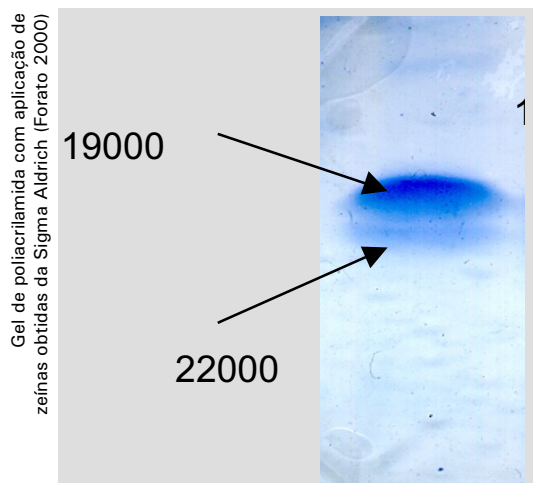


Análise de Zeínas α do Milho por LC-ESI-Q/TOF



Rogério C. Bicudo¹
Tatiana C. Bicudo²
Lucimara Aparecida Forato³
Luiz Alberto Colnago⁴
Fernando Mauro Lanças⁵

As zeínas, proteínas de reserva do milho, têm sido bastante estudadas pelo interesse que despertam tanto sob o aspecto nutricional quanto tecnológico. Elas constituem uma importante fonte protéica na dieta humana uma vez que representam cerca de 80% das proteínas do milho, estando presentes na alimentação humana, seja pelo consumo direto ou pelo consumo de carne de aves e suínos que têm sua alimentação à base de milho.

O interesse tecnológico pelas proteínas de reserva do milho, assim como para a maioria das matérias primas de origem biológica, vem da possibilidade destas substituírem derivados de petróleo, principalmente por serem biodegradáveis e renováveis, diminuindo o impacto ambiental. No caso das zeínas, o interesse é devido também a algumas propriedades, como alta hidrofobicidade, que, por exemplo, permite a confecção de filmes comestíveis para cobertura de medicamentos e alimentos, protegendo-os da umidade e do oxigênio (FORATO, 2000).

No milho, as proteínas correspondem à aproximadamente 10% da massa seca dos grãos, o amido corresponde de 70 a 80%, os açúcares solúveis de 1 a 4% e o óleo de 3 a 6%.

As proteínas do milho são constituídas de aproximadamente 20% de globulinas e albuminas (proteínas solúveis em água ou solução salina), 40% prolaminas (proteínas insolúveis em água e solúveis em álcool 70%) e 40% de glutelinas (proteínas insolúveis em água e álcool). As proteínas desses dois últimos grupos

são também conhecidas como proteínas de reserva. As prolaminas são comuns a todos os cereais e são ricas em prolina e glutamina. No milho, as prolaminas são denominadas zeínas. A maioria das glutelinas tornam-se solúveis em álcool após redução das ligações de dissulfeto, e também têm sido classificadas como prolaminas (zeínas) por várias semelhanças de seqüência e composição de aminoácidos. Assim, as zeínas totais representam cerca de 80 % das proteínas do milho.

As zeínas totais, que são extraídas com álcool e agente redutor de ligações de dissulfeto, são compostas de um grande número de proteínas que têm sido caracterizadas principalmente por eletroforese (SDS/PAGE) (FORATO, 2000). Nas zeínas, são identificadas 6 frações com massas relativas de 10, 14, 16, 19, 22 e 28 kDa.

As zeínas α compreendem as proteínas de 19 kDa (Z19) e 22 kDa (Z22) e representam de 75 a 85% das zeínas totais. A eletroforese (SDS/PAGE) da fração solúvel em álcool apresenta bandas variando de 19-22 kDa (Z19) e de 22-26 kDa (Z22). A análise dos DNA complementares (cDNA) e genes revelaram que essas proteínas continham 210-220 e 240-245 aminoácidos, e apresentaram estruturas muito similares. Na Fig. 1, é apresentado um diagrama da seqüência de aminoácidos das proteínas Z19 e Z22. Essas proteínas têm domínios não repetitivos nos terminais carboxi e amino e repetições homólogas na região central. A Z19 tem 9 blocos de repetições homólogas de 20 aminoácidos e a Z22 tem 10

¹Químico, Doutorando, IQSC/USP

²Químico, Dra., IQSC/USP

³Química, Dra., Pesquisadora, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua 15 de Novembro 1452, São Carlos, SP, Brasil, 13560-970, e-mail: lucimara@cnpdia.embrapa.br

⁴Farmacêutico, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua 15 de Novembro 1452, São Carlos, SP, Brasil, 13560-970, e-mail: colnago@cnpdia.embrapa.br

⁵Químico, Dr., Professor IQSC/USP

blocos. Na literatura considera-se que a Z22 também tem 9 blocos e o décimo bloco está inserido na região carboxi-terminal (FORATO, 2000).

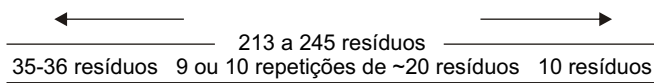


Fig. 1: Diagrama da seqüência de aminoácidos das zeínas Z19 e Z22 (Forato, 2000)

No presente trabalho, as zeínas foram analisadas por espectrometria de massas (MS - do inglês "mass spectrometry"), que tem se tornado um método para análise de proteínas e peptídeos. Por definição, o espectrômetro de massas consiste de uma fonte de íons, um analisador de massas que mede a razão massa/carga (m/z) dos analitos ionizados e um detector que registra o número de íons para cada valor m/z. A ionização por eletronebulização (ESI do inglês "electrospray ionization") e a espectrometria de ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI do inglês "matrix-assited laser desorption/ionization") são as duas técnicas mais comumente usadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos para análise por espectrometria de massas (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Há várias opções de analisadores de massa sendo as combinações mais comuns o tempo de voo (TOF do inglês "time of flight") conectado à MALDI e triplo quadrupolo (QQQ), quadrupolo/TOF (Q/TOF) ou analisador de massas por captura de íons acoplado à ESI (NYMAN, 2001).

Para se analisar a seqüência de uma proteína por espectrometria de massas é necessário digeri-la com uma enzima. Com o advento dos equipamentos com analisadores de massas Q/TOF e TOF/TOF é possível fazer a identificação da proteína e obter sua seqüência baseada na análise dos peptídeos gerados pela digestão enzimática (NYMAN, 2001).

Um espectro de massas resultante de uma proteína digerida por enzima fornece as massas dos peptídeos resultantes da digestão. Muitas vezes é possível identificar proteínas a partir dessa informação. Este método de identificação é mais confiável do que se usar padrões de migração de eletroforese em gel ou tempos de retenção por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

Neste trabalho, foram analisadas zeínas α obtidas da Sigma Chemical. Para os experimentos com espectrometria de massas fez-se uso da técnica de LC-MS/MS por meio do acoplamento entre o cromatógrafo capLC e o espectrômetro de massas Q/TOF, ambos da Waters/Micromass.

A amostra foi digerida com uma mistura de enzimas (tripsina e quimiotripsina) e os peptídeos gerados foram separados por cromatografia líquida capilar, com uma coluna de fase reversa, em linha com o espectrômetro de massas. Assim, os peptídeos separados foram analisados pelo Q/TOF nos modos MS e MS/MS. Abaixo, estão mostrados os cromatogramas dos peptídeos selecionados para o modo MS/MS do espectrômetro de massas (Fig. 2).

Após toda a corrida de LC-MS/MS, os dados resultantes foram processados e pesquisados no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), com o auxílio do software MASCOT. Os

resultados fornecidos pelo software estão sumarizados na Tabela 1 e na Fig. 3. Na tabela 1 são listadas as proteínas (e suas características), do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), relacionadas pelo programa MASCOT, com pontuação ("score") acima do recomendado, > 68, para esta análise (padrão de zeínas α). A pontuação do íon é dada por $-10 \cdot \log(P)$, onde P é a probabilidade de que a combinação observada é um evento aleatório. As pontuações de íons individuais acima de 68 indicam identidade ou extensa homologia ($p < 0,05$). A pontuação das proteínas é derivada das pontuações dos íons, e tem base não probabilística na ordenação das mesmas. Abreviações: N° A. número de acesso do proteína no NCBI, M. M. massa molecular, pI ponto isoelétrico, N° P. I. número de peptídeos identificados, % C. P. porcentagem de cobertura da proteína.

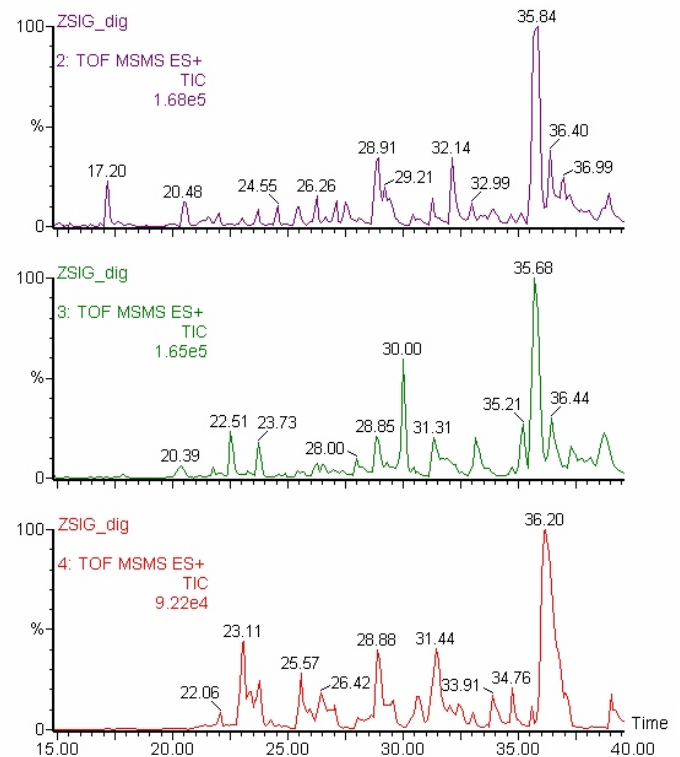


Fig. 2: Cromatogramas (TIC) dos peptídeos, da zeína α da sigma digerida com uma mistura de enzimas (tripsina e quimiotripsina), selecionados (função 2,3 e 4) para o modo MS/MS; as funções 2, 3 e 4 são as responsáveis pela seleção dos picos mais intensos de cada espectro de MS.

Tabela 1: Proteínas (e suas características), do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), relacionadas pelo programa MASCOT, com pontuação ("score") acima do recomendado.

ORGANISMO	DEFINICAO (PROTEINA)	N° A.	M. M.	pI	N° P. I.	PONTUACAO (*VER FIGURA 3)	% C. P.
Zea mays	1.Precursor Zeina	22538	26238	8,41	4	180	19
Zea mays	2. Zeina M6	224513	26226	8,41	4	178	19
Zea mays	3. Zeina α B3 19kDa	16305129	26264	8,52	4	176	19
Zea mays	4. Sem Definicao	22529	26224	8,52	4	176	19
Zea mays	5. Precursor Zeina 19kDa (clone c219C1)	72310	26238	8,52	4	176	19
Zea mays	6. Zeina A.20	224508	26184	8,52	4	176	19
Zea mays	7. AZS22-8 Zeina α 22kDa	13606089	29015	8,85	5	156	19

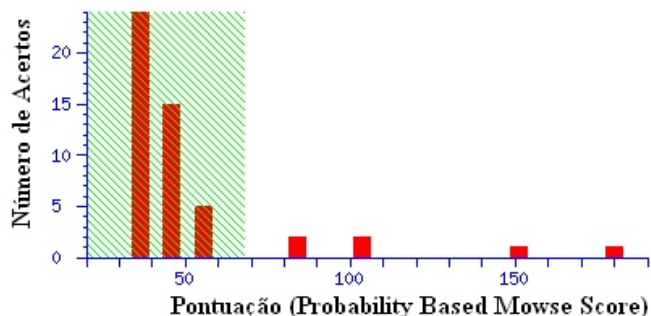


Fig. 3: Gráfico de pontuação (Probability Based Mowse Score) pelo número de acertos. Tal gráfico foi fornecido pelo MASCOT como resultado da pesquisa feita no banco de dados, com as informações resultantes da análise, por LC-MS/MS, da zeína α digerida. O algoritmo MOWSE (MOlecular Weight SEarch) emprega base probabilística na determinação da pontuação. Quanto maior a distância da região hachurada, em verde, maior a confiabilidade da identificação.

Considerações finais

De acordo com a Tabela 1, nota-se que todas as proteínas listadas são derivadas do milho (*Zea mays*) e, além disso, são zeínas. As seis primeiras proteínas mostradas foram identificadas por quatro peptídeos comuns em suas seqüências de aminoácidos. Elas apresentam diferenças mínimas nas suas seqüências, possuem massas moleculares, pontos isoelétricos e pontuações (score) muito próximas e apresentaram o mesmo grau de cobertura. Assim, conclui-se que essas seis proteínas estão relacionadas à zeína α Z19. Já a sétima proteína listada está relacionada à zeína α Z22.

Portanto, utilizando-se a técnica de LC-ESI-Q/TOF, foi possível identificar as duas proteínas que compõem a zeína α : Z19 e Z22.

Referências

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature, insight review articles*, London, v. 422, p. 198-207, 2003.

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das Zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. Review. *Biomolecular Engineering*, New York, v. 18, p. 221-227, 2001.

Comunicado Técnico, 77

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: 16 3374 2477

Fax: 16 3372 5958

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição

1a. impressão 2006: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane