

ISSN 2175-8395

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

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1a edição

1a impressão (2013): tiragem 50

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 VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

ANÁLISE DA CONFORMAÇÃO DE PROTEÍNAS DE RESERVA DO SORGO SACARINO POR RMN DE ^{13}C NO ESTADO SÓLIDO

Manoel Messias P. Miranda¹; Juliana Scramin²; Tatiana Santana Ribeiro³; José Avelino Santos Rodrigues⁴; Rubens Bernardes Filho⁵, Lucimara A. Forato⁵

¹USP, São Carlos, SP, messiasmpm@usp.br; ²Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP; ³Universidade Federal de São Carlos -Campus Araras, SP; ⁴Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; ⁵Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP.

Projeto Componente: PC 3 **Plano de Ação:** PA 2

Resumo

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no estado sólido foi utilizada para analisar a conformação das kafirinas (proteínas de reserva do sorgo sacarino). As kafirinas aqui estudadas foram obtidas com e sem adição de um agente redutor das ligações de S-S, o bissulfito de sódio. Nos espectros de RMN de ^{13}C das kafirinas obtidas sem adição de bissulfito foram observados sinais atribuídos às estruturas do tipo folhas- β , α - hélice e estruturas desordenadas, ao passo que, com o uso de bissulfito observou-se estruturas do tipo α - hélice, uma contribuição importante do tipo folha- β , além de não apresentar estruturas desordenadas. Isto é atribuído à diferente composição das frações protéicas obtidas pelos dois métodos.

Palavras-chave: kafirinas, RMN, agente redutor de ligações S-S.

Publicações relacionadas: Caracterização e avaliação das estruturas secundárias de kafirinas por SDS/PAGE e FTIR.

SCRAMIN, J. A.; RODRIGUES, J. A. S.; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES FILHO, R.; FORATO, L. A. Caracterização e avaliação das estruturas secundárias de kafirinas por SDS/PAGE e FTIR In: WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 6.; 2012, Fortaleza. Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 89-92. 2012.

Introdução

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no estado sólido é uma poderosa ferramenta para obter informações sobre os componentes das proteínas sem a destruição da amostra, enquanto as técnicas tradicionais são destrutivas e fornecem apenas informação sobre um tipo de componente da proteína. As kafirinas (ou prolaminas do sorgo) são proteínas de reserva do sorgo sacarino e podem ser encontradas no endosperma do grão de sorgo marrom ou branco correspondendo à aproximadamente 70% das proteínas totais do grão. Elas são obtidas de fontes naturais renováveis, são atóxicas e apresentam características altamente hidrofóbicas, o que possibilita o seu uso na formação de filmes comestíveis para o recobrimento tanto de frutos como de outros alimentos. As kafirinas são classificadas de acordo com sua solubilidade e representam aproximadamente 70% das proteínas

totais do sorgo. Kafirinas α representam entre 80 e 84% das kafirinas totais e apresentam bandas em 23 e 25 KDa no gel de SDS/PAGE; as kafirinas tipo γ , que correspondem de 9 a 12% das kafirinas totais e apresentam banda predominante em 28KDa; a fração β representa de 7 a 8% das kafirinas totais e aparece sob a forma de monômeros, polímeros e oligômeros com bandas em 15, 17 e 18 KDa no gel de SDS/PAGE (BELTON et al., 2006). As kafirinas apresentam elevada porcentagem de aminoácidos apolares em sua cadeia peptídica, o que as tornam hidrofóbicas. Scramin et al. (2008), analisaram as kafirinas do sorgo sacarino marrom por SDS/PAGE com e sem o uso de bissulfito como agente redutor. Foi concluído que as proteínas extraídas sem bissulfito são ricas em α e γ , com traços da fração β . Enquanto que as extrações feitas com o agente redutor obtiveram uma banda intensa para a fração alfa e uma banda de menor intensidade da fração β , notando-se a

ausência de kafirinas gama devido à redução das ligações dissulfeto, pelo uso do agente redutor.

Em relação à conformação Wu *et al.* (1971) publicaram que tais proteínas apresentam estruturas helicoidais (40%) em solução de butanol 60%. O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido para estudar as estruturas secundárias (ES) da proteína, extraída por métodos diferentes, dos grãos de sorgo sacarino BR5021. A diferença desta extração está no uso ou não do reagente bissulfito.

Materiais e métodos

O espectrômetro de RMN utilizado foi um Varian, modelo Inova 400, campo de 9,4 T.

Foram obtidos espectros de RMN ^{13}C no estado sólido com a técnica de polarização cruzada, rotação da amostra no ângulo mágico e desacoplamento de alta potência, conhecida como CPMAS. Usou-se um pulso de $\pi/2$ de 4 μs , tempo de contato de 1ms, 1024 pontos, tempo de repetição de 3s, desacoplador com banda de 60 KHz e janela espectral de 40 KHz. As amostras foram empacotadas em rotores de zircônia de 5 mm e submetidas a uma rotação no ângulo mágico de 8 KHz. Foram obtidos 1000 transientes e os espectros foram filtrados com função de decaimento exponencial ($\text{lb} = 20$). Primeiramente foi realizada a expansão entre os sinais, que foi de δ 165 ppm a δ 200 ppm, com o objetivo de visualizar melhor os picos típicos das carbonilas que são sensíveis às estruturas secundárias da proteína. Como o sinal da carbonila é largo, foi calculada a sua segunda derivada e o ajuste do sinal, para encontrar todos os sinais correspondentes à sua estrutura.

Resultados e discussão

No espectro de RMN de ^{13}C referente à extração da proteína sem bissulfito (Fig. 1) observou-se sinais em δ 172, 174 e 176 ppm, atribuídos à carbonila de estruturas folhas- β , estruturas desordenadas e α -hélice, respectivamente.

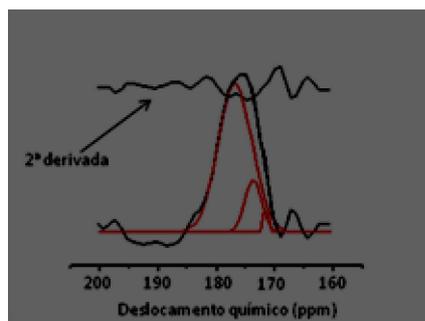


Fig. 1: Espectro expandido da carbonila das kafirinas extraídas sem bissulfito.

A quantificação das ES, pelo cálculo das áreas individuais das bandas na Fig.1, indicou 84% de estrutura α -hélice, 14% de estruturas desordenadas e 2% de estruturas folhas- β para as kafirinas obtidas sem o uso de agente redutor.

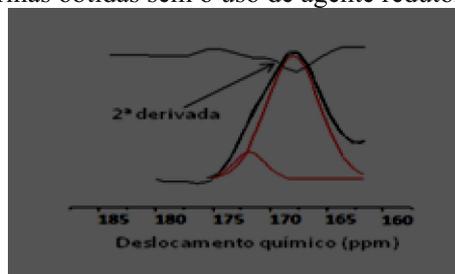


Fig. 2: Espectro expandido da carbonila das kafirinas extraídas com bissulfito. Região da carbonila em preto, áreas individuais dos picos calculadas em vermelho e segunda derivada acima do espectro.

Nas extrações com bissulfito (Fig. 2) observaram-se sinais em δ 172 e 176 ppm, atribuídos às carbonilas de estruturas folha- β e α -hélice respectivamente e indicaram que estas kafirinas possuem 89% de estrutura α -hélice e 11% de folha- β . Ambos os espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido destas proteínas são típicos de estruturas predominantes do tipo α -hélice, mas a extração com bissulfito apresentou uma contribuição importante do tipo folha- β , além de não apresentar estruturas desordenadas. Ambos os espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido destas proteínas (Fig. 3) são típicos de estruturas predominantes do tipo α -hélice, mas a extração com bissulfito apresentou uma contribuição importante do tipo folha- β , e não apresentar estruturas desordenadas. Os resultados das quantificações das ES das kafirinas com e sem o uso de agente redutor refletem a composição das frações protéicas presentes em cada caso. Como já publicado por Scramin *et al.* (2012), na ausência do bissulfito de sódio, há presença de

praticamente todas as frações protéicas das kafirinas totais, com exceção das kafirinas δ que representam somente traços destas proteínas. No caso do uso do agente redutor há a ausência da fração γ que é solubilizada após a redução das ligações S-S. Ou seja, com a ausência da fração γ há praticamente a manutenção das estruturas do tipo α -hélice e um aumento significativo das estruturas do tipo folhas β , (Fig. 3) o que pode ser atribuído a uma maior proporção das kafirinas β na amostra contendo agente redutor. Isto pode ser atribuído ao fato das kafirinas β se apresentarem como monômeros, polímeros e oligômeros, o que pode levar à formação de agregados, os quais em geral, aumentam a proporção de estruturas do tipo folhas β (GAO *et. al.*, 2005). No entanto, esta é uma hipótese que só pode ser validada com estudos estruturais das frações protéicas individuais.

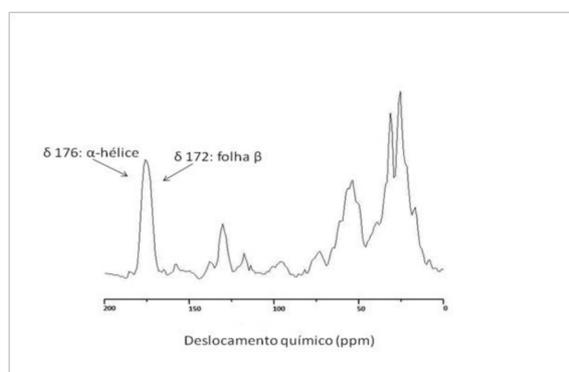


Fig. 3: Espectro de RMN CP-MAS de ^{13}C da kafirina das folhas- β

Conclusões

Nos espectros de RMN de ^{13}C referente à extração sem bissulfito observou-se sinais atribuídos a carbonila de estruturas folhas- β , α -hélice e estruturas desordenadas. Na extração com bissulfito além das estruturas do tipo α -hélice houve uma contribuição importante das estruturas do tipo folhas- β , sem a presença de estruturas desordenadas. Isto pode ser atribuído a um aumento proporcional das kafirinas β na amostra obtida com o uso do agente redutor. A maior proporção desta fração protéica pode levar a um aumento na formação de aglomerados refletindo numa maior proporção das estruturas do tipo folhas- β .

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FAPESP e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

- BELTON P. S.; DELGADILLO I.; HALFORD N. G.; SHERY P. R.; Karafine structure and functionality. *Journal of Cereal Science*. v. 44, p. 172-286, 2006.
- GAO, C., TAYLOR, J., WELLNER, N., BYARUHANGA, Y.B., PARKER, M.L., MILLS, E.N.C., BELTON, P.S.; Effect of preparation conditions on protein secondary structure and biofilm formation of kafirin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 306–312, 2005.
- SCRAMIN, J. A.; RODRIGUES, J. A. S.; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES FILHO, R.; FORATO, L. A. Caracterização e avaliação das estruturas secundárias de karifinas por SDS/PAGE e FTIR In: WORKSHOP DA REDE DE NANO TECNOLOGIA APLICADA AO AGRO-NEGÓCIO, 6.; 2012, Fortaleza. Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 89-92, 2012.
- SCRAMIN, J. A. ; BRITTO, D. ; ASSIS, O.B.G ; COLNAGO, L.A ; FORATO, L.A . Zeins Based Coatings to Protect Pears: A Preliminary Study. In: International Conference of Agricultural Engineering, Foz do Iguaçu. International Conference of Agricultural Engineering, 2008.
- WU, Y. V.; CLUSKEY J. E.; JONES R. W.; Sorghum prolamins: Their optical rotatory dispersion, circular dichroism, and infrared spectra. *Journal Agronomic Food. Chemically*. 19 (6); pages: 1139; 1971.