

### Ajuste de metodologia para obtenção de padrão de identidade (SDS-PAGE) de presunto de peru submetido à alta pressão

Marília Penteado Stephan<sup>1</sup>  
Rosires Deliza<sup>2</sup>  
Amauri Rosenthal<sup>3</sup>  
Simone Pereira Mathias<sup>4</sup>

#### Introdução

Uma linha de pesquisa baseada em processos não convencionais de processamento de alimentos, na qual estão incluídos processos não térmicos, deu origem a uma tecnologia capaz de preservá-los por meio de tratamento à alta pressão. A alta pressão é um processo de preservação que causa poucos danos ao alimento em termos de propriedades sensoriais, tais como, cor, aroma e sabor (BARBIERI, 2005; BARBOSA-CÁNOVAS; RODRIGUEZ, 2002). Esta tecnologia consiste em submeter o alimento a pressões elevadas que chegam a atingir 800 Mpa e a temperatura final não ultrapassa a 60°C. 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. 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 entre 106 MPa e 318 MPa.

As carnes são compostas de quatro tipos básicos de tecidos: muscular, epitelial, nervoso e conjuntivo (SGARBIERI, 1996). O músculo é o principal componente da carne, e é composto de três classes de proteínas: sarcoplasmáticas, miofibrilares e estromáticas. As proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em soluções de baixa força iônica e representam 30-35% da proteína total da musculatura esquelética. As miofibrilares se caracterizam por serem solúveis em soluções de alta força iônica e representam 52-56% de toda proteína muscular e 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. Do ponto de vista nutricional, com raras exceções, as proteínas de origem animal apresentam um melhor equilíbrio de seus aminoácidos

<sup>1</sup> Farmac.-bioquím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, CEP23.020-470 Rio de Janeiro - RJ. E-mail:stephan@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. Alim., PhD, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: rodeliza@ctaa.embrapa.br

<sup>3</sup> Eng. Alim., PhD, Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: arosent@ctaa.embrapa.br

<sup>4</sup> Méd. Vet. Bolsista CAPES, mestranda da UFRRJ. E-mail: spmathias@terra .com.br

## Equipamentos básicos necessários

indispensáveis e um maior índice de digestibilidade do que as de origem vegetal (SGARBIERI, 1987). A utilização de eletroforese para estudo de perfil protéico tem sido utilizada para caracterização de vários alimentos protéicos (KAISER; KRAUSE, 1985), desde a forma in natura (KAISER; KRAUSE, 1985) até a processada (CHENG; PARRISH, 1979; FRAZÃO; STEPHAN; FURTADO, 2005). Esta técnica também tem sido utilizada para identificação de espécies de peixes (CRAIG; RITCHIE; MACKIE, 1995), frutos do mar (FRAZÃO; STEPHAN; FURTADO, 2005) e carne de porco (STEPHAN et al., 2006) o que a torna muito útil quanto aos aspectos relacionados à legislação. A determinação de perfil protéico em eletroforese requer que seja extraída quantidades adequadas de proteína da matriz a ser utilizada. Além disto, em amostras provenientes de produtos cárneos estes extratos não podem conter gordura, o que impediria uma perfeita visualização das cadeias polipeptídicas no gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como agente desnaturante. A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica que permite a identificação de massa molecular de cadeias polipeptídicas separadas após aplicação de 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. O objetivo deste estudo foi adaptar um método de extração de proteínas de presunto de peru submetida à esterilização em três diferentes condições de alta pressão (200, 300 e 400MPa) e obter um padrão de identificação das cadeias polipeptídicas, após separação e caracterização por eletroforese do tipo SDS-PAGE.

## 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 uma tensão de 100V. Os marcadores de alta massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 200,0-miosina ; 116,2 -?-galactosidase; 66,2-soralbumina ; 45,0-ovalbumina. Os marcadores de baixa massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 97,4 - fosforilase b; 66,2 -soralbumina ; 45,0-ovalbumina; 31,0-anidrase carbônica; 21,5-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 de amostra de extrato protéico de presunto de peru para análise das cadeias polipeptídicas em eletroforese (SDS-PAGE) e resultados

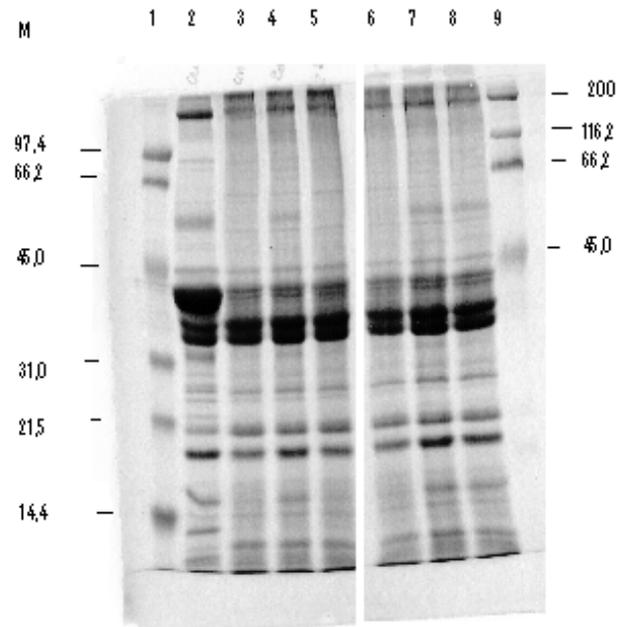
Para este estudo foram utilizados pedaços de presunto de peru previamente submetidos a três diferentes níveis de pressão (200, 300 e 400MPa). Utilizou-se 15g deste material (previamente triturado) e 30 mL de solução extratora contendo tampão fosfato 20mM, KCl 0,45M e 0,05% de Triton X-100 para realização da extração inicial em blender durante 2 minutos e posterior homogeneização em ultra-som durante mais 2 minutos . Após estas etapas de homogeneização, o extrato bruto foi filtrado em pedaço de pano de algodão para retirada das partículas sólidas. O material obtido no filtrado foi submetido a centrifugado à 4000 rpm durante 15 minutos. Dois mililitros do sobrenadante foram tratados com três volumes de acetona e colocado no congelador durante uma noite, visando desengordurar o material e precipitar as proteínas. As proteínas precipitadas com acetona, após a centrifugação, foram ressuspensas em 700  $\mu$ L do tampão TRIS-HCl pH 6,8. Desta amostra aproximadamente duas vezes concentrada, foram retirados 20  $\mu$ L e aplicados em gel de poliacrilamida, utilizando-se as condições e padrões conforme descrito acima. Deve-se enfatizar que em tentativas iniciais de ressuspender as proteínas no mesmo tampão utilizado para a extração foi observada uma forte insolubilidade da amostras. Portanto, introduziu-se esta alternativa de solubilização utilizando tampão TRIS-HCl pH 6,8. Na Figura 1 pode-se observar o gel de poliacrilamida contendo as cadeias polipeptídicas provenientes das diferentes amostras de presunto de peru (crua, processada termicamente a 680C, e tratadas com alta pressão). As proteínas de massas conhecidas (padrões) foram aplicadas, em paralelo, e submetidas a corrida com outros sete extratos contendo proteínas desconhecidas. Desta forma pôde-se fazer os cálculos de massa molecular e comparar com a amostra referência, a amostra crua (Tabela 1). Na Tabela 1 pode-se observar que quase não houve modificações no perfil de migração das proteínas das amostras processadas em comparação com a amostra crua. Estes extratos são provenientes dos tratamentos de 200 MPa (5 e 15 minutos), 300 MPa (10 minutos) e 400 MPa (5 e 15 minutos). 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%) mostraram que estão presentes nos extratos em estudo, na seguinte forma (Figura 1, Tabela 1): a) uma banda fortemente corada de 195 kDa (Figura 1-Tabela 1), que representa a cadeia pesada de miosina b) três bandas que variam em intensidade de coloração de acordo com o tratamento, 20,8, 18,7 e 15,0 kDa que representam as cadeias leves de miosina c) duas bandas intensamente

coradas de 45,0 e 41,1 kDa que possivelmente representam cadeias de actina. Das 14 cadeias polipeptídicas identificadas na amostra crua (Figura 1) somente três bandas desapareceram tanto com o tratamento térmico como para a alta pressão (74,4, 25,1 e 24,0 kDa). Possivelmente estas bandas referem-se a alguma enzima presente na fração sarcoplasmática, que também foi possível ser extraída com o tampão utilizado. Futuros estudos precisam ser realizados visando entender melhor porque houve ausência de desaparecimento de 3 diferentes bandas (55,8, 29,8 e 15,0 kDa) nos tratamentos de 200 MPa (5 minutos) e 400 MPa (5 minutos). Pode-se especular que estas bandas referem-se a produtos de degradação da cadeia pesada de miosina, proveniente de hidrólise desta cadeia. Foi verificada menor intensidade de coloração da banda de 195 kDa, que se refere à cadeia pesada de miosina. Estes resultados não estão em acordo com o descrito por Ko e Hsu (2002) que mostraram que bandas de proteínas acima de 97 Kda desapareceram com o tratamento de alta pressão (2000 e 3000 atm). Neste trabalho foi possível ver claramente que a banda de 195 kDa apareceu em todos os tratamentos (Figura 1). Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que as cadeias de miosina de alta e baixa massa molecular apareceram também em presunto de carne de porco submetido a alta pressão (STEPHAN et al, 2006). A metodologia descrita neste trabalho mostrou-se útil para caracterização da modificação do padrão de identificação de presunto de peru submetido à alta pressão.

**Tabela 1.** Valores de massa molecular das cadeias polipeptídicas separadas por eletroforese SDS-PAGE, com indicação de suas presenças (+) e ausências (-), tomando como referência a amostra crua e amostra tratada termicamente

Massa Molecular (kDa)	Amostra crua	Amostras tratada termicamente	200 MPa		300 MPa		400 MPa	
			Tempo de exposição à alta pressão (min)		Tempo de exposição à alta pressão (min)		Tempo de exposição à alta pressão (min)	
			5	15	10	5	15	
195,1	+	+	+	+	+	+	+	
74,4	+	-	-	-	-	-	-	
55,8	+	-	+	-	-	+	+	
45,0	+	+	+	+	+	+	+	
41,1	+	+	+	+	+	+	+	
34,4	+	+	+	+	+	+	+	
31,3	+	+	+	+	+	+	+	
29,8	+	-	+	-	-	+	-	
26,2	+	+	+	+	+	+	+	
25,1	+	-	-	-	-	-	-	
24,0	+	-	-	-	-	-	-	
20,8	+	+	+	+	+	+	+	
18,7	+	+	+	+	+	+	+	
15,0	+	-	+	-	-	+	+	

Conclui-se que o método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também se diferenciou de outros descritos na literatura que utilizam outros tampões. A introdução do detergente Triton X-100 junto com a utilização de tampão TRIS-HCl permitiu uma boa extração e solubilização de proteínas. O método se mostrou preciso e, com, isto pôde-se observar bandeamentos típicos de proteínas miofibrilares.



**Figura 1.** Perfil eletroforético das proteínas extraídas de presunto de peru. (2) cru, (3) tratado termicamente (600C) e submetido a diferentes pressões e tempos: (4) 200 MPa, 5 min.; (5) 200 MPa, 15 min.; (6) 300 MPa, 10 min; (7) 400 MPa, 5 min., (8) 400 MPa, 15 min. Os marcadores de massa molecular estão nos poços 1 e 9, os valores estão em kDa.

## Referências Bibliográficas

BARBIERI, J. FEA testa tecnologia para processamento de alimentos. **Jornal da Unicamp**, n. 301, 12-18 set. 2005. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/setembro2005/ju301pag02.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/setembro2005/ju301pag02.html)>. Acesso em: 12 nov. 2007.

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.

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

CHENG, C. S.; PARRISH JR., F. C. Heat-induced changes in myofibrillar proteins of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, p. 22-24, 1979.

CRAIG, A.; RITCHIE, H.; MACKIE, I. M. Determining the authenticity of raw reformed breaded scampi (*Nephrops norvegicus*) by electrophoretic techniques. **Food Chemistry**, Essex, v. 52, p. 451-454, 1995.

FRAZÃO, A. S.; STEPHAN, M. P.; FURTADO, A. L. Utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para estudos de proteínas de tecido muscular de lula "in natura" e processada. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, p. 311-328, 2005.

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

KAISER, K. K.; KRAUSE, I. Analytik von proteinen in lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen verfahren. **Zeitung Lebensmittel Untersuchung Forschung**, v. 180, p. 181-201, 1985.

KO, W. C.; HSU, K. C. Effect of high-pressure storage on the processing quality of tilápia meat. **Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology**, 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. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: Ed. UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987.

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

STEPHAN, M. P.; SLONGO, A. P.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Adaptação de método de extração e caracterização de **proteínas extraídas de presunto submetido à alta pressão**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2006. 4 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 96).

### Comunicado Técnico, 117

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) 2410-1090 / 2410-9713  
**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>  
**E-mail:** [sac@ctaa.embrapa.br](mailto:sac@ctaa.embrapa.br)

1ª edição  
1ª impressão (2007): tiragem (50 exemplares)

### Comitê de publicações

**Presidente:** *Virgínia Martins da Matta.*  
**Membros:** *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy Renata Torrezan, Soraya Pereira e André Luis do Nascimento Gomes.*

**Secretárias:** *Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes.*

**Revisão editorial:** *Soraya Pereira.*

**Revisão de texto:** *Comitê de Publicações.*

**Normalização bibliográfica:** *Luciana S. de Araújo.*

**Editoração eletrônica:** *André Luis do N. Gomes e Filipe Loureiro Rebelo.*

### Expediente