nas faixas moleculares entre 103 e 17 kDa para SDS-PAGE (Figura 2) e múltiplas bandas acima de 26,7 para

Tricina-SDS-PAGE (Figura 3). Duas bandas podem ser selecionadas como proteína e peptídeo de destaques. Elas se caracterizaram por se apresentarem bem distantes das demais e, portanto, fáceis de serem retiradas do gel para futuro sequenciamento (Figura 3). Pode-se verificar que há uma banda isolada acima do padrão de 26,7 kDa no gel Tricina- SDS-PAGE (Figura 3) que não foi observada no gel de SDS-PAGE. Isto, certamente, pelo fato do percentual de acrilamida se diferenciar, 12% no SDS-PAGE e 4% no Tricina-SDS-PAGE. De uma forma complementar, a técnica Tricina-SDS-PAGE permite que esta banda seja visualizada, mas não quantificada em relação ao valor da massa molecular. Estudos futuros serão realizados com padrões mais adequados. Quanto às frações peptídicas, destaca-se a banda de 11 kDa, vista tanto no gel de SDS-PAGE (Figura 2) como no gel de Tricina SDS-PAGE (Figura 3). Esta banda, apesar da baixa intensidade de coloração na concentração da amostra de 3 mg/mL, mostra uma nitidez diferenciada para a concentração de 5 mg/mL. Além disto, a técnica de Tricina SDS-PAGE se destacou pela possibilidade de economia de tempo e reagente de análise e também pelo preparo da amostra simplificado. Deve-se ressaltar que a mesma estratégia de preparo de amostra pode também ser recomendada para quem tem interesse em usar a técnica de SDS-PAGE.

A etapa de desengorduramento foi um avanço importante no que diz respeito à clareza na identificação das bandas de proteínas quando comparada àquela utilizada com técnica eletroforética UREIA-PAGE (Stephan et al., 2013b). Esta técnica atual mostra-se promissora não só como uma estratégia simples de retirada de gordura das amostras, como também na possibilidade de utilização de microquantidades, tanto de reagentes como de amostras.

Conclusão

Essa nova estratégia metodológica apresentou vantagens diferenciais em aspectos relacionados à praticidade da técnica para extração de proteínas de farinhas de soja e à escolha da técnica eletroforética (Tricina-SDS-PAGE). Em um mesmo gel foi possível identificar proteínas acima de 100 kDa e peptídeos até 1 kDa, contendo visualizações límpidas e com bandas bem definidas. Estudos futuros de sequenciamento da banda referente ao peptídeo de 11 kDa serão realizados visando obter parâmetros de avaliação de um possível novo peptídeo bioativo. A importância dos peptídeos na soja preta se dá na possibilidade dos mesmos terem atividade biológica.

Referências

AZEVEDO, T. L.; CARNEIRO, J. O.; STEPHAN, M. P.; SANTOS, A. A.; CHAVES A. C. D. C. **Método de eletroforese de proteínas TRIS/TRICINA modificado para identificação da hidrólise de caseínas ao longo da maturação de queijos**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2019. 6 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 238).

MORA-ESCOBEDO, R.; ROBLEZ-RAMIREZ, M.; RAMÓN-GALLEGOS, E. Effect of protein hydrolysates from germinated soybean on cancerous cells of the human cervix: and "in vitro" study. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 271-278, 2009.

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the ranger from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

STEPHAN, M. P.; AZEVEDO, T. de L.; MELLINGER-SILVA, C.; SANTOS, A. A. dos; FURTADO, A. A. L.; PONTES, S. M. **Implantação do método de eletroforese tris-tricina visando à identificação de peptídeos em croquete de CMS de tilápia**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2013a. 4 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 197).

STEPHAN, M. P.; AZEVEDO, T. de L.; FELBERG, I.; MELLINGER-SILVA, C.; SANTOS, A. A. dos; PEREIRA, J. de N.; OLIVEIRA, D. R. de; CARRÃO-PANIZZI, M. C. Implantação de método de eletroforese SDS-PAGE para identificação da presença de grãos contendo lipoxigenase em extrato de soja. In: AMERICAS: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SOYBEAN UTILIZATION, 2013, Bento Gonçalves. **Proceedings...** Brasília, DF: Embrapa, 2013b.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações e Editoração da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente
Esdras Sundfeld

Secretária-executiva
Virgínia Martins da Matta

Membros

André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janice Ribeiro Lima, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Melicia Cintia Caldeano, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial
Janine Passos Lima da Silva

Revisão de texto
Regina Celi de Araujo Lago

Normalização bibliográfica
Elizabete Alves de Almeida Soares

Tratamento das ilustrações
André Luis do Nascimento Gomes

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa
Fabiano Marques Dourado Bastos

CGPE 15571