

Foto: Marília Penteado Stephan



Implantação do Método de Eletroforese Tris-tricina para Identificação de Peptídeos em Croquete de Carne Mecanicamente Separada de Tilápia

Marília Penteado Stephan¹
Tatiana de Lima Azevedo²
Caroline Mellinger Silva³
Alexsandro Araújo dos Santos⁴
Angela Aparecida Lemos Furtado⁵
Sérgio Macedo Pontes⁶

Introdução

A eletroforese SDS-PAGE é uma técnica bem difundida e bastante útil para separação de proteínas (LAEMMLI, 1970). O gel preparado é constituído por uma matriz polimérica de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida que, quando preparado em diferentes concentrações, permite uma modificação da rede entrecruzada formada durante sua polimerização. Quanto maior a concentração de acrilamida menores serão os poros formados na malha do gel. Entretanto, o uso desta técnica se limita à caracterização de proteínas com massa molecular superior a 10kDa. A necessidade de identificação de cadeias peptídicas de baixa massa molecular, entre 1 a 100kDa, permitiu o desenvolvimento de uma técnica alternativa em que há a substituição do tampão glicina pela tricina (SCHÄGGER; JAGOW, 1987). A tricina tem uma carga negativa maior do que

a glicina o que permite que esta molécula migre mais rapidamente no gel. Esta também tem uma maior força iônica o que causa uma movimentação maior deste íon em relação à proteína. Esta característica permite que proteínas de baixa massa molecular sejam mais facilmente separadas em gel com menor percentual de acrilamida.

Algumas propostas têm sido estudadas buscando estimular o consumo de carne de pescado no Estado do Rio de Janeiro, pela elaboração de produtos agroindustriais alternativos a partir da utilização de carne mecanicamente separada (CMS), subproduto gerado após a filetagem do pescado. O objetivo deste trabalho foi implantar a técnica de eletroforese tris-tricina para a identificação de possíveis peptídeos formados durante o processamento de croquete formulado à base de CMS de tilápia.

¹ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marilia.stephan@embrapa.br

² Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana.azevedo@embrapa.br

³ Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, caroline.mellinger@embrapa.br

⁴ Técnico em Alimentos, técnico da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, alexsandro.santos@embrapa.br

⁵ Engenheira Química, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, angela.furtado@embrapa.br

⁶ Químico Industrial, técnico da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sergio.pontes@embrapa.br

Preparação do croquete de CMS de tilápia

A carne mecanicamente separada de tilápia foi adquirida da Cooperativa Regional de Psicultores e Rancultores do Vale do Macacu e Adjacências (RJ). O processo de separação da polpa (carne) e carcaça (resíduos) se deu em despolpadeira de pescado e o material foi transportado congelado até a Embrapa Agroindústria de Alimentos onde foi armazenado em câmara de congelamento à -18°C . Os croquetes de CMS de tilápia foram preparados conforme a seguinte formulação: CMS de tilápia (65,7 %), sal de cozinha (2,1 %), glutamato monossódico (3,9 %), coentro fresco (0,3 %), cebola desidratada (0,4 %), azeite de oliva (3,9 %), suco de limão (0,4 %), leite de vaca integral (11,5 %), farinha de trigo (11,8 %). As amostras foram empanadas usando ovo e farinha de rosca e, posteriormente, congeladas. O processo de fritura se deu em fritadeira elétrica utilizando-se óleo de soja a 210°C por 2 min.

Extração das proteínas de CMS *in natura*, croquete de tilápia frito e não frito

O preparo dos extratos proteicos de CMS *in natura*, croquete frito e não frito foi realizado segundo a metodologia descrita por Stephan et al. (2011), em três etapas consecutivas utilizando a mesma amostra. Para a primeira extração foram utilizadas 10 g de amostra em 30 mL de tampão-fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20 mM pH 7,5), homogeneizadas em *blender* por 2 min e centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4°C . Para a segunda extração repetiu-se o procedimento anterior utilizando o precipitado obtido na centrifugação anterior. Na terceira extração homogeneizou-se o precipitado resultante da segunda extração com 30 mL de tampão fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20 mM + KCl 0,45M pH 7,5) em *blender* por 2 min e centrifugou-se a 4000 rpm por 15 min e 4°C . As proteínas do croquete frito e não frito foram extraídas também com solução carbonato (0,05 M de Na_2CO_3 , 12 % de sacarose, 1 % SDS e 6 M de ureia) nas mesmas condições descritas para a primeira extração.

Identificação de peptídeos utilizando o método de eletroforese SDS-PAGE Tris-tricina

Para o presente estudo foi utilizado o sistema de eletroforese da marca Bio-Rad e a metodologia de preparação dos géis descrita por Schagger e Jagow (1987). Para polimerização do gel de corrida foram utilizadas soluções de dois monômeros (acrilamida / bis) em três diferentes concentrações: a) 4 % e 3 % no gel de aplicação da amostra b) 10 % e 3 % para o gel de espaçamento c) 16,5 % e 3 % para o gel

de separação. As amostras foram preparadas para aplicação solubilizando-se 100 μL do extrato em 200 μL de tampão (4 % SDS, 12 % glicerol, 50 mM de Tris, 2 % β -mercaptoetanol, 0,01 % azul de Coomassie G250 em pH 6,8). A corrida foi realizada em duas etapas: a primeira de 15 h sob uma tensão de 38 V e a segunda, de 8 h, sob uma tensão de 100 V. Para identificação dos peptídeos foi utilizado o padrão de massa molecular ultra baixa, com as seguintes proteínas (em kDa): triose-fosfato isomerase (26,625); mioglobina (16,950); α -lactalbumina (14,437); aprotinina (6,512); insulina β -oxidada (3,496); bacitracina (1,423). O gel foi colocado em solução fixadora (50 % metano, 10 % ácido acético) por 1 h. Após este período foi colocado em solução corante (0,025 % de azul de Coomassie G250 em ácido acético 10 %) por 2 h. O descolorimento do gel foi realizado em solução descorante (ácido acético 10 %) por 2 h, trocando a solução a cada 30 min. O gel foi lavado com água destilada e seco no sistema de secagem de gel de eletroforese (marca Bio-Rad, modelo 583) por 2 h.

Avaliação do perfil de peptídeos das amostras de CMS *in natura* e dos croquetes

Na Figura 1, pode-se observar a separação dos peptídeos extraídos nas amostras de CMS de tilápia *in natura*, croquete cru e croquete frito, utilizando o gel de Tris-tricina. Os resultados obtidos para CMS *in natura* foram utilizados como modelo comparativo para as análises das amostras de massa crua e frita. No perfil das duas primeiras extrações (tampão fosfato) realizadas na amostra de CMS *in natura*, pode-se observar a presença das proteínas sarcoplasmáticas. Na terceira extração (fosfato/KCl), pode-se observar as proteínas de maior massa molecular, retidas no gel de espaçamento e algumas outras proteínas miofibrilares presentes no gel de corrida. O mesmo não ocorre para as amostras de croquete cru e frito, observando-se uma menor intensidade das bandas no gel. Dentre os tampões estudados, o tampão carbonato foi o que permitiu uma melhor extração dos peptídeos e proteínas presentes nas amostras proporcionando uma melhor visualização das bandas de diferentes massas molares.

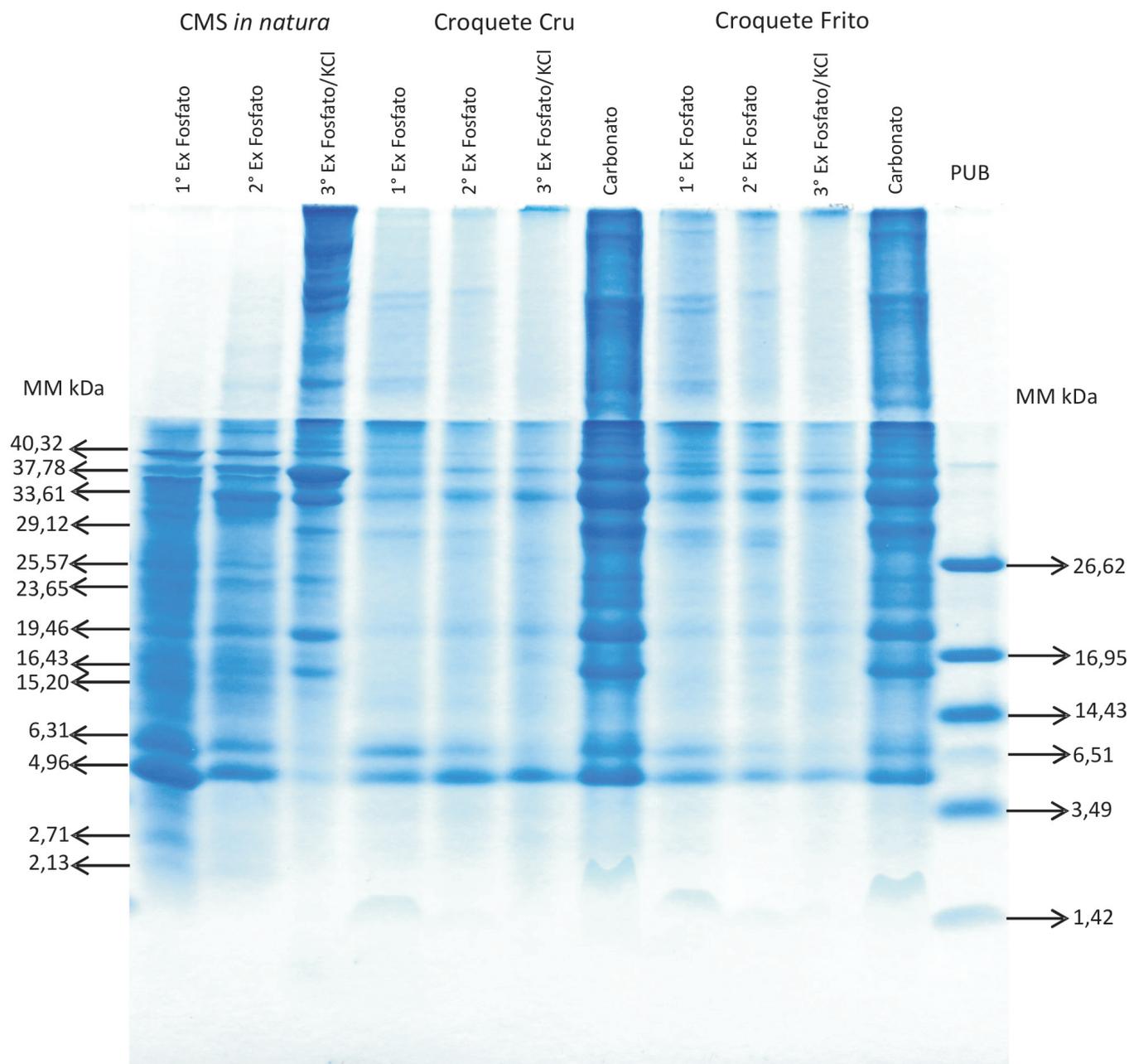


Figura 1. Perfil de peptídeos presentes nas amostras de CMS de tilápia *in natura*, croquete cru, croquete frito e do padrão de massa molecular ultra baixa (PUB).

No processo de preparo do croquete a CMS de tilápia foi submetida a tratamento térmico (cozimento) e depois homogeneizada aos demais ingredientes da formulação. O efeito da temperatura na modificação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares de peixes e carnes tem sido observado (LARREA et al., 2006; RAGHUNATH et al., 1995). Isto provavelmente explica porque os tampões fosfato e fosfato/KCl não foram eficazes na extração dos peptídeos no material processado. Desta forma, devido ao alto grau de desnaturação das proteínas durante o tratamento térmico, foi necessária a utilização do tampão carbonato.

A técnica de eletroforese SDS-PAGE Tris-tricina implantada gerou resultados satisfatórios para a separação e caracterização dos padrões de peptídeos na faixa de 1-26 kDa (ultra baixa), como observado na Figura 1. Logo, este procedimento permitiu a identificação separação e caracterização dos peptídeos na faixa de massa molecular ultra baixa. O perfil de proteínas encontradas nas amostras *in natura* e processada foi similar, mantendo-se a integridade nutricional da carne nos produtos. Deve-se ressaltar que estudos têm mostrado a modificação desta técnica para caracterização de inibidores de proteases na faixa de até 490 Da (LE; KATUNUMA, 2004).

Conclusão

O tampão carbonato foi o que melhor permitiu a extração dos peptídeos do croquete de CMS de tilápia. Não foi observada hidrólise dos peptídeos presentes na CMS após o tratamento térmico e fritura do croquete. Isto indica a integridade proteica da CMS e de suas características nutricionais, mostrando o potencial valor industrial deste coproduto. A técnica de eletroforese SDS-PAGE Tris-tricina foi implantada e perfeitamente adequada para a análise de peptídeos na faixa de 1-26 kDa.

Referências

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, Aug. 1970.
- LARREA, V.; HERNANDO, I.; QUILES, A.; LLUCH, M. A.; PÉREZ-MUNUERA, I. Changes in proteins during Teruel dry-cured ham processing. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 586-593, Nov. 2006.
- LE, Q. T.; KATUNUMA, N. Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris (hydroxymethyl) aminomethane- Tricine buffer system. **Analytical Biochemistry**, v. 324, n. 2, p. 237-240, Jan. 2004.
- SCHÄGGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, Nov. 1987.
- STEPHAN, M. P.; AZEVEDO, T. de L.; LOBO, C. M. de O.; CARDOSO, D. de O.; TORREZAN, R.; FURTADO, A. A. L. **Estudo comparativo do padrão de identidade e da atividade proteolítica do pescado oriundo de híbridos de cachara e pintado**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. 4 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 181).
- RAGHUNATH, M. R.; SANKAR, T. V.; AMMU, K.; DEVADASAN, K. Biochemical and nutritional changes in fish proteins during drying. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 197-204, Feb. 1995.

Comunicado Técnico, 197

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) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2013): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De G. Castro Freitas
Revisão de texto: Janine Passos Lima da Silva
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin