



## Método para Fracionamento de Proteínas de Feijão por Eletroforese SDS-PAGE

Marília Penteado Stephan<sup>1</sup>  
Sidinéa Cordeiro de Freitas<sup>2</sup>

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) desidratado vem sendo estudado pelo fato de apresentar, mesmo após a etapa de aquecimento, a presença da atividade inibitória de tripsina. Muitos questionamentos estão voltados para os efeitos adversos que esta atividade representa em relação à digestibilidade protéica e ao valor nutritivo do feijão.

Os inibidores de proteases são proteínas de ampla distribuição no reino animal, capazes de inibir as atividades da tripsina, quimiotripsina, amilase e carboxipeptidase (Bender, 1987; Xavier-Filho & Campos, 1989). Estes caracterizam-se por serem moléculas protéicas, que em feijão apresentam pesos moleculares que variam de 8 a 23 kDa, podendo estes valores serem maiores em decorrência do método de fracionamento usado. Devido a esta natureza protéica, o estudo da atividade destes inibidores tem sido feito utilizando-se métodos convencionais de extração de proteína.

A presença de inibidores de protease em uma larga variedade de tecidos animais e vegetais é de ocorrência natural. Nos tecidos animais estes inibidores têm um papel importante devida a sua função de regular inúmeros processos biológicos, incluindo o catabolismo de macromoléculas protéicas. Entretanto, o papel destes inibidores de protease em tecido vegetal ainda não está claro. Existem algumas possibilidades para que estes compostos ocorram em vegetais, entre elas: a) como agentes reguladores de proteinases endógenas; b) como proteínas de reserva;

c) como agente protetor direcionados para a função de atuar sobre proteinases de insetos ou microrganismos (Liener & Kakade, 1980). A pesquisa sobre estes inibidores de protease esteve mais voltada para os inibidores de tripsina, encontrados nas sementes de leguminosas, mais especificamente soja e feijão, pelo fato destes serem os responsáveis pelos baixos valores nutricionais de leguminosas cruas (Pereira & Costa, 2002; Xavier-Filho & Campos, 1989).

Este trabalho teve como objetivo implantar, com algumas modificações, a mesma técnica de extração de proteínas utilizada para análise de inibidor de tripsina como alternativa de obtenção de extratos protéicos para fracionamento destas macromoléculas por eletroforese em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliácridamida, contendo dodecil sulfato de sódio).

### Eletroforese de Proteínas

#### Condições de utilização da eletroforese SDS-PAGE

Neste estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Para o gel de corrida foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e no gel de aplicação da amostra esta foi utilizada na concentração de 4%. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100V.

<sup>1</sup>Farmac., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup>Eng. Quím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: sidi@ctaa.embrapa.br

Os marcadores de peso molecular dos padrões de proteínas utilizados foram (em kDa): 97–fosforilase b; 66–albumina; 45–ovalbumina; 30–anidrase carbônica; 20,1–inibidor de tripsina; 14,4– $\alpha$  lactalbumina. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “coomassie blue R250”, durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético (40% e 10%, respectivamente), durante três horas.

### Preparação de amostra de extrato protéico de feijão

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas sementes de feijão da variedade pérola, provenientes da Embrapa Arroz e Feijão. O método de extração de proteína usado na análise de inibidor de tripsina pôde também ser aplicado para análise destas moléculas protéicas por eletroforese, mediante a inclusão de uma etapa de centrifugação. A extração foi feita durante 3 horas em NaOH 0,01M, utilizando-se para isto 5 g de semente moída. O extrato bruto (Fig. 1A) obtido foi centrifugado durante 20 min, a 4000 rpm.

### Análise de proteínas de feijão em eletroforese SDS-PAGE

Os extratos obtidos foram avaliados quanto a atividade inibitória de tripsina. Este ensaio foi feito seguindo o protocolo recomendado pela American Association of Cereal Chemists (American..., 1995), que descreve que o mesmo deve ser realizado sem a etapa de centrifugação da amostra. Para quantificar a fração protéica foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). Visando obter dados relativos ao teor de proteína em uma faixa de concentração acima de 12 kDa, introduziu-se a etapa de diálise, usando uma membrana com peso molecular de exclusão de 12 kDa. Portanto, o extrato obtido na extração alcalina foi aplicado no gel para a eletroforese nas seguintes formas: a) não dialisado (Fig. 1B) b) dialisado (Fig. 1C) em tampão fosfato 20mM, durante 48 horas.

O teor de proteína solúvel obtida no extrato de feijão para a variedade Pérola, apresentou um valor de 1,632 para o tratamento dialisado e 1,704 para o não dialisado.

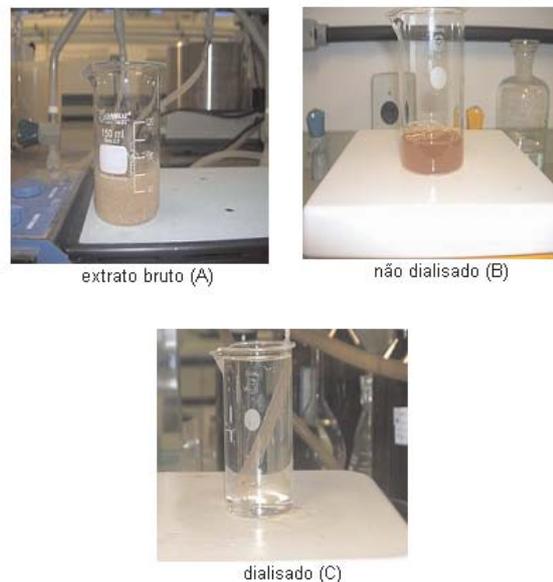
Pode-se verificar uma queda dos níveis de proteína de aproximadamente 0,1mg/mL, o que demonstra que somente uma pequena parte deste material protéico é passível de permear por uma membrana com peso molecular de exclusão de 12 kDa (Tabela 1).

O resultado da análise da atividade de inibidor de tripsina mostrou um teor de 199,5 UIT/mg de proteína, para feijão da var. pérola.

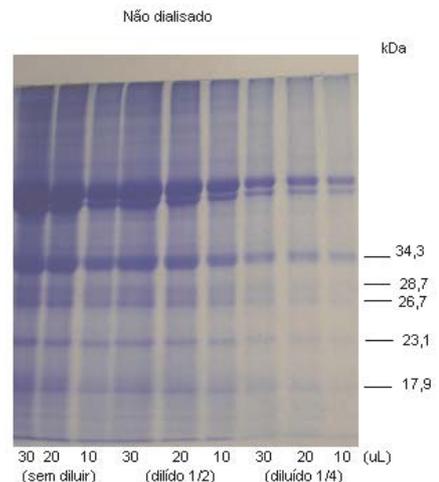
O teor encontrado mostra estar próximo ao descrito por Genovese & Lajolo (1996) o qual foi de 170,4 UIT/mg de proteína para feijão da variedade Carioca. Enquanto que, Rayas-Duarte et al., (1992), observaram um teor mais baixo de atividade de inibidor de tripsina (138,6 UIT/mg de proteína) para variedade “Black Beauty”.

**Tabela 1.** Teores de proteína solúvel do extrato de feijão (var. pérola).

Tratamento	Proteína mg/mL
Dialisado	1,632
Não dialisado	1,704



**Fig. 1:** Extratos de feijão (var. Pérola): extrato bruto (A), extrato não dialisado (B) e extrato dialisado (C)



**Fig. 2.** Perfil protéico dos extratos de feijão (var. pérola) não dialisados

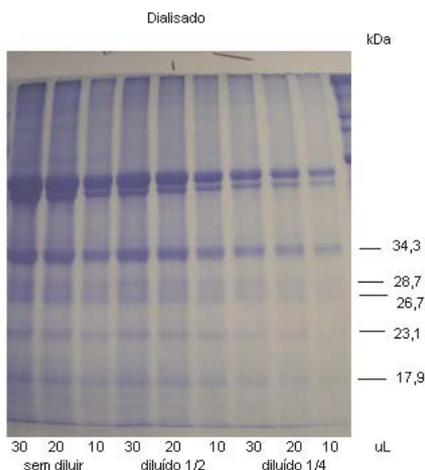


Fig. 3: Perfil proteico dos extratos de feijão (var. pérola) dialisados

O gel de poliacrilamida da corrida realizada com extratos submetidos a etapa de diálise se mostrou sem manchas e com os bandeamentos mais nítidos do que daquele oriundo de extratos não dialisados. A melhor concentração de proteína foi observada na diluição de 1/2, aplicando-se 20 µL de amostra, que equivale a aproximadamente 16 µg de proteína. No gel observa-se as bandas de peso molecular (em kDa): 34,3; 28,7; 26,7; 23,1 e 17,9, que podem corresponder aos inibidores de protease presentes em feijão (var. pérola).

## Considerações Finais

Esta estratégia metodológica pode ser útil para futuros estudos de diferenciação proteica entre variedades de feijão. Assim, pode-se fazer uma analogia da diferença de atividade de inibidor de tripsina com a visualização de alguma banda proteica específica para uma variedade. Apesar do tratamento dialisado mostrar um gel mais limpo e sem muito sombreamento, o tratamento sem dialisar pode ser escolhido pela praticidade e rapidez de análise que este permitirá.

## Referências Bibliográficas

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the ...** 9<sup>th</sup> ed. St. Paul, Minn., 1995.

BENDER, A. E. Effects on the nutritional balance: antinutrients. In: Watson, D.H. **Natural toxicants in food: progress and prospects**. London: Ellis Horwood International, 1987. p. 110-124.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Inibidores de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris*): isoformas e estabilidade térmica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Alimento, população e desenvolvimento**. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. p. 1335-1338.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 33, p. 680-685, 1970.

LIENER, I. E.; KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In: LIENER, I.E. (Ed.). **Toxic constituents of plant food stuffs**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1980. p. 7-71.

PEREIRA, C. A. S.; COSTA, N. M. B. Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, p. 5-14, 2002.

RAYAS-DUARTE, P.; BERGERON, D.; NIELSEN, S. Screening of heat-stable Trypsin Inhibitors in Dry Beans and their Partial Purification from Great Northern Beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin-Sepharose Affinity Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC., v. 40, p. 32-42., 1992

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. **Proteinase inhibitors**. In: CHEEK, P.R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v. 3, p. 1-27.

### Comunicado Técnico, 81

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) 2410-9500  
**Fax:** (0XX21) 2410-1090 / 2410-9513  
**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>  
**E-mail:** [sac@ctaa.embrapa.br](mailto:sac@ctaa.embrapa.br)

1ª edição  
 1ª impressão (2005): versão on-line

### Comitê de publicações

**Presidente:** Regina Isabel Nogueira  
**Membros:** Maria da Graça Fichel do Nascimento, Maria Ruth Martins Leão, Neide Botrel Gonçalves, Ronoel Luiz de O. Godoy, Virginia Martins da Matta

### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria Ruth Martins Leão  
**Revisão de texto:** Comitê de Publicações  
**Editoração eletrônica:** André Luis do N. Gomes  
 André Guimarães de Souza