

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO

### ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012

Maria Alice Martins  
Morsyleide de Freitas Rosa  
Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Nicodemus Moreira dos Santos Junior  
Odílio Benedito Garrido de Assis  
Caue Ribeiro  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

**Editores**

Fortaleza, CE  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**  
Rua XV de Novembro, 1452,  
CEP 13560-970 – São Carlos, SP  
Fone: (16) 2107-2800  
Fax: (16) 2107-2902  
<http://www.cnpdia.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,  
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
<http://www.cnpat.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpat.embrapa.br](mailto:sac@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa  
Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira  
Milori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra  
Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.  
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula  
Herrmann Júnior

**Comitê de Publicações da Embrapa  
Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama  
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim  
Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana  
Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano  
Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley  
Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner

Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures  
Mourão, Viviane Soares

Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares

Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabricio Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes,  
Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice,  
Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior

Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui  
violação dos direitos autorais (Lei nº. 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Instrumentação

---

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São  
Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa. Morsyleide de  
Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemos Moreira  
dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz  
Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria  
Tropical.



## CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DE KAFIRINAS POR SDS/PAGE E FTIR.

**Juliana Aparecida Scramin<sup>1</sup>, José Avelino Santos Rodrigues<sup>2</sup>; Odílio B. G. Assis<sup>3</sup>; Rubens Bernardes Filho<sup>3</sup>, Lucimara Aparecida Forato<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Aluna de doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, SP, [ju.biotec08@gmail.com](mailto:ju.biotec08@gmail.com);

<sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG;

<sup>3</sup>Pesquisadores, Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP.

**Projeto Componente:** PC3 e PC6

**Plano de Ação:** 1 e 2

### Resumo

As kafirinas foram extraídas com etanol 70% com e sem uso agente redutor, elas foram caracterizadas pela SDS/PAGE e suas estruturas secundárias avaliadas FTIR. A SDS/PAGE revelou que as kafirinas extraídas sem agente redutor são ricas em kafirinas  $\alpha$  e  $\gamma$  com traços da fração  $\beta$ . Na presença de agente redutor observou-se uma banda intensa para a fração  $\alpha$  e traços das frações  $\beta$  e  $\delta$ . Com o FTIR pôde-se determinar que as kafirinas obtidas sem uso de agente redutor têm estruturas predominantemente  $\alpha$  hélice. A diminuição dessas estruturas foi observada para kafirinas extraídas com agente redutor e está relacionada à ausência das kafirinas  $\gamma$  devido à redução das ligações dissulfeto.

**Palavras-chave:** Kafirinas, FTIR, SDS/PAGE, Estruturas Secundárias, Agente Redutor

### Introdução

As Kafirinas, também denominadas de prolamínas, são proteínas de reserva do sorgo assim como as Zeínas do milho. Estas correspondem à aproximadamente 70% das proteínas totais do grão de sorgo e podem ser classificadas, de acordo com a sua solubilidade, em Kafirinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  sendo que as primeiras são as mais abundantes, representam de 80 a 84% das kafirinas totais e podem ser encontradas, através de bandas reveladas pela SDS/PAGE, na forma de Kafirinas  $\alpha 1$  que apresentam massa relativa ( $M_r$ ) de 23 a 25 KDa e Kafirinas  $\alpha 2$  com  $M_r$  de 19 a 22 KDa. As Kafirinas  $\gamma$  apresentam  $M_r$  de 27 KDa e as  $\beta$   $M_r$  de 15 a 18 KDa [1]. O interesse por essas proteínas está relacionado com a elevada percentagem de aminoácidos apolares como fenilalanina, leucina e isoleucina presentes na cadeia peptídica, tornando-as proteínas hidrofóbicas [2]. Contudo, estudos

estruturais sobre essas proteínas são escassos e em geral elas têm sido comparadas com as zeínas em sua conformação. Entretanto dados encontrados na literatura indicaram um alto conteúdo de estruturas helicoidais (40%) para kafirinas em solução de t-butanol a 60% [3]. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi extrair as Kafirinas, caracterizá-las pela SDS/PAGE e analisar as suas estruturas secundárias (ES) no estado sólido, pois são proteínas insolúveis, pela espectroscopia na região do infravermelho (IV).

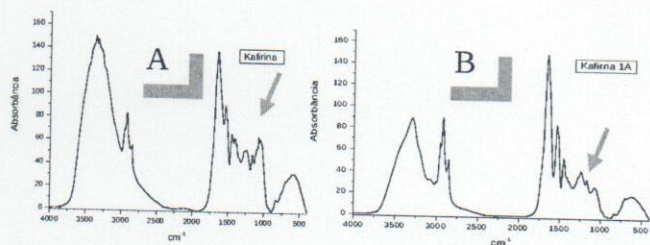
### Materiais e métodos

As kafirinas foram extraídas do cultivar de Sorgo BR 501 fornecido pela Embrapa Milho e Sorgo. A metodologia de extração consistiu na moagem do grão e em seguida na extração do óleo em soxlet com hexano. Após a extração do óleo, a farinha de sorgo foi agitada por 6 horas em solução aquosa de NaCl 1,25 Mol/L para remoção das

albuminas e globulinas e filtrada a vácuo. A massa residual foi agitada por 24 horas em etanol 70% para a extração das kafirinas e filtrada a vácuo. Após a evaporação do etanol em temperatura ambiente as amostras contendo kafirinas foram secas em estufa a 35°C. Devido à co-purificação de amido juntamente com a fração protéica, após a extração, uma parte das amostras de kafirinas foi agitada em solução aquosa contendo 100 mM de Bissulfito de Sódio para romper essas ligações. Para a obtenção dos espectros de IV foi utilizado um espectrômetro de FTIR Perkin Elmer modelo Paragon 1000. Os espectros foram obtidos com 16 varreduras, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e as amostras foram analisadas sob a forma de pastilha de KBr contendo 1 mg de proteína. As ES foram calculadas por um método de reconhecimento de padrões, utilizando a banda de amida I (1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ ). A separação eletroforética das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (SDS/PAGE). Em cada poço aplicou-se 5 $\mu\text{L}$  de amostra e as bandas obtidas foram comparadas com bandas de Mr já conhecidas.

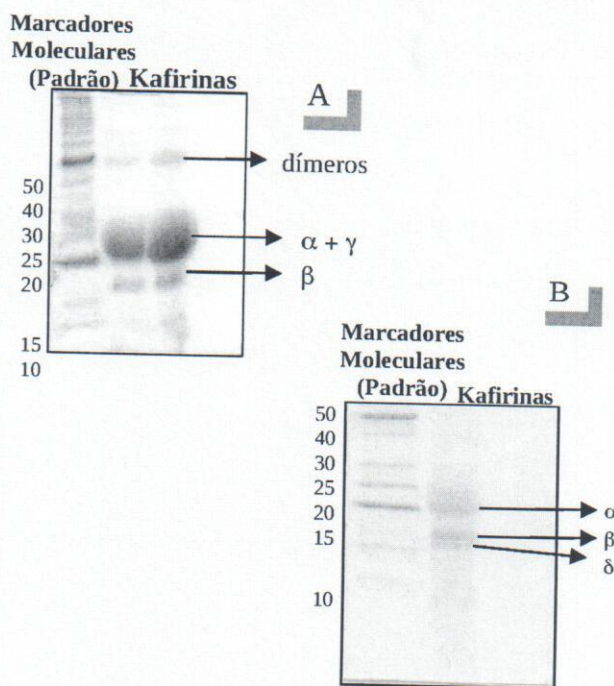
## Resultados e discussão

Na fig. 1A representada pelo espectro de Kafirinas extraídas sem adição de agente redutor após sua extração podem-se observar bandas típicas de proteínas como Amida I na região de 1600 – 1700  $\text{cm}^{-1}$ , Amida II em 1450 – 1550  $\text{cm}^{-1}$  e também bandas, indicadas pela seta na região de 1050  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente, típicas de amido [4]. Na fig. 1B está o espectro de Kafirinas após a lavagem com bissulfito de sódio, agente redutor responsável pela quebra das ligações de S-S. Observou-se também bandas típicas de proteínas Amida I, II e III, bem como Amida A na região de 3100  $\text{cm}^{-1}$ . Contudo nota-se no espectro a ausência do amido.



**Fig. 1:** Espectro de IV das kafirinas. 1A: kafirinas extraídas com etanol 70%, 1B: kafirinas extraídas com etanol 70% e lavadas com solução aquosa de bissulfito de sódio,

Através do padrão eletroforético para kafirinas purificadas sem agente redutor, fig. 2A, foram reveladas, , bandas de alta massa molecular próximas a 50 KDa consideradas dímeros. Além disso, bandas intensas de aproximadamente 17-18 KDa referente às Kafirinas  $\beta$  e um aglomerado na região que se estende de 20 a 28 KDa referente às Kafirinas  $\alpha + \gamma$  foram também visualizadas. Já para as kafirinas purificadas na presença de agente redutor, fig. 2B observou traços de aproximadamente 14 KDa referentes à Kafirina  $\delta$ , a Kafirina  $\beta$  pode ser visualizada aproximadamente em 15-17 KDa e a Kafirina  $\alpha_2$  que apresenta maior proporção, revelou Mr em torno de 19 – 22 KDa. O agente redutor age na despolimerização das proteínas (ruptura das ligações de dissulfeto S-S) e a banda de elevada Mr 45 KDa observada no gel com proteínas extraídas sem agente redutor desapareceu. Como as Kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$  apresentam uma forte tendência a formarem ligações de dissulfeto com outras proteínas ou entre si, essas ligações foram quebradas revelando bandas de menor intensidade, o desaparecimento das Kafirinas  $\gamma$  e o surgimento de uma nova banda de baixa intensidade em aproximadamente 14 KDa, atribuída à Kafirina  $\delta$ .



**Fig.2:** A: Perfil eletroforético das Kafirinas extraídas do cultivar Br 501 sem agente redutor. B: com agente redutor.

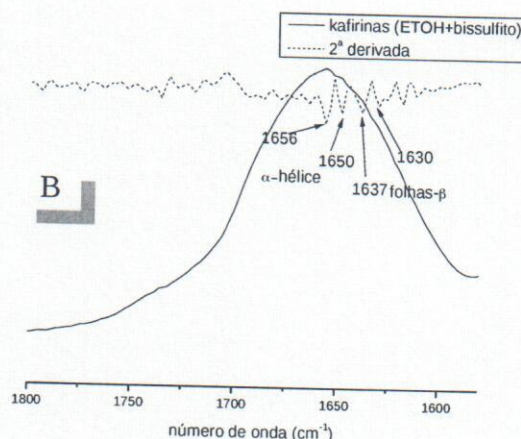
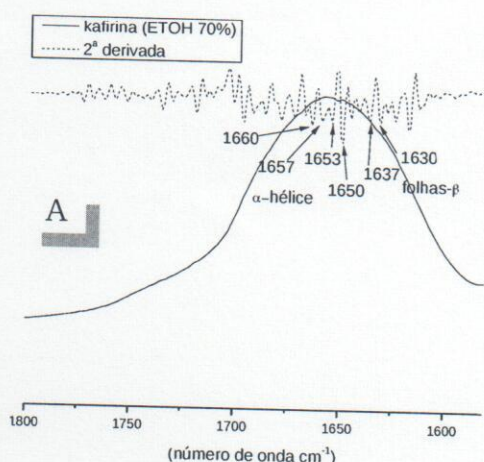
Na tab. 1 estão representados os valores obtidos em porcentagem para kafirinas purificadas com e sem agente redutor.

**Tab. 1:** Valores, em %, das ES de kafirinas purificadas com e sem agente redutor.

Estruturas	Kafirinas extraídas com etanol 70% sem agente redutor	Kafirinas extraídas com etanol 70% com agente redutor
$\alpha$ Helice	45%	34%
Folha $\beta$	20%	33%
Volta	24%	25%
Outras Estruturas	11%	13%

Em geral, as kafirinas possuem estrutura secundária predominantemente helicoidal. Esse resultado de 45% de  $\alpha$  hélice está de acordo com dados encontrados na literatura. Essa maior proporção de estruturas  $\alpha$  helice para kafirinas extraídas sem agente redutor está relacionada com a presença de frações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Entretanto, proteínas extraídas com agente redutor apresentaram uma diminuição das estruturas  $\alpha$  helice. Isso pode estar relacionado com a ausência das kafirinas  $\gamma$  que contribuíam para o aumento dessas estruturas [5].

Abaixo, na fig. 3, estão representados os espectros de IV das kafirinas extraídas com e sem agente redutor da região de amida I (expansão da região de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) e sua segunda derivada (parte superior).



**Fig. 3:** Espectro das kafirinas com aumento de resolução da banda de amida I e sua segunda derivada

Através desses espectros pode-se calcular a segunda derivada e observar picos referentes às ES. Os picos nas regiões de 1650 a 1660  $\text{cm}^{-1}$  são considerados estruturas  $\alpha$  hélice, em maior proporção na fig. 3A para proteínas extraídas com etanol 70% e em menor proporção para proteínas extraídas com agente redutor, fig. 3B. Já os sinais abaixo de 1645  $\text{cm}^{-1}$  são considerados estruturas do tipo folha  $\beta$ .

## Conclusões

Com os resultados das análises obtidas por FTIR e SDS/PAGE pode-se notar que as frações protéicas quando extraídas somente com etanol 70% apresentam um aglomerado de elevada Mr. (dímeros) decorrente das ligações (S-S) entre as proteínas. As kafirinas  $\gamma$  são proteínas solúveis somente em aquosa após redução das ligações dissulfeto. Com isso, quando as frações proteicas foram extraídas com bissulfito de sódio (agente redutor) e analisadas por eletroforese nota-se somente a presença das kafirinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e o surgimento de traços  $\delta$  e o desaparecimento dos dímeros. Pela técnica de FTIR pôde-se calcular as ES das kafirinas e os resultados obtidos nos mostram que quando as proteínas foram extraídas com agente redutor apresentaram uma diminuição as estruturas  $\alpha$  hélice referente ao desaparecimento das kafirinas  $\gamma$ . Isto condiz com resultados obtidos pela SDS/PAGE.

---

**Agradecimentos**

---

CAPES, EMBRAPA, REDE AGRONANO, FINEP e CNPq.

---

**Referências**

---

1. P.S. Belton; I. Delgadillo; N.G. Halford; P.R. Shewry. *J. of Cereal Scin.* 2006, 44, 172-286.
  2. C. A. Pina da Cruz Nunes. Tese, Universidade de Aveiro. 2000.
  3. Y.V. Wu, J.E. Cluskey, R.W. Jones. *J. Agr. Food. Chem.* 1971, 19, 1139.
  4. L.A. Forato. Dissertação. Universidade de São Paulo, 1996.
  5. C. Gao; J. Taylor; N. Wellner. *J. of Agric. and Food Chem.* 2005, 53, 306-312.
  6. L.A. Forato. Tese. Universidade de São Paulo, 2000.
-