



Adaptação de método de extração e caracterização das proteínas extraídas de presunto submetido à alta pressão

Marília Penteado Stephan¹
Adriana Paula Slongo²
Rosires Deliza³
Amauri Rosenthal⁴

Introdução

Uma linha de pesquisa baseada em processos não convencionais de processamento de alimentos, na qual estão incluídos processos não térmicos, deu origem à tecnologia capaz de preservá-los por meio de tratamento à alta pressão. Esta tecnologia consiste em submeter o alimento a pressões elevadas que chegam a atingir 800MPa. Estes valores diferenciados de pressão são responsáveis pela inativação de microrganismos e de enzimas dos alimentos, proporcionando uma extensão da vida-de-prateleira do produto. Dessa maneira, de acordo com Cheftel (1995) e Barbieri (2005), a conservação das características dos alimentos tem uma melhora bastante acentuada. Trata-se de processo bastante rápido que utiliza poucos segundos e não envolve aquecimento muito alto. As temperaturas de processamento podem não ultrapassar 60°C e, portanto, alterações nas características como, cor, aroma e sabor são muito menores do que em processos convencionais (Barbosa-Cánovas & Rodriguez, 2002; Barbieri, 2005). Estas pressões hidrostáticas podem alterar a estrutura terciária e quaternária das proteínas, o que conseqüentemente pode causar a inativação de muitas enzimas (Heremas, 1982). Segundo Heremas (1982), as proteínas tendem a se desnaturar, dissociar ou precipitar irreversivelmente a pressões que variam entre 106 MPa e 318 MPa.

O músculo é o principal componente da carne, sendo este composto por três classes de proteínas: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. As proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em água e representam 30-35% da proteína total da musculatura esquelética. As miofibrilares se caracterizam por serem solúveis em soluções de alta concentração de sais e de perfazerem 52-56% de toda proteína muscular. As estromáticas são insolúveis em solventes aquosos e perfazem o total de 10-15% de toda proteína muscular (Sgarbieri, 1996). Quando se caracteriza as proteínas quanto à sua função biológica, dentro dos nove grupos encontrados (estruturais, transporte, defesa, hormonais, fatores de crescimento, proteínas catalíticas, contráteis, receptoras e de transferência de elétrons), destaca-se que a miosina e a actina pertencem ao grupo das proteínas contráteis que compõem o tecido muscular. A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica que permite a identificação de massa molecular de cadeias polipeptídicas separadas após aplicação de uma corrente elétrica. Através da comparação da distância percorrida por uma molécula protéica de massa molecular desconhecida com outras de padrões com massa molecular conhecida pode-se estimar a massa molecular das diferentes cadeias polipeptídicas visualizadas no gel após coloração com um agente de cor específico para proteína.

¹ 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

² Eng. Alim., Bolsista UFSC/DEQA. E-mail: aslongo@enq.ufsc.br

³ Eng. Alim., PhD, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: rodeliza@ctaa.embrapa.br

⁴ Eng. Alim., PhD, Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: arosent@ctaa.embrapa.br

O objetivo deste estudo foi de adaptar um método de extração de proteínas de presunto submetida à esterilização em duas diferentes condições de alta pressão (200 e 400 MPa) e obter um padrão de identificação das cadeias polipeptídicas, após separação e caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) como agente desnaturante.

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 tensão de 100V. Os marcadores de alta massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 200–miosina ; 116- β -galactosidase; 97-fosforilase b; 66-soralbumina ; 45-ovalbumina. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 97-fosforilase b; 66–soralbumina ; 45–ovalbumina; 30-anidrase carbônica; 20-inibidor de tripsina; 14,4-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 da amostra de extrato protéico de presunto para análise das cadeias polipeptídicas em eletroforese (SDS-PAGE) e resultados

Para este estudo foram utilizados pedaços de presunto previamente submetidos a dois diferentes níveis de pressão (200 e 400MPa). Utilizou-se 10g deste material e 30mL de solução extratora contendo tampão fosfato 20mM e KCl 0,45M para a extração em blender, durante 2 minutos. Após esta homogeneização o extrato bruto foi centrifugado a 3000rpm e, posteriormente, desengordurado com 2 volumes de éter de petróleo. Após a separação das fases em funil de decantação, foram retirados 10mL da fase aquosa e adicionados 20mL de acetona. O “pellet” protéico obtido foi centrifugado a 3000rpm e, posteriormente, ressuscitado em 5mL do mesmo tampão utilizado para a extração. Desta amostra, duas vezes concentrada, foram retirados 30iL e aplicados em gel de poliacrilamida, utilizando-se as condições e padrões conforme descrito acima. Este procedimento foi uma adaptação do método descrito por Chang-Lee (1990), aplicado para extração de proteínas de surimi. O que diferencia os dois trabalhos são as seguintes modificações: a) utilização tampão fosfato contendo já a alta concentração de sal (KCl 0,45M), o que permite a extração conjunta de proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares; b) inclusão da etapa de desengorduramento; c) inclusão da etapa de concentração das proteínas.

Os resultados são mostrados na Tabela 1 e ilustrados na Fig. 1.

Tabela 1. Valores de massa molecular das cadeias polipeptídicas separadas por eletroforese SDS-PAGE, com suas respectivas intensidades de coloração.

Massa Molecular (kDa)	200 MPa		400 MPa	
	Tempo de exposição à alta pressão (min.)		Tempo de exposição à alta pressão (min.)	
	5	15	5	15
198	X	X	X	X
58	Y	Y	X	X
44	Y	X	Y	X
42	Y	X	Y	X
38	Z	Z	Z	Z
36	Z	Z	Z	Z
30	X	Y	X	Y
25	Y	Y	X	X
20	Y	Y	X	X
17	Y	X	A	A

X- fracamente corada, Y- fortemente corada, Z- coloração extra forte, A- ausência de cadeia polipeptídica

Na Fig. 1 pode-se observar o gel de poliacrilamida contendo cadeias polipeptídicas que variaram em número e intensidade de coloração, de acordo com o tratamento utilizado (Tabela 1). As proteínas de massas conhecidas (padrões) foram aplicadas, em paralelo, e submetidas a corrida com outros quatro extratos contendo proteínas desconhecidas. Estes extratos foram provenientes dos tratamentos de 200 MPa (5 e 15 minutos) e de 400 MPa (5 e 15 minutos). Através da comparação da distância de migração das proteínas desconhecidas com as de massa conhecida pôde-se calcular a massa das proteínas presentes nos quatro extratos. As proteínas miofibrilares que se caracterizam por serem solúveis em soluções de alta concentração de sais e de se apresentarem em maior concentração em tecido muscular (52-56%), foram observadas nos extratos em estudo, na seguinte

forma: a) uma banda fracamente corada de 198 kDa (Fig. 1 e Tabela 1), que representa a cadeia pesada de miosina; b) três bandas que variam em intensidade de coloração de acordo com o tratamento, 25, 20 e 17 kDa que representam as cadeias leves de miosina; c) duas bandas intensamente coradas de 38 e 36 kDa que possivelmente representam cadeias de actina.

Observa-se que a mudança de intensidade de cor das cadeias polipeptídicas, junto com a ausência de aparecimento de algumas bandas variou de acordo com o tratamento de alta pressão e com os tempos de aplicação. Esta mudança pode ser decorrente da desnaturação da proteína que possivelmente se tornou insolúvel, o que impossibilitou a sua extração. Resultados similares foram obtidos em tilápia submetido à alta pressão (Ko & Hsu, 2002).

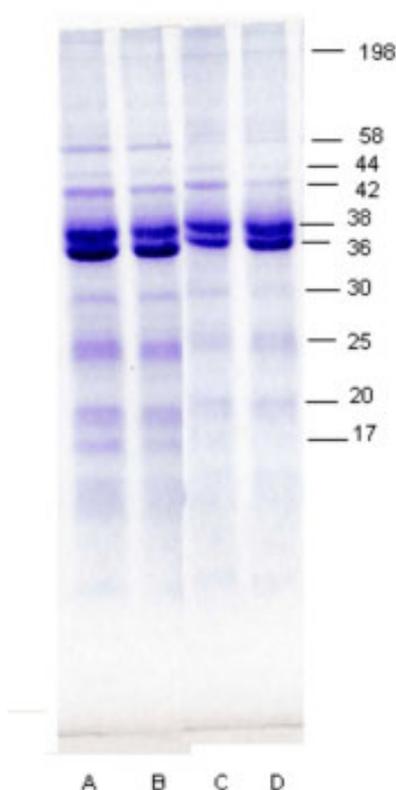


Fig. 1. Perfil eletroforético das proteínas extraídas de presunto submetido a diferentes pressões e tempos. (A: 200 MPa, 5 min; B: 200 MPa, 15 min.; C: 400 MPa, 5 min; D: 400 MPa, 15 min.)

Considerações Finais

Esta metodologia pode ser útil para futuros estudos de padrão de identificação de presuntos submetidos à alta pressão. O método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também se diferenciou de outros descritos na literatura que utilizam outros tampões e ausência de etapa de desengorduramento. O método

se mostrou rápido e preciso e, com isto, pôde-se observar bandeamentos típicos de proteínas miofibrilares. Como esperado, pode-se concluir que na pressão de 400 MPa houve maior desnaturação das proteínas em relação ao tratamento de 200 MPa. Esta evidência foi caracterizada pelo bandeamento menos intenso no tratamento de 400 MPa.

Referências Bibliográficas

BARBIERI, J. **FEA testa tecnologia para processamento de alimentos**. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/setembro2005/ju301pag02.html>. Acesso em: 25 out. 2005.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; RODRIGUEZ, J. J. Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v. 54, n. 11, p. 513-520, 2002.

CHANG-LEE, M. V.; LAMPILA, L. E.; CRAWFORD, D. L. Yield and composition of surimi from Pacific Whiting (*Merluccius products*) and effect of various protein additives on gel strength. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 83-86, 1990.

CHEFTEL, J. C. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v. 1, n. 1, p. 75-90, 1995.

HEREMAS, K. High pressure effects on proteins and other biomolecules. **Annual Review Biophysics Bioengineering**, v. 11, p. 1-17, 1982.

KO, W. C.; HSU, K. C. Effect of high-pressure storage on the processing quality of tilapia meat. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**, v. 19, p. 411-416, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

Comunicado Técnico, 96

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

1ª edição

1ª impressão (2006): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Márcia Nitschke, Ronoel Luiz de O. Godoy e André Luis do Nascimento Gomes*
Secretárias: *Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes*

Expediente

Supervisor editorial: *André Luis do N. Gomes*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações*
Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Guimarães de Souza e André Luis do N. Gomes*