

Otimização da extração das proteínas de soja para estudos metalômicos empregando SR-XRF, ICP OES e ICP-MS, após a separação por eletroforese em gel.

Alessandra Sussulini¹(PG), Jerusa S. Garcia¹(PG), Márcia F. Mesko²(PG), Diogo P. Moraes²(PG), Érico M. M. Flores²(PQ), Carlos A. Pérez³(PQ) e Marco A. Z. Arruda^{1*}(PQ). *e-mail: zezzi@iqm.unicamp.br

¹Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química, C. P. 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Química, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

³Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), C. P. 6192, 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

Palavras Chave: Metaloproteínas, SR-XRF, ICP-MS.

Introdução

A extração das proteínas é um processo onde ocorre a quebra das ligações químicas entre os compostos a serem analisados e os interferentes, a eliminação dos interferentes e a prevenção da reagregação secundária dos analitos durante o processo de separação. A extração geralmente é feita em um tampão contendo surfactantes, agentes redutores e inibidores de proteases¹. Entretanto, modificações na composição do tampão ou no método utilizado para remover os interferentes são estratégias utilizadas para melhorar o preparo da amostra. Neste trabalho, dois métodos de extração de proteínas de soja foram testados de modo a avaliar o método mais adequado para os estudos metalômicos, ou seja, aquele que apresentar uma maior preservação da ligação metal-proteína.

Resultados e Discussão

No primeiro método de extração das proteínas de soja (*Método A*) a remoção dos interferentes foi feita com o uso de hexano e o tampão de extração consistia em uma solução de 0,03 mol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,0) e 0,01 mol L⁻¹ de β-mercaptoetanol. No segundo (*Método B*) a remoção dos interferentes foi feita com o uso de éter de petróleo e o tampão de extração consistia em uma solução de 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,8), 1,5 mmol L⁻¹ de KCl, 10 mmol L⁻¹ de DTT, 1,0 mmol L⁻¹ de PMSF e 0,1% (m/v) de SDS. A quantificação das proteínas extraídas foi feita com o uso do método de Bradford e o *Método B* apresentou uma maior concentração de proteínas. A Fig. 1 mostra o perfil de massa molar das proteínas extraídas pelos dois métodos. As bandas de proteínas foram recortadas do gel, secas em estufa a 40°C por 5h, e seus metais foram determinados qualitativamente por SR-XRF. Os metais encontrados nas bandas foram o Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Ni, e Zn. De acordo com a Fig. 2, nota-se que nas bandas de proteínas extraídas pelo *Método B*, mais íons metálicos foram detectados. A seguir, estas bandas de proteínas foram

decompostas por meio da combustão assistida por microondas em sistema fechado e os metais Al, Ba, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na e Zn, foram quantificados por ICP OES e ICP-MS. Concordando com os resultados obtidos por SR-XRF (Fig. 2), as bandas contendo proteínas extraídas pelo *Método B* apresentaram, em sua maioria, uma concentração mais elevada de metais.

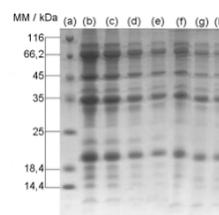


Fig. 1. Eletroferograma de proteínas de soja. Colunas: (a) padrão protéico; proteínas extraídas pelo *Método B*, sendo aplicados (b) 41, (c) 23, (d) 12 e (e) 8 μg de proteína; proteínas extraídas pelo *Método A*, sendo aplicados (f) 10, (g) 5 e (h) 3 μg.

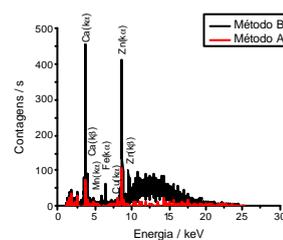


Fig. 2. Espectro de SR-XRF para a banda de metaloproteínas de MM 31,5 kDa, comparando-se os dois métodos de extração testados.

Conclusões

A partir dos dados qualitativos (SR-XRF) e quantitativos (ICP OES e ICP-MS) obtidos, é possível concluir que o *Método B* é o mais adequado para a extração das metaloproteínas de soja, pelo fato de que a preservação das ligações metal-proteína é mais eficiente.

Agradecimentos

LNLS, FAPESP, CNPq e CAPES.

¹Rabilloud, T. *Electrophoresis* **1996**, 17, 813.