

COMUNICADO
TÉCNICO

121

São Carlos, SP
Outubro, 2023

Embrapa

Extração e análise das estruturas secundárias das kafirinas nos corpos proteicos de sorgo sacarino

Lucimara Aparecida Forato
Fernanda Raposo
Rubens Bernardes Filho

Extração e análise das estruturas secundárias das kafirinas nos corpos proteicos de sorgo sacarino

Lucimara Aparecida Forato, Química, Doutora, Embrapa Instrumentação. Fernanda Raposo, Bacharel em Química, USP/IQSC, Rubens Bernardes Filho, Físico, Doutor, Embrapa Instrumentação.

Introdução

Assim como a cana-de-açúcar, o sorgo sacarino contém um colmo rico em sacarose e que pode ser utilizado na produção de etanol, possuindo a vantagem de apresentar um ciclo de crescimento curto, cerca de 120 dias contra doze meses para cana-de-açúcar (Gomes, 2014). Além do colmo, o sorgo contém grãos ricos em kafirinas, que são as proteínas de reserva do sorgo. Assim como as zeínas, prolaminas do milho, as kafirinas são hidrofóbicas (portanto insolúveis em água) e apresentam capacidade de formação de filmes e revestimentos comestíveis (Ribeiro et al., 2022).

As kafirinas representam de 68 a 70% das proteínas totais do sorgo, e, pela SDS/PAGE, podem ser classificadas em frações proteicas denominadas de kafirinas α , β , γ e δ . As kafirinas são extraídas em solução de água/álcool e representam cerca de 80 a 84% das kafirinas totais. Elas apresentam duas bandas no gel de SDS/PAGE, com massas relativas (M_r) de 23 e 25 KDa, conhecidas como frações α_2 e α_1 , respectivamente (Belton, 2006).

Estudos realizados na década de 1970 indicaram um alto conteúdo de estruturas helicoidais (40%) para kafirinas em solução de t-butanol a 60%.

Os estudos foram conduzidos pelas técnicas de dispersão óptica rotatória e dicroísmo circular (Wu et al., 1971). Gao et al., (2005) analisaram kafirinas α extraídas com misturas água/etanol por FTIR, utilizando o acessório de reflexão atenuada total (ATR), e obtiveram uma razão de 1,39:1 de estruturas α -hélices:folhas β . Duodu et al. (2001) analisaram as proteínas do sorgo nos corpos proteicos, organelas onde as kafirinas são depositadas, por FTIR, e observaram de 50 a 60% de estruturas do tipo α -hélice. Ribeiro et al (2022) analisaram as estruturas das kafirinas, extraídas com etanol 70%, no estado sólido por RMN e FTIR, e concluíram que essas proteínas têm estrutura predominante helicoidal.

As kafirinas, assim como as zeínas, são depositadas em organelas conhecidas como corpos proteicos (CP). Há evidências de que as proteínas de reserva são sintetizadas no retículo endoplasmático e então depositadas no lúmen, onde se agregam em corpos proteicos, os quais são degradados durante a germinação da semente. No entanto, os CP podem ser encontrados em algumas sementes maduras de cereais, como o sorgo (Taylor et al., 1985). A vantagem de se analisar as estruturas das kafirinas nos corpos proteicos é que não há necessidade de utilização de solventes orgânicos para

sua extração, os quais poderiam causar algum efeito desnaturante sobre as proteínas.

Assim, foram extraídos CPs de grãos de sorgo BRS Ponta Negra (marrom com tanino) e os mesmos foram analisados por FTIR e microscopia de Força atômica (MFA).

Materias e Métodos

Preparação dos CP de sorgo

Grãos de sorgo BRS Ponta Negra foram gentilmente cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo. Os grãos foram moídos e peneirados, e o óleo da farinha resultante foi extraído em sistema Soxhlet com hexano por 24 h. Após extração do óleo, adicionou-se a 1 volume de farinha de sorgo, 3 volumes de solução tampão: tris-HCl- 200 mmol/L; sacarose 200 mmol/L; KCl 60 mmol/L, MgCl₂ 50 mmol/L, pH 8,5) sob agitação por 6 h, 500 x g por 20 min. O sobrenadante foi centrifugado a 40.000 x g por 1,5 h. O resíduo desta última centrifugação foi lavado com água na razão 1:5 (resíduo:água) e então liofilizado (Bicudo et. al., 2007).

Remoção do amido

Notou-se nos espectros na região do infravermelho que havia grande quantidade de amido agregado aos corpos proteicos. Para remover o amido presente na amostra, foi tomada como base a metodologia proposta por Paredes-López et. al., (2006), utilizando uma solução tampão de fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 6,5) contendo 1% de α -amilase e 20% de CP em massa. Essa mistura foi submetida a agitação magnética durante 3 h, a 50°C.

Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Pastilhas da amostra com KBr foram preparadas com 1 mg da proteína e 100 mg de KBr. As análises por espectroscopia no IV foram realizadas em um espectrômetro de FTIR Perkin Elmer, modelo Paragon 1000. Os espectros foram obtidos com 16 varreduras, na região de 400 a 4000 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

Cálculo das estruturas secundárias (ES) das kafirinas nos corpos proteicos de sorgo por FTIR

Foi utilizado um método de reconhecimento de padrões já desenvolvido para se calcular as ES das kafirinas nos CP de sorgo a partir dos espectros de FTIR (Forato et. al., 1998). Para tanto os espectros sofreram correção da linha de base de 2100 a 900 cm⁻¹ e normalização na região de 1800 a 1200 cm⁻¹. A região utilizada para o cálculo foi a de 1800 a 1600 cm⁻¹. O software livre Octave foi utilizado para o uso do método de reconhecimento de padrões e cálculo das ES.

Microscopia de Força Atômica (MFA)

As análises de MFA foram feitas em um microscópio Veeco modelo Dimension V utilizando cantilíveres Veeco para modo não-contato, com frequência de ressonância de 190 Khz.

Resultados

Análise das proteínas nos CP de sorgo FTIR

Na Figura 1 pode-se notar que o

espectro em preto apresenta bandas típicas de proteínas em, aproximadamente, 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} (Banda de amida I) e 1550 cm^{-1} (Banda de Amida II). Além disso, é possível observar que apresenta bandas típicas de amido, em 1050 cm^{-1} , aproximadamente. O espectro em vermelho (Figura 1) foi adquirido para os corpos proteicos após a remoção do amido de acordo com a metodologia proposta por Paredes-López et. al., (2006).

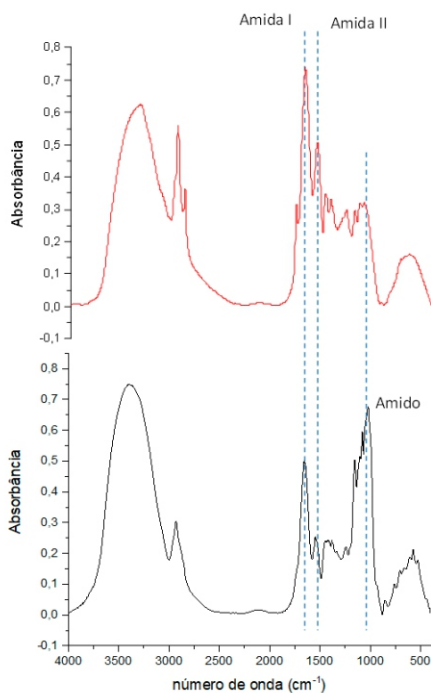


Figura 1: Espectros de FTIR dos CP do sorgo antes (em preto) e após digestão com amilase (vermelho).

A partir do espectro de FTIR dos CP do sorgo após a digestão com amilase, as ES das kafirinas foram calculadas pelo método de reconhecimento de padrões (Tabela 1).

Tabela 1: ES das kafirinas nos CP de sorgo BRS Ponta Negra, após remoção do amido com amilase e calculadas pelo método de reconhecimento de padrões aplicado aos espectros de FTIR.

α -hélice (%)	Folhas β (%)	Voltas (%)	Outras estruturas (%)
41	20	24	14

Pela tabela 1, verificou-se que as kafirinas nos CP têm estrutura predominante helicoidal, concordando com os resultados obtidos para essas proteínas após extração com etanol 70% (Ribeiro et. al., 2022).

Análise das proteínas por Microscopia de Força Atômica (MFA)

Os corpos proteicos do sorgo sacarino Ponta Negra foram analisados por Microscopia de Força Atômica. Na Figura 2 é apresentada a imagem dos CP, após remoção do amido, depositados em superfície de mica.

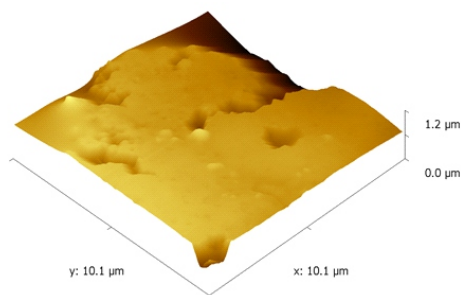


Figura 2: Imagem de MFA de CP de sorgo ponta negra em mica.

Na Figura 3 é apresentada uma expansão da Figura 1, onde é possível visualizar o CP isolado com medida de $1\ \mu\text{m}$.

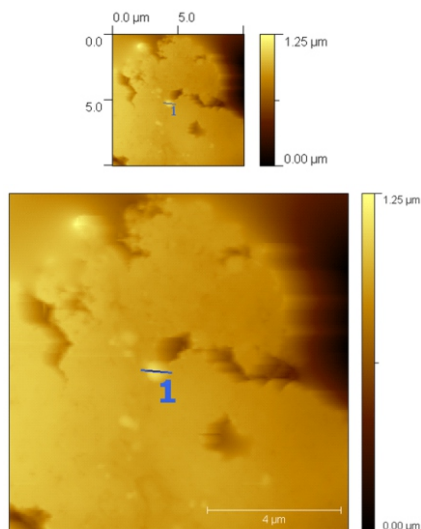


Figura 3: Imagem de MFA indicando a presença de uma estrutura esférica de CP de sorgo sacarino.

Conclusão

Pela análise dos espectros de FTIR, conclui-se que a extração dos CP do sorgo sacarino com a digestão do amido pela amilase foi bem sucedida, uma vez que os espectros apresentaram somente sinais típicos de proteínas. Pelo uso do método de reconhecimento de padrões, verificou-se que as kafirinas nos CP do sorgo tem estrutura predominante helicoidal, de acordo com os dados da literatura para as kafirinas extraídas com soluções alcoólicas. Pelas imagens de MFA, verificou-se que a estrutura esférica do CP foi preservada após sua extração.

Referências

BELTON, P.S.; DELGADILLO, I.; HALFORD, N.G.; SHEWRY, P.R. Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.*, v. 44, p. 272-286, 2006.

BICUDO, T.C.; BICUDO, R.C.; FORATO, L.A.; BELTRAMINI, L.M.; BATISTA, L.A.R.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L.A. ©-Zein Secondary Structure in Solution by Circular Dichroism. *Biopolymers*. v. 89, p. 175-178, 2007.

DUODU, K.G.; TANG, H.; GRANT, A.; WELLNER, N.; BELTON, P.S.; TAYLOR, R.N. FTIR and Solid State ^{13}C NMR Spectroscopy of Proteins of Wet Cooked and Popped Sorghum and Maize. *J. Cereal Sci.*, v. 33, p. 261-269, 2001.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 259, n.1, p. 136-141, 1998.

GAO, C.; TAYLOR, J.; WELLNER, N.; BYARUHUANGA, Y.B.; PARKER, M.L.; MILLS, E.N.C.; BELTON, P.S. Effect of Preparation Conditions on Protein Secondary Structure and Biofilm Formation of Kafirin. *J. Agr. Food Chem.*, v. 53, p. 306-312, 2005.

GOMES, S.C.M.P. Produção de etanol utilizando mix de sorgo sacarino e cana-de-açúcar em processo de maturação. Unesp – Jaboticabal, 2014. Dissertação de Mestrado. 48p.

PAREDES-LÓPEZ, O.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; CÁRABEZ-TREJO, A. Enzymatic Production of High-Protein Amaranth Flour and Carbohydrate Rich Fraction. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 4, p. 1157-1161, 2006.

RIBEIRO, T.S., SCRAMIN, J.A., RODRIGUES, J.A.S., BERNARDES FILHO, R., COLNAGO, L.A., FORATO, L.A. ^{13}C ss-NMR Singular value decomposition and fitting for sorghum proteins conformation elucidation. *Polímeros*, v. 32, n.1, e2022009, 2022. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20210082>

TAYLOR, J.R.N.; NOVELLIE, L.; LIEBENBERG, W. Protein Body Degradation in the Starchy Endosperm of Germinating Sorghum. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n. 169, p.1287-1295, 1985.

WU, Y.V.; CLUSKEY, J.E.; JONES, R.W. Sorghum Prolamins: Their Optical Rotatory Dispersion, Circular Dichroism, and Infrared Spectra. **J. Agr. Food Chem.**, v.19, n.6, 1139-1143, 1971.

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 São Carlos, SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (2023): tiragem 100



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



Comitê Local de Publicações

Presidente

Daniel Souza Corrêa

Membros

Elaine Cristina Paris

Maria Alice Martins

Cristiane Sanchez Farinas

Cíntia Cabral da Costa

Carlos Renato Marmo

Paulo Renato Orlandi Lasso

Maria do Socorro Gonçalves de Souza Monzane

Imagem da capa

*Imagem de microscopia de força atômica
de corpos proteicos de sorgo sacarino*

Autoria: Rubens Bernardes Filho

Editoração eletrônica e

tratamento das ilustrações

Valentim Monzane