

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**Fabiana Alves Casanova**

**EFEITO DA FOSFORILAÇÃO QUÍMICA SOBRE AS PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA VICILINA DE ERVILHA (*Pisum sativum*)**

**Rio de Janeiro**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**EFEITO DA FOSFORILAÇÃO QUÍMICA SOBRE AS PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA VICILINA DE ERVILHA (*Pisum sativum*)**

**Fabiana Alves Casanova**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Eliane Fialho de Oliveira

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

Rio de Janeiro

Setembro 2006

EFEITO DA FOSFORILAÇÃO QUÍMICA SOBRE AS PROPRIEDADES  
FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA VICILINA DE ERVILHA (*Pisum sativum*)

Fabiana Alves Casanova

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovado por:

---

Prof<sup>a</sup>. Eliane Fialho de Oliveira  
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INJC/UFRJ  
Orientador

---

Prof. Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima  
Prof. Adjunto da Faculdade de Farmácia/UFRJ  
Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Andréa Cheble de Oliveira  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/IBqM/UFRJ  
Revisor

---

Prof<sup>a</sup>. Débora Foguel  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/IBqM/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Cristiana Pedrosa Melo Porto  
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INJC/UFRJ

---

Prof. Andre Marco de Oliveira Gomes  
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/IBqM/UFRJ  
Suplente externo

---

Prof<sup>a</sup>. Vera Lúcia Valente Mesquita  
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/INJC/UFRJ  
Suplente interno

Casanova, Fabiana Alves

Efeito da fosforilação química sobre as propriedades funcionais e estruturais da vicilina de ervilha (*Pisum sativum*) / Fabiana Alves Casanova. – Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2006.

xviii, 117 f. il.

Orientadores: Eliane Fialho de Oliveira e Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2006.

Referências bibliográficas: f. 81-91

1. vicilina. 2. *Pisum sativum*. 3. propriedades funcionais. 4. fosforilação. 5. TMFS. 6. estabilidade estrutural. 7. alta pressão hidrostática – Tese. I. Fialho de Oliveira, Eliane. II. Trambaioli da Rocha e Lima, Luis Maurício. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição. IV. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química e Bioquímica dos Alimentos do Departamento de Nutrição Básica e Experimental, INJC/UFRJ, sob orientação da professora Eliane Fialho de Oliveira e do professor Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, e na vigência de auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB-ALV) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

***Dedico esta tese aos meus pais,  
Nilton e Ivaneide***

## AGRADECIMENTOS

À minha ORIENTADORA Lili, por ter acreditado em mim, pelos seus ensinamentos tanto na área científica como na forma de encarar a vida, e por sua amizade. Sempre disposta a solucionar minhas dúvidas, me incentivou e me incentiva até hoje. MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!

Ao Maurício, meu co-orientador, por toda a ajuda e atenção.

À Angélica, minha eterna “orientadora”, que me ensinou a dar meus primeiros passos na vida científica, os quais foram primordiais para as etapas seguintes. Por todo seu carinho, atenção e amizade. Obrigada!

Ao Vagner, meu “irmão” científico, por todos os momentos bons e pelo constante apoio. Se pudesse, seu nome apareceria nos meus próximos 355 artigos, como forma de pagamento a toda ajuda prestada durante todo esse tempo, mas como não pode, só tenho a lhe agradecer.

À Renatinha, que, de alguma forma, fez com que meu experimento voltasse a dar certo. Por sua amizade e carinho!

À Chris, à Flávia, ao Daniel, ao André, à Renatinha 2, à Ana Luísa, à Ana Carla, à Adriana e à Natália, por animarem o laboratório, pelo incentivo e por todas as conversas de início da manhã, de hora de almoço, de final de tarde...

À Daniella Duque, à Danielly e à Lia, pela amizade.

Ao professor Masuda e à professora Débora Foguel, que colaboraram com este trabalho, disponibilizando equipamentos e instalações do laboratório.

À professora Vera Lúcia Valente Mesquita e à professora Maria Lúcia Mendes Lopes, pela convivência e aprendizado.



À Lilian e à Helô, pela atenção e auxílio quanto as tarefas no laboratório, tornando as atividades mais fáceis e práticas.

Aos professores Mário, Kátia, Geórgia e Horácio, pelos ensinamentos e pela convivência.

A todos do laboratório do Masuda e GKM, em especial à Raquel, ao Alan, ao Petter, à Rachelzinha, à Lize e à Denise, pelo agradável convívio, pelas risadas, pelo apoio e pelos papos na hora do almoço.

A todos do laboratório da professora Débora e do Jerson, pelo auxílio na utilização do fluorímetro e o gerador de pressão e, através de conversas durante o experimento, me ajudaram a entender sobre a estrutura da proteína.

Ao professor Sgarbieri, por ter gentilmente doado o trimetafosfato de sódio.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram, em especial à Priscila, ao Leonardo, à Raquel, à Vivi, à Emi e ao Rafael, pelos conselhos, pela compreensão e diversão.

A todos meus familiares, pelo carinho e por mostrarem a importância do convívio familiar.

À minha irmã Renata, por ser a minha irmã. Ninguém faria este papel melhor do que ela. E por abrir mão do computador na fase final da tese.

Aos meus pais, por terem acreditado em mim mais do que eu mesma. Por me amarem tanto, por terem se esforçado pela minha educação e criação, sempre me incentivando e apoiando. Palavras não transmitem o quanto agradeço vocês por tudo. Amo vocês!

Ao Bruno, meu amor, por sempre estar disposto a me ajudar no que for preciso, pelo seu carinho e principalmente sua paciência no final desta dissertação. Por sua compreensão, palavras de incentivo e pela presença em minha vida. Obrigado por tudo!

A Deus, pela minha vida e por tudo que a cerca. Por ter me dado forças, saúde e todo o resto para conseguir enfrentar os obstáculos, e assim, poder chegar até aqui. OBRIGADO!

## RESUMO

As proteínas de sementes, em especial das leguminosas, são consideradas proteínas de fácil obtenção e baixo custo. Vários esforços têm sido feitos para modificar essas proteínas e assim causar alterações intencionais em suas propriedades físico-químicas, tornando-as mais atrativas como ingredientes em produtos alimentícios. Adicionalmente, a estabilidade estrutural das proteínas de sementes tem sido estudada, uma vez que essa pode interferir em suas propriedades funcionais. Vicilina é uma proteína de reserva de sementes de ervilha, que corresponde a 15 a 35% de proteína total da semente, e sua massa molecular é 150 kDa, com subunidades de cerca de 50 kDa. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da fosforilação com trimetafosfato de sódio (TMFS) em diferentes concentrações (1% e 4%) sobre as propriedades funcionais e a estabilidade estrutural da vicilina de ervilha (*Pisum sativum*) exposta a diversas perturbações físicas (pressão hidrostática e temperatura) e químicas (variação de pHs, uso de sais, glicerol e desnaturantes químicos). A vicilina foi obtida por precipitação em sulfato de amônio, e a fosforilação foi realizada incubando-a em Tris-HCl 10 mM pH 10,0 com solução de TMFS 1% e 4% (p:v) em tampão borato 200 mM pH 11,0, por 3 horas a 37° C. Os resultados mostram que a fosforilação química com TMFS 4% é capaz de melhorar significativamente a solubilidade da vicilina em sua faixa de pH crítico (4,0 – 5,0). No entanto, diminui aproximadamente 80% a sua capacidade de geleificação. A presença de solução salina (NaCl 0,5 M) modifica o pl da vicilina controle e fosforilada, e dessa forma sua solubilidade se torna muito baixa em pHs muito ácidos, como pH 1,0. A capacidade de geleificação da vicilina não fosforilada na presença de NaCl diminui aproximadamente 80% quando comparada à vicilina na ausência de NaCl. O tratamento com alta pressão hidrostática (APH) a 241 MPa modifica significativamente a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4% nos pHs 1,0 e 4,0, de 100% para 67,6% e de 65,4% para 43,9%, respectivamente, e aumenta três vezes a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada com TMFS 1%. A presença de glicerol 20% diminui a capacidade de geleificação da vicilina controle e fosforilada, bem como a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4% ( $P < 0,05$ ). Em relação às propriedades estruturais, a fosforilação diminui a intensidade de fluorescência da vicilina e a aplicação de APH resulta na supressão parcialmente reversível de sua fluorescência, sendo esta reversão maior nas

vicilinas fosforiladas. Através de gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes conclui-se que a APH causa dissociação da vicilina fosforilada e controle, embora não se observe deslocamento no pico de máxima emissão de fluorescência. Observa-se ainda, através da análise da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima, da área e do centro de massa espectrais, que a fosforilação diminui a dissociação da vicilina induzida por APH nas diferentes concentrações estudadas (2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ), sendo que na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , este efeito somente foi notado a partir de 172 MPa. Na análise do efeito de diferentes pHs (7,0 a 10,0) sobre a estabilidade estrutural da vicilina, nota-se que a alcalinização do meio provoca um aumento em sua sensibilidade frente à APH. A aplicação da APH em diferentes temperaturas (10 °C, 23 °C e 37 °C) mostra que, a 37 °C, a vicilina fosforilada teve uma menor dissociação do que a vicilina controle. A presença de cosolventes (NaCl 0,5 M e glicerol 20%) no meio promove um aumento na estabilidade da forma oligomérica da vicilina frente à APH e a fosforilação da vicilina aumenta este efeito estabilizante. O uso de cloridrato de guanidina (GdnHCl) e uréia diminui a intensidade de fluorescência da vicilina, no entanto, a partir de 1 M de GdnHCl, ocorre um aumento na intensidade de fluorescência da vicilina controle e fosforilada e um deslocamento do seu pico de emissão para comprimentos de onda menores. Estes resultados indicam que a fosforilação química com TMFS é um método eficiente para controlar modificações das propriedades físico-químicas da vicilina, e aumentar sua estabilidade estrutural.

## ABSTRACT

The seed proteins, especially legume proteins, are considered cheap and easily obtained. Many studies have been carried out to modify these proteins and thus to cause intentional alterations in their physico-chemical properties, in order to make them more attractive as ingredients in food products. Besides, structural stability of seeds proteins has been studied, since it can interfere in their functional properties. Vicilin is a pea seed storage protein, corresponding to 15 to 35% of the total protein content of the seeds, and its molecular mass is 150 kDa, with subunits around 50 kDa. The aim of this work was to investigate the effect of phosphorylation with sodium trimetaphosphate (STMP) at different concentrations (1% and 4%) on functional properties and structural stability of the pea (*Pisum sativum*) vicilin exposed to physical (hydrostatic pressure and temperature) and chemical (different pHs, salt, glycerol and chemical denaturants) perturbations. The vicilin was obtained by ammonium-sulfate precipitation, and the phosphorylation was obtained by incubating it with 1% and 4% of STMP solution (w/v) in borate buffer 200 mM at pH 11.0 for 3 hours, at 37 °C. The results show that chemical phosphorylation with 4% STMP significantly improves vicilin solubility in its critical pH range (4.0-5.0). However, it decreases approximately 80% its gelation capacity. The presence of saline solution (0.5 M NaCl) modifies the pI of control and phosphorylated vicilin, resulting in a decrease of the solubility in the acidic pHs, such as pH 1.0. The gelation capacity of control vicilin, in the presence of 0.5 M NaCl, decreases approximately 80% when compared with control vicilin without NaCl. High hydrostatic pressure (HHP) treatment at 241 MPa significantly changes the solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP at pH 1.0 and 4.0 from 100% to 67.6% and from 65.4% to 43.9 %, respectively, and it increases three fold the gelation capacity of phosphorylated vicilin with 1% STMP. The presence of 20% glycerol decreases the gelation capacity of control and phosphorylated vicilin, and the solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP ( $P < 0.05$ ). In relation to structural properties, the phosphorylation decreases the fluorescence intensity of vicilin and the application of HHP on vicilin results in the partially reversible quenching of its fluorescence, being this reversion higher in phosphorylated vicilins. We can not observe a shift in the peak of maximum emission of vicilin during the experiments of dissociation by HHP. PAGE in nondenaturing conditions reveals that HHP causes dissociation of

control and phosphorylated vicilin. Additionally, analyzing the fluorescence intensity in maximum emission wavelength, the spectral area and the spectral center of mass, the data show that phosphorylation decreases the pressure-induced dissociation of vicilin in different concentrations (2, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ), effect that at 5  $\mu\text{M}$  is only observed above 172 MPa. The effect of different pHs (7.0 to 10.0) on structural stability of vicilin shows that alcalinization of the medium leads to enhanced sensitivity to HHP. The HHP treatment at different temperatures (10 °C, 23 °C and 37 °C), shows that at 37 °C the effect on phosphorylated vicilin is lower than on control vicilin. The presence of cosolvents (0.5 M NaCl and 20% glycerol) promotes an increase in the stability to HHP of the oligomeric form of vicilin and phosphorylation increases this stabilizing effect. The use of guanidine hydrochloride (GdnHCl) and urea decreases the vicilin fluorescence intensity, although, above 1 M GdnHCl, it occurs an increase in the fluorescence intensity of the control and phosphorylated vicilin and a shift of emission peak to shorter wavelengths. These results indicate that chemical phosphorylation with STMP is an efficient method to control modifications of physico-chemical properties of vicilin, and to increase its structural stability.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

APH / HHP – Alta pressão hidrostática / *High hydrostatic pressure*

CLAE / HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / *High Performance Liquid Chromatography*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FDA - *Food and Drug Administration*

GdnHCl – Cloridrato de guanidina

pI – Ponto isoelétrico

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

SBTI – Inibidor de tripsina de soja

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TEMED – N, N, N', N', -tetrametiletilenodiamina

TMFS / STMP – Trimetafosfato de sódio / *Sodium trimetaphosphate*

Tris-HCl - Tris-(hidroximetil) aminometano

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Derivação dos polipeptídeos constituintes da vicilina a partir do precursor de 50 kDa.	6
Figura 1: Sequência de aminoácidos da vicilina (vic) e da $\beta$ -conglucina (cong).	7
Esquema 2: Diagrama esquemático do trímero da $\beta$ -conglucina.	8
Esquema 3: Mecanismo de fosforilação por TMFS.	10
Esquema 4: Diagrama de Jablonski.	14
Esquema 5: Esquema da célula de alta pressão hidrostática.	38
Esquema 6: Esquema do sistema gerador de alta pressão hidrostática.	39
Figura 2: Eletroforese em condições desnaturantes da vicilina.	41
Figura 3: Avaliação do grau de fosforilação em aminas com uso de fluorescamina.	42
Figura 4: Solubilidade da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.	44
Figura 5: Capacidade de geleificação da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.	45
Figura 6: Emissão de fluorescência intrínseca da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.	51
Figura 7: Efeito da APH sobre o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.	52
Figura 8: Eletroforese em condições não desnaturantes da vicilina controle e fosforilada submetidas à pressão hidrostática.	54
Figura 9: Efeito da APH sobre a dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes concentrações.	55
Figura 10: Efeito da concentração de proteína na dissociação induzida por pressão hidrostática da vicilina controle.	56
Figura 11: Efeito da APH sobre a dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes pHs.	58
Figura 12: Efeito do pH na dissociação induzida por APH da vicilina controle.	59



Figura 13: Efeito da APH sobre a dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes temperaturas.	60
Figura 14: Efeito da temperatura na dissociação induzida por APH da vicilina controle.	61
Figura 15: Efeito de NaCl 0,5 M sobre a dissociação induzida por APH da vicilina controle e fosforilada.	63
Figura 16: Efeito de glicerol 20% sobre a dissociação induzida por APH da vicilina controle e fosforilada.	64
Figura 17: Efeito do cloridrato de guanidina sobre o espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle e fosforilada.	66
Figura 18: Efeito do cloridrato de guanidina sobre a área (A) e centro de massa espectrais (B) da vicilina controle e fosforilada.	67
Figura 19: Efeito da uréia sobre o espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle e fosforilada.	68
Figura 20: Efeito da uréia sobre a emissão de fluorescência (A), área (B) e centro de massa espectrais (C) da vicilina controle e fosforilada.	69
<b>Anexo</b>	
Figure 1: Effect of NaCl on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin.	112
Figure 2: Effect of NaCl on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin.	113
Figure 3: Effect of high pressure treatment on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin.	114
Figure 4: Effect of high pressure treatment on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin.	115
Figure 5: Effect of glycerol on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin.	116
Figure 6: Effect of glycerol on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin.	117

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. A ervilha e sua composição nutricional	1
1.2. Proteínas de reserva	3
1.3. Vicilina	5
1.4. Fosforilação química com TMFS	8
1.5. Propriedades Funcionais	10
1.6. Espectroscopia de fluorescência no estudo das estruturas terciárias e quaternárias de proteínas	13
1.7. Agentes Perturbadores da Estrutura de Proteínas	17
1.7.1. Glicerol	17
1.7.2. Sais	19
1.7.3. Alta pressão hidrostática	21
1.7.4. Desnaturantes químicos	25
<b>2. Objetivos</b>	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
<b>3. Material e métodos</b>	30
3.1. Reagentes	30
3.2. Sementes	30
3.3. Obtenção da Vicilina	30
3.4. Dosagem de proteína	31
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	32
3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	32

3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de SDS	33
3.6. Densitometria	33
3.7. Fosforilação da vicilina com trimetafosfato de sódio – TMFS	34
3.8. Avaliação do grau de fosforilação em aminas	34
3.9. Propriedades Funcionais	35
3.9.1. Solubilidade	35
3.9.2. Capacidade de geleificação	35
3.10. Análises estatísticas	36
3.11. Medidas de fluorescência	36
3.12. Estabilidade frente à alta pressão hidrostática (APH)	37
3.13. Estabilidade frente a agentes desnaturantes: cloridrato de guanidina e uréia	39
<b>4. Resultados</b>	<b>40</b>
4.1. Parte I: Propriedades funcionais da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%	40
4.2. Parte II: Efeitos de agentes químicos e físicos sobre a solubilidade e a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada com de TMFS	47
4.3. Parte III: Efeitos de agentes químicos e físicos sobre as propriedades estruturais da vicilina fosforilada com TMFS 1% e 4%	50
<b>5. Discussão</b>	<b>72</b>
<b>6. Referências</b>	<b>81</b>
<b>7. Anexo</b>	<b>92</b>

# 1. Introdução

## 1.1. A ervilha e sua composição nutricional

A ervilha é uma leguminosa de origem imprecisa. Há relatos de que sua origem seja no Oriente Médio, desde o nordeste da Índia até o Afeganistão. Outros autores demonstram que ela surgiu na Etiópia, no nordeste da África. Só a partir do século XVIII é que a ervilha verde, recém-colhida, passou a ser usada na alimentação humana (GIORDANO, 1993).

A ervilha é cultivada em regiões de clima temperado e a variedade “Mikado” é a mais plantada na região central do Brasil. Em geral, nos países de clima tropical, ela é plantada em locais de maior altitude e temperaturas entre 13 °C e 18 °C são ideais para o seu cultivo. Sabe-se que a produção é bastante prejudicada acima dos 27 °C, especialmente na época do florescimento. Apresenta peso de aproximadamente 160 g por milheiro e não é tão suscetível ao descoloramento quanto outras variedades. Pode ser plantada em solos de média fertilidade e seu ciclo vegetativo (do plantio à colheita) é em torno de 110 dias (GIORDANO, 1993).

Nas sementes de ervilha, os carboidratos são estocados principalmente na forma de amido e representam aproximadamente 52% da massa total da semente, constituindo-se assim como uma importante fonte deste nutriente. Os lipídeos encontram-se principalmente na forma de lipídeos neutros e representam cerca de 6% das reservas da semente, enquanto as proteínas representam cerca de 25% da massa total das sementes de ervilha (BEWLEY & BLACK, 1985). IQBAL *et al.* (2006) relataram a qualidade nutricional de quatro leguminosas (grão-de-bico, feijão fradinho, lentilha e ervilha) e observaram que a lentilha possui a maior quantidade de

proteína (26,1%), seguida da ervilha (24,9%). Entre as quatro leguminosas estudadas, a ervilha demonstrou ser rica nos seguintes aminoácidos: lisina, cistina, alanina e tirosina, e deficiente em alguns aminoácidos sulfurados e triptofano. Esta deficiência em alguns aminoácidos pode ser resolvida pela simples utilização de misturas envolvendo leguminosas e cereais, uma vez que estes apresentam carência em lisina (AMJAD *et al.*, 2003). Desta forma, um complementa o outro e as deficiências isoladas são resolvidas. Podemos citar como uma mistura protéica de hábito alimentar do brasileiro o arroz (cereal) com o feijão (leguminosa).

Em relação ao conteúdo de minerais, a ervilha é composta por sódio (111 mg/ 100 g), potássio (1021 mg/ 100 g), fósforo (283 mg/ 100 g), cálcio (110 mg/ 100 g), ferro (2,3 mg/ 100 g), cobre (10 mg/ 100 g), zinco (3,2 mg/ 100 g), manganês (2,2 mg/ 100 g) e magnésio (4,2 mg/ 100 g) (IQBAL *et al.*, 2006).

Consumida tanto na forma de semente verde (imatura) como na forma de semente seca (madura), a ervilha é uma fonte potencialmente rica em carboidratos e proteínas. No entanto, o valor nutritivo da semente crua é relativamente baixo. Isso pode ser atribuído à baixa digestibilidade das suas proteínas, deficiência de aminoácidos sulfurados e presença de antinutrientes, tais como: ácido fítico; taninos; polifenóis; inibidores de tripsina, quimiotripsina e  $\alpha$ -amilase (ALONSO *et al.*, 1998), que causam alterações fisiológicas e metabólicas no indivíduo que consome, reduzindo sua habilidade de efetivamente utilizar os nutrientes (ALONSO *et al.*, 2001).

Com relação aos antinutrientes, estes podem ser inativados ou controlados por processos apropriados. Estes processos envolvem congelamento, desidratação, cocção por calor úmido, torrefação e germinação (ALONSO *et al.*, 2001; REHMAN & SHAH, 2005; URBANO *et al.*, 2005).

## **1.2. Proteínas de reserva**

As proteínas de reserva são sintetizadas na semente em desenvolvimento, ficam estocadas nos corpúsculos protéicos durante todo o estágio seco da semente e são hidrolisadas durante a germinação, suprimindo assim as necessidades de aminoácidos e nitrogênio para o crescimento da planta (WENZEL *et al.*, 1993).

A síntese das proteínas de reserva ocorre nas células do cotilédone durante o desenvolvimento da semente, durante os 20 dias que se seguem à floração (BEWLEY & BLACK, 1985). Após sua síntese, as proteínas de reserva podem então sofrer processamento pós-traducional, através de reações de glicosilação, proteólise, fosforilação, dentre outras, no retículo endoplasmático rugoso. As proteínas modificadas são então transportadas e depositadas nos corpúsculos protéicos (BEWLEY & BLACK, 1985; GATEHOUSE *et al.*, 1984), onde podem sofrer ainda novas etapas de proteólise (BEWLEY & BLACK, 1985). Durante a germinação, a metabolização das proteínas de reserva começa pela hidrólise da membrana que envolve o corpúsculo protéico, seguida pela proteólise destas proteínas e pelo direcionamento dos aminoácidos resultantes para as atividades biossintéticas do embrião (BAUMGARTNER & CHRISPEELS, 1977).

De acordo com a classificação proposta por OSBORNE e CAMPBELL (1898), as proteínas de sementes podem ser divididas em quatro classes, de acordo com a solubilidade:

- albuminas – solúveis em água e meio neutro;
- globulinas – solúveis em soluções salinas e água;
- glutelinas – solúveis em soluções ácidas e alcalinas;
- prolaminas – solúveis em soluções alcoólicas.

As proteínas de reserva de sementes de ervilha são globulinas e podem ser separadas em duas frações principais denominadas legumina, vicilina e narboninas. A legumina é quantitativamente a maior fração, mas suas proporções dependem da variedade da semente (GATEHOUSE *et al.*, 1981).

Legumina e vicilina diferem entre si pela massa molecular, coeficiente de sedimentação e pela composição de subunidades. Essas proteínas são compostas por diversas subunidades não idênticas (LYCETT *et al.*, 1983; PATEL *et al.*, 1994). A legumina é menos solúvel do que a vicilina em soluções salinas e apenas a vicilina coagula a 95 °C, enquanto a legumina não coagula nesta temperatura (DERBYSHIRE *et al.*, 1976).

A legumina é um hexâmero com 3 dímeros unidos por ligação covalente em uma estrutura de massa molecular de 360 kDa. Cada dímero consiste de uma subunidade com característica ácida, de massa molecular aproximada de 40 kDa e uma subunidade com característica básica de aproximadamente 20 kDa de massa molecular, ligadas por uma ou mais pontes de enxofre (GATEHOUSE *et al.*, 1980).

Atualmente, têm-se utilizado proteínas de reservas de sementes como ingredientes em produtos alimentícios, destacando-se para estudos que envolvem desde a estrutura (PEDROSA *et al.*, 2000; UTSUMI *et al.*, 2002) até as propriedades funcionais dessas proteínas (ADEBOWALE & LAWAL, 2004; MARTINS & NETTO, 2006; SEENA & SRIDHAR, 2005).

### **1.3. Vicilina**

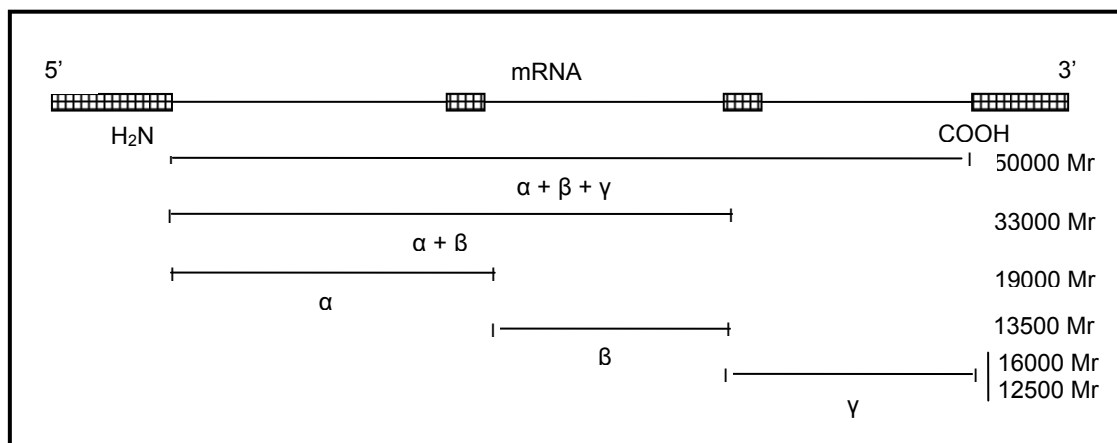
A vicilina de ervilha apresenta um coeficiente de sedimentação 7 S, com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, e três subunidades com cerca de

50 kDa cada. Algumas dessas subunidades contêm quebras na cadeia polipeptídica causadas por proteólise específica pós-traducional (GATEHOUSE *et al.*, 1982). Quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, a vicilina apresenta polipeptídeos majoritários de 50 kDa, 33 kDa, 31 kDa e polipeptídeos minoritários de 28 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 13,5 kDa e 12,5 kDa (GATEHOUSE *et al.*, 1984). No retículo endoplasmático rugoso, ocorre também a glicosilação da proteína, que afeta cerca de 0,5 a 1,4 % da vicilina total, sendo particularmente notável o fato de que a subunidade de 12,5 kDa glicosilada passa a apresentar uma massa molecular aparente de 16 kDa. Os açúcares constituintes da proteína glicosilada são glicosamina e manose, estando ligados a resíduos de asparagina da proteína (PERNOLLET & MOSSÉ, 1983). A vicilina passa por três tipos de modificações pós-traducionais: assim que a proteína atravessa a membrana do retículo endoplasmático rugoso, ocorre a remoção da seqüência líder; em seguida, algumas de suas subunidades podem ser glicosiladas; finalmente, algumas são proteolisadas e clivadas. A clivagem proteolítica pode permitir o empacotamento adequado da vicilina nos corpúsculos protéicos da semente, permitindo ainda uma mobilização mais rápida de aminoácidos durante a germinação. A proteólise não altera a massa molecular da proteína em condições não desnaturantes, porque os polipeptídeos resultantes se mantêm associados por forças de natureza não-covalente (GATEHOUSE *et al.*, 1982).

A elucidação da seqüência de aminoácidos da vicilina mostrou que os polipeptídeos menores do que 50 kDa apresentam grande homologia entre si e, de fato, se originam de um precursor de 50 kDa. Assim, podemos dizer, de forma simplificada, que o modelo estrutural da molécula de vicilina é um trímero (GATEHOUSE *et al.*, 1984). O **esquema 1**, proposto por GATEHOUSE *et al.* em



1984, apresenta a estrutura da vicilina, composta por três grupos de polipeptídeos:  $\alpha$  (19 kDa),  $\beta$  (13,5 kDa) e  $\gamma$  (12,5 ou 16 kDa na forma glicosilada). A forma não proteolisada (50 kDa) se apresenta como a soma  $\alpha + \beta + \gamma$ , e os pesos intermediários se originam da proteólise incompleta da molécula precursora ( $\alpha + \beta = 33$  kDa e  $\beta + \gamma = 31$  kDa). Sugere-se ainda que a vicilina seja sintetizada a partir de uma família de genes, com base na descoberta de diversos cDNAs codificantes para polipeptídeos da vicilina (CROY *et al.*, 1982; LYCETT *et al.*, 1983; SPENCER, 1983).



**Esquema 1. Derivação dos polipeptídeos constituintes da vicilina a partir do precursor de 50 kDa (adaptado de GATEHOUSE, 1984).**

A estrutura tridimensional do  $\beta$ -conglucina de soja é mostrada no **esquema 2**, proposto por MARUYAMA *et al.* (2001). Esta proteína apresenta grande homologia com a vicilina de ervilha (**figura 1**), assim como com outras proteínas de leguminosas, tais como canavalina e faseolina, que pertencem à classe das globulinas 7S. A estrutura proposta foi baseada em análises da seqüência de aminoácidos, cristalografia de raios-X e modelagem molecular. A subunidade da  $\beta$ -conglucina é composta por dois domínios estruturais semelhantes: amino-terminal e carboxi-terminal. Cada domínio da subunidade é subdividido em um *core* que consiste de folhas  $\beta$ , e uma alça estendida contendo várias pequenas  $\alpha$ -hélices. Os

resíduos hidrofóbicos constituem a interface entre os dois domínios de cada subunidade, além de ligações de hidrogênio e 2 pontes salinas. As interfaces entre as subunidades no trîmero são formadas pelas alças estendidas; e são compostas principalmente de resíduos hidrofóbicos, suplementados por ligações de hidrogênio e uma ponte salina. A maioria dos resíduos conservados entre os domínios e entre várias vicilinas ocorre na interface entre as subunidades. O grande número de aminoácidos conservados na interface sugere que a formação do oligômero é crucial para as propriedades da proteína.

```

vic 29 RSDPQNPFIFKS-NKFQTLFENENHIRLLQKFDQRSKIFENLQNYRLLLEYKSKPHTIFLPQHTDADYILVVLGKAILT 107
cong 4 REDENNPFYFRSsNSFQTLFENQNGRIRLLQRFNKRSPOLENLRDYRIVQFQSKPNTILLPHHADADFLFLVLSGRAILT 83

vic 108 VLKPPDRNSFNLERGDTIKLPAGTIAVLVNRDDNEELRVLDLAIPVNRPGQLQSFLLSGNQNNQNYLSGFSKNILEASFN 187
cong 84 LVNNDDRDSYNLHPGDAQRI PAGTTYVLVNP HDHQNLKIKLAIPV NKPGRYDDFFLSSTQAQQSYLQGF SHNILETSFH 163

vic 188 TDYEEIEKVLLEEHketqhrsrslkdkrQQSQEENVIVKLSRGQIEELSKNAKSTSKKSVSSESEPFNLRSRGPIYSNEF 267
cong 164 SEFEEINRVLFGEEE-----EQRQQEGVIVELSKQIRQLSRRAKSSSRKTISSEDEPFNLRSRNPIYSNNF 230

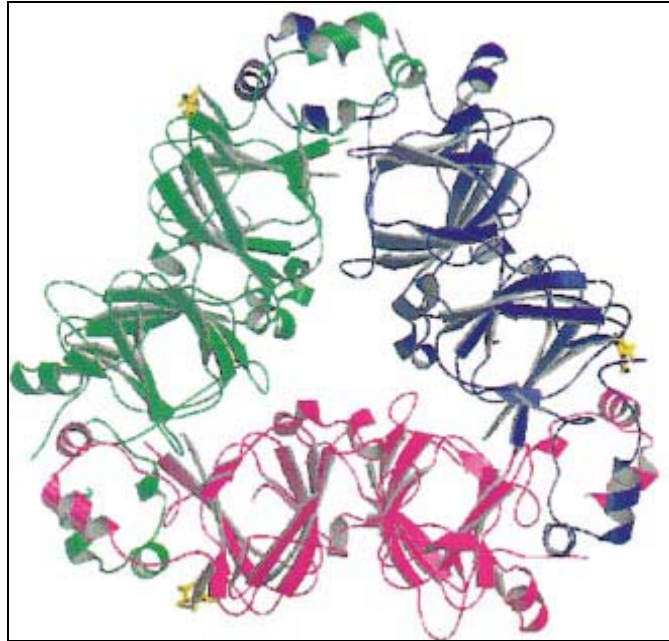
vic 268 GKFFEITPEKNPQLQDLDFVNSVEIKEGSLLLPHYNSRAIVIVTVNEGKGFELVGRnENQQEQRKEDDEEEeqgeee 347
cong 231 GKFFEITPEKNPQLRDLDFLSVDINEGALLLPHFNSKAIIVILVINEGDANIELVGIK-EQQKQKQEEEPLE----- 303

vic 348 inkqVQNYKAKLSSGDFVFIIPAGHPVAVKASNLDDLGFGINAENNRNFLAGDEDNVISQIQRPVKELAFPGSAQEVDR 427
cong 304 ----VQRYRAELSEDDVFIIPAAYPFVFNATSNLNF LAFGINAENNRNFLAGEKDNVVRQTERQVQELAFPGSAQDVER 379

vic 428 ILENQKQSHFADAQPQQRERGSRETRDRLSSV 459
cong 380 LLKKQRESYFVDAQPQQKEEGSKGRKGFPSI 411

```

**Figura 1. Sequência de aminoácidos da vicilina (vic) e da  $\beta$ -conglucina (cong).** Os aminoácidos idênticos entre as duas proteínas estão representados pelas letras em vermelho, os aminoácidos do mesmo grupo estão pelas letras azuis e os aminoácidos em cinza são os que diferem entre as duas proteínas (Adaptado do: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cblast/cblast.cgi?client=entrez&output=html&query\\_gi=313671&hit=21465628&hsp=1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cblast/cblast.cgi?client=entrez&output=html&query_gi=313671&hit=21465628&hsp=1). Acessado em: 10 de setembro de 2006).



**Esquema 2. Diagrama esquemático do trímero da  $\beta$ -conglicina.** As três subunidades da  $\beta$ -conglicina estão em verde, azul e rosa. As moléculas de carboidratos são mostradas em amarelo (Extraído de MARUYAMA *et al.*, 2001).

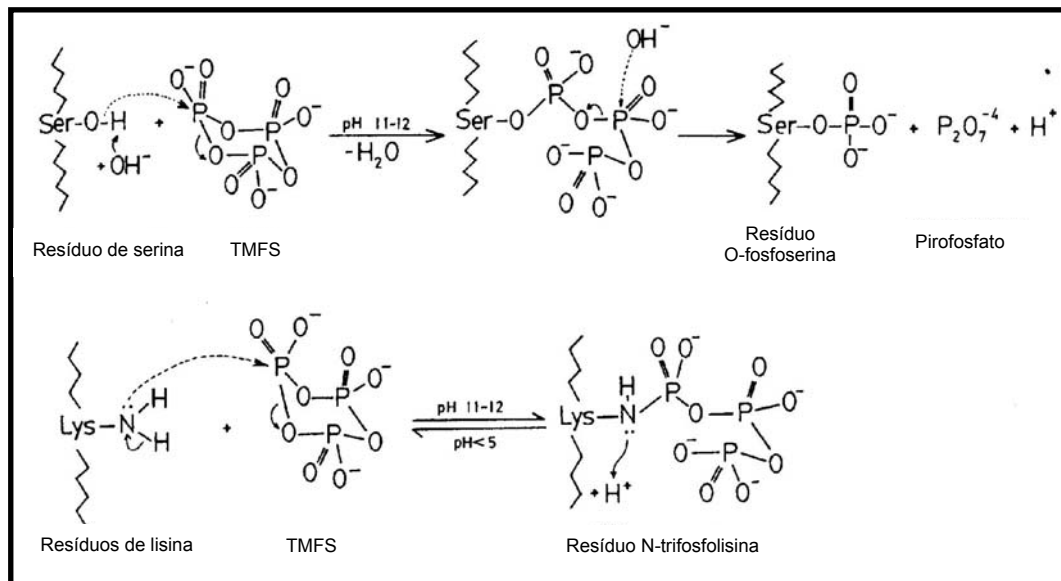
#### 1.4. Fosforilação química com TMFS

A fosforilação química pode ser utilizada para alterar as propriedades funcionais das proteínas presentes nos alimentos. Esse método de modificação de proteínas pode ser realizado tanto com o oxiclreto de fósforo ( $\text{POCl}_3$ ) como com o trimetafosfato de sódio (TMFS ou STMP – do inglês, "sodium trimetaphosphate"). Estudos comparativos das vantagens e desvantagens de cada reagente indicaram que o TMFS era o reagente mais apropriado, pois o mesmo apresenta custo inferior e seu emprego é mais indicado para o setor alimentício (SGARBIERI, 1996). De acordo com a resolução CNS/MS n°4, de 24 de novembro de 1988, o TMFS pode ser utilizado como estabilizante em diversos alimentos como leite condensado, leite em pó, leite evaporado, produtos cárneos cozidos, inclusive conservas enlatadas, queijo fundido, queijo pasteurizado, requeijão e revestimento externo de pescado

congelado. O limite máximo permitido de TMFS adicionado no alimento varia de 0,2-0,5 g/ 100 g, dependendo do tipo de alimento.

A reação de fosforilação de proteínas por TMFS ocorre em meio fortemente alcalino (pH 11-12) e temperatura em torno de 30 °C (SUNG *et al.*, 1983) e o fosfato é inserido predominantemente em resíduos de serina ou em menor proporção em resíduos de lisina. O mecanismo proposto pelos autores sugere que o resíduo de serina é fosforilado em seu grupamento hidroxila, ao mesmo tempo em que há liberação de quantidade equimolar de pirofosfato. No caso da lisina, há a formação do derivado N-trifosfolisina, sendo a reação reversível em pHs ligeiramente baixos (pH < 5) sem a formação de pirofosfato (**esquema 3**) (SGARBIERI, 1996; SUNG *et al.*, 1983).

O TMFS também é muito utilizado para fosforilação de amido, dando origem a amidos quimicamente modificados, como fosfato de diamido, muito utilizado como estabilizante em vários alimentos. A fosforilação do amido ocorre nas mesmas condições descritas acima. O amido quimicamente modificado geralmente é mais resistente à gelatinização, e preparações na forma de pasta feitas deste amido possuem maior estabilidade térmica do que pastas produzidas com amido não modificado (LIM & SEIB, 1993). O Food and Drug Administration – FDA (2005) permite, para alimentos, o uso de amidos modificados com TMFS, cuja concentração máxima de fósforo residual não deve ultrapassar 0,04%.



Esquema 3. Mecanismo de fosforilação por TMFS (Adaptado de SUNG *et al.*, 1983).

### 1.5. Propriedades Funcionais

As propriedades funcionais têm sido definidas como qualquer propriedade de um alimento ou componente de um alimento, excetuando-se as nutricionais, que influencie a sua aceitação e utilização. O somatório das propriedades funcionais de um alimento ou ingrediente alimentício é referido como "funcionalidade". Adicionalmente, o "valor funcional" refere-se a uma característica de funcionalidade de um produto ou ingrediente alimentício que aumente a sua aceitação e utilização (SGARBIERI, 1996).

As propriedades funcionais das proteínas dependem de suas propriedades físicas e químicas e são muito importantes para o preparo de determinados tipos de alimentos, bem como para a sua aceitação pelo consumidor. Essas propriedades expressam o comportamento das proteínas em um alimento sob as condições de tratamento e/ou conservação desse alimento (SGARBIERI, 1996).

Uma classificação bastante racional das propriedades funcionais foi descrita por SGARBIERI (1996), como segue:

- hidrofílicas – depende da afinidade da proteína pela água (solubilidade, capacidade de hidratação e retenção de água)
- interfásicas – depende da capacidade das moléculas de proteína se unirem e formarem uma película entre duas fases imiscíveis (emulsificação, formação de espuma)
- intermoleculares – depende da habilidade da proteína de formar ligações cruzadas entre suas próprias moléculas ou com outros componentes do alimento (formação de fibras de proteínas, geleificação, formação de massa visco-elástica)
- reológicas – propriedades que dependem de características físico-químicas específicas das proteínas (viscosidade)
- sensoriais – são propriedades que se manifestam através dos órgãos dos sentidos, por isso, também chamadas de propriedades sensoriais (textura, cor, gosto, aroma).

Nessa dissertação, abordaremos a solubilidade e a geleificação. Tais propriedades detalharemos a seguir.

A solubilidade é uma propriedade físico-química fundamental das proteínas, também classificada como uma propriedade funcional pela importância que exerce sobre a funcionalidade das proteínas nos alimentos. Depende de vários fatores como: massa molecular e conformação das moléculas; densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH, natureza e concentração de íons ou força iônica e temperatura (ADEBOWALE & LAWAL, 2004; SEENA & SRIDHAR, 2005; SGARBIERI, 1996; MWASARU *et al.*, 2000).

O pH afeta a densidade e a distribuição de cargas na molécula da proteína, de tal forma que no ponto isoelétrico (pI), pH no qual o número de cargas positivas e negativas é igual, a proteína apresentará um mínimo de solubilidade. Nessas condições, as moléculas de proteína apresentam a menor afinidade pelo solvente (água) e atraem-se mutuamente formando uma massa insolúvel que se precipita (LEHNINGER *et al.*, 1995; SGARBIERI, 1996).

A geleificação é um processo complexo e normalmente ocorre com o resfriamento da solução coloidal, após aquecimento prévio. A ação do calor promove a desnaturação da proteína e a conseqüente abertura das cadeias com a exposição de grupos hidrofóbicos que se atraem mutuamente. Concomitantemente, podem se formar ligações cruzadas, tipo ligações de enxofre que promovem a formação de estrutura tridimensional capaz de aprisionar água e produzir a imobilização do sistema, dando origem ao chamado ponto de gel (SGARBIERI, 1996).

Em alguns casos, a geleificação pode ocorrer sem aquecimento, como exemplo temos: adição de íons  $\text{Ca}^{++}$  em micelas de caseína, alcalinização seguida de acidificação até alcançar o pI (SGARBIERI, 1998) ou através do uso da alta pressão hidrostática (MOLINA *et al.*, 2002).

Muitas proteínas são utilizadas pela indústria de alimentos no intuito de melhorar suas propriedades funcionais, mais do que aumentar o seu valor nutritivo. As proteínas de sementes, em especial as leguminosas, são consideradas proteínas de fácil obtenção e baixo custo, porém costumam apresentar baixa funcionalidade. Nesse sentido, vários esforços têm sido feitos para modificar essas proteínas e aumentar o valor funcional. Tais modificações dizem respeito às alterações intencionais nas propriedades físico-químicas das proteínas através de agentes químicos, enzimáticos ou físicos, e incluem sulfonação, deaminação alcalina,

carboximetilação, succinilação (EL-ADAWY, 2000) e alquilação (SUNG *et al.*, 1983). Outras técnicas também estão sendo aplicadas, como: fosforilação enzimática (CAMPBELL *et al.*, 1992); fosforilação química (KRAUSE, 2002); glicosilação (BANIEL *et al.*, 1992; PEDROSA *et al.*, 1997); hidrólise alcalina (KRISTINSSON & RASCO, 2000); acilação (KRAUSE, 2002) e acetilação (EL-ADAWY, 2000).

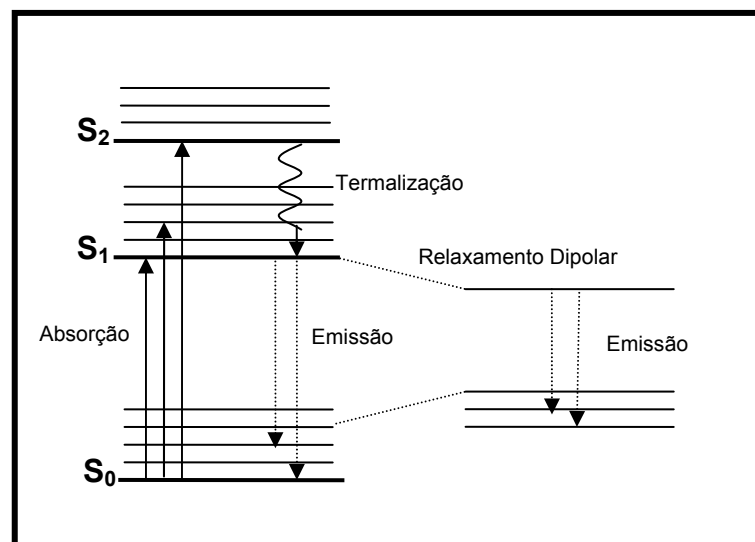
Além disso, muitos estudos têm investigado os efeitos de agentes químicos e físicos, como, por exemplo, cloreto de sódio (NaCl) e alta pressão hidrostática, sobre as propriedades funcionais de proteínas. Estes dois agentes perturbadores são muito utilizados na indústria alimentícia como forma de preservar o alimento, aumentando seu tempo de prateleira. RAGAB *et al.* (2004) mostraram que a adição de NaCl 0,5 M aumentou de 5% para 18% a solubilidade do isolado protéico de feijão fradinho no seu ponto isoelétrico. MWASARU *et al.* (2000) mostraram que o aumento de força iônica de 0,1 para 0,5 M resultou em uma significativa redução da capacidade de geleificação do isolado protéico de feijão fradinho e feijão guandu. Em 2006, BOUAOUINA *et al.* demonstraram que a alta pressão hidrostática, com valores até 300 MPa, aumentou a estabilidade de formação de espuma do isolado protéico do trigo. CHAPLEAU *et al.* (2003) observaram que até 400 MPa, a solubilidade das proteínas de tremoço-branco não foi afetada, no entanto, entre 400 e 600 MPa, as proteínas perderam um quarto de sua solubilidade.

### **1.6. Espectroscopia de fluorescência no estudo das estruturas terciárias e quaternárias de proteínas**

A espectroscopia de fluorescência tem tido crescente aplicação em estudos físico-químicos da estrutura de proteínas. Os aspectos básicos envolvidos na



emissão de fluorescência podem ser melhor compreendidos através do diagrama de Jablonski (**esquema 4**). A absorção de um fóton de comprimento de onda adequado resulta na elevação de um elétron da molécula a um estado excitado denominado singlete  $S_1$ , o qual corresponde a um nível energético mais alto. A emissão de fluorescência é observada quando este elétron excitado retorna, em uma faixa temporal próxima ao nano segundo, do estado singlete  $S_1$  ao estado fundamental  $S_0$  (**esquema 4**). Devido às perdas energéticas que podem ocorrer durante o estado excitado, a emissão de fluorescência se apresenta deslocada para comprimentos de onda mais longos (menor energia) em relação ao comprimento de onda da absorção do respectivo cromóforo. Quanto maior o tempo de vida no estado excitado, maior a probabilidade da ocorrência de processos do estado excitado que possam influenciar na emissão de fluorescência (CRONEY *et al.*, 2001; LAKOWICZ, 2000).



**Esquema 4. Diagrama de Jablonski (Adaptado de LAKOWICZ, 2000)**

A fluorescência intrínseca das proteínas resulta da emissão de resíduos aromáticos, como: triptofano, tirosina e fenilalanina. Em proteínas que contêm estes três aminoácidos, a fluorescência é usualmente dominada pela contribuição de

resíduos de triptofano, pois seu rendimento quântico da emissão de fluorescência é geralmente maior do que os respectivos valores para tirosina e fenilalanina. O grupamento indol dos resíduos de triptofano é bastante sensível às mudanças de polaridade do meio em que se encontra. O máximo de emissão de fluorescência do triptofano livre em solução aquosa é em torno de 352 nm e se torna menor, em torno de 320 nm, quando o triptofano se encontra em solvente apolar ou em um meio hidrofóbico como no interior da proteína. Sendo assim, quanto mais apolar o meio, maior é o deslocamento do comprimento de onda de emissão máxima do triptofano para o azul. Quando a proteína é gradualmente desenovelada, os resíduos de triptofano se tornam cada vez mais expostos à solução aquosa. Então, o comprimento de onda de emissão máxima desloca para o vermelho e finalmente alcança 352 nm quando o triptofano está completamente solvatado, por exemplo, quando a proteína está completamente desnaturada (LAKOWICZ, 2000; RUAN & BALNY, 2002).

Para medir emissão de fluorescência somente dos resíduos de triptofano, sem qualquer interferência dos resíduos de tirosina e fenilalanina, a amostra de proteína deve ser excitada a 295 nm ou maiores comprimentos de onda, nos quais a tirosina e fenilalanina não absorvem. Na grande maioria dos experimentos laboratoriais, a contribuição da emissão de fenilalaninas pode ser negligenciada no estudo da fluorescência de proteínas (LAKOWICZ, 2000).

Em relação à tirosina, seu comprimento de onda de emissão máxima é em torno de 305 nm e este resíduo é insensível à polaridade de solvente. A emissão de tirosina da maioria das proteínas é pequena e às vezes não é detectável. Essa ausência ou supressão da fluorescência da tirosina pode ser atribuída a uma série de fatores. Estes incluem transferência de energia da tirosina para os resíduos de

triptofano, ou pela presença de grupos carboxil carregados ou grupos amino não carregados próximos da tirosina. Assim, a supressão de fluorescência é devido à transferência de um próton para estes aceptores de prótons durante o tempo de vida do estado excitado. Além disso, a fluorescência da tirosina é também suprimida por grupos amino carregados e por grupos carboxilatos neutros.

É importante ressaltar que a excitação da tirosina modifica seu estado de ionização: no estado fundamental, o  $pK_a$  da hidroxila do grupamento aromático está em torno de 10,3, e no estado excitado o  $pK_a$  cai para 4,0. Portanto, a tirosina pode sofrer ionização durante o tempo de vida do estado excitado, levando à formação do ânion tiosinato, que possui o pico de emissão em torno de 345 nm. A ionização do estado excitado é facilitada pela presença e proximidade de aceptores de prótons, que podem ser íons de fosfato presentes na solução ou resíduos glutâmicos e/ou aspárticos na proteína (LAKOWICZ, 2000). SHIMIZU e IMAKUVO (1977) investigaram o efeito de fosfato sobre o espectro de emissão da tirosina e mostraram que o aumento da concentração de fosfato (0 - 3,5 M) na solução resultou na diminuição progressiva da emissão da tirosina a 305 nm. Concomitantemente, uma nova emissão foi observada a 345 nm, caracterizada como emissão de tiosinato.

Entre os parâmetros relacionados ao espectro de fluorescência, o comprimento de onda de máxima emissão, a intensidade de emissão de luz e o centro de massa espectral de emissão são os mais utilizados na apresentação dos dados obtidos nos estudos (RUAN & BALNY, 2002). Os estudos da estrutura de proteínas através de fluorescência estão baseados na sensibilidade da emissão fluorescente a mudanças nas propriedades físico-químicas do meio na vizinhança dos fluoróforos. Assim, mudanças na estrutura de proteínas causadas por

desnaturação, ionização, polimerização, interações moleculares ou outros fenômenos podem levar à supressão ou aumento na intensidade de fluorescência ou no tempo de vida de permanência no estado excitado, mudanças na polarização da emissão, ou mudanças nos espectros de excitação e emissão.

## **1.7. Agentes Perturbadores da Estrutura de Proteínas**

### **1.7.1. Glicerol**

Glicerol é um cosolvente que tem mostrado aumentar a estabilidade de proteínas (HERBERHOLD *et al.*, 2004; PEDROSA & FERREIRA, 1994; PRIEV *et al.*, 1996). Tem sido proposto que este fenômeno ocorre devido à hidratação preferencial da proteína pela exclusão das moléculas de cosolventes da sua superfície, criando uma tendência da proteína em diminuir sua superfície (GEKKO & TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF *et al.*, 1976) sem induzir mudanças conformacionais (TIMASHEFF, 1993). Em outras palavras, o contato entre as regiões não-polares, sejam do interior da cadeia polipeptídica, no caso de equilíbrios de desnaturação, ou de regiões interfaciais no caso de equilíbrios de associação, e a mistura água-glicerol é entropicamente mais desfavorável que o contato com a água. Como resultado, os grupos hidrofóbicos da superfície migrariam para o interior da proteína, fora do contato com o solvente. Além disso, o glicerol é excluído destas regiões não-polares, indo para o solvente “bulk”, e deixando para trás uma camada enriquecida em água (GEKKO & TIMASHEFF, 1981). No entanto, SCHARNAGL *et al.* (2005) observaram que a análise da distribuição de água e glicerol na camada de solvatação do citocromo *c* revelou que o glicerol em alta concentração, em torno de

60%, não é excluído desta camada. Essa distribuição pode ser devido à formação de ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio do glicerol e doadores de hidrogênio na superfície da proteína.

Em 1994, PEDROSA e FERREIRA mostraram que a presença de 20% de glicerol, ao mesmo tempo em que protege a vicilina da dissociação induzida por alta pressão hidrostática, permite um aumento significativo na reassociação correta do oligômero após o retorno à pressão atmosférica. HERBERHOLD *et al.* (2004) mostraram que o glicerol aumentou a energia livre de Gibbs de desnaturação da enzima Snaase, a nuclease de *estafilococos*, dessa forma, agindo como cosolvente estabilizante da estrutura da proteína.

GEKKO e TIMASHEFF (1981), ao utilizarem medidas volumétricas na solução proteína-glicerol, atribuíram o efeito do glicerol sobre o volume específico da proteína à modificação da camada de hidratação, com nenhum efeito sobre o interior da proteína. No entanto, PRIEV *et al.* (1996) sugeriram que o glicerol desidrata a proteína, diminuindo seu volume interno e sua compressibilidade, assim como aumenta a estabilidade de proteínas.

VALENTE-MESQUITA *et al.* (1998) mostraram que a adição de 20% de glicerol promoveu um ligeiro deslocamento da emissão de fluorescência da  $\beta$ -lactoglobulina para o azul, à pressão atmosférica, provavelmente refletindo uma diminuição da polaridade do meio. Os resultados do centro de massa obtidos na ausência ou presença de glicerol foram aproximadamente paralelos, indicando que o glicerol não teve efeito estabilizante contra a alta pressão hidrostática de até 3,5 kbar.

### **1.7.2. Sais**

Soluções salinas afetam de diferentes maneiras as propriedades de macromoléculas, como sua estabilidade, solubilidade e atividade biológica (LINDMAN *et al.*, 2006; RAGAB *et al.*, 2004 e VOGEL, 2004). Em forças iônicas ou concentrações salinas baixas, a solubilidade das proteínas tende a aumentar, fenômeno conhecido como “salting in”, porém à medida que se eleva a concentração salina além de certos limites, as proteínas tendem a se tornar insolúveis e precipitar, o que caracteriza o “salting out”. Os íons passam a competir pela água com as moléculas de proteína, destruindo a sua camada de hidratação e permitindo que as moléculas de proteína se atraiam mutuamente, agregando-se e formando precipitado. Esse é o princípio da precipitação de proteínas por sais como, por exemplo, o sulfato de amônio (SGARBIERI, 1996).

As soluções salinas podem afetar proteínas de três formas: (1) O efeito Debye-Hückel, uma redistribuição de cargas próxima da superfície da proteína, é observada para todos os sais. Isto pode afetar a conformação da proteína e sua solubilidade. (2) O efeito Hofmeister, uma reorganização das moléculas de água ao redor dos íons. Este efeito é responsável pelo “salting in” ou “salting out” da proteína. (3) Interações específicas entre os íons da solução salina e os resíduos dos aminoácidos carregados sobre a superfície da proteína (MANCEVA *et al.*, 2004).

Princípios de Le Chatelier implicam que se o cosolvente liga preferencialmente ao estado nativo da proteína, o estado nativo será estabilizado e a desnaturação se torna menos favorável quando a concentração do cosolvente aumenta. No entanto, cosolventes que ligam preferencialmente à proteína desnaturada, desestabilizarão o estado nativo (SCHELLMAN, 1987).

Efeitos de diferentes sais sobre a estabilidade e solubilidade de proteínas foram descritos pela primeira vez por HOFMEISTER (1888). De acordo com a série de Hofmeister, ou seja, série de cátions e ânions ordenados de acordo com os efeitos dos íons sobre a estabilidade e solubilidade da proteína, o NaCl é um agente neutro por não apresentar efeito estabilizante nem desestabilizante. Assim, era esperado que o NaCl não tivesse qualquer efeito sobre a estrutura da proteína. No entanto, muitos estudos têm demonstrado o contrário. MANCEVA *et al.* (2004) mostraram que Cyt1A, uma toxina citolítica produzida pelo *Bacillus thuringiensis*, é afetada por mudanças na concentração de NaCl. Um aumento de seis vezes na fluorescência de *Nile red* em função da concentração de NaCl foi observado em pH neutro, enquanto que nenhum efeito foi encontrado em pHs ácidos. Isto indica que o aumento da força iônica induz um aumento na hidrofobicidade de superfície da toxina em solução, que pode levar a um aumento da agregação.

Em 1989, TIMASHEFF e ARAKAWA revisaram os estudos acerca da estabilização de estruturas de proteínas por diversos co-solventes, incluindo vários sais, tais como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, e sulfato de guanidina. Aparentemente, o efeito estabilizante destes sais se dá não por interação direta com a proteína, mas sim através de um aumento na tensão superficial do solvente que resulta na exclusão do co-solvente da camada de solvatação da proteína. Assim, os cátions podem influenciar o grau de organização da água em torno de grupamentos que fazem parte da interface proteína-água, mudando, assim, o potencial químico das subunidades dissociadas no sentido de favorecer o oligômero.

Os resultados obtidos por PEDROSA e FERREIRA (1994) indicaram que a presença de 0,5 M de NaCl, KCl ou LiCl conferiu significativa proteção contra a dissociação da vicilina por pressão, mesmo a pH 10,0, em que a dissociação é

favorecida. É possível que o efeito estabilizante dos cátions seja de natureza eletrostática, e se dê pela ligação dos cátions a resíduos ácidos de aminoácidos presentes na proteína. Outra alternativa seria que os cátions podem estar blindando cargas negativas e eliminando eventuais forças de repulsão, aumentando a estabilidade do oligômero. Adicionalmente, os cátions poderiam participar da formação de pontes iônicas inter-cadeia, resultando em ligações mais fortes entre as subunidades. VALENTE-MESQUITA *et al.* (1998) observaram que NaCl 1 M causou estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina contra dissociação de suas subunidades induzida por pressão. Esta estabilização pode ser devido à blindagem de cargas e uma diminuição nas interações eletrostáticas não favoráveis entre as subunidades.

CERASOLI *et al.* (2003) mostraram que apesar da chiquimato quinase de *Erwinia chrysanthemi* ter sofrido desnaturação por uréia, ocorreu um aumento na estabilidade da mesma na presença de NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este efeito pode refletir os efeitos gerais da força iônica assim como ligação específica ao estado enovelado e, portanto sua estabilização. Desta forma, este trabalho mostrou que é possível induzir o renovelamento da enzima em uréia 4 M, simplesmente pelo aumento da força iônica.

### **1.7.3. Alta pressão hidrostática**

Desde o pioneiro trabalho de BRIDGMAN (1914), mostrando que a pressão de 7 kbar é capaz de desnaturar as proteínas da clara do ovo de uma forma similar, porém não idêntica, à alta temperatura, vem crescendo o interesse na aplicação de pressão como uma variável em sistemas biológicos. Uma das razões para este interesse é a possibilidade de utilização da pressão em áreas biotecnológicas



específicas, principalmente em processamento de alimentos (HAYASHI, 1992). Nesse sentido, as pesquisas têm demonstrado que o tratamento por alta pressão hidrostática (APH) permite a obtenção de produtos de elevada qualidade, com grande capacidade de conservação, sem a utilização de aditivos químicos (PARK *et al.*, 2002; SGROPPO *et al.*, 2002).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado o potencial da APH para revelar mudanças na estrutura protéica que são inacessíveis por métodos bioquímicos e biofísicos convencionais (LULLIEN-PELLERIN & BALNY, 2002; MARCHAL *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2001). Devido ao progresso tecnológico, muitos problemas instrumentais que dificultavam a pesquisa com alta pressão foram resolvidos e, atualmente, quase todos os métodos físicos usados, rotineiramente, à pressão atmosférica, podem ser adaptados para estudos com alta pressão, tais como: espectroscopia vibracional (DZWOLAK *et al.*, 2002), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (LI & AKASAKA, 2006), cristalografia de raios-X (FOURME *et al.*, 2006), espectroscopia de fluorescência (RUAN & BALNY, 2002; SILVA *et al.*, 2001) e eletroforese (LIU *et al.*, 2005).

Os efeitos da pressão podem ser compreendidos com base no princípio de Le Chatelier, segundo o qual a aplicação de pressão desloca o equilíbrio de um sistema em direção ao estado que ocupa um menor volume, e acelera qualquer processo para o qual o estado de transição tenha um volume menor do que o ocupado pela conformação nativa, compactamente enovelada. Em outras palavras, a pressão favorece os processos que são acompanhados por variações de volume negativas, como a dissociação e a desnaturação de proteínas, através do enfraquecimento das interações inter- ou intra- subunidades que estabilizam as estruturas quaternárias e terciárias, respectivamente (MOZHAEV *et al.*, 1996).

O volume de uma proteína em solução é a soma de três constituintes principais: o volume individual dos átomos, o volume vazio das cavidades internas causado pelo empacotamento imperfeito dos resíduos de aminoácidos e a contribuição dada pela solvatação das ligações peptídicas e das cadeias laterais de aminoácidos. A compressibilidade de uma proteína é em grande parte determinada pela compressão das cavidades internas, que depende do empacotamento interno. A aplicação de APH induz tanto mudanças locais quanto globais na estrutura da proteína e, finalmente, pode levar à desnaturação (MOZHAEV *et al.*, 1996). Enquanto pressões de 0,5 – 3 kbar são suficientes para causar dissociação de muitas proteínas oligoméricas e de complexos multiprotéicos (SILVA & WEBER, 1993), pequenas proteínas monoméricas são, freqüentemente, desnaturadas em intervalos de pressão que variam de 4 a 12 kbar (WEBER, 1992), embora sejam conhecidos casos em que proteínas monoméricas desnaturam em pressões mais baixas (PREVELIGE *et al.*, 1994).

As interações fracas são uma das chaves para entender os efeitos da alta pressão hidrostática nos biomateriais. As interações fracas estão envolvidas tanto em níveis intermoleculares como intramoleculares. A maioria das interações intramoleculares encontradas nas biomoléculas são iônicas, hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e hidratação (ligação de hidrogênio com moléculas de água na primeira camada de solvatação e com água dentro das cavidades protéicas). As interações intermoleculares são as feitas entre proteína-proteína, enzima-substrato ou enzima-inibidor, proteína-ligante e interações da proteína com o solvente. Dependendo de sua natureza, essas interações são afetadas positiva ou negativamente pela pressão (MARCHAL *et al.*, 2005).

A APH promove alterações pouco significativas na estrutura secundária das proteínas, pois esta é estabilizada por ligações de hidrogênio, que são pouco afetadas, uma vez que a variação de volume da quebra de uma ligação de hidrogênio é zero. No que diz respeito às interações eletrostáticas (pontes salinas) e interações hidrofóbicas, sua quebra é acompanhada de uma diminuição de volume resultante da eletrostricção e solvatação dos resíduos expostos e por isso afetados pela APH (MOZHAEV *et al.*, 1994). Ficam claras, portanto, as razões físicas para a seletividade da APH em afetar principalmente as estruturas quaternárias e terciárias das proteínas. Esta peculiaridade faz com que a APH seja uma excelente ferramenta para popular estados intermediários das proteínas, já que estes se caracterizam por apresentar uma reduzida perda da estrutura secundária, porém uma grande perda na estrutura terciária (FERREIRA *et al.*, 2005).

Podemos dizer que, com exceção das ligações de hidrogênio, todas as demais interações fracas responsáveis por manter as proteínas em estado nativo são desfeitas sob pressão. A APH é uma ferramenta capaz de perturbar a estrutura protéica atuando unicamente nas interações não covalentes, de uma forma controlada (MARCHAL *et al.*, 2005; MOZHAEV *et al.*, 1994). Ela pode promover a dissociação de pares iônicos levando à eletroconstricção, e a hidratação das cavidades do interior da proteína levando a uma conformação transicional que resulta no desenovelamento. Também é utilizada para caracterizar a importância das interações hidrofóbicas na estabilidade da proteína (BOONYARATANAKORNKIT *et al.*, 2002).

Em sistemas biológicos onde o conhecimento das interações moleculares é essencial, a pressão permite variar controladamente as distâncias intermoleculares, o que resulta na desnaturação ou dissociação de proteínas (HEREMANS, 1982;

WEBER & DRICKAMER, 1983; WEBER, 1992), permitindo assim estudar os fatores que determinam o seu enovelamento. Por estabilizar intermediários de enovelamento, permite a caracterização de sua estrutura e sua dinâmica, possibilitando desvendar mecanismos de enovelamento (SILVA *et al.*, 2001).

Além disso, ela tem a propriedade de perturbar as macromoléculas em solução, alterando somente o volume total do sistema. Essa característica contrasta com aquelas de outras perturbações, como alta temperatura e agentes desnaturantes, cujos efeitos dependem de vários fatores. Um aumento na temperatura produz simultaneamente mudanças na energia e volume total, enquanto os efeitos da desnaturação química dependem de propriedades de ligação das proteínas (SILVA *et al.*, 2001).

#### **1.7.4. Desnaturantes químicos**

As proteínas podem ser desnaturadas em soluções aquosas por altas concentrações de certos reagentes como uréia ou cloridrato de guanidina (GdnHCl). As curvas de desnaturação por uréia e GdnHCl são freqüentemente usadas para se obter uma estimativa da estabilidade conformacional entre o estado nativo e o estado desnaturado (CHATTERJEE & MANDAL, 2003; COBOS *et al.*, 2002).

A estabilidade de uma proteína nativa refere-se principalmente ao efeito hidrofóbico, no qual está associado com a estrutura tetraédrica da água. FRANK (2002) sugeriu que qualquer cosolvente que é incompatível com o arranjo tetraédrico das moléculas de água destruirá esta estrutura da água e enfraquecerá as forças hidrofóbicas. O efeito é similar à influência do aquecimento sobre a estabilidade da proteína: se as interações hidrofóbicas são diminuídas, não favorecerá o

direcionamento dos resíduos hidrofóbicos para o interior da proteína. Esta hipótese é baseada em um aumento na solubilidade de hidrocarbonos na mistura água-uréia.

Uréia e cloridrato de guanidina possuem grupos N-H<sub>2</sub> cujo caráter sp<sup>2</sup> é incompatível com a geometria tetraédrica de moléculas de água. Dessa forma, estes desnaturantes formam somente fracas ligações de hidrogênio com água, portanto, são pouco hidratados (MASON *et al.*, 2003; MOUNTAIN & THIRUMALAI, 2004). Como uma consequência, estas moléculas de cosolventes interagem preferencialmente com regiões pouco hidratadas ou apolares da superfície de proteínas. Assim, sugere-se que a desnaturação pela uréia ou cloridrato de guanidina é acompanhada por uma ligação preferencial de moléculas de cosolventes no estado desnaturado (TIMASHEFF & XIE, 2003). Princípios de Le Chatelier implicam que se o cosolvente liga preferencialmente ao estado nativo da proteína, o estado nativo será estabilizado e a desnaturação se torna menos favorável quando a concentração do cosolvente aumenta. No entanto, cosolventes que ligam preferencialmente à proteína desnaturada desestabilizarão o estado nativo (SCHELLMAN, 1987).

Por outro lado, não é somente a ligação preferencial, mas também a mudança na estrutura da água que pode favorecer a solvatação dos aminoácidos hidrofóbicos. Presumivelmente, os dois mecanismos agem em combinação, especialmente em altas concentrações. Um estudo sobre simulação de dinâmica molecular sobre desnaturação com uréia (BENNION & DAGGETT, 2003) mostrou que o mecanismo de desnaturação é a alteração da estrutura da água. A ligação da uréia com a proteína ocorre em passos subsequentes.

As diferenças na desnaturação de proteínas por uréia e GdnHCl têm sido discutidas em termos de suas diferentes formas de ligação às proteínas (ROSEMAN

& JENCKS, 1975; MAKHATADZE & PRIVALOV, 1992). CHATTERJEE & MANDAL (2003) observaram que o equilíbrio de desnaturação da concanavalina A, lectina da *Canavalia ensiformis*, na presença de uréia ou GdnHCl apresentou três estados, englobando um estado monomérico estruturado entre os estados tetramérico nativo e monomérico desenovelado. As concentrações de uréia para transições de dissociação e desenovelamento em termos da intensidade de fluorescência, foram 1,4 M e 4,5 M, respectivamente. No entanto para GdnHCl, por ser um desnaturante mais potente do que a uréia, essas concentrações foram 0,8 M e 2,4 M, respectivamente.

PACE *et al.* (1990) propuseram que a força iônica mais alta das soluções de GdnHCl suprimisse os efeitos das interações eletrostáticas entre grupos carregados nas proteínas. Sabe-se que o GdnHCl é um sal e, portanto, espera-se que ele se encontre ionizado em soluções aquosas. Em baixas concentrações, presume-se que os íons  $\text{Gdn}^+$  e  $\text{Cl}^-$  se liguem às cadeias laterais de aminoácidos carregados negativa e positivamente, respectivamente, reduzindo ou eliminando qualquer interação eletrostática estabilizadora ou desestabilizadora. Em altas concentrações, o GdnHCl se torna desnaturante, não importando o tipo de interação eletrostática presente na proteína. MONERA *et al.* (1994b) concluíram que o efeito diferencial do GdnHCl e da uréia sobre as interações eletrostáticas serve para monitorar, seletivamente, a contribuição de diferentes tipos de interações, isto é, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas, para a estabilidade da proteína. Se se deseja avaliar os efeitos das interações eletrostáticas ou se a estabilidade total da proteína é de interesse, as desnaturações por uréia ou temperatura tornam-se escolhas óbvias. Entretanto, se o objetivo é determinar a contribuição específica das interações hidrofóbicas ou não iônicas para a estabilidade protéica, o uso de GdnHCl seria mais

apropriado. Desta forma, o uso dos dois desnaturantes em pauta deveria ser baseado na análise das interações da proteína.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar o efeito da fosforilação com TMFS sobre as propriedades funcionais e a estabilidade estrutural da vicilina de ervilha (*Pisum sativum*) exposta a diversas perturbações físicas (pressão hidrostática e temperatura) e químicas (desnaturantes, variação de pH e uso de sais).

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1- Caracterizar alterações nas propriedades funcionais da vicilina de ervilha após a fosforilação com TMFS;
- 2.2.2- Investigar efeitos de agentes químicos e físicos sobre a solubilidade e a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada;
- 2.2.3- Analisar mudanças estruturais da vicilina fosforilada por perturbação com variáveis químicas (pH, uréia, cloridrato de guanidina, glicerol, NaCl) e físicas (temperatura e pressão).



### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Reagentes**

Albumina bovina, EDTA, leupeptina, PMSF, SBTI, pepstatina A, padrão de alta massa molecular, acrilamida, fluorescamina, coomassie brilliant blue R, bis-acrilamida, persulfato de amônio, uréia e TEMED foram obtidos da SIGMA ALDRICH FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Tris-(hidroximetil) aminometano, ácido bórico, sulfato de amônio, acetato de sódio e citrato de sódio foram obtidos da REAGEN. Acetona, metanol, ácido acético, glicina e glicerol foram obtidos da MERCK. Cloreto de sódio e sacarose foram obtidos da VETEC. Cloridrato de guanidina foi obtido da INVITROGEN. Bis-tris propano foi obtido da USB. SDS foi obtido da BIO-RAD. TMFS da Solutia foi gentilmente doado pelo Dr. Sgarbieri (ITAL, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

#### **3.2. Sementes**

As sementes secas de ervilhas, *Pisum sativum* L. cultivar MIKADO, foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Brasília.

#### **3.3. Obtenção da Vicilina**

A vicilina foi obtida de acordo com o protocolo descrito por PEDROSA e FERREIRA (1994), da forma descrita a seguir: as sementes secas de ervilha eram

trituras em moinho Retsch ZM 1 (H. Jungens and Co., Bremen), utilizando-se peneira metálica com poro de 0,5 mm. A farinha resultante era delipidada com acetona P.A. em 5 ciclos de extração, à temperatura ambiente, na proporção de 1 g de farinha para 10 mL de acetona. Em cada ciclo, a acetona era adicionada sobre a farinha e após 30 minutos, sob agitação, deixava-se o material decantar, desprezando-se o sobrenadante. Após a total evaporação do solvente, a farinha delipidada era então incubada por 1 hora sob agitação constante a 4 °C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, leupeptina 0,5 µg/mL, PMSF 2 µg/mL, SBTI 0,05 µg/mL e pepstatina A 0,07 µg/mL, na proporção de 1 g de farinha para 10 mL de tampão. Este material era então centrifugado por 30 minutos a 8000 rpm (rotor Sorval SS34) entre 12 e 16 °C. O sobrenadante era recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 40% de saturação, sofrendo nova centrifugação nas mesmas condições citadas acima. O sobrenadante era novamente recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 75% de saturação. Após nova centrifugação, o sobrenadante era recolhido e precipitado por sulfato de amônio a 99% de saturação. Centrifugava-se uma última vez e recolhia-se o precipitado, que era ressuspendido em tampão tris-HCl 50 mM pH 10,0 e dialisado em membrana com poro de 4 a 6 kDa, a 4 °C por 48 horas, contra o mesmo tampão.

### **3.4. Dosagem de proteína**

A dosagem de vicilina foi realizada seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina 0,1 g% como padrão. Este método é baseado na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas e/ou aromáticas. No pH de reação, a

interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante, provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica. A reação é lida espectrofotometricamente a 595 nm.

### **3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

#### **3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes**

50 µg da vicilina foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na presença de SDS (LAEMMLI, 1970). O gel de corrida em condições desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1 g%, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, TEMED 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha Tris-HCl 83 mM, SDS 0,07 g%, acrilamida 3,2 g%, bisacrilamida 0,09 g%, persulfato de amônio 0,073 g%, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 g%, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,001 g%, SDS 2 g%, β-mercaptoetanol 10%. Os padrões de massa molecular utilizados foram: miosina (204 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 0,03% (p/v), metanol 46% (v/v) e ácido acético 9% (v/v) por 20 a 30 minutos e descorados com uma solução de metanol 5% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v).

### **3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de SDS**

10  $\mu$ M da vicilina controle e fosforilada foram submetidos à APH por 60 minutos. Em seguida, 50  $\mu$ g de proteína total das amostras que sofreram tratamento com APH, assim como vicilina controle e fosforilada que não foram pressurizadas, foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% na ausência de SDS (LAEMMLI, 1970). O gel de corrida em condições não desnaturantes continha Tris-HCl 375 mM, acrilamida 9,7 g%, bisacrilamida 0,3 g%, persulfato de amônio 0,033 g%, TEMED 0,055 % (v/v), pH 8,8. O gel de empacotamento continha Tris-HCl 83 mM, acrilamida 3,2 g%, bisacrilamida 0,09 g%, persulfato de amônio 0,073 g%, TEMED 0,123 % (v/v), pH 6,8. O tampão de corrida continha Tris-HCl 24,7 mM, glicina 190 mM, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,1 g% e sacarose 15 g%. Após as corridas, utilizando corrente constante de 15 mA, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 0,03% (p/v), metanol 46% (v/v) e ácido acético 9% (v/v) por 20 a 30 minutos e descorados com uma solução de metanol 5% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v).

### **3.6. Densitometria**

A análise densitométrica foi realizada no gel de poliacrilamida na ausência de SDS, utilizando o Programa Image Master TotalLab da Amersham Pharmacia Biotech.

### **3.7. Fosforilação da vicilina com trimetafosfato de sódio – TMFS**

A fosforilação da vicilina foi realizada com algumas alterações do procedimento descrito por SUNG *et al.* (1983). A vicilina foi fosforilada incubando 25 mg de proteína total em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 10,0 com o mesmo volume de solução de trimetafosfato de sódio (TMFS) 1% e 4% (p/v) em tampão borato 200 mM pH 11,0, por 3 horas a 37 °C. Após esse tempo, o material foi dialisado em tampão Tris-HCl 10 mM pH 10,0 por 48 horas, a 4 °C, e congelado a -18 °C até a realização dos experimentos.

### **3.8. Avaliação do grau de fosforilação em aminas**

Fluorescamina é um composto que se liga em resíduos de aminas primárias livres, que podem ser N-terminal e lisinas. A análise da fluorescência utilizando fluorescamina foi realizada com algumas alterações do procedimento descrito por GARESSE (1979). O espectro de emissão de fluorescência foi obtido utilizando um espectrômetro de fluorescência Jasco FP6300 (Faculdade de Farmácia – UFRJ). O comprimento de onda utilizado foi medido entre 460 – 500 nm com excitação a 375 nm. 0,1 mg de vicilina (500 µL) foi adicionado em 300 µL de fluorescamina 0.03% e 1300 µL de água destilada. Após a mistura, a intensidade de fluorescência foi quantificada imediatamente.

### **3.9. Propriedades Funcionais**

#### **3.9.1. Solubilidade**

A solubilidade das vicilinas controle e fosforilada foi determinada pela modificação do método de COFFMAN e GARCIA (1977). Vicilinas controle e fosforilada (0,5 mg/ mL) foram incubadas em uma mistura de tampões (3:2 v/v) contendo: Tris, Glicina, Acetato de sódio e Citrato de sódio, todos a 0,1 M, em diferentes pHs (1,0-10,0). Depois de 5 min sob agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 34.000 g. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Bradford descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em % de proteína presente no sobrenadante.

A solubilidade da vicilina controle e fosforilada foi analisada de três formas: na presença de NaCl 0,5 M, na presença de glicerol 20% e após ser pressurizada a 241 MPa por 30 min.

#### **3.9.2. Capacidade de geleificação**

O método de COFFMAN e GARCIA (1977) foi empregado com algumas modificações. 500 µL da vicilina controle e fosforilada (10 mg/ mL) em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, foram aquecidos a 100 °C por 1 hora em banho maria e logo em seguida resfriados a 4 °C em gelo. Após o resfriamento, o sobrenadante foi desprezado com auxílio de uma pipeta automática, e a porção geleificada, quantificada através de pesagem em balança analítica. Os resultados foram expressos em mg de peso do precipitado geleificado.

A capacidade de geleificação da vicilina controle e fosforilada foi analisada de três formas: na presença de NaCl 0,5 M, na presença de glicerol 20% e após ser pressurizada a 241 MPa por 30 min.

### **3.10. Análises estatísticas**

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o Programa Prism 4 for Windows versão 4.02 e o teste-t foi usado para determinar as diferenças entre as médias com nível de significância com valor de  $P < 0,05$ .

### **3.11. Medidas de fluorescência**

A fluorescência de proteínas é devida à presença dos aminoácidos aromáticos. A vicilina possui um total de 27 tirosinas, 9 em cada subunidade de 50 kDa, e nenhum resíduo de triptofano. Assim, a fluorescência de resíduos de tirosina pode ser utilizada para monitorar mudanças nos estados conformacionais da vicilina (PEDROSA e FERREIRA, 1994).

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL). Os espectros de emissão de tirosina foram obtidos excitando-se a amostra em 272 nm e coletando a emissão na faixa de 290-400 nm. O pico de emissão da amostra fica em torno de 307 nm. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu$ M em Tris-HCl 10 mM pH 10,0, a 23 °C. O resultado é expresso através de gráficos representativos de triplicata.

### **3.12. Estabilidade frente à alta pressão hidrostática**

Nos experimentos de alta pressão hidrostática, as amostras de proteína foram acondicionadas dentro de um cubeta de quartzo em forma de garrafa, que foi vedada com um tubo compressível de polietileno (**esquema 5F**), capaz de equalizar a pressão entre o meio hidrostático (etanol absoluto) e a amostra. Esta cubeta (**esquema 5B**) era acomodada em uma célula de alta pressão (**esquema 5A**) constituída de aço vascomax temperado para esta utilização com três janelas de safira (**esquema 5E**), que permitem o acompanhamento das amostras por medidas de espectroscopia de fluorescência, mesmo durante a aplicação da pressão (PALADINI & WEBER, 1981). Esta célula era acoplada a um gerador de pressão formado por um pistão, duas válvulas e um manômetro (**esquema 6**), por onde se pode regular a pressão exercida sobre a amostra, e ao espectrofluorímetro, permitindo o registro de espectros antes, durante e após a aplicação da pressão.

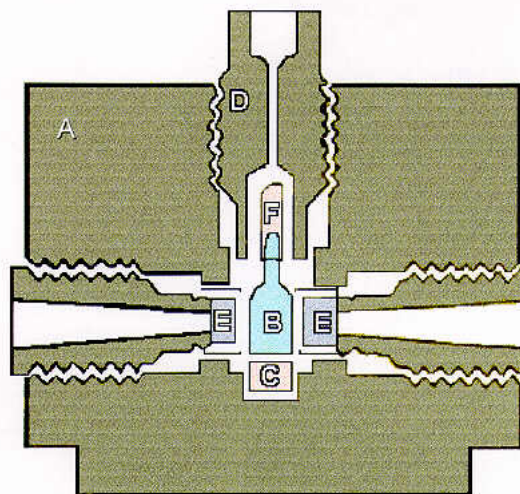
A pressão foi aumentada em passos de 34,5 MPa. A cada passo, a amostra foi incubada para atingir o equilíbrio durante 5 minutos antes de qualquer medida espectroscópica. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu\text{M}$  em Tris-HCl 10 mM pH 10,0, a 23 °C, ou em outras condições, caso indicado. Experimentos controles a pH 9,0 e 10,0, utilizando bis-tris propano 10 mM, ao invés de Tris-HCl, foram realizados obtendo os mesmos resultados. O resultado é expresso através de gráficos representativos de triplicata.

Foram analisadas as seguintes variáveis:

- Dependência da concentração de proteína. As concentrações de proteína utilizadas foram de 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ;

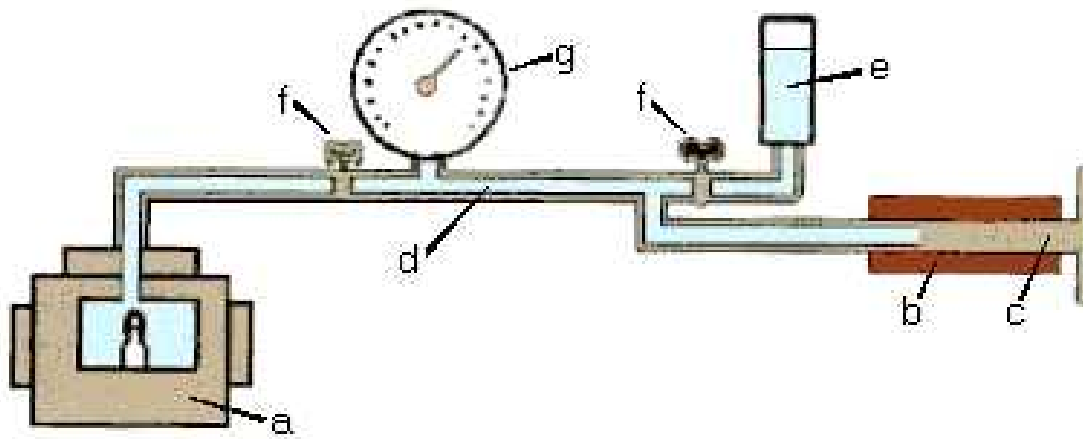


- Efeito da temperatura sobre propriedades estruturais. As variações da temperatura foram 10 °C, 23 °C e 37 °C;
- Efeito de diferentes pHs sobre propriedades estruturais. Os pHs utilizados foram pH 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0;
- Efeito da força iônica sobre propriedades estruturais. As amostras foram dissolvidas em soluções de NaCl 0,5 M;
- Efeito de propriedades osmóticas sobre características estruturais. As amostras foram dissolvidas em soluções de glicerol 20 %.



**Esquema 5. Esquema da célula de alta pressão hidrostática.**

A – Célula de alta pressão; B – Cubeta; C – Suporte para cubeta; D – Anel de vedação e conexão do gerador; E – Janelas de safira; F – Tubo compressível de polietileno.



**Esquema 6. Esquema do sistema gerador de alta pressão hidrostática.**

O sistema é composto pela bomba (a), pelo gerador de pressão (b), o pistão (c), a linha de etanol (d), o reservatório de etanol (e), duas válvulas (f) e o manômetro (g).

**3.13. Estabilidade frente a agentes desnaturantes: cloridrato de guanidina e uréia**

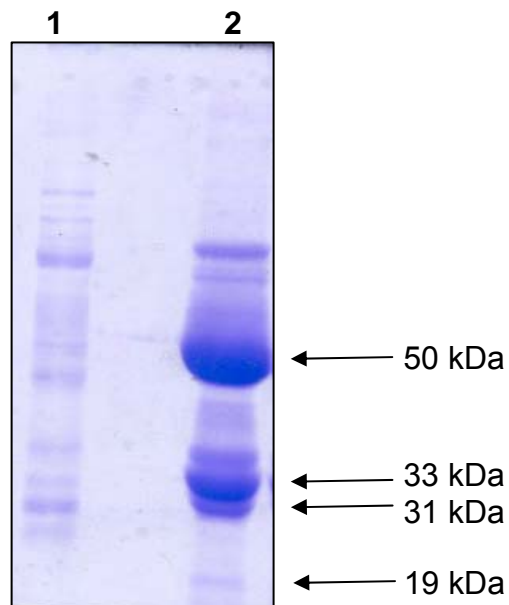
Diferentes concentrações de cloridrato de guanidina e uréia foram dissolvidas em Tris-HCl 10 mM, pH 10 a 23 °C. Para esta análise, 5 µM das vicilinas controle e fosforilada foram misturados e incubados com diferentes concentrações de cloridrato de guanidina (0 - 6 M) ou uréia (0 - 6 M). Depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente, o espectro de emissão de fluorescência foi obtido, utilizando um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL). Os espectros foram obtidos excitando-se a amostra em 272 nm e coletando a emissão na faixa de 290-400 nm. O resultado é expresso através de gráficos representativos de triplicata.

## **4. Resultados**

### **4.1. Parte I: Propriedades funcionais da vicilina controle e fosforilada com 1% e 4% de TMFS**

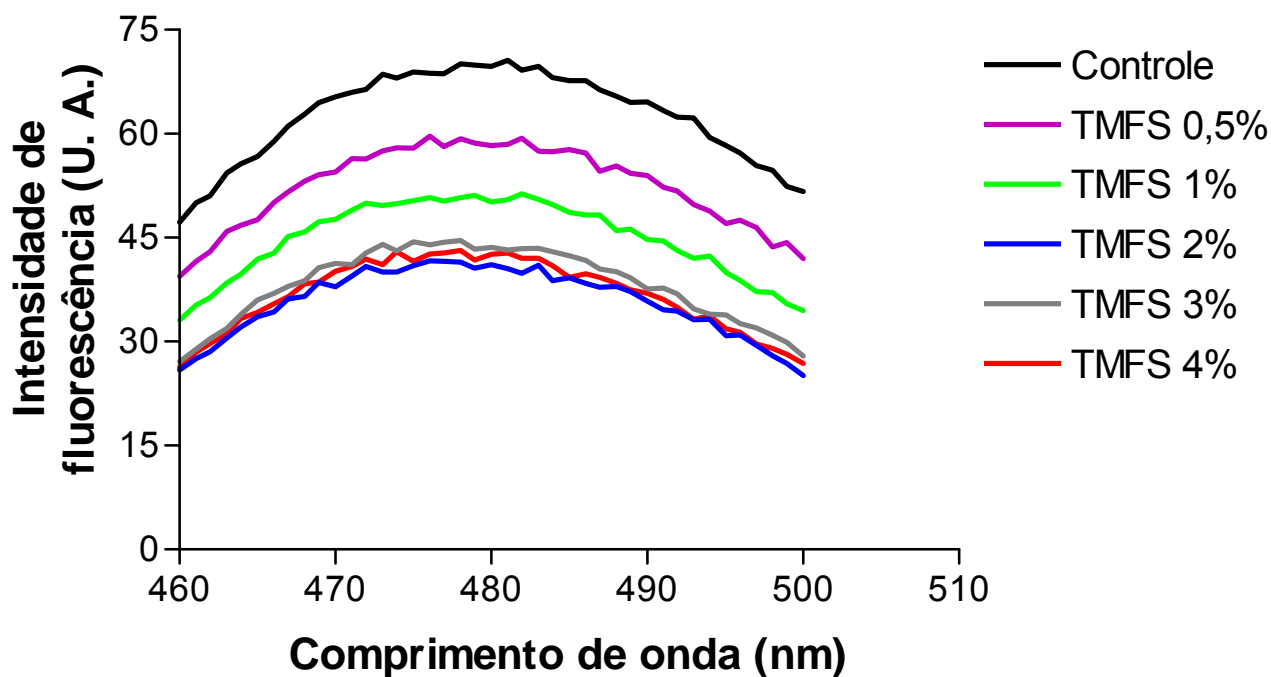
Para o estudo do efeito da fosforilação sobre as propriedades funcionais e estruturais da vicilina, primeiramente a proteína foi obtida. O processo de obtenção consiste em precipitar por sulfato de amônio o homogenato obtido através da farinha de sementes secas de ervilha desengordurada. Como podemos observar na **figura 2**, a vicilina apresenta subunidades de 50 kDa, 33 kDa, 31 kDa e 19 kDa.

A vicilina de ervilha já se encontra fosforilada após sua obtenção, assim, neste trabalho, estamos aumentando seu nível de fosforilação ao utilizarmos concentração final de trimetafosfato de sódio 0,5%, 1%, 2%, 3% ou 4%. Sabe-se, que a fosforilação química com TMFS ocorre preferencialmente em resíduos de serina ou em menor proporção em resíduos de lisina (SUNG *et al.*, 1983). A fim de avaliarmos o grau de fosforilação em aminas, utilizamos fluorescamina, um composto fluorescente que se liga em aminas primárias livres, podendo ser N-terminal e lisinas (GARESSE, 1979). Na **figura 3**, observamos uma diminuição gradativa da intensidade de fluorescência em função do aumento dos níveis de fosforilação com TMFS. No entanto, a partir de 2% de TMFS, não ocorreram mudanças na intensidade de fluorescência. Assim, para os experimentos de propriedades funcionais e estruturais da vicilina, decidimos utilizar as concentrações de 1% e 4% TMFS.



**Figura 2. Eletroforese em condições desnaturantes da vicilina.**

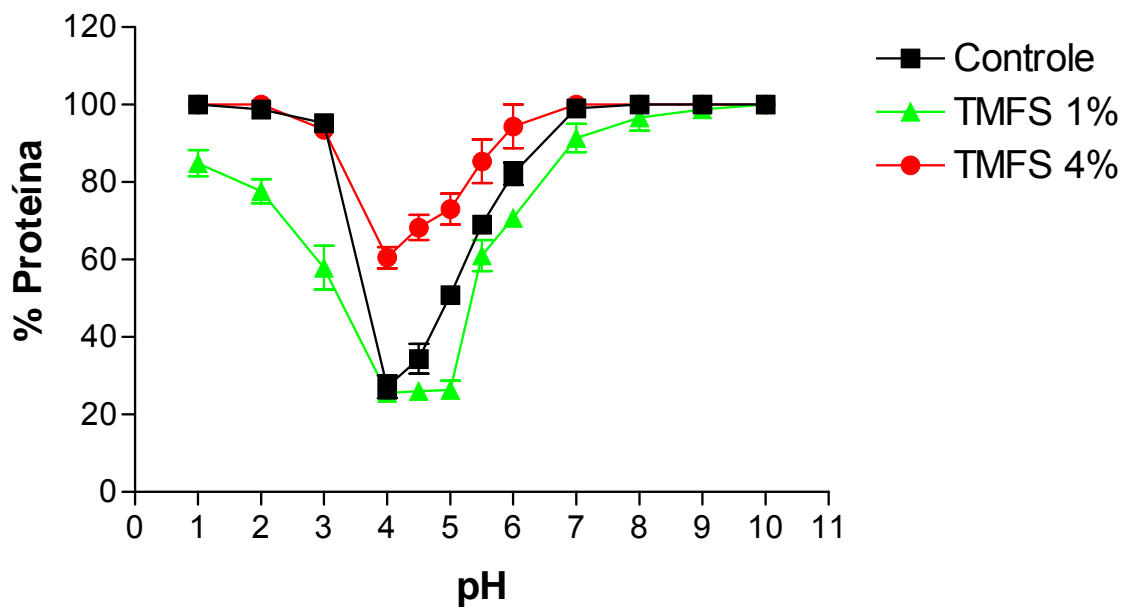
As sementes secas de ervilha foram moídas e a farinha resultante foi delipidada com acetona, e posteriormente ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo NaCl 200 mM, EDTA 1 mM e inibidores de protease. O homogenato resultante sofreu precipitação seqüencial por sulfato de amônio, nas concentrações de 40%, 75% e 99%. Esta figura representa uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, 10%. *Lane 1*: padrão de massa molecular, e *lane 2*: vicilina purificada (50 µg).



**Figura 3. Avaliação do grau de fosforilação em aminas com uso de fluorescamina.**

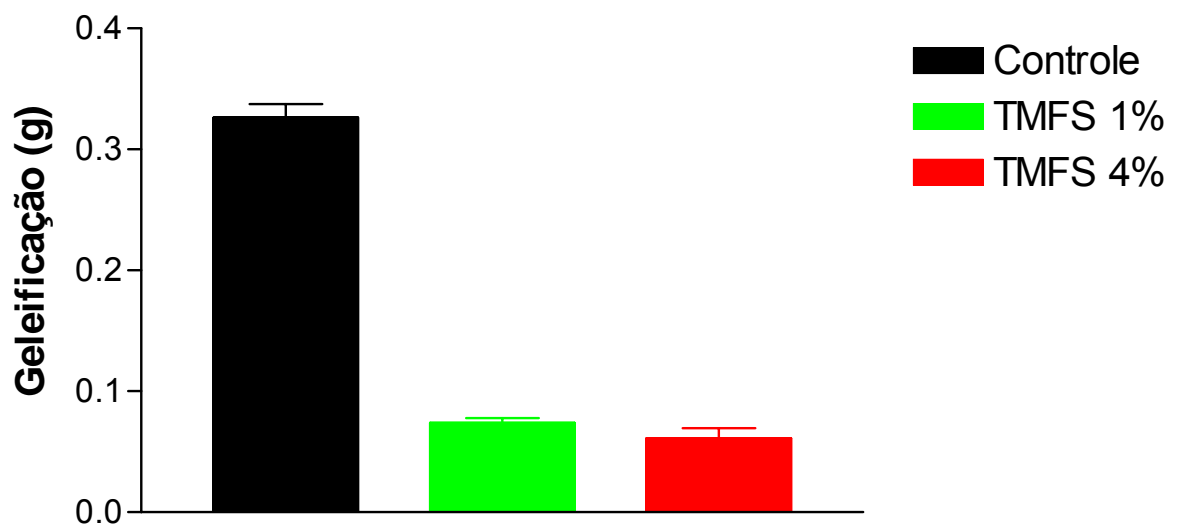
0,1 mg de vicilina (500  $\mu$ L) foi adicionada em 300  $\mu$ L de fluorescamina 0.03% e 1300  $\mu$ L de água destilada. Após a mistura, a intensidade de fluorescência foi quantificada imediatamente. O comprimento de onda utilizado foi medido entre 460 – 500 nm com excitação a 375 nm.

A caracterização das propriedades funcionais e estruturais foi realizada após a obtenção da vicilina fosforilada. Com relação às propriedades funcionais, primeiramente observamos que a solubilidade da vicilina é muito baixa em pHs próximos de 4,0-5,0. Adicionalmente, a fosforilação química da vicilina com 4% de TMFS é capaz de melhorar significativamente sua solubilidade de 27,1% para 60,5% nessa mesma faixa de pH (**figura 4**). No entanto, quando a vicilina está fosforilada com 1% de TMFS, a solubilidade desta vicilina, comparada com a controle, diminui de 100% para 84,9% e de 95,3% para 57,9% nos pHs 1,0 e 3,0, respectivamente. Com relação à outra propriedade funcional analisada, observamos que o processo de fosforilação diminui aproximadamente 80% ( $P < 0,05$ ) a capacidade de geleificação da vicilina (**figura 5**).



**Figura 4. Solubilidade da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.**

0,5 mg/mL de vicilina foi incubada em uma mistura de tampões (3:2 v/v) como: Tris-HCl, glicina, acetato de sódio e citrato de sódio, todos a 0,1 M, em diferentes pHs (1,0-10,0). Depois de 5 min sob agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 34.000 g. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Bradford.



**Figura 5. Capacidade de geleificação da vicilina controle e fosforilada com TMFS 1% e 4%.**

500  $\mu$ L da vicilina controle e fosforilada (10 mg/ mL) foram aquecidos a 100  $^{\circ}$ C por 1 hora em banho maria e imediatamente resfriados a 4  $^{\circ}$ C. Após o resfriamento, o sobrenadante foi desprezado, e a porção geleificada foi quantificada através de pesagem em balança analítica.



### **Conclusões da parte I**

- O uso de TMFS, em diferentes concentrações, promove uma diminuição da intensidade de fluorescência. Observa-se ainda, que em concentrações de 2%, 3% e 4%, os efeitos são similares;
- A fosforilação química com TMFS 4% foi capaz de melhorar a solubilidade da vicilina;
- A fosforilação com TMFS 1% e 4%, diminui aproximadamente 80% a capacidade de geleificação da vicilina.

**4.2. Parte II: Efeitos de agentes químicos e físicos sobre as propriedades funcionais da vicilina fosforilada com TMFS**

**(Effects of chemical and physical agents on functional properties of phosphorylated vicilin with STMP)**

Artigo a ser submetido para publicação na *Food Chemistry*

(Anexo I)

### **Efeitos de agentes químicos e físicos sobre a solubilidade e a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada com TMFS**

Este estudo avalia o efeito da fosforilação com trimetafosfato de sódio (TMFS) 1% e 4% sobre as propriedades funcionais da vicilina de ervilha exposta a agentes químicos e físicos. A vicilina foi obtida por precipitação em sulfato de amônio e a fosforilação foi realizada incubando a vicilina com TMFS em tampão borato pH 11,0, por 3 horas a 37° C. Os resultados mostraram que o pI da vicilina controle e fosforilada mudou na presença de NaCl 0,5 M, resultando na diminuição da solubilidade nos pH 1,0. A capacidade de geleificação da vicilina controle, na presença de NaCl 0,5 M, diminuiu aproximadamente 80% quando comparada com vicilina controle sem NaCl. O tratamento com APH mudou significativamente a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4% nos pHs 1,0 e 4,0 de 100% para 67,6% e de 65,4% para 43,9%, respectivamente. O tratamento a 241 MPa melhorou a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada com TMFS 1%. O glicerol diminuiu a capacidade de geleificação da vicilina e sua solubilidade nos pHs ácidos.

Obs: Os dados referentes a parte II da dissertação se encontram em anexo, a partir da página 92.

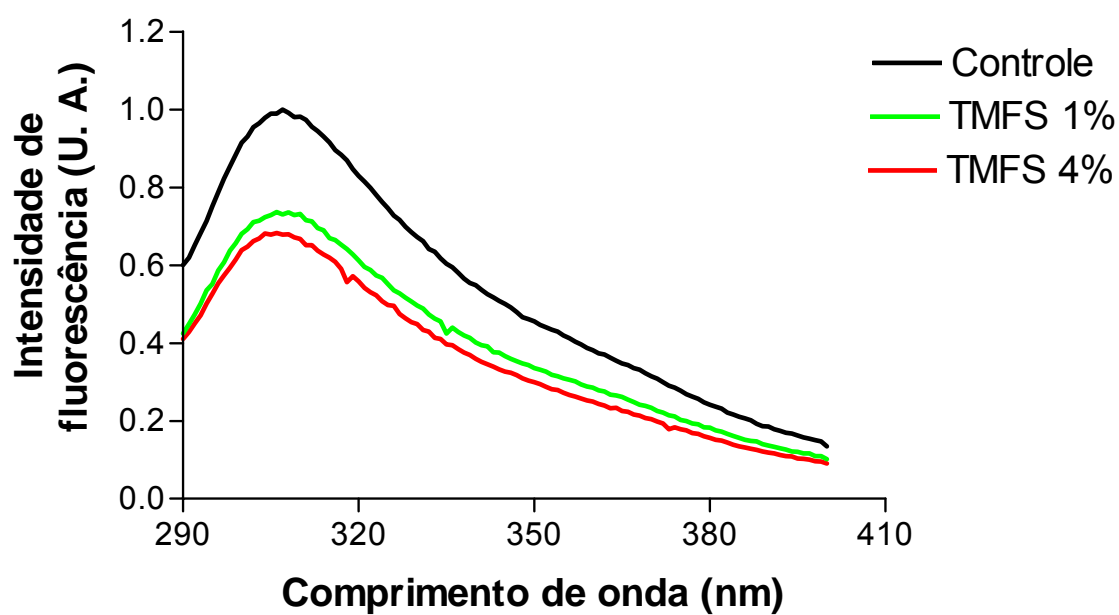
### **Conclusões da parte II**

- O pI da vicilina controle e fosforilada diminui para pH 1,0 na presença de NaCl 0,5 M;
- A capacidade de geleificação da vicilina controle na presença de NaCl 0,5 M diminui aproximadamente 80% quando comparada com a vicilina controle sem NaCl;
- O tratamento com APH a 241 MPa diminui significativamente a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4%;
- O tratamento a 241 MPa aumenta 3 vezes a capacidade de geleificação da vicilina fosforilada com TMFS 1%;
- A presença de glicerol, assim como o tratamento com APH, diminui a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4%. Porém, esta vicilina, na presença de glicerol ou submetida à APH, possui maior solubilidade do que a vicilina controle;
- A capacidade de geleificação da vicilina controle e fosforilada é diminuída significativamente na presença de glicerol 20%.

### **4.3. Parte III: Efeitos de agentes químicos e físicos sobre as propriedades estruturais da vicilina fosforilada**

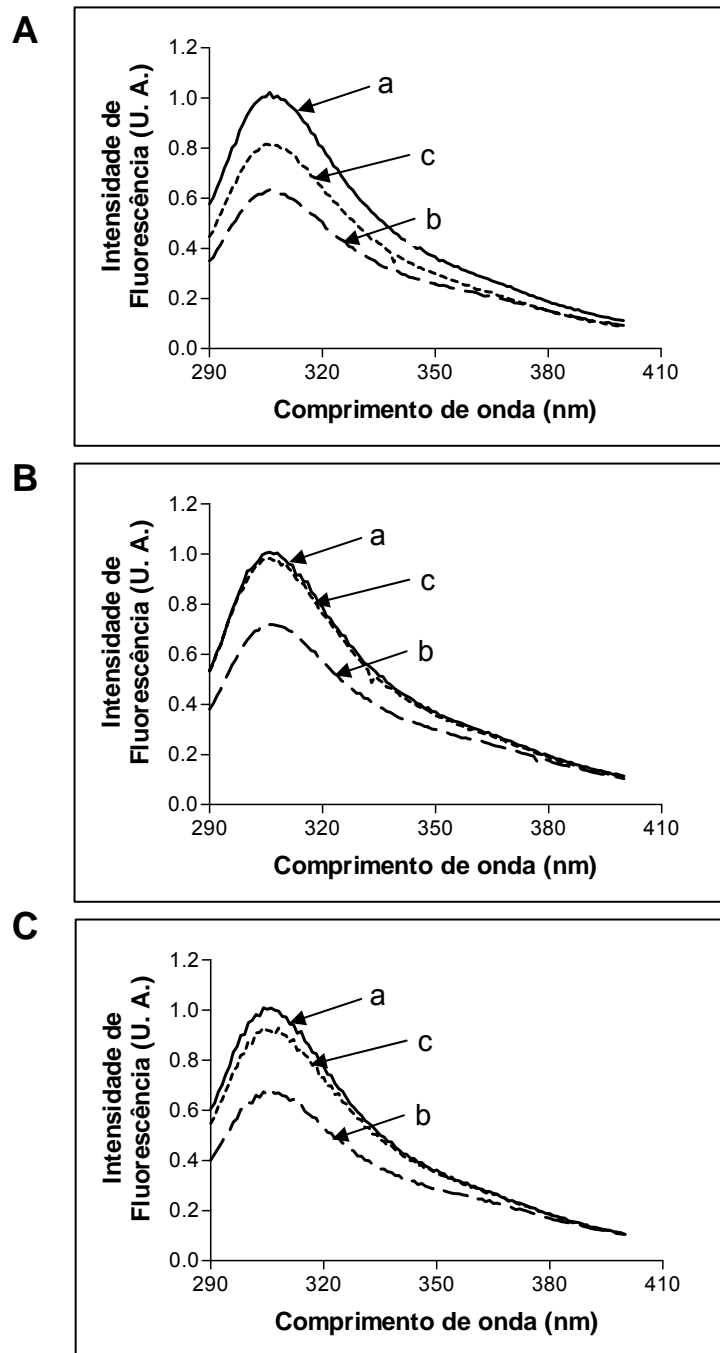
A espectroscopia de fluorescência tem tido crescente aplicação em estudos físico-químicos da estrutura de proteínas. Ao analisarmos o espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle e fosforilada (**figura 6**), observamos que o comprimento de onda de máxima emissão é de cerca de 307 nm. O comprimento de onda de emissão com este valor é típico para a emissão fluorescente de resíduos de tirosina em proteínas (LAKOWICZ, 2000). Além disso, nota-se que a intensidade de fluorescência da vicilina diminui conforme aumenta o grau de fosforilação. Nos resultados posteriores, mostramos medidas da fluorescência da vicilina sob diversas condições experimentais.

Na **figura 7** podemos observar os espectros de emissão de fluorescência da vicilina controle (A), vicilina fosforilada com TMFS 1% (B) e com TMFS 4% (C), em pH 10,0, à pressão atmosférica (traçado a), e o espectro medido sob pressão após 60 minutos de pressurização da proteína a 241 MPa (traçado b). Conclui-se que a pressurização das amostras promove supressão da fluorescência. Quando a amostra é despressurizada (traçado c), ocorre reversão considerável do efeito da pressão hidrostática sobre a emissão de fluorescência, e esta reversão é maior quando a vicilina se encontra fosforilada. Nota-se ainda, na mesma figura, que não houve deslocamento no comprimento de onda de emissão máxima em função do uso da APH.



**Figura 6. Emissão de fluorescência intrínseca da vicilina controle e fosforilada com 1% e 4% de TMFS.**

Os espectros foram obtidos com excitação a 272 nm. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu$ M em Tris-HCl 10 mM pH 10,0, a 23 °C.



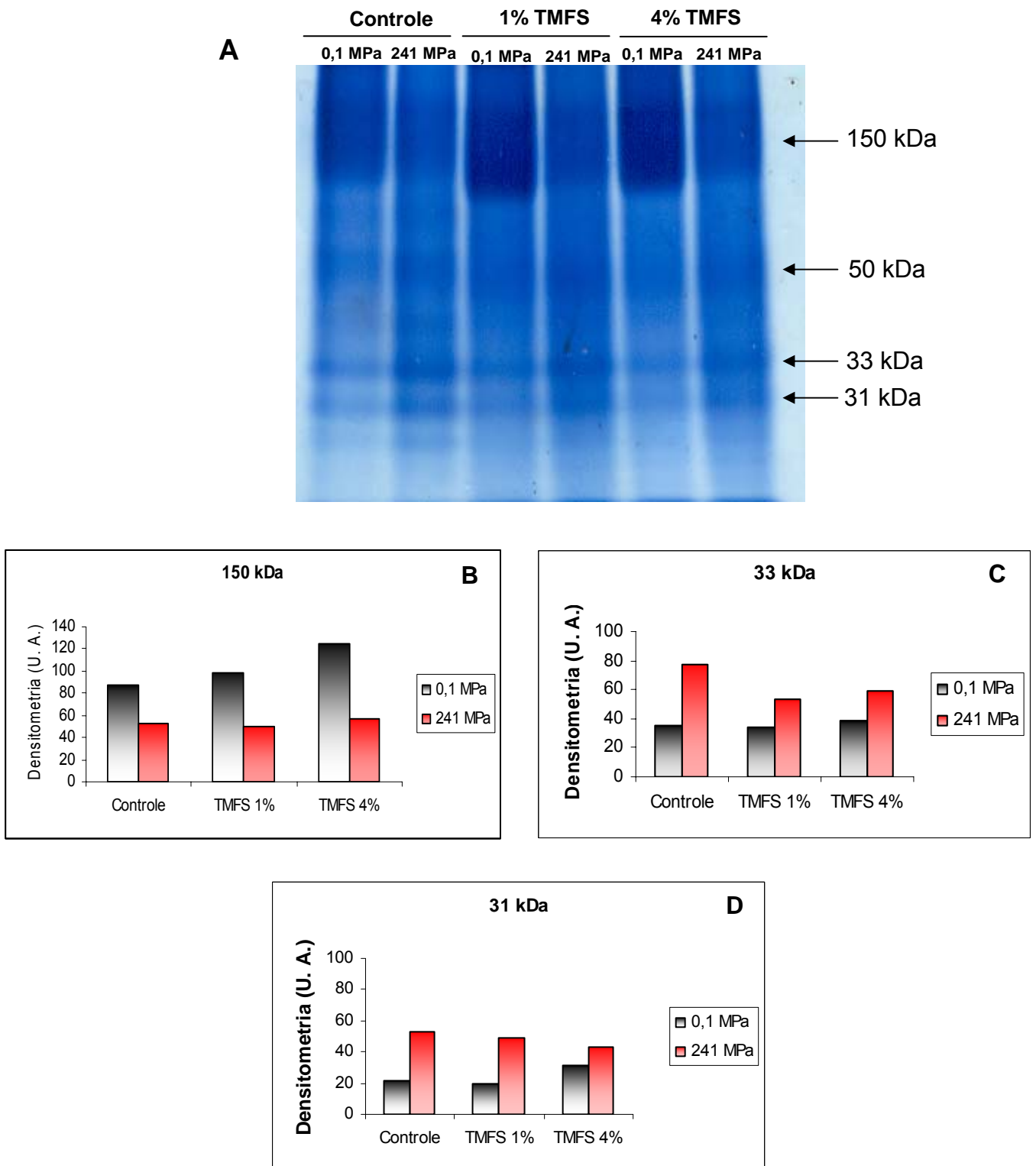
**Figura 7. Efeito da APH sobre o espectro de emissão de fluorescência intrínseca da vicilina controle e fosforilada com 1% e 4% de TMFS.**

Os espectros da vicilina controle (A), vicilina fosforilada com TMFS 1% (B) e com TMFS 4% (C) foram obtidos com excitação a 272 nm, antes da pressurização (a), sob pressão de 241 MPa por 60 minutos (b), e 5 minutos após liberação da pressão (c).

A fim de verificarmos se a APH causa dissociação das subunidades da vicilina, fizemos um gel de poliacrilamida na ausência de SDS (**figura 8A**). Observamos uma diminuição na intensidade da banda correspondente a 150 kDa (**figuras 8A e B**) e um aumento na intensidade das bandas correspondentes a 33 kDa (**figuras 8A e C**) e 31 kDa (**figuras 8A e D**) nas amostras pressurizadas. Assim, conclui-se deste experimento que a APH provoca dissociação das subunidades da vicilina.

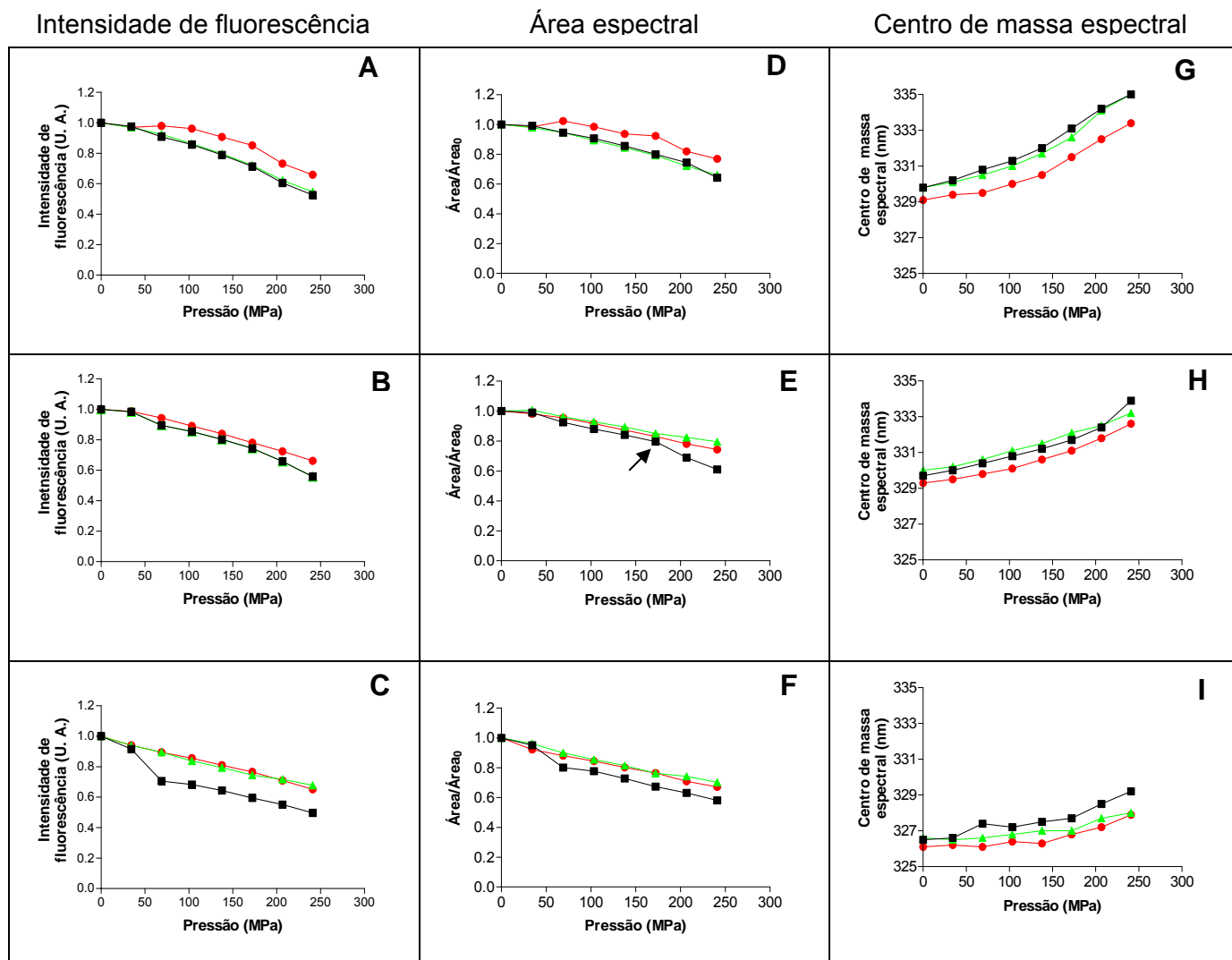
A **figura 9** mostra a dissociação, induzida por APH, da vicilina controle e fosforilada em três concentrações distintas de proteína (2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ). Observamos através da análise da intensidade de fluorescência no comprimento de emissão máxima, bem como a área e o centro de massa espectrais, que a fosforilação com TMFS 4% diminui o efeito da dissociação da vicilina induzido por APH na concentração de 2  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , somente a partir da pressão a 172 MPa que começamos a notar pequenas mudanças no perfil de dissociação da vicilina devido à fosforilação. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , observa-se uma maior supressão da intensidade de fluorescência, assim como da área espectral na vicilina controle do que na fosforilada. Além disso, de acordo com a **figura 10**, verificamos que ocorreram pequenas mudanças nos perfis de dissociação da vicilina controle induzida pela APH nas 3 diferentes concentrações de proteína utilizadas. As vicilinas controle e fosforilada, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , apresentaram um deslocamento do pico de emissão para a esquerda (para o azul) à pressão atmosférica (**figura 10B e 9I**). No entanto, a APH não provoca deslocamento do pico de emissão máxima da vicilina controle e fosforilada nas três diferentes concentrações.





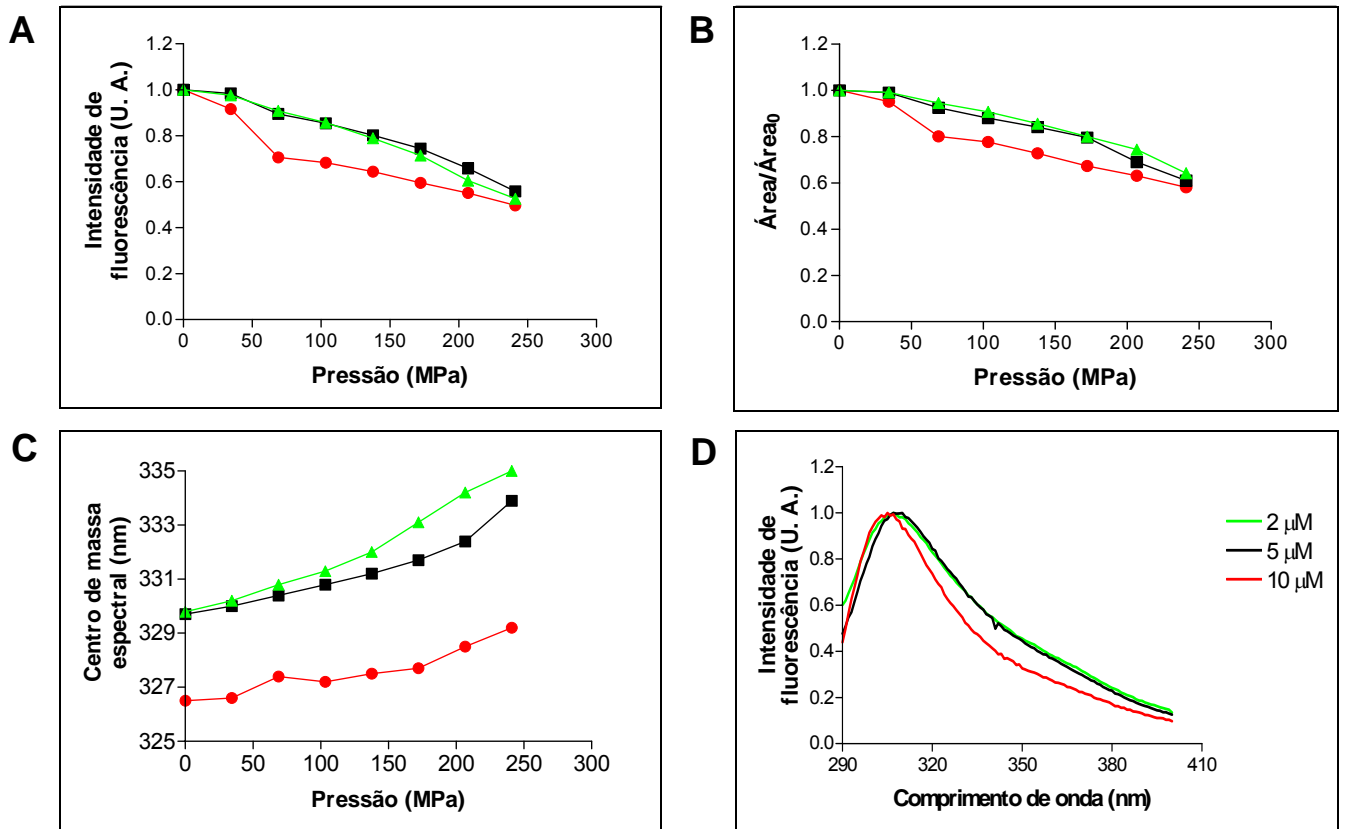
**Figura 8. Eletroforese em condições não desnaturantes da vicilina controle e fosforilada submetidas à pressão hidrostática.**

Amostras de vicilina controle e fosforilada (10  $\mu$ M) foram pressurizadas por 60 minutos a 241 MPa. Em seguida, 50  $\mu$ g das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na ausência de SDS (A). Densitometria das bandas de 150 kDa (B), 33 kDa (C) e 31 kDa (D).



**Figura 9. Efeito da APH sobre a dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes concentrações.**

Amostras de vicilina em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, foram excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. Os resultados estão expressos através dos gráficos da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão (A, B e C), razão da área espectral (D, E e F) e centro de massa espectral (G, H e I). A razão da área espectral foi obtida através da divisão da área espectral final pela área espectral inicial. Concentração da proteína: 2  $\mu$ M (A, D e G), 5  $\mu$ M (B, E e H) e 10  $\mu$ M (C, F e I). Controle (■), TMFS 1% (▲), TMFS 4% (●).

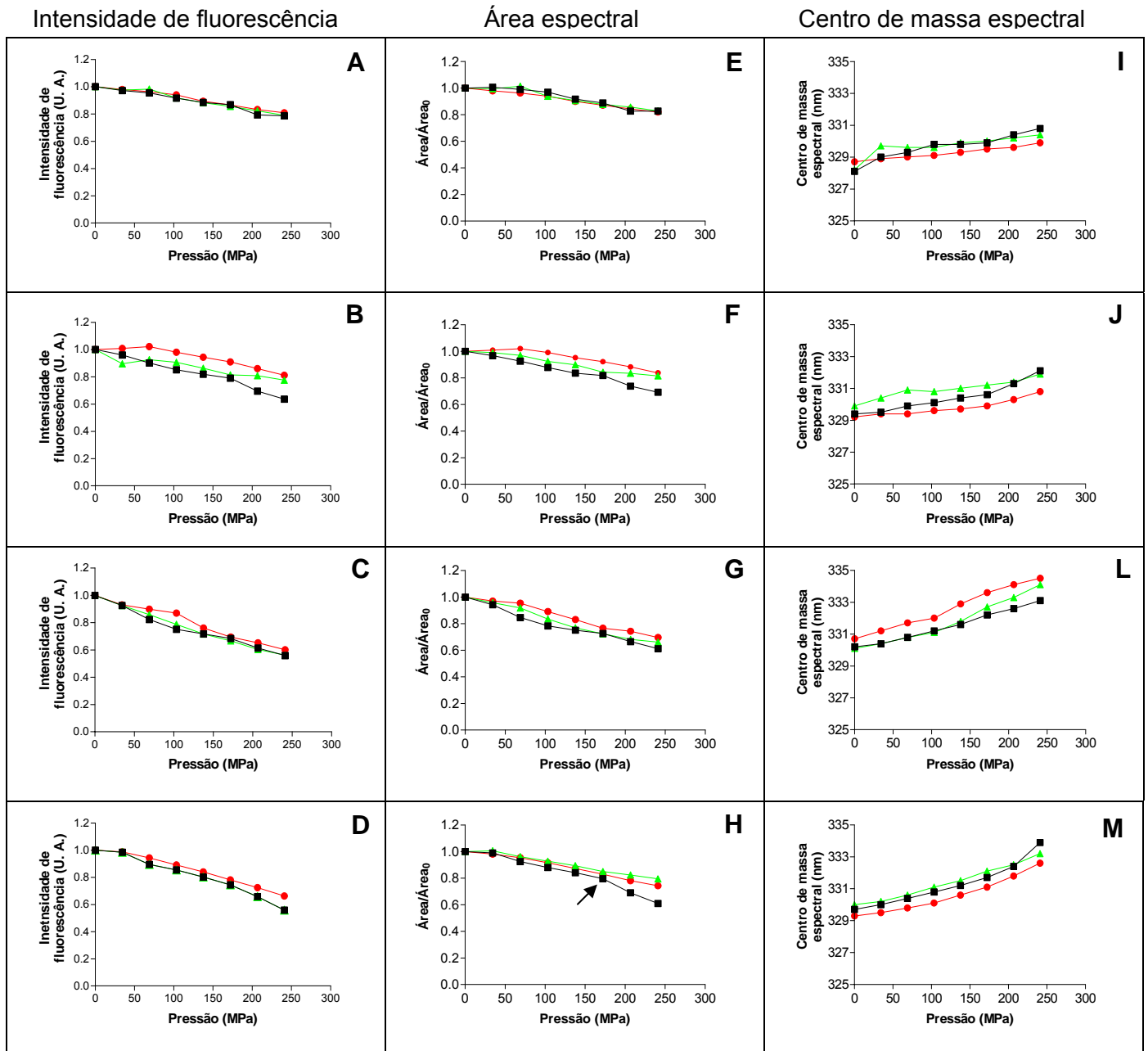


**Figura 10. Efeito da concentração de proteína na dissociação induzida por pressão hidrostática da vicilina controle.**

Amostras de vicilina controle em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, foram excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. **A** - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão da vicilina controle. **B** - Razão da área espectral da vicilina controle. **C** - Centro de massa espectral da vicilina controle. **D** - Espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle à pressão atmosférica. Concentração de proteína: 2 μM (▲), 5 μM (■) e 10 μM (●).

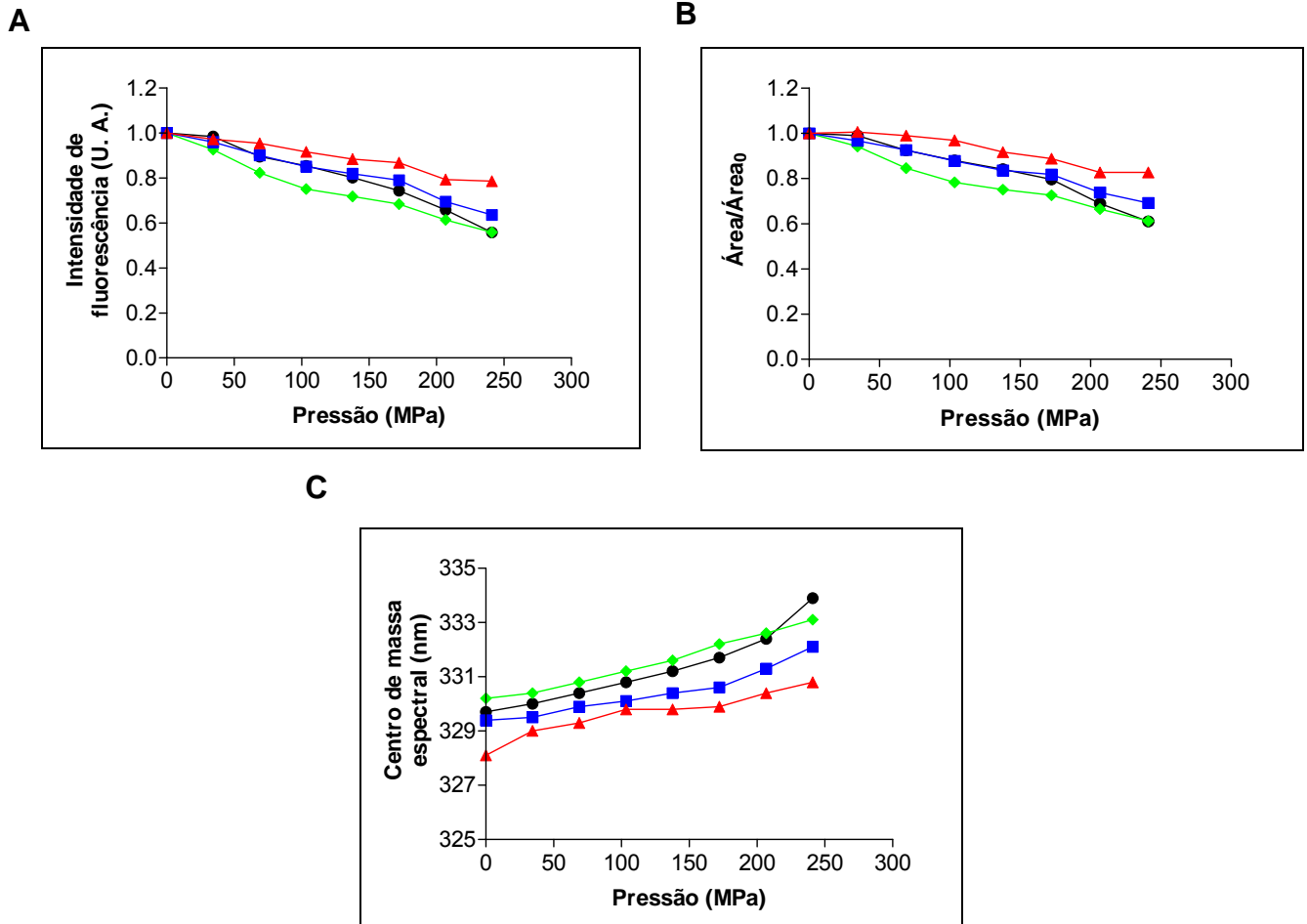
Na **figura 11** observa-se o efeito da APH sobre a estabilidade estrutural da vicilina em diferentes pHs. Neste conjunto de dados, nota-se que no pH 8,0 (**figuras 11B, F e J**), a supressão da emissão de fluorescência e da área espectral induzida pela pressão é maior na vicilina controle do que na fosforilada, principalmente após 172 MPa. Adicionalmente, no pH 10,0, somente a partir de 172 MPa que começamos a notar pequenas mudanças no perfil de dissociação da vicilina devido à fosforilação (**figuras 11D, H e M**). Nos demais pHs, a fosforilação aparentemente não exerce nenhum efeito na dissociação por APH da vicilina (**figuras 11A, C, E, G, I e L**). Nos pHs 9,0 e 10,0, o efeito da pressão hidrostática sobre a vicilina é maior do que nos pHs 7,0 e 8,0 (**figuras 12A, B e C**). Dessa forma, pressupõe-se que a alcalinização do meio provoca um aumento da sensibilidade da vicilina frente à pressão hidrostática. Deve-se ressaltar que não ocorre deslocamento do pico de emissão de fluorescência da vicilina devido à APH.

A vicilina fosforilada com TMFS 1% e 4%, quando comparada com a vicilina controle, mostra um menor desvio do centro de massa espectral e uma diminuição na supressão da fluorescência, assim como na área espectral, induzida por APH, a 37 °C (**figuras 13C, F e I**). Na temperatura de 10 °C, as vicilinas controle e fosforilada apresentaram o mesmo perfil de dissociação por APH (**figuras 13A, D e G**), enquanto que a 23 °C, mudanças neste perfil só foram observadas a partir de 172 MPa (**figuras 13B, E e H**). Na **figura 14**, observamos, através da análise da intensidade de fluorescência no comprimento de emissão máxima, área e centro de massa espectral que a vicilina controle, a 10 °C, apresenta maior estabilidade contra a APH do que a 23 °C e 37 °C.



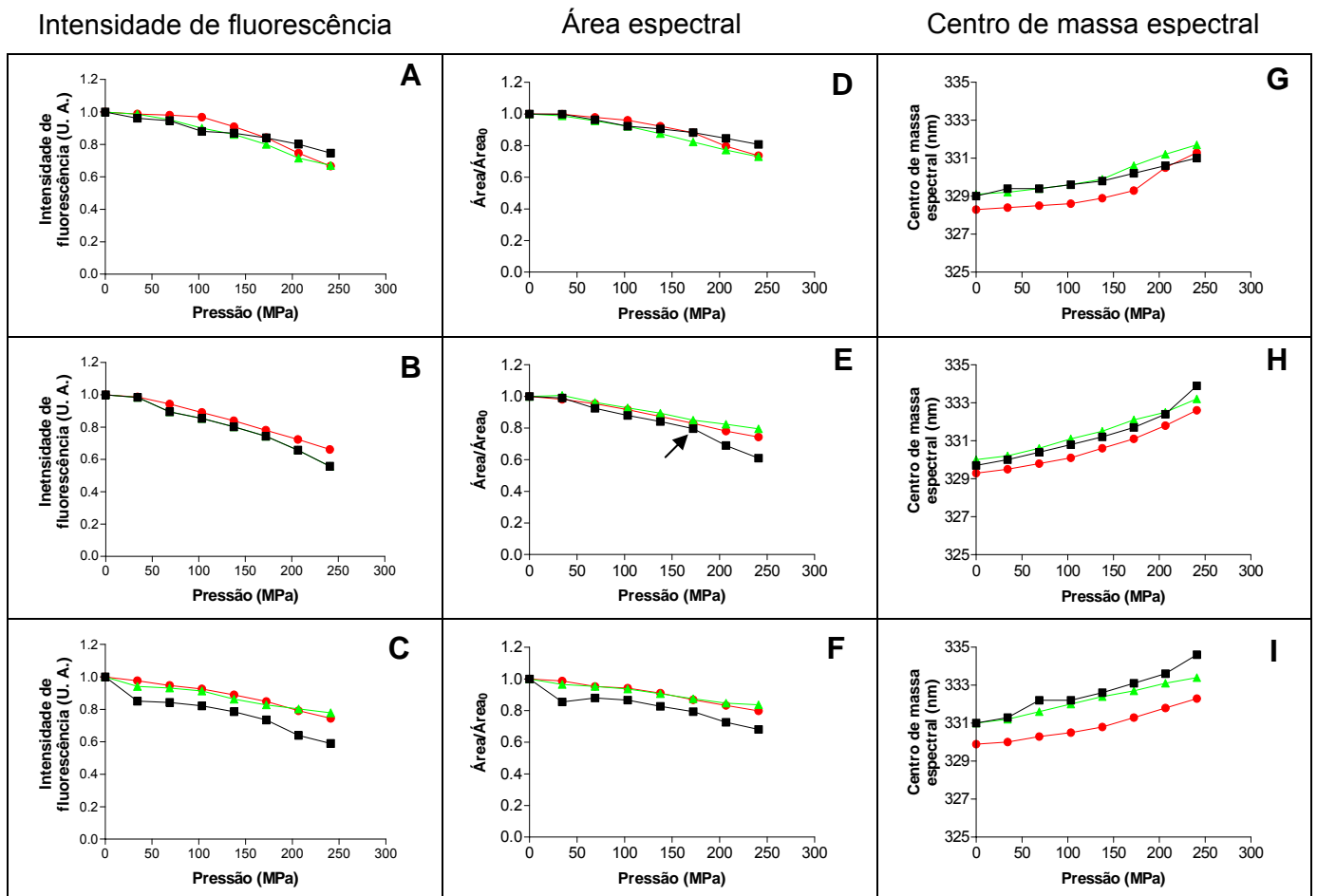
**Figura 11. Efeito da APH sobre dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes pHs.**

5  $\mu$ M de vicilina em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (A, E e I), pH 8,0 (B, F e J), pH 9,0 (C, G e L) ou pH 10,0 (D, H e M), a 23  $^{\circ}$ C, foram excitadas em 272 nm e a emissão foi de 290-400 nm. A, B, C e D - intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão. E, F, G e H - razão da área espectral. I, J, L e M - centro de massa espectral. Controle (■), TMFS 1% (▲), TMFS 4% (●).



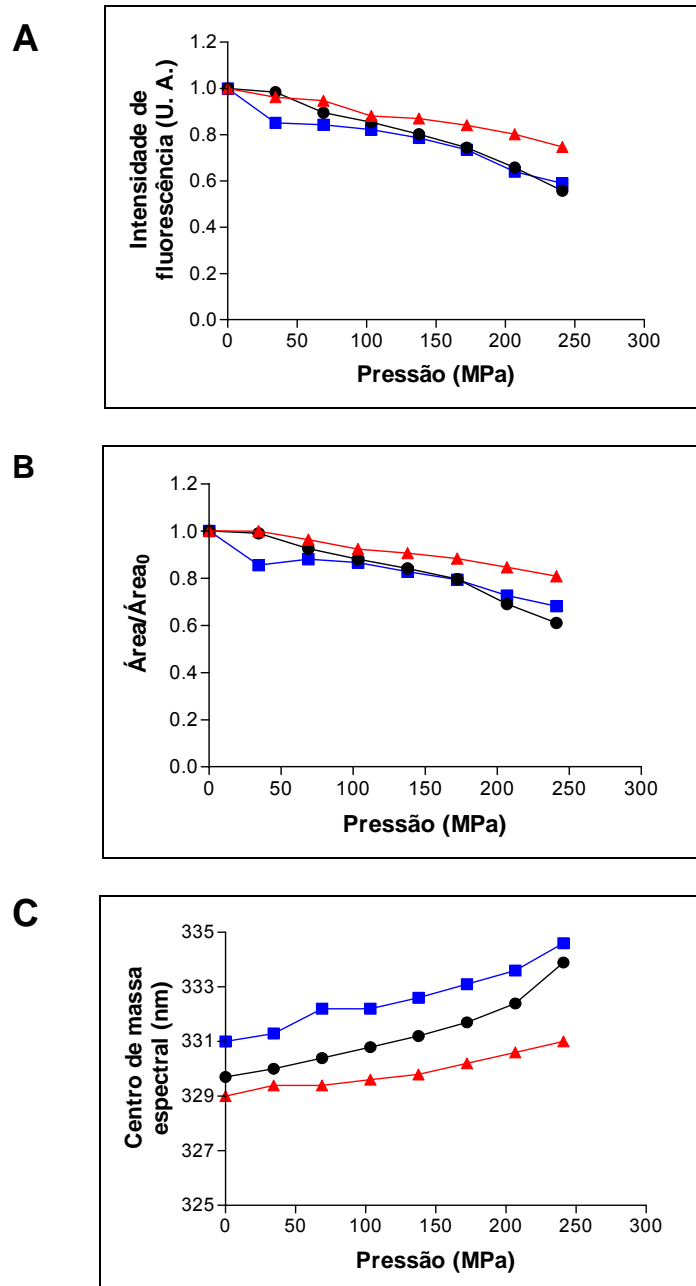
**Figura 12. Efeito do pH na dissociação induzida por APH da vicilina controle.**

5  $\mu\text{M}$  de vicilina controle em Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 (▲), 8,0 (■), 9,0 (◆) ou 10,0 (●), a 23 °C, foram excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. **A** - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão da vicilina controle. **B** - Razão da área espectral da vicilina controle. **C** - Centro de massa espectral da vicilina controle.



**Figura 13. Efeito da APH sobre a dissociação da vicilina controle e fosforilada em diferentes temperaturas.**

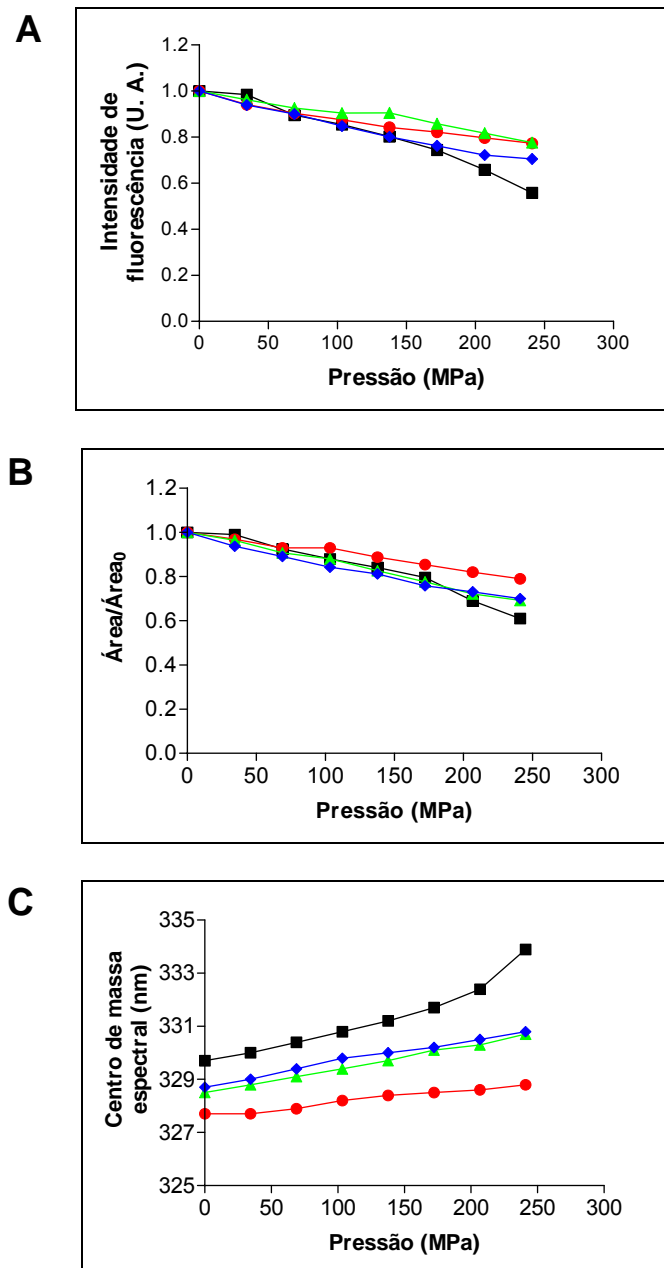
5  $\mu\text{M}$  de vicilina em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, foram excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. Os resultados estão expressos através dos gráficos da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão (A, B e C), razão da área espectral (D, E e F) e centro de massa espectral (G, H e I). Temperaturas usadas no experimento: 10 °C (A, D e G), 23 °C (B, E e H) e 37 °C (C, F e I). Controle (■), TMFS 1% (▲), TMFS 4% (●).



**Figura 14. Efeito da temperatura na dissociação induzida por APH da vicilina controle.** 5  $\mu$ M de vicilina controle em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, a 10 °C (▲), 23 °C (●) ou 37 °C (■), foram excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. **A** - Intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão da vicilina controle. **B** – Razão da área espectral da vicilina controle. **C** - Centro de massa espectral da vicilina controle.

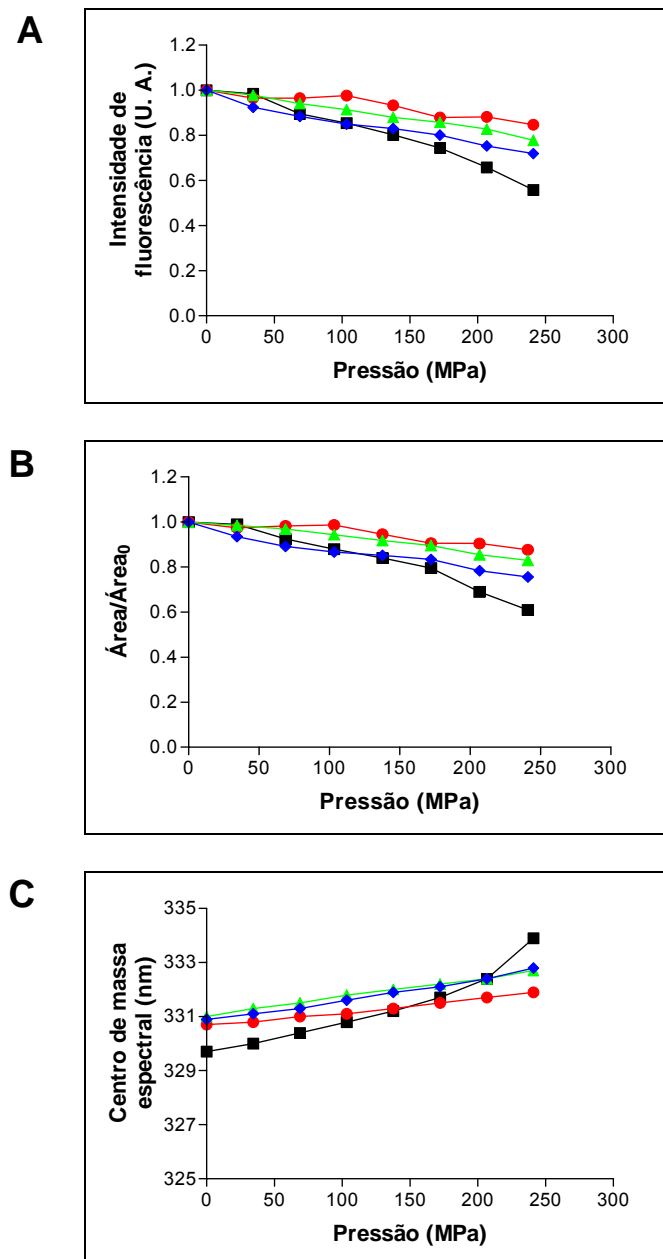


Após investigarmos a dissociação da vicilina controle e fosforilada induzida pela aplicação da APH a pH 10,0, pesquisamos os efeitos de cosolventes sobre a dissociação. O primeiro cosolvente utilizado foi o NaCl. A **figura 15** mostra a dissociação da vicilina controle e fosforilada, a pH 10,0, na ausência ou presença de NaCl 0,5 M. Como se pode observar, o aumento da força iônica do meio promove um aumento na estabilidade da forma oligomérica da vicilina controle frente à APH. Observamos ainda, que a fosforilação da vicilina aumentou este efeito estabilizante. O glicerol foi o segundo cosolvente a ser utilizado, e, assim como NaCl, sua presença no meio diminui a dissociação da vicilina controle ao ser submetida à APH (**figura 16**). E a fosforilação da vicilina intensifica este efeito do glicerol. A presença de cosolventes não provoca deslocamento do pico de emissão de fluorescência da vicilina devido à APH.



**Figura 15. Efeito de NaCl 0,5 M sobre a dissociação induzida por APH da vicilina controle e fosforilada.**

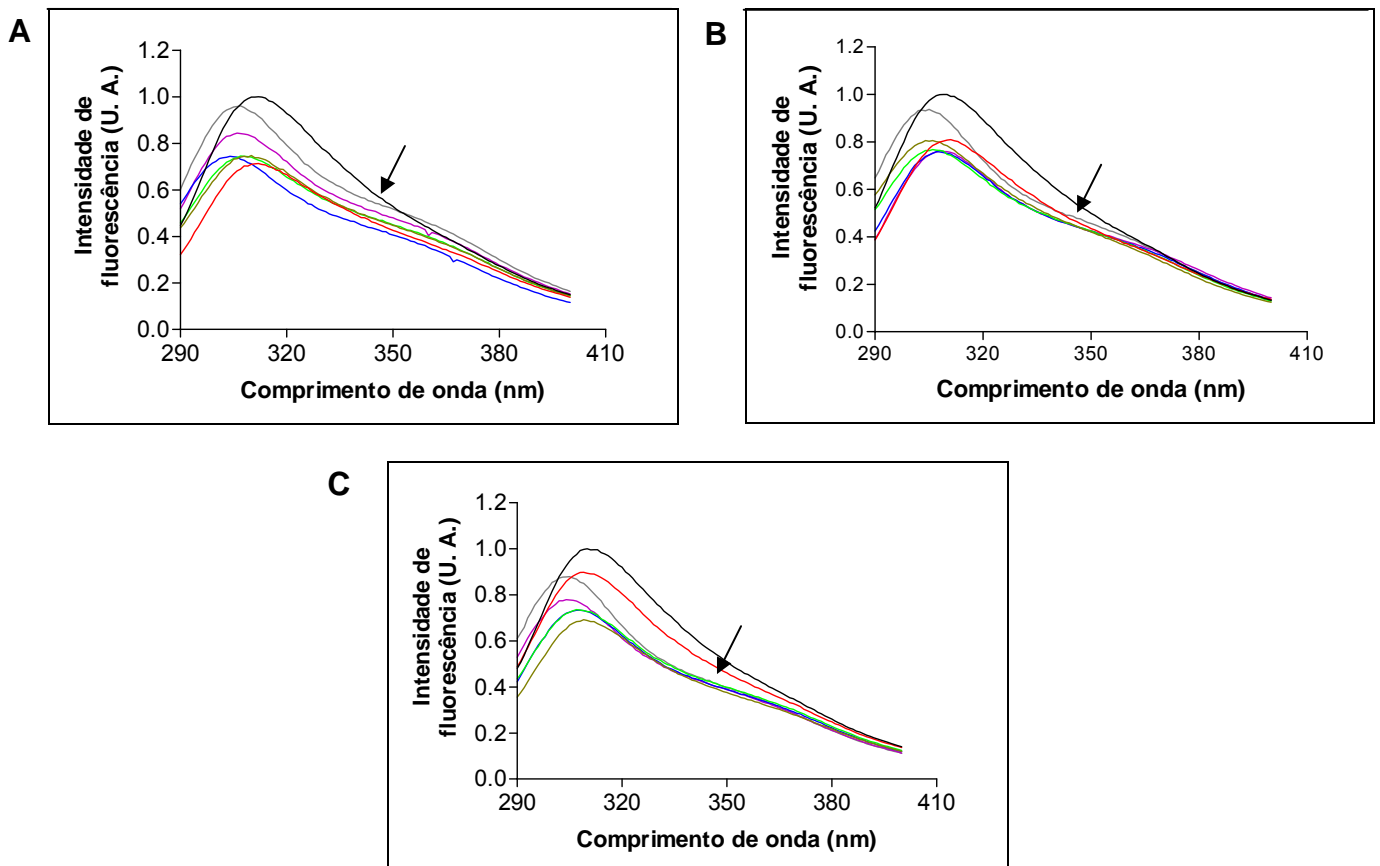
5  $\mu$ M de vicilina foram dissolvidos em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, excitados em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. Os resultados estão expressos através dos gráficos da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão (A), razão da área espectral (B) e centro de massa espectral (C). Vicilina controle na ausência de NaCl (■). Vicilina controle (◆), TMFS 1% (▲) e TMFS 4% (●) na presença de NaCl 0,5 M.



**Figura 16. Efeito de glicerol 20% sobre a dissociação induzida por APH da vicilina controle e fosforilada.**

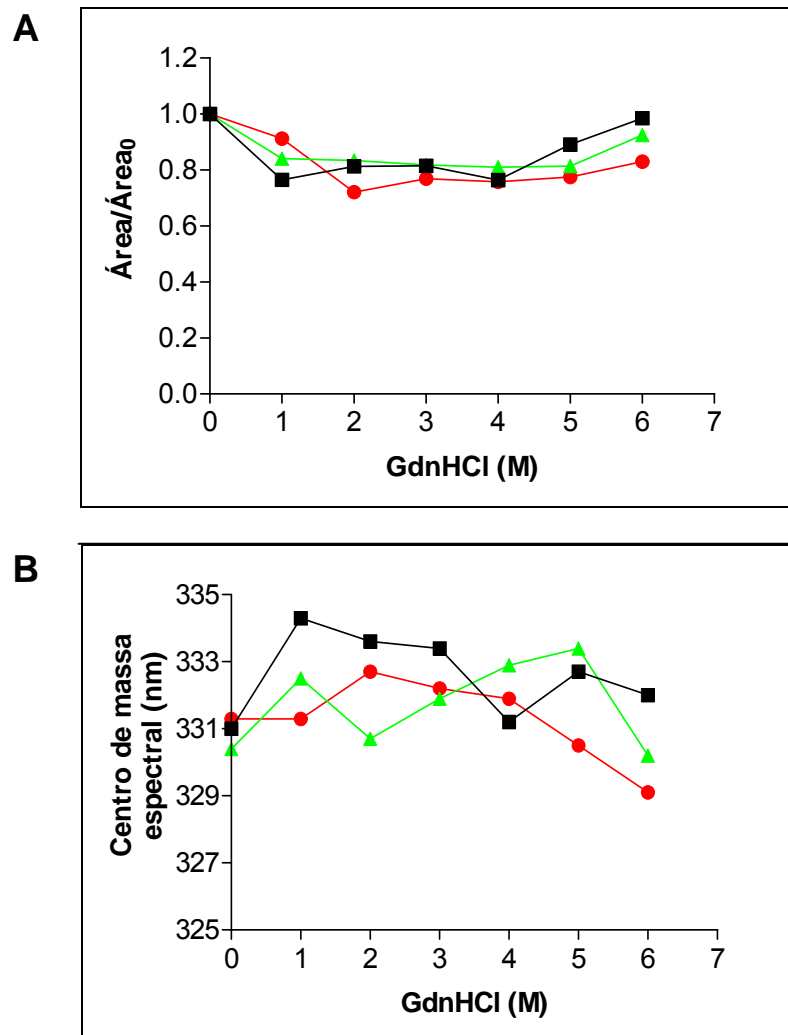
5  $\mu$ M de vicilina foram dissolvidas em Tris-HCl 10 mM, pH 10,0, excitadas em 272 nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 290-400 nm. Os resultados estão expressos através dos gráficos da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão (A), razão da área espectral (B) e centro de massa espectral (C). Vicilina controle na ausência de glicerol (■). Vicilina controle (◆), TMFS 1% (▲) e TMFS 4% (●) na presença de glicerol 20%.

Outros agentes perturbadores da estabilidade estrutural da proteína estudados neste trabalho foram os desnaturantes químicos, cloridrato de guanidina e uréia. A **figura 17** apresenta os espectros de fluorescência da vicilina controle e fosforilada exposta a diferentes concentrações de GdnHCl (0 M – 6 M). Observa-se primeiramente uma queda da intensidade de fluorescência da vicilina em 1 M de GdnHCl, e conforme a concentração deste desnaturante aumenta, ocorre um deslocamento do pico de emissão de fluorescência para comprimentos de onda menores concomitante com o aumento da intensidade de fluorescência. Este resultado também pode ser monitorado pela área e o centro de massa espectrais (**figura 18**). O uso de uréia não mostra qualquer modificação no comprimento de onda de máxima emissão da vicilina, porém o efeito deste desnaturante é refletido na intensidade de fluorescência desta proteína (**figura 19**). Conclui-se que, o aumento na concentração de uréia proporciona uma supressão da intensidade de fluorescência e diminuição da área espectral da vicilina controle e fosforilada (**figuras 18 e 19A e B**). Observamos ainda que, em concentrações crescentes chegando até 5 M de uréia, ocorre um aumento no centro de massa espectral da vicilina (**figura 19C**). Este aumento pode ser explicado pelo fato da uréia ter levado a um aumento da intensidade de fluorescência da vicilina no comprimento de onda em torno de 345 nm. Este mesmo efeito é encontrado ao utilizar GdnHCl como agente desnaturante.



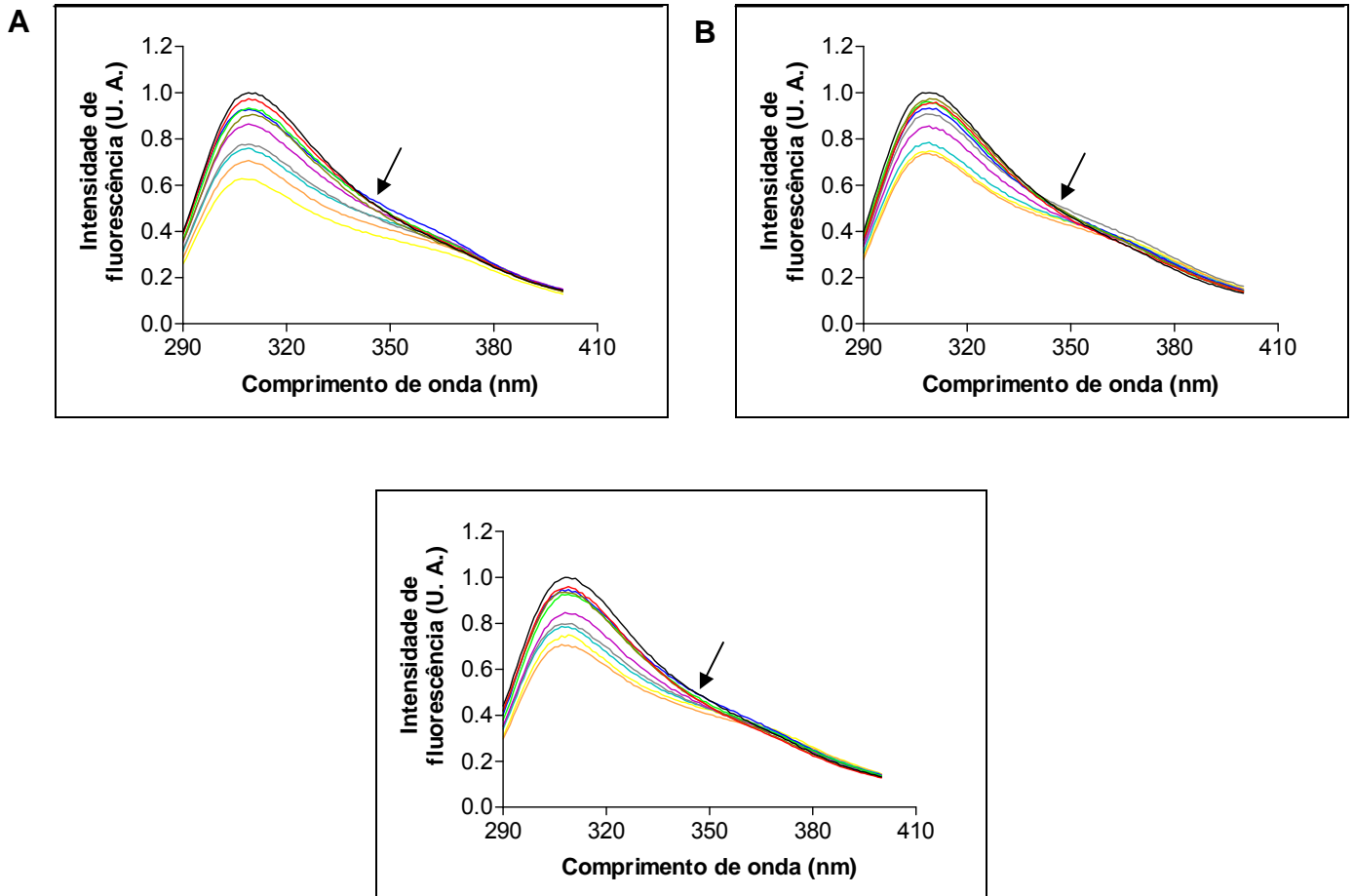
**Figura 17. Efeito do cloridrato de guanidina sobre o espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle e fosforilada.**

Os espectros de emissão de fluorescência da vicilina controle (A), vicilina fosforilada com TMFS 1% (B) e com TMFS 4% (C) foram obtidos com excitação a 272 nm. As amostras foram incubadas previamente com diferentes concentrações de GdnHCl por 2 horas antes das medidas dos espectros. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu$ M em Tris-HCl 10 mM pH 10, a 23 °C. Concentrações de GdnHCl: 0 M (—), 1M (—), 2 M (—), 3 M (—), 4 M (—), 5 M (—) e 6 M (—). A seta indica o aumento na intensidade de fluorescência da vicilina no comprimento de onda em torno de 345 nm.



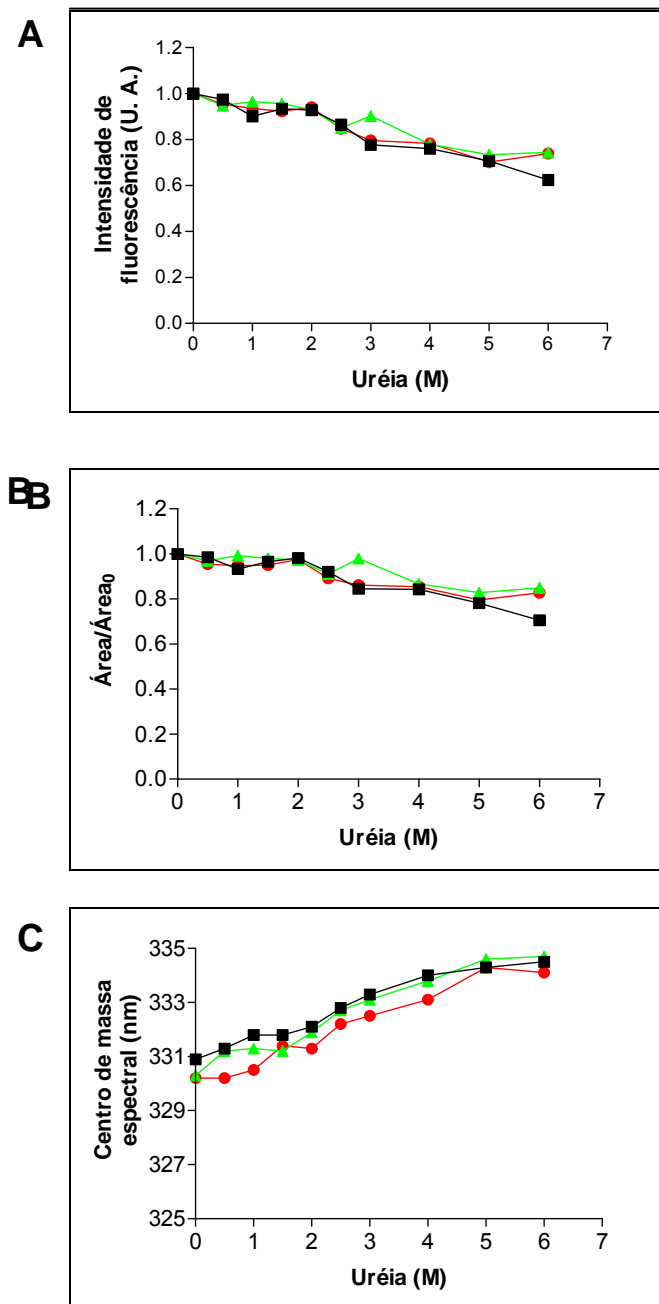
**Figura 18. Efeito do cloridrato de guanidina sobre a área (A) e centro de massa espectrais (B) da vicilina controle e fosforilada.**

As amostras de vicilina controle (■), fosforilada com TMFS 1% (▲) e com TMFS 4% (●), incubadas com diferentes concentrações de uréia por 2 horas, foram excitadas a 272 nm. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5 µM em Tris-HCl 10 mM pH 10, a 23 °C.



**Figura 19. Efeito da uréia sobre o espectro de emissão de fluorescência da vicilina controle e fosforilada.**

Os espectros de emissão de fluorescência da vicilina controle (A), vicilina fosforilada com TMFS 1% (B) e com TMFS 4% (C) foram obtidos com excitação a 272 nm. As amostras foram incubadas previamente com diferentes concentrações de uréia por 2 horas antes das medidas dos espectros. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu$ M em Tris-HCl 10 mM pH 10,0, a 23 °C. Concentrações de uréia: 0 M (—), 0,5 M (—), 1 M (—), 1,5 M (—), 2 M (—), 2,5 M (—), 3 M (—), 4 M (—), 5 M (—) e 6 M (—). A seta indica o aumento na intensidade de fluorescência da vicilina no comprimento de onda em torno de 345 nm.



**Figura 20.** Efeito da uréia sobre a emissão de fluorescência (A), área espectral (B) e centro de massa espectral (C) da vicilina controle e fosforilada.

As amostras de vicilina controle (■), fosforilada com TMFS 1% (▲) e com TMFS 4% (●) incubadas com diferentes concentrações de uréia por 2 horas foram excitadas a 272 nm. A concentração da vicilina controle e fosforilada foi de 5  $\mu$ M em Tris-HCl 10 mM pH 10, a 23  $^{\circ}$ C.



### **Conclusões da parte III**

- A intensidade de fluorescência da vicilina diminui conforme aumenta o grau de fosforilação;
- A aplicação de APH sobre a vicilina resulta na supressão parcialmente reversível de sua fluorescência, sendo esta reversão maior nas vicilinas fosforiladas;
- A APH não promove deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão da vicilina controle e fosforilada, mas causa a dissociação das suas subunidades;
- A fosforilação diminui a dissociação da vicilina induzida por APH em diferentes concentrações de proteína (2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ );
- A alcalinização do meio provoca um aumento na sensibilidade da vicilina frente à APH;
- A vicilina fosforilada teve uma menor dissociação induzida por APH, a 37 °C, do que a vicilina controle;
- A presença de cosolventes (NaCl 0,5 M ou glicerol 20%) aumenta a estabilidade da forma oligomérica da vicilina controle frente à APH e a fosforilação da vicilina aumenta este efeito estabilizante;

- GdnHCl 1 M diminui a intensidade de fluorescência da vicilina, e concentrações maiores deste desnaturante promove um deslocamento de pico de emissão de fluorescência para comprimentos de onda menores concomitante com o aumento da intensidade de fluorescência;
- O aumento na concentração de uréia proporciona uma supressão da intensidade de fluorescência e diminuição da área espectral da vicilina controle e fosforilada.

## **5. Discussão**

Neste trabalho, procuramos estudar se o estado de fosforilação da vicilina com TMFS influencia as suas propriedades funcionais e estruturais. Atualmente, as características físico-químicas das proteínas de reserva de sementes de leguminosas têm despertado grande interesse biotecnológico e na indústria alimentícia, uma vez que há a possibilidade dessas proteínas servirem como ingredientes funcionais, atuando como agentes emulsificantes, espumantes, etc. A aplicabilidade das propriedades funcionais de proteínas pode diminuir a densidade calórica e de gordura de alguns alimentos, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento de produtos alimentícios alternativos. Essas proteínas podem também servir como uma fonte protéica de baixo custo, servindo para suplementar a alimentação, principalmente da população de baixa renda.

Para realizar esse estudo, obtivemos a vicilina a partir das sementes secas de ervilha, através do fracionamento das proteínas por precipitação por sulfato de amônio. A vicilina de ervilha já se encontra fosforilada após sua obtenção, dessa forma, estamos aumentando seu nível de fosforilação ao fosforilá-la quimicamente com o uso de trimetafosfato de sódio (TMFS), um agente que já é utilizado pela indústria alimentícia como aditivo químico. Essa fosforilação foi monitorada através da análise de fluorescência da vicilina controle ou fosforilada utilizando fluorescamina, que é um composto que se liga em resíduos de aminas primárias livres, que podem ser N-terminal e lisinas (GARESSE, 1979). Observamos que a fosforilação com TMFS 1% e 2% diminui a intensidade de fluorescência da vicilina conforme aumenta o grau de fosforilação, devido à provável diminuição no conteúdo de aminas primárias livres, uma vez que estas estariam fosforiladas. A partir de

TMFS 2%, ocorre uma estabilização na intensidade de fluorescência da vicilina (**figura 3**), sugerindo que a partir desta concentração, os resíduos de lisina possíveis de serem fosforilados se encontram ocupados, possivelmente fosforilados.

Nakamura (2003) monitorou a fosforilação da vicilina com TMFS através da técnica de Western blotting, utilizando anticorpo antifosferina, e observou que a quantidade de fosfoserina presente na vicilina aumentou após o tratamento com TMFS. Uma outra alternativa utilizada para saber se a vicilina estava fosforilada, foi utilizar uma coluna de troca iônica MonoQ em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC – do inglês, “High Performance Liquid Chromatography”). Os resultados mostraram que o tempo médio de eluição da vicilina aumentou de 27,4 minutos no controle para 30,1 minutos na proteína fosforilada com 10% de TMFS, indicando uma maior interação da proteína com a resina, característica de aumento de carga negativa associada à proteína.

Ao analisarmos todos esses dados sobre a fosforilação da vicilina com TMFS, decidimos utilizar as concentrações de 1% e 4% TMFS, porque, apesar dos resíduos de lisina estarem totalmente fosforilados quando utilizamos TMFS 2%, o mesmo não ocorre com os resíduos de serina. Estes possivelmente aumentam o grau de fosforilação com o aumento da concentração de TMFS de até 10%. No entanto, a concentração de TMFS 10%, não respeitaria o limite máximo permitido de TMFS adicionado no alimento, que varia de 0,2-0,5 g/ 100 g, dependendo do tipo de alimento. É importante lembrar que estamos fosforilando a vicilina com intuito de utilizá-la em produtos alimentícios, sendo assim, as concentrações de TMFS 1% e 4% estariam dentro dos padrões preconizados na resolução CNS/MS nº4, de 24 de novembro de 1988, dependendo da quantidade de vicilina a ser adicionada no alimento.

Ao estudarmos as propriedades funcionais, observamos que a solubilidade da vicilina fosforilada com TMFS 4% aumenta significativamente na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 (**figura 4**), região crítica na qual a vicilina tende a precipitar. A capacidade de geleificação também foi estudada e observamos que a vicilina fosforilada diminui esta propriedade (**figura 5**). KUNSHENG *et al.* (2006) mostraram que a fosforilação com tripolifosfato de sódio não alterou significativamente a solubilidade do isolado protéico de soja. No entanto, nos pHs 3,0 e 4,0, a solubilidade desta proteína fosforilada foi maior do que a proteína nativa. Em 1983, SUNG *et al.* demonstraram que a fosforilação com TMFS aumentou a capacidade de retenção de água, estabilidade de emulsão e solubilidade do isolado protéico de soja. Os resultados encontrados sobre as propriedades funcionais da vicilina fosforilada podem ser explicados pelo aumento da repulsão eletrostática entre as proteínas nos pHs 4,0 e 5,0, devido à ligação do grupamento fosfato carregado negativamente à proteína. De acordo com SGARBIERI (1998), as repulsões eletrostáticas e as interações água-proteína tendem a separar as cadeias polipeptídicas. Por esta razão, na vicilina fosforilada com TMFS, na qual pode haver uma maior repulsão de cargas, a formação do gel se torna mais difícil. O aumento da solubilidade permite que se ampliem as possibilidades de utilização dessa proteína na indústria alimentícia. A diminuição da capacidade de geleificação pode ser considerada um fator positivo, caso o produto no qual esta proteína modificada fosse acrescentada, não tivesse que sofrer geleificação.

A estabilidade estrutural da vicilina de ervilha já foi bem caracterizada por PEDROSA e FERREIRA (1994). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da fosforilação com TMFS sobre a estabilidade estrutural da vicilina. Para analisarmos a estabilidade estrutural da vicilina quando fosforilada, utilizamos um

sistema de APH acoplado a um fluorímetro. Primeiramente, investigamos se a fosforilação estaria causando alguma mudança no espectro de emissão de fluorescência da vicilina. O resultado desse experimento mostra uma queda na intensidade de fluorescência da vicilina fosforilada (**figura 6**). O espectro de emissão de fluorescência da vicilina é característico de tirosinas, já que a proteína não contém resíduos de triptofano (WATSON *et al.*, 1988). A emissão de tirosina da maioria das proteínas é baixa e às vezes não é detectável. Essa ausência ou supressão da fluorescência da tirosina pode ser atribuída à transferência, no estado excitado, do próton da hidroxila aromática para um aceptor em suas vizinhanças, os quais podem ser carboxilatos, grupamentos amino carregados ou não carregados (LAKOWICZ, 2000). Assim, essa queda de emissão de fluorescência pela fosforilação pode ser explicada pela formação de grupamentos amino de lisina carregados, em decorrência da fosforilação, próximos as tirosinas.

A aplicação de APH sobre a vicilina resulta na supressão parcialmente reversível de sua fluorescência, sendo esta reversão maior nas vicilinas fosforiladas (**figura 7**). Mostramos através de gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes que a APH causa dissociação da vicilina controle e fosforilada (**figura 8**). Este resultado está de acordo com PEDROSA e FERREIRA (1994), que mostrou através do perfil de eluição em coluna de filtração em gel que, quando submetida à pressão, a vicilina na forma agregada desaparece concomitantemente com o aparecimento de componentes de baixa massa molecular. Em 2005, LIU *et al.* mostraram, através do gel de poliacrilamida na presença de SDS, que a APH de 600 MPa provocou dissociação dos agregados do concentrado protéico do soro de leite formados durante o processo de ultrafiltração. Além disso, mostraram que os espectros de fluorescência do triptofano do concentrado protéico de soro de leite

foram predominadas pelos espectros da  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina devido à alta concentração destas proteínas. Observaram também que o tratamento com APH aumentou a intensidade de fluorescência e deslocou o pico de máxima emissão para comprimentos de onda maiores. Isto indica mudanças na polaridade do meio onde se encontram os resíduos de triptofano, de um meio menos polar para um meio mais polar.

Dessa forma, verificamos que a supressão da fluorescência devido à pressão hidrostática é um indicador da dissociação das subunidades da vicilina. Sugere-se duas explicações possíveis para a supressão da fluorescência quando a proteína dissocia: a primeira possibilidade resultaria da exposição ao solvente de resíduos de tirosina previamente na interface entre subunidades, que poderiam então realizar a transferência de  $H^+$  para o tampão; a segunda possibilidade é que a pressurização da proteína pode levar a mudanças na estrutura terciária das subunidades em paralelo à dissociação, podendo então haver aproximação de resíduos supressores (carboxilatos, grupamentos amino carregados ou não carregados) das tirosinas. As subunidades dissociadas possivelmente sofrem mudanças estruturais que resultam na inabilidade da proteína em reassumir suas estruturas terciária e quaternária (**figura 7**) uma vez retornando à pressão atmosférica. A origem molecular deste fenômeno está no fato de que a exposição de superfícies hidrofóbicas à água, originalmente envolvidas na associação das subunidades, gera uma situação termodinamicamente desfavorável, que resulta em mudanças conformacionais nas interfaces (deriva conformacional; SILVA *et al.*, 1986; RUAN e WEBER, 1988). Assim, as subunidades “derivadas” perdem parte da afinidade pelas outras, resultando na remontagem de oligômeros “derivados”, podendo haver perda de sua função biológica.

Neste trabalho, observamos, através da análise da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima, área e centro de massa espectrais, a não dependência de concentração da vicilina para dissociação por APH (**figura 10**). A individualidade molecular dos oligômeros de vicilina é devido à síntese do precursor de 50 kDa por uma família de genes e ao processamento pós-traducional da proteína (proteólise e glicosilação), que gera oligômeros intrinsecamente heterogêneos. WEBER (1989) sugere que a heterogeneidade molecular de oligômeros complexos dá origem a uma distribuição de energias-livres de associação entre as subunidades, que resulta na falta de dependência de concentração. Observamos ainda que a fosforilação diminui a dissociação da vicilina induzida por APH nas diferentes concentrações estudadas, sendo que na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , este efeito só é notado a partir de 172 MPa (**figura 9**). A diminuição do centro de massa espectral da vicilina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  pelo deslocamento do pico de emissão de fluorescência para o azul, pode ser devido ao aumento da associação da vicilina em decorrência da maior concentração de proteína (**figuras 9I e 10C**). Dessa forma, as tirosinas situadas na interface entre subunidades estariam protegidas à exposição ao solvente.

Assim como PEDROSA e FERREIRA (1994), observamos que a alcalinização na faixa de pH 9,0 a 10,0 mostra um aumento na dissociação por pressão da vicilina controle (**figura 12**). Este mesmo grupo mostrou, através de medidas de tempo de vida do estado excitado de fluorescência, volume hidrodinâmico e dicroísmo circular, que o pH alcalino não desnatura a vicilina à pressão atmosférica. Assim, sugeriram que o aumento do pH deva resultar na ionização de grupamentos envolvidos na interação entre subunidades, resultando na quebra de pontes salinas inter-cadeias. Em pH 8,0, observamos que a fosforilação é capaz de reduzir a supressão da



fluorescência, induzida por pressão, da vicilina (**figuras 11B, F e J**). Adicionalmente, em pH 10,0, somente a partir de 172 MPa começamos a notar pequenas mudanças no perfil de dissociação da vicilina devido à fosforilação (**figuras 11D, H e M**). Experimentos controles a pH 9,0 e 10,0, utilizando bis-tris propano 10 mM, ao invés de Tris-HCl, foram realizados obtendo os mesmos resultados.

Nossos resultados mostraram que a 10 °C, a vicilina controle apresenta uma menor supressão da fluorescência por APH do que a 23 °C e 37 °C (**figura 14**), indicando uma menor dissociação da proteína a esta temperatura. Adicionalmente, mostramos que o perfil de dissociação da vicilina controle e fosforilada a esta temperatura foi parecido (**figuras 13A, D e G**). KOLAKOWSKI *et al.* (2001) mostraram que alta pressão (300 MPa), a temperatura de 25 °C levou a dissociação parcial do dímero da  $\beta$ -lactoglobulina, sendo este fenômeno parcialmente reversível. Temperaturas de +5 °C a -16 °C, sobre alta pressão, resultou em um efeito protetor contra a dissociação induzida pela APH da proteína. Este resultado mostrou que pressurização a baixas temperaturas pode ser útil para minimizar as mudanças estruturais e assim a perda na funcionalidade da proteína. A supressão da fluorescência da vicilina controle e fosforilada por APH, a 37 °C, é diminuída devido à fosforilação (**figuras 13C, F e I**). Sabendo que a reação de fosforilação do TMFS ocorre a 37 °C, podemos sugerir que nesta temperatura ocorra o fortalecimento das possíveis interações eletrostáticas adicionais, em decorrência ao acréscimo de cargas negativas pela fosforilação.

Os efeitos de cosolventes carregados e não carregados sobre a estabilidade da vicilina foram investigados. A presença de NaCl 0,5 M ou glicerol 20% causa estabilização da vicilina contra dissociação de subunidades induzida por APH (**figuras 15 e 16**). CERASOLI *et al.* (2003) mostraram que a adição de NaCl 1 M

aumentou a concentração requerida de uréia de 2,1 M para 4,6 M para desenvolver 50% a chiquimato quinase. O efeito do sal refletiu uma estabilização da conformação enovelada devido a possível ligação dos íons cloreto a sítios específicos na enzima. VALENTE-MESQUITA *et al.* (1998) observaram que NaCl 1 M causou estabilização da  $\beta$ -lactoglobulina contra dissociação de suas subunidades induzida por pressão. A estabilização promovida pelo NaCl, neste estudo, pode ser devido à blindagem de cargas, eliminando eventuais forças de repulsão, e aumentando a estabilidade do oligômero. Já o efeito do glicerol pode ser explicado pelo mecanismo de exclusão do cosolvente da superfície da proteína. O glicerol foi demonstrado promover uma grande estabilização de hemoglobina extracelular de *G. paulistus* (BONAFÉ *et al.*, 1991). Neste caso, o efeito do glicerol pode ser explicado pelo mecanismo de exclusão do cosolvente da superfície da proteína, mas também pode ser devido a um aumento das interações eletrostáticas entre subunidades resultantes da diminuição da constante dielétrica promovida pela adição de glicerol. Além disso, podemos observar que a fosforilação aumenta o efeito estabilizante proporcionado pelo NaCl ou pelo glicerol (**figuras 15 e 16**).

A estabilidade conformacional de proteínas oligoméricas pode ser determinada por estudos de equilíbrio de desnovelamento usando uréia e cloridrato de guanidina, dois reagentes comumente empregados como desnaturantes de proteínas (CHATTERJEE e MANDAL, 2003). A diminuição observada na intensidade de fluorescência da vicilina pela presença de cloridrato de guanidina ou uréia pode indicar a dissociação da proteína e sua possível desnaturação (**figuras 17 e 19**). Uma hipótese para a desnaturação por uréia ou cloridrato de guanidina considera a afinidade do soluto pela superfície da proteína. Se esta afinidade é mais energeticamente favorecida do que a hidratação do soluto, o equilíbrio do estado

nativo↔desnaturado será deslocado para o estado da proteína que tenha uma maior área de superfície, o estado desnaturado (COURTENAY *et al.*, 2001; SCHELLMAN, 2003). Uma outra hipótese se baseia na habilidade do soluto em alterar a estrutura da água, que diminui o efeito hidrofóbico e facilita a exposição do centro hidrofóbico da proteína (BENNION e DAGGETT, 2003). Em relação ao cloreto de guanidina, observamos que a partir da concentração de 1 M, ocorre um deslocamento do comprimento de onda de emissão máxima da tirosina para o azul e um aumento de sua intensidade de fluorescência (**figura 17**). Este efeito pode estar relacionado ao fato do cloridrato de guanidina ser um sal, e assim estaria blindando cargas negativas ou positivas na superfície da proteína, eliminando eventuais forças de repulsão. Além disso, nossos resultados mostraram que, tanto para uréia quanto para cloridrato de guanidina, houve um aumento na intensidade de fluorescência da tirosina no comprimento de onda em torno de 345 nm. Uma vez que a vicilina não possui triptofano, pressupõe-se que este resultado deva ser pela formação do ânion tirosinato, que possui seu pico de emissão em torno de 345 nm.

Através dos resultados obtidos em relação às propriedades estruturais da vicilina, podemos dizer que a fosforilação possui um efeito em estabilizar a vicilina contra a dissociação de suas subunidades. Este efeito pode ser devido ao aumento de carga negativa na superfície da proteína, causado pela modificação com TMFS, podendo assim criar interações eletrostáticas adicionais entre as subunidades, tornando o oligômero mais estável.

## 6. Referências

ADEBOWALE, K. O.; LAWAL, O. S. Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformes*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. **Food Research International**, v. 37, p. 355-365, 2004.

ALONSO, R.; ORÚE, E.; MARZO, F. Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. **Food Chemistry**, v. 63, p. 505-512, 1998.

ALONSO, R.; GRANT, G.; MARZO, F. Thermal treatment improves nutritional quality of pea seeds (*Pisum sativum*) without reducing their hypocholesterolemic properties. **Nutritional Research**, v. 21, p. 1067-1077, 2001.

AMJAD, I.; KHALID, I. A.; SHAH, H. Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 19, p. 127-134, 2003.

BANIEL, A.; CAER, D.; COLAS, B.; GUEGUEN, J. Functional properties of glycosylated derivatives of the 11S storage protein from pea (*Pisum sativum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 200-205, 1992.

BAUMGARTNER, B.; CHRISPEELS, M. J. Purification and characterization of vicilin peptidohydrolase, the major endopeptidase in the cotyledons of mung-bean seedlings. **European Journal of Biochemistry**, v. 77, p. 223-233, 1977.

BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 5142-5147, 2003.

BEWLEY, J. D.; BLACK M. **Seeds physiology development and germination**. Plenum Press, N.Y., 1985.

BONAFÉ, C. F. S.; VILLAS-BOAS, M. S.; SUAREZ, M. C.; SILVA, J. L. Reassembly of a large multisubunits protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the reassociation of extracellular hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 13210-13216, 1991.

BOONYARATANAKORNKIT, B. B.; PARK, C. B.; CLARK, D. S. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 235-249, 2002.

BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 275-284, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRASIL. **Resolução CNS/MS n.4, de 24 nov. 1988**. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial, Brasília, 19 dez. 1988.

BRIDGMAN, P. W. The coagulation of albumin by pressure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 19, p. 511-512, 1914.

CAMPBELL, N. F.; SHIH, F. F.; MARSHALL, W. E. Enzymatic phosphorylation of soy protein isolate for improved functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 403-406, 1992.

CERASOLI, E.; KELLY, S. M.; COGGINS, J. R.; LAPHORN, A. J.; CLARKE, D. T.; PRICE, N. C. Effects of salts on the function and conformational stability of shikimate kinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1648, p. 43-54, 2003.

CHAPLEAU, N.; DE LAMBALLERIE-ANTON, M. Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 273-280, 2003.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1648, p. 174-183, 2003.

COBOS, E. S.; FILIMONOV, V. V.; G´LVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ, J. C.; MATEO, P. L. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1598, p. 98-107, 2002.

COFFMANN, M. C.; GARCIA, V. V. Functional properties and amino acids of a protein isolated from mung bean flour. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 473-484, 1977.

COURTENAY, E. S.; CAPP, M. W. RECORD, T. M. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible surface area. **Protein Science**, v. 10, p. 2485-2597, 2001.

CRONEY, J. C.; JAMESON, D. M.; LEARMONTH, R. P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 29, p. 60-65, 2001.

CROY, R. R. D.; LYCETT, G. W.; GATEHOUSE, J. A.; YARWOOD, J. N.; BOULTER, D. Cloning and analysis of cDNAs encoding plant storage protein precursors. **Nature**, v. 295, p. 76-79, 1982.

DERBYSHIRE, D. J.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 3-24, 1976.

DZWOLAK, W.; KATO, M.; TANIGUCHI, Y. Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins. **Biochemical Biophysical Acta Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1595, p. 131-144, 2002.

EL-ADAWY, T. A. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. **Food Chemistry**, v. 70, p. 83-91, 2000.

FDA. **Food starch modified: code of federal regulation**. Washington: U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services, v. 3, title 21, sec. 172.892, p. 115-117, 2005.

FERREIRA, S.T.; CHAPEAUROUGE, A.; DE FELICE, F. G. Stabilization of partially folded states in protein folding/misfolding transitions by hydrostatic pressure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p. 1215-1222, 2005.

FOURME, R.; GIRARD, E.; KAHN, R.; DHAUSSY, A.; MEZOUAR, M.; COLLOC'H, N.; ASCONE, I. High-Pressure Macromolecular Crystallography (HPMX): Status and prospects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 3, p. 384-390, 2006.

FRANK, F. Protein stability: the value of 'old literature'. **Biophysical Chemistry**, v. 96, p. 117-127, 2002.

GARESSE, R.; CASTELL, J. V.; VALEJO, C. G.; MARCO, R. A fluorescamine-based sensitive method for the assay of proteinases, capable of detecting the initial cleavage steps of a protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 99, p. 253-259, 1979.

GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; BOULTER, D. Isoelectric-focusing properties and carbohydrate content of pea (*Pisum sativum*) legumin. **Biochemical Journal**, v. 185, p. 497-503, 1980.

GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; MORTON, H.; TYLER, M.; BOULTER, D. Characterization and subunit structures of vicilin storage proteins of pea (*Pisum sativum* L). **European Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 627-633, 1981.

GATEHOUSE, J. A.; EVANS, I. M.; BOWN, D.; CROY, R. R. D.; BOULTER, D. Control of storage-protein synthesis during seed development in pea (*Pisum sativum*). **Biochemical Journal**, v. 208, p. 119-127, 1982.

GATEHOUSE, J. A.; LYCETT, R. R. D.; BOULTER, D. The synthesis and structure of pea storage proteins. **CRC Critical Review of Plant Science**, v. 4, p. 287-314, 1984.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**, v. 20, p. 4667-4676, 1981.

GIORDANO, L. B. **As culturas da ervilha e da lentilha / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Coleção Plantar, v. 2, 1993.

HAYASHI, R. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. Em **High Pressure and Biotechnology** (BALNY, C.; HAYASHI, R.; HEREMANS, K.; MASSON, P. Eds). Colloque INSERM, London: John Libbey, v. 224, p. 185-192, 1992.

HERBERHOLD, H.; ROYER, C. A.; WINTER, R. Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: an FT-IR study on staphylococcal nuclease. **Biochemistry**, v. 43, p. 3336-3345, 2004.

HEREMANS, K. A. H. High pressure effects upon proteins and other biomolecules. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 11, p. 1-21, 1982.

HEREMANS, K.; SMELLER, L. Protein structure and dynamics at high pressure. **Biochimica et Biophysical Acta**, v. 1386, p. 353-370, 1998.

HOFMEISTER, F. On the understanding of the effects of salts. **Arch. Exp. Path. Pharm.**, v. 24, p. 441-456, 1888.

IQBAL, A.; IQTIDAR, A. K.; ATEEQ, N.; MUHAMMAD, S. K. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 331-335, 2006.

KOLAKOWSKI, P.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. -C. Effects of high pressure and low temperature on  $\beta$ -lactoglobulin unfolding and aggregation. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 215-232, 2001.

KRAUSE, J. -P. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 221-228, 2002.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 657-666, 2000.

KUNSHENG, Z.; YANGYANG, L.; YUNXIA, R. Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate. **Journal of Food Engineering**, manuscrito aceito para publicação sem páginas definidas, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press, N. Y., 2<sup>a</sup> ed., 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2<sup>o</sup> ed., p. 839, 1995.



LI, H.; AKASAKA, K. Conformational fluctuations of proteins revealed by variable pressure NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 3, p. 331-345, 2006.

LIM, S.; SEIB, P. A. Preparation and pasting properties of wheat and corn starch phosphates. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 137-144, 1993.

LINDMAN, S.; XUE, W.; SZCZEPANKIEWICZ, O.; BAUER, M. C.; NILSSON, H.; LINSE, S. Salting the charged surface: pH and salt dependence of protein G B1 stability. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 2911-2921, 2006.

LIU, X.; POWERS, J. R.; SWANSON, B. G.; HILL, H. H.; CLARK, S. Modification of whey protein concentrate hydrophobicity by high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 3, p. 310-317, 2005.

LULLIEN-PELLERIN, V.; BALNY, C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 209-221, 2002.

LYCETT, G. W.; DELAUNEY, A. J.; GATEHOUSE, J. A.; CROY, R. R. D.; BOULTER, D. The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L): a complete cDNA coding sequence for preprovicilin. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 2367-2380, 1983.

MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, 491-505, 1992.

MANCEVA, S. D.; PUSZTAI-CAREY, M.; BUTKO, P. Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1A: a fluorescence spectroscopy study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1699, p. 123-130, 2004.

MARCHAL, S.; TORRENT, J.; MASSON, P.; KORNBLATT, J. M.; TORTORA, P.; FUSI, P.; LANGE, R.; BALNY, C. The powerful high pressure tool for protein conformational studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1175-1183, 2005.

MARTINS, V. B.; NETTO, F. M. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. **Food Research International**, v. 39, p. 145-153, 2006.

MARUYAMA, N.; ADACHI, M.; TAKAHASHI, K.; YAGASAKI, K.; KOHNO, M.; TAKENAKA, Y.; OKUDA, E.; NAKAGAWA, S.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Crystal structures of recombinant and native soybean  $\beta$ -conglycinin  $\beta$  homotrimers. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 3595- 3604, 2001.

MASON, P. E.; NEILSON, G. W.; DEMPSEY, C. E.; BARNES, A. C.; CRUICKSHANK, J. M. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 4557-4561, 2003.

MOLINA, E.; DEFAYE, A. B.; LEDWARD, D. A. Soy protein pressure-induced gels. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 625-632, 2002.

MONERA, O. D.; KAY, C. M.; HODGES, R. S. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contribution of electrostatic interactions. **Protein Science**, v. 3, p. 1984-1991, 1994b.

MOUNTAIN, R. D.; THIRIMAKAI, D. Importance of excluded volume on the solvation of urea in water. **Journal of Physical Chemistry**, v. 108, p. 6826-6831, 2004.

MOZHAEV, V. M.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. **TIBTECH**, v. 124, p. 493-501, 1994.

MOZHAEV, V. M.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 24, p. 81-91, 1996.

MWASARU, M. A.; MUHAMMAD, K.; BAKAR, J.; CHE MAN, Y. B. Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. **Food Chemistry**, 71, 157-165, 2000.

NAKAMURA, A. **Mecanismo de fosforilação e defosforilação ao longo da germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e suas implicações nas propriedades funcionais**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

OSBORNE, T. B.; CAMPBELL, G. R. Proteins of the pea. **Journal of American Chemistry Society**, v. 29, p. 348, 1898.

PACE, C. N.; LAURENTS, D. V.; THOMSON, J. A. Ph dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. **Biochemistry**, v. 29, p. 2564-2572, 1990.

PALADINI, A., Jr. WEBER, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. **Biochemistry**, v. 20, p. 2587-2593, 1981.

PARK, S. L.; LEE, J. I.; PARK, J. Effects of combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1827-1834, 2002.

PATEL, S.; CUDNEY, R.; MCPHERSON, A. Crystallographic characterization and molecular symmetry of edestin, a legumin from hemp. **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p. 361-363, 1994.

PEDROSA, C.; FERREIRA, S. T. Deterministic pressure-induced dissociation of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds: effects of pH and cosolvents on oligomer stability. **Biochemistry**, v. 33, p. 4046-4055, 1994.

PEDROSA, C.; TRISCIUZZI, C.; FERREIRA, S. T. Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2025-2030, 1997.

PEDROSA, C.; DE FELICE, F. G.; TRISCIUZZI, C.; FERREIRA, S. T. Selective neoglycosylation increases structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 2, p. 203-210, 2000.

PERNOLLET, J. C.; MOSSÉ, J. Structure and localization of legume and cereal seed storage proteins. **Seed Protein**, v. 7, p. 155-191, 1983.

PREVELIGE, P. E.; KING, J.; SILVA, J. L. Pressure denaturation of the bacteriophage P22 coat protein and its entropic stabilization in icosahedral shells. **Biophysical Journal**, v. 66, p. 1631-1641, 1994.

PRIEV, A.; ALMAGOR, A.; YEDGAR, S.; GAVISH, B. Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. **Biochemistry**, v. 35, p. 2061-2066, 1996.

RAGAB, D. M.; BABIKER, E. E.; ELTINAY, A. H. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. **Food Chemistry**, v. 84, p. 207-212, 2004.

REHMAN, Z.; SHAH, W. H. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **Food Chemistry**, v. 91, p. 327-331, 2005.

ROSEMAN, M.; JENCKS, W. P. Interactions of urea and other polar compounds in water. **Journal of American Chemistry Society**, v. 97, p. 631-640, 1975.

RUAN, K.; WEBER, G. Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure. **Biochemistry**, v. 27, p. 3295-3301, 1988.

RUAN, K.; BALNY, C. High-pressure static fluorescence to study macromolecular structure-function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 94-102, 2002.

SCHARNAGL, C.; REIF, M.; FRIEDRICH, J. Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1749, p. 187-213, 2005.

SCHELLMAN, J. A. The thermodynamic stability of proteins. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 16, p. 115-137, 1987.

SCHELLMAN, J. A. Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 108-125, 2003.

SEENA, S.; SRIDHAR, K. R. Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, *Canavalia* of the southwest coast of India. **Food Research International**, v. 38, p. 803-814, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Livraria Varela, p. 517, 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 32, p. 105-126, 1998.

SGROPPO, S.; ANCOS, B.; CANO, M. P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 82, n. 8, p. 90-96, 2002.

SHIMIZU, O.; IMAKUVO, K. New emission band of tyrosine induced by interaction with phosphate ion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 26, p. 541-543, 1977.

SILVA, J. L.; MILES, E. W.; WEBER, G. Pressure dissociation and conformational drift of the dimer of tryptophan syntase. **Biochemistry**, v. 25, p. 5780-5786, 1986.

SILVA, J. L.; WEBER, G. Pressure stability of proteins. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 44, p. 89-113, 1993.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 10, p. 612-618, 2001.

SPENCER, D.; CHANDLER, P. M.; HIGGINS, T. J. V.; INGLIS, A. S.; RUBIRA, M. Sequence interrelationship of the subunits of vicilin from pea seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 2, p. 259-267, 1983.

SUNG, H.; CHEN, H.; LIU, T.; SU, J. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 716-721, 1983.

TIMASHEFF, S. N.; LEE, J. C.; PITZ, E. P.; TWEEDY, N. Interaction of tubulin and other proteins with structure-stabilizing solvents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 55, p. 658-663, 1976.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of proteins by solvents. In Protein Structure, a practical approach. Ed. T. E. Creighton, IRL Press, v. 14, p. 331-345, 1989.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993.

TIMASHEFF, S. N.; XIE, G. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. **Biophysical Chemistry**, v. 105, p. 421-448, 2003.

URBANO, G.; ARANDA, P.; VÍLCHEZ, A.; ARANDA, C.; CABRERA, L.; PORRES, J. M.; LÓPEZ-JURADO, M. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. **Food Chemistry**, v. 93, p. 671-679, 2005.

UTSUMI, S.; MARUYAMA, N.; SATOH, R.; ADACHI, M. Structure-function relationships of soybean proteins revealed by recombinant systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 284-288, 2002.

VALENTE-MESQUITA, V. L.; BOTELHO, M. M.; FERREIRA, S. T. Pressure-induced subunit dissociation and unfolding of dimeric  $\beta$ -lactoglobulin. **Biophysical Journal**, v. 75, p. 471-476, 1998.

VOGEL, R. Influence of salts on rhodopsin photoproduct equilibria and protein stability. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 133-138, 2004.

WATSON, M. D.; LAMBERT, N.; DELAUNEY, A.; YARWOOD, J. F.; CROY, R. R. D.; GATEHOUSE, J. A.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Isolation and expression of a pea vicilin cDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 251, p. 857-864, 1988.

WEBER, G.; DRICKAMER, H. G. Effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 16, p. 89-112, 1983.

WEBER, G. Dynamics of oligomeric proteins. **J. Mol. Liquids**, v. 42, p. 255-268, 1989.

WEBER, G. **Protein Interactions**, Chapman & Hall, New York, 1992.

WENZEL, M.; GERS-BARLAG, H.; SCHIMPL, A.; RÜDIGER, H. Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. **Biological Chemistry**, v. 374, p. 887-894, 1993.

## 7. Anexo

### **Effects of chemical and physical agents on functional properties of phosphorylated vicilin with STMP**

Casanova, F.<sup>a</sup>; Nakamura, A.<sup>b</sup>; Masuda, H.<sup>b</sup>; Lima, L.M.T.R.<sup>c</sup>; Fialho, E.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

\* Corresponding author:

Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Caixa Postal 68041, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brasil.

*E-mail adress:* elianefialho@yahoo.com.br

Fax number: + 55 21 2280 8343

Tel number: +55 21 2562 6449

---

**Abstract**

This study evaluates the effect of phosphorylation with 1% and 4% of sodium trimetaphosphate (STMP) on functional properties of the pea vicilin exposed to chemical and physical agents. The vicilin was obtained by ammonium-sulfate precipitation and the phosphorylation was carried out by incubating vicilin with STMP in borate buffer at pH 11.0 for 3 hours, at 37 °C. The results showed that the pI of unmodified and phosphorylated vicilin changed in the presence of 0.5 M NaCl, resulting in a decrease of the solubility at pH 1.0. The gelation capacity of unmodified vicilin, in the presence of 0.5 M NaCl, decreased approximately 80% when compared with unmodified vicilin without NaCl. Pressure treatment significantly changed the solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP at pH 1.0 and 4.0 from 100% to 67.6% and from 65.4% to 43.9 %, respectively. The treatment at 241 MPa improved the gelation capacity of phosphorylated vicilin with 1% STMP. Glycerol decreased the gelation capacity of vicilin and its solubility in the acidic pH range.

*Keywords:* *Pisum sativum*; Vicilin; Functional properties; Phosphorylation; STMP

---



## 1. Introduction

The use of plant proteins in the formulation of new food products or as a replacement for expensive animal proteins in conventional foods has been the focus of various research efforts. In order to develop plant proteins for use as ingredients in the food industry, there is the need to determine the physicochemical and functional properties of these proteins (Adebowale & Lawal, 2004; Akintayo, Adebayo & Arogundade, 2002; Chavan, McKenzie & Shahidi, 2001; Rangel, Domont, Pedrosa & Ferreira, 2003; Sze-Tao & Sathe, 2000). Protein hydration and hydration related properties such as the protein solubility, water holding capacity, oil binding properties, foaming capacity and stability, emulsion capacity and stability, viscosity, and gelation are some of the functional properties that have a significant impact on product quality from food industry.

Chemical modifications, like phosphorylation, succinylation, glycosilation and acetylation, are methods proposed to improve the functional properties of the seeds proteins for processing (El-Adawy, 2000; Krause, 2002; Lawal, 2005; Nakamura, 2003; Pedrosa, Trisciuzzi & Ferreira, 1997). Sodium trimetaphosphate (STMP) is a phosphorylating, economical and practical reagent for large-scale application (Matheis & Whitaker, 1984), has been regarded as a successful food protein modification method (Nakamura, 2003; Sung, Chen, Liu & Su, 1983) and is already being used by food industries in food products (CNS/MS, 1988).

Factors, such as pH, salts and solvents, affect physicochemical properties and interaction between proteins and in turn might alter functional properties (Arogundade, Akinfenwa & Salawu, 2004; Khalid, Babiker & El Tinay, 2003; Mwasaru, Muhammad, Bakar & Che Man, 2000; Ragab, Babiker & Eltinay, 2004). Sodium chloride (NaCl) is a principal ingredient in food formulation due to its flavour, preservative and protein-

solubilizing properties (Gimeno, Astiasaran & Bello, 1999; Seman, Olson & Mandigo, 1980). Like NaCl, high-pressure processing, an emerging technology, is used to preserve food products. High pressure induces macromolecules (including proteins) modification, due to disruption of hydrophobic and electrostatic interactions. The protein conformation changes are more or less important and bring about modifications of the food functional properties (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003; Bouaouina, Desrumaux, Loisel & Legrand, 2006).

The functional properties of vicilin, a major storage protein from pea (*Pisum sativum*) seeds, have been investigated (Nakamura, 2003; Pedrosa, Trisciuzzi & Ferreira, 1997; Rangel, Domont, Pedrosa & Ferreira, 2003); however, a literature search showed that the effect of salt, high-pressure and glycerol on its functional properties has not been reported. Vicilin corresponds to up to 35 % of the total protein content of the seeds and consists of three major subunits of 50 kDa assembled into a 150 kDa oligomer (Gatehouse, Croy & Boulter, 1984). This study, therefore aimed at investigating the effect of phosphorylation with STMP in different concentrations (1% and 4%) on functional properties of the pea vicilin exposed to physical (hydrostatic pressure) and chemical (salt and glycerol) agents.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Materials*

Pea (*Pisum sativum*) seeds were obtained from the Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Brasília, Brazil. EDTA, leupeptin, PMSF, SBTI and pepstatin A were from SIGMA ALDRICH FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Tris[tris-(hydroxymethyl) aminomethane], boric acid, ammonium sulfate, sodium acetate and sodium citrate were from REAGEN. Acetone, glycine

and glycerol were from MERCK. Sodium chloride was from VETEC. STMP from Solutia was kindly provided for Dr. Sgarbieri (ITAL, Brazil). The others chemicals were from analytical grades.

## *2.2. Methods*

### *2.2.1. Purification of vicilin*

Vicilin was purified from pea seeds as described by Pedrosa and Ferreira (1994). Throughout the purification, the solutions contained a cocktail of protease inhibitors, including 0.5 µg/mL of leupeptin, 0.007 µg/mL of pepstatin A, 2 µg/mL of PMSF and 0.05 µg/mL of SBTI. Vicilin stock solutions (~5 mg/mL) were stored at - 18 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 10.0. Protein concentration was determined according to Bradford's method (1976).

### *2.2.2. Protein phosphorylation*

Phosphorylation of vicilin was carried out by a modification of the procedure described by Sung, Chen, Liu, and Su (1983). 25 mg of vicilin were phosphorylated with a solution of 1% or 4% of STMP in 0.2 M borate buffer at pH 11.0. Reactions were incubated at 37 °C for 3 h, and after this time, samples were dialyzed against 10 mM Tris HCl buffer at pH 10.0 for 48 h.

### *2.2.3. High-pressure treatment*

0.5 mg/mL or 10 mg/mL of unmodified (without STMP) or phosphorylated (with STMP) vicilin were conditioned in a eppendorf. Then, these proteins were subjected to high-pressure treatment at 241 MPa for 30 min, at 23 °C using a pressure generator. The time

needed to achieve the pressure at 241 MPa was approximately 2 min. After exposure to high pressure, functional properties of the phosphorylated or not vicilin were studied.

#### *2.2.4. Evaluation of functional properties of vicilin*

##### *2.2.4.1. Solubility*

Solubilities of unmodified or phosphorylated vicilin samples exposed to physical (hydrostatic pressure) or chemical (0.5 M NaCl or 20 % glycerol) agents were determined by a modification of the method of Coffman and Garcia (1997). Protein solutions (0.5 mg/mL) were incubated over a range of pH (1.0-10.0) using a mixture of buffers, such as: Tris, Glycine, Sodium acetate and Sodium citrate. After 5 min of stirring with a magnetic stirrer at room temperature, samples were centrifuged for 15 min at 34 000 g. Protein concentration in the supernatants was determined according to Bradford's method (1976) and expressed as a percentage of initial total protein concentration. All analyses were conducted in triplicate and average values were calculated.

##### *2.2.4.2. Gelation Capacity*

The method of Coffman and Garcia (1977) was employed with some modifications. The eppendorfs containing 0.5 mL (10 mg/mL) of unmodified vicilin or the phosphorylated ones exposed to chemical or physical agents were heated for 1 hour in a boiling water bath and cooled to 4 °C on an ice bath. After it, the supernatant was discarded and the eppendorf was weighted. The results are expressed in mg of gelified samples weight. All analyses were conducted in triplicate and average values were calculated.

### 2.2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was done with Prism 4 for Windows version 4.02 and the t-test was used to determine significance of differences between means. Trends were considered significant when means of compared sets differed at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effects of NaCl on solubility

Sodium chloride had significant effects on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin as shown in **Figure 1**. For both vicilins, the presence of NaCl significantly decreased the solubility of the proteins in the pH 1.0. The presence of 0.5 M NaCl increased from 32.5% to 67.8% ( $P < 0.05$ ), from 30.3% to 59.1% ( $P < 0.05$ ) and from 62.8% to 69.20% ( $P \geq 0.05$ ) the solubility around isoelectric point (pH 4.0 – 5.0) of unmodified vicilin, 1 % phosphorylated, and 4 % phosphorylated vicilin, respectively. From pH 7.0 to pH 10.0, the solubility of the vicilins did not change relative to the samples without NaCl. For unmodified and phosphorylated vicilin, the maximum solubility in 0.5 M NaCl shifted from pH 7.0 to 10.0. The lowest solubility was observed in 0.5 M NaCl at pH 1.0 for unmodified vicilin (32.5 %), for phosphorylated vicilin with 1% STMP (37.8 %) and with 4% STMP (37.0 %), compared to 100 %, 88.5 % and 100 %, respectively for their controls. Mwasaru *et al.* (2000) had shown that above pH 4.0 the solubility of pigeonpea and cowpea protein isolates increased with increasing ionic strength but, as pH was decreased, the effect of NaCl diminished. The findings in our study are similar to the findings of previous investigations on the effect of NaCl on the pH-solubility of protein isolates from beach pea (Chavan, McKenzie & Shahidi, 2001) and cowpea proteins (Ragab *et al.*, 2004). The effects

of ionic strength on protein solubility presumably involve electrostatic, solvation, and salting-in and salting-out phenomena (Kinsella, 1979). The structure-function relationship approach of Aluko and Yada (1995) explained that, at low pH, all carboxyl groups are protonated and the protein acquires a net positive charge, resulting in decreased repulsion of the  $\text{Cl}^-$  ions and enhanced hydrophobic interactions leading to the formation of insoluble aggregates. At high pH values the increased negative charge on the proteins, combined with the salting-in effect of NaCl, serve to dissociate the protein aggregates and thus increase solubility. Vicilin showed good solubility at alkaline pH, and the presence of salts enhanced solubility only at the isoelectric pH, which is an important characteristic for food formulations (Idouraine, Yensen & Weber, 1991).

### *3.2. Effects of NaCl on gelation properties*

Effects of ionic strength on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin is shown in **Figure 2**. The phosphorylation process decreased approximately 80% of the gelation capacity of vicilin ( $P < 0.05$ ). The gelation capacity of unmodified vicilin in the presence of 0.5 M NaCl decreased approximately 80% when compared with unmodified vicilin without NaCl ( $P < 0.05$ ). Although no change was observed in gelation capacity of phosphorylated vicilin when was added 0.5 M NaCl. Ragab *et al.* (2004) suggested that gelation is not only a function of protein quantity but seems also to be related to the type of protein as well as to the non-protein components and protein solubility. Akintayo, Oshodi and Esuoso (1999) had earlier reported ionic strength dependent gelation properties for *Cajanus cajan* protein. In their report, the gelation capacity of flour improved at low ionic strength (0.5 M NaCl), while it reduced at high ionic strength solution (1.0 M). They attributed improvement in gelation capacity at low ionic strength to enhanced protein solubilisation to

the salt solution, which created an effective overlapping of the functional groups between adjacent protein molecules, a condition necessary for a network gel formation. Mwasaru *et al.* (2000) showed that increasing NaCl from 0.1 to 0.5 M resulted in significant reduction in the gelation capacity values of pigeonpea and cowpea protein isolates. The similar fact was observed by Adebowale and Lawal (2004), these authors showed that an increase in ionic strength of the protein solution reduced the gelation capacity of mucuna bean flour compared with the control. Arntfield, Murray and Ismond (1990) reported that optimal network characteristics were obtained with 0.3 M NaCl for ovalbumin and 0.2 M NaCl for faba bean vicilin; at higher salt concentration may be resulted in the disruption of the network due to the masking of protein charges by the salt. Decrease of the gelation capacity of vicilin in the presence of NaCl may be due to decrease in protein unfolding limiting access to reactive side groups within the protein molecules, a condition necessary for the formation of a three-dimensional network structure as seen in protein gels. Similar observation had been reported earlier (Adebowale & Lawal, 2004).

### *3.3. Effects of high pressure treatment on solubility*

The solubility profile of pressurized unmodified or phosphorylated vicilin is presented in **Figure 3**. Solubility of the unmodified vicilin did not significantly change after pressure treatment. No significant changes were observed in the solubility of phosphorylated vicilin with 1% STMP after treatment at 241 MPa. Pressure treatment significantly changed the solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP at pH 1 and 4 from 100.0% to 67.6% and from 65.4% to 43.9 %, respectively. The solubility of this phosphorylated vicilin remained higher around isoelectric point (pH 4.0 – 5.0) than its control after pressure treatment nonetheless. From pH 7.0 to pH 10.0, the solubility of the vicilins treated with high pressure

did not change relative to the non-treated samples. Chapleau *et al.* (2003) showed that below 400 MPa, lupin proteins solubility was not affected. Between 400 and 600 MPa, proteins lost a quarter of their solubility. Molina, Papadopoulou and Ledward (2001) observed that the solubility of the high pressure treated soy protein isolate was affected in a complex way because of its effect on the two main globulins (7S and 11S globulins). At 200 MPa, it was not affected, but dropped at 400 MPa, probably due to the aggregation of the 11S. Generally, high-pressure processing induced the rupture of non-covalent interactions within proteins molecules, which may imply formation of new complexes between proteins by means of intra and intermolecular bonds. Application of high pressure on globular proteins involved a decrease of volume linked with the compression of the internal cavities (Gekko, 1991). Pressure higher than 200 MPa modified electrostatic and hydrophobic interactions which lead to structure modification as far as protein aggregation induced by tertiary and secondary structure changes (Masson, 1992). In our study, the changes in the solubility of vicilin after pressure treatment can be related to exposure of hydrophobic residues that could lead to a loss in solubility.

#### *3.4. Effects of high pressure treatment on gelation properties*

Effect of high pressure treatment on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin is shown in **Figure 4**. Gelation properties of unmodified and phosphorylated vicilin with 4% STMP after pressure treatment did not modify ( $P \geq 0.05$ ). Although the treatment at 241 MPa increased three times the gelation capacity of phosphorylated vicilin with 1% STMP ( $P < 0.05$ ). The maximum phosphorylation of vicilin in lysine residues with STMP occurs using 4% of this reagent. Probably, when the vicilin is phosphorylated with 1% STMP, any serine and lysine residues are not phosphorylated. These



results suggests that the high pressure treatment increased the gelation capacity due to the presence of these nonphosphorylated residues. The gel capacity and the type of gel formed depend on protein concentration, temperature, pH, and the formation and rupture of disulfide bonds, hydrophobic and electrostatic interactions (García, Torre, Marina & Laborda, 1997). Many studies have been carried out to investigate the formation high-pressure induced gels (Apichartsrangkoon, 2003; Molina, Defaye & Ledward, 2002; Zhang, Li, Tatsumi & Isobe, 2005). Zhang *et al.* (2005) showed that tofu gel with a coagulant ( $\text{CaCl}_2$ ) was formed with pressures up to 400 MPa, but these gels displayed very little strength. Molina *et al.* (2002) observed that the gel network that result from high-pressure treatment of the soy 11S subunits involve SH/SS interchange. The  $-\text{SH}$  residues of the polypeptide chains are exposed during pressure treatment and in the presence of oxygen after release, they interact to form intra- or intermolecular stable S-S bonds, that help in the formation of the gel matrix. Higher pressures formed gels with greater strength. By the way, high-pressure effects on proteins are primarily related to the rupture of non-covalent interactions within protein molecules and to the subsequent re-formation of intra- and intermolecular bonds within or between protein molecules. The heat primarily affects hydrogen bonded networks while pressure more effectively disrupt hydrophobic and electrostatic interactions. Thus, pressure treatment before heating could be improve the gelation capacity, as demonstrated in this work.

### 3.5. Effects of glycerol on solubility

**Figure 5** shows the relationship between the use of 20% glycerol to modify the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin with 4% STMP ( $P < 0.05$ ). The glycerol decreased the vicilin solubility in the acidic range (1-3). The solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP decreased from 62.9% to 50% at around the isoelectric point of vicilin.

In spite of this decrease, the solubility of phosphorylated vicilin with 4% STMP was significantly higher than unmodified vicilin. No change was observed in the vicilin solubility in the pH over 7.0. Glycerol and other polyolic cosolvents have been shown to enhance protein stability (Ruan, Xu, Li, Li, Lange & Balny, 2003; Gekko & Timasheff, 1981; Prieu, Almagor, Yedgar & Gavish, 1996). It has been proposed that the mechanism of this phenomenon is due to “preferential hydration” of the protein, i. e. exclusion of the cosolvents molecules from the protein surface, which creates a tendency of the protein to minimize its surface (Gekko & Timasheff, 1981). The nonpolar groups on the protein surface should be expected, then, to react unfavorably to contact with the mixed solvent. Surface hydrophobic groups would prefer to migrate into the interior of the protein out of contact with solvent in order to relieve this situation. Thus, this could decrease the surface hydrophobicity of the protein (Gekko & Timasheff, 1981). Tolstoguzov (2003) showed that the aggregation of insoluble complex particles is mainly due to electrostatic and hydrophobic interactions. The observed decreased in solubility of vicilin in the acidic range (pH <7.0), in our study, may have been due to the possible increase of the formation of hydrophobic interactions because of the decrease in the surface hydrophobicity. Besides, the preferential binding data indicate that the chemical potential of a protein (or its activity coefficient) increases with increasing glycerol concentration. An increase in the activity coefficient of a solute corresponds to a decrease in its concentration at constant activity or a decrease in its solubility (Gekko & Timasheff, 1981). To understand the mechanism of glycerol on functional properties of proteins more studies should be done.

### *3.6. Effects of glycerol on gelation properties*

Gelation capacity of vicilin in the presence of glycerol is presented in **Figure 6** and we observed that glycerol significantly decreased the gelation properties of unmodified and phosphorylated vicilin. Gelation mechanism and gel appearance are fundamentally controlled by the balance between attractive hydrophobic interactions and repulsive electrostatic interactions. The repulsive forces are due to surface charges and the attractive forces are due to various functional groups exposed by the thermal unfolding of the protein (Kojima & Nakamura, 1985). Denaturation, or unfolding, involves an increase in the surface of contact between protein and solvent, and in particular exposes additional hydrophobic residues to contact with the solvent. In the presence of glycerol, this would increase the thermodynamically unfavorable situation and require the use of more free energy for unfolding than in water. As a result, the presence of glycerol should tend to favor the more folded, or native, state (Gekko & Timasheff, 1981). Thus, like NaCl, glycerol would decrease protein unfolding, limiting access to reactive side groups within the protein molecules, which is a condition necessary for the formation of protein gels. It is important to emphasize that before our study, there were not studies about the effect of glycerol on functional properties of vicilin in the literature.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB) – Prêmio Antonio Luís Vianna 2001; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). The authors are grateful to Dr. Hatisaburo Masuda and Dr. Débora

Foguel from the Instituto de Bioquímica Médica – IBqM – UFRJ for the use of their laboratories and for partially supporting the research work described in this article.

## References

Adebowale, K. O., & Lawal, O. S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, 37, 355-365.

Akintayo, E. T., Adebayo, E. A., & Arogundade, L. A. (2002). Chemical composition, physicochemical and functional properties of akee (*Bilphia sapida*) pulp and seed flours. *Food Chemistry*, 77, 333-336.

Akintayo, E. T., Oshodi, A. A., & Esuoso, K. O. (1999). Effect of ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66, 51-56.

Aluko, R. E., & Yada, R. Y. (1995). Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53, 259-265.

Apichartsrangkoon, A. (2003). Effects of high pressure on rheological properties of soy protein gels. *Food Chemistry*, 80, 55-60.

Arntfield, S. D., Murray, E. D., & Ismond, M. A. H. (1990). Influence of salts on the microstructural and rheological properties of heat-induced protein networks from ovalbumin and vicilin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1335-1343.

Arogundade, L. A., Akinfenwa, M. O., & Salawu, A. A. (2004). Effect of NaCl and its partial or complete replacement with KCl on some functional properties of defatted *Colocynthis citrullus* L. seed flour. *Food Chemistry*, 84, 187-193.

Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, 275-284.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brasil. *Resolução CNS/MS n.4, de 24 nov. 1988*. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial, Brasília, 19 dez. 1988.

Chapleau, N., & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17, 273-280.

Chavan, U. D., McKenzie, D. B., & Shahidi, F. (2001). Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*, 74, 177-187.

Coffmann, M. C., Garcia, V. V. (1977). Functional properties and amino acids of a protein isolated from mung bean flour. *Journal Food Technology*, 12, 473-484.

El-Adawy, T. A. (2000). Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry*, 70, 83-91.

García, M. C., Torre, M., Marina, M. L., & Laborda, F. (1997). Composition and characterisation of soybean and related products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 361-391.

Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D., & Boulter, D. (1984). The synthesis and structure of pea storage proteins. *CRC Critical Review of Plant Science*, 4, 287-314.

Gekko, K. (1991). Flexibility of globular proteins in water as revealed by compressibility. In H. Levine, & L. Slade (Eds.), *Waterrelationships in foods* (pp.753-771). New York: Plenum Press.

Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20, 4667-4676.

Gimeno, O., Astiasaran, I., & Bello, J. (1999). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl<sub>2</sub> on texture and color of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 873-877.

Idouraine, A., Yensen, S. B., & Weber, C. W. (1991). Terapy bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. *Journal of Food Science*, 56, 1316-1318.

Khalid, E. K., Babiker, E. E., & El Tinay, A. H. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82, 361-366.

Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 56, 242-257.

Kojima, E., & Nakamura, R. (1985). Heat gelling properties of hen`s egg yolk low density lipoprotein (LDL) in the presence of other proteins. *Journal of Food Science*, 50, 63-66.

Krause, J. -P. (2002). Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). *Industrial Crops and Products*, 15, 221-228.

Lawal, O. S. (2005). Functionality of native and succinylated Lablab bean (*Lablab purpureus*) protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 19, 63-72.

Masson, P. (1992). Pressure denaturation of proteins. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, & P. Masson (Eds.), (Vol. 224), *High pressure and Biotechnology*, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext LTd.

Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1984). Chemical phosphorylation of food proteins: an overview and a prospectus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 699-705.

Molina, E., Defaye, A. B., & Ledward, D. A. (2002). Soy protein pressure-induced gels. *Food Hydrocolloids*, 16, 625-632.

Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15, 263-269.

Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Che Man, Y. B. (2000). Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. *Food Chemistry*, 71, 157-165.

Nakamura, A. (2003). Mecanismo de fosforilação e defosforilação ao longo da germinação de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) e suas implicações nas propriedades funcionais. Rio de Janeiro, 115p., Thesis (Master), UFRJ.

Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (1994). Deterministic pressure-induced dissociation of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds: effects of pH and cosolvents on oligomer stability. *Biochemistry*, 33, 4046-4055.

Pedrosa, C., Trisciuzzi, C., & Ferreira, S. T. (1997). Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2025-2030.



Priev, A., Almagor, A., Yedgar, S., & Gavish, B. (1996). Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. *Biochemistry*, 35, 2061-2066.

Ragab, D. M., Babiker, E. E., & Eltinay, A. H. (2004). Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 84, 207-212.

Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5792-5797.

Ruan, K., Xu, C., Li, T., Li, J., Lange, R., & Balny, C. (2003). The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding. *European Journal of Biochemistry*, 270, 1654-1661.

Seman, D. L., Olson, D. G., & Mandigo, R. W. (1980). Effect of reduction and partial replacement of sodium on bologna characteristics and acceptability. *Journal of Food Science*, 45, 1116-1121.

Sung, H., Chen, H., Liu, T., & Su, J. (1983). Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *Journal of Food Science*, 48, 716-721.

Sze-Tao, K. W. C., & Sathe, S. K. (2000). Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 69, 153-160.

Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.

Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E., & Isobe, S. (2005). High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 38, 7-14.

### **Figure Captions**

Fig. 1. Effect of NaCl on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin.

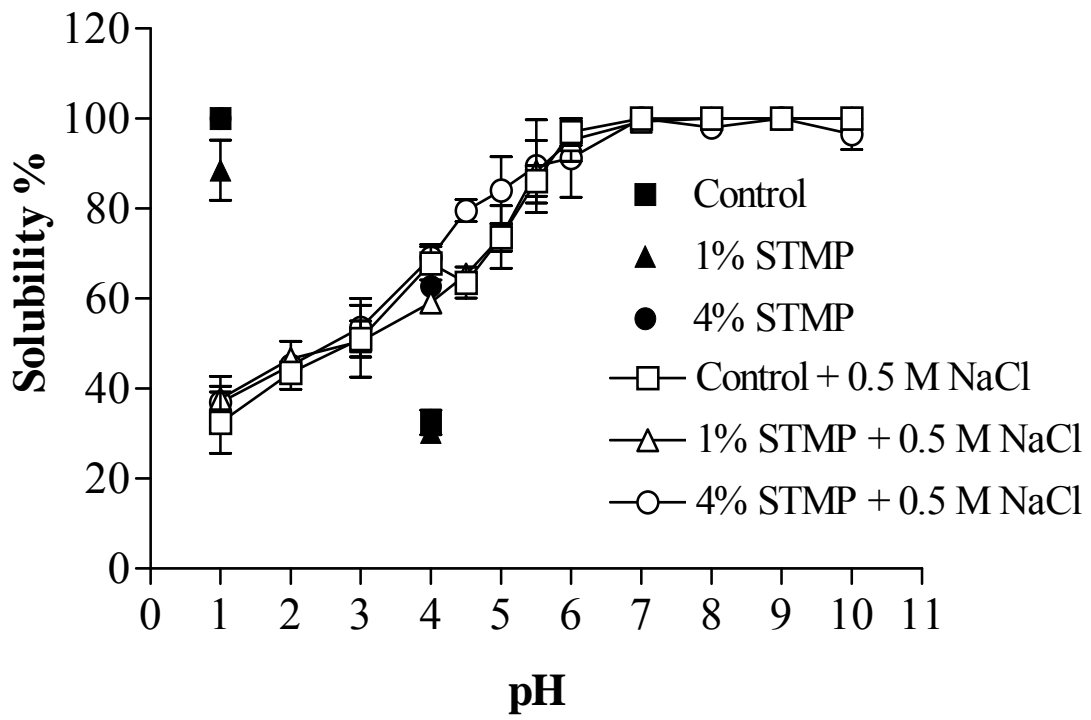
Fig. 2. Effect of NaCl on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin.

Fig. 3. Effect of high pressure treatment on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin. 0.1 MPa = 1 atm.

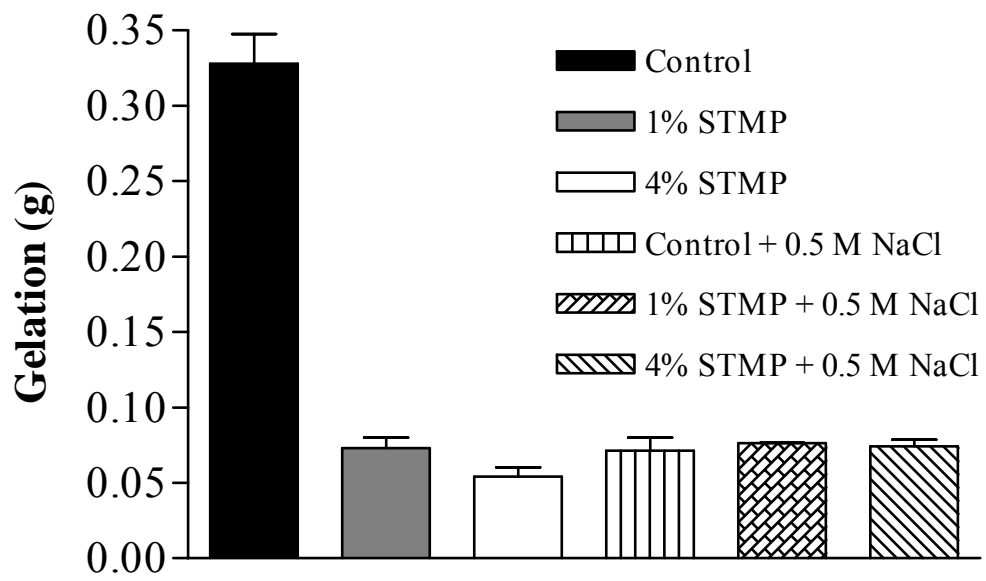
Fig. 4. Effect of high pressure treatment on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin. 0.1 MPa = 1 atm.

Fig. 5. Effect of glycerol on the solubility of unmodified and phosphorylated vicilin.

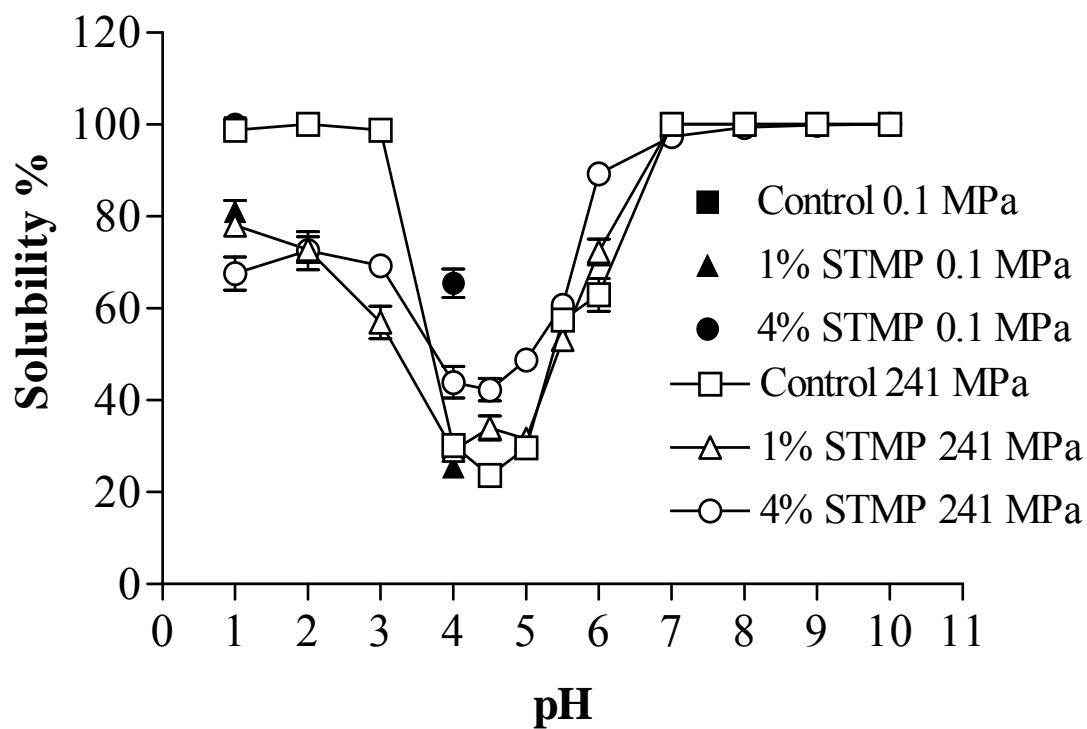
Fig. 6. Effect of glycerol on gelation capacity of unmodified and phosphorylated vicilin.



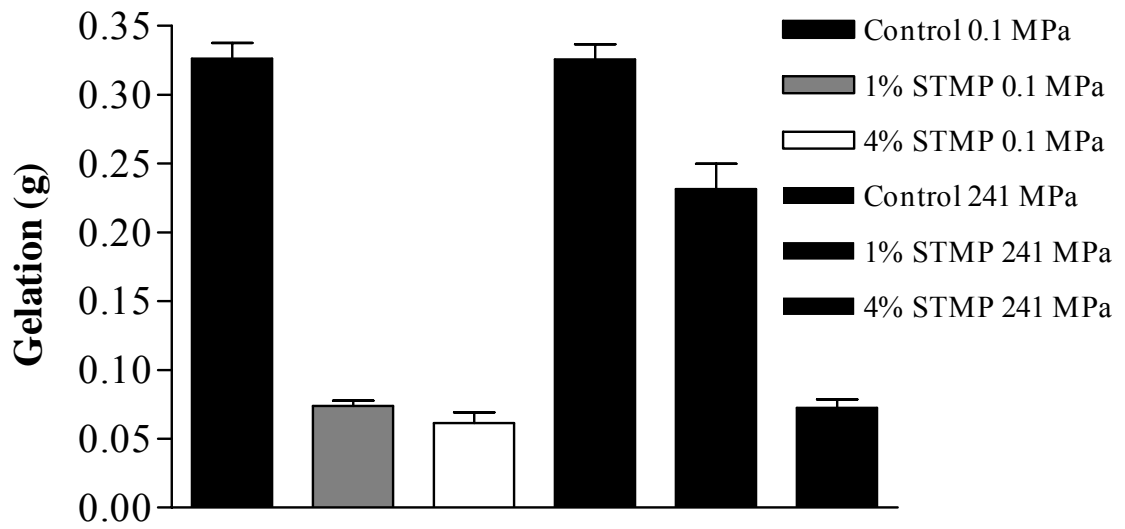
Casanova et al., 2006, Figure 1



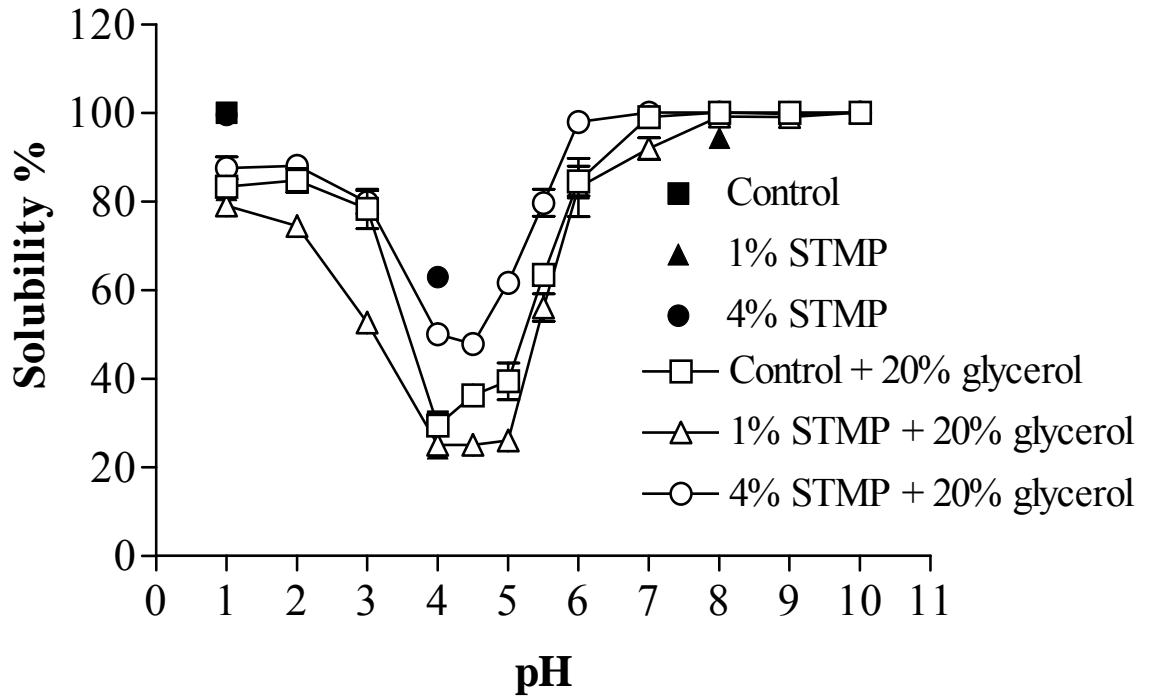
Casanova, et al., 2006, Figure 2.



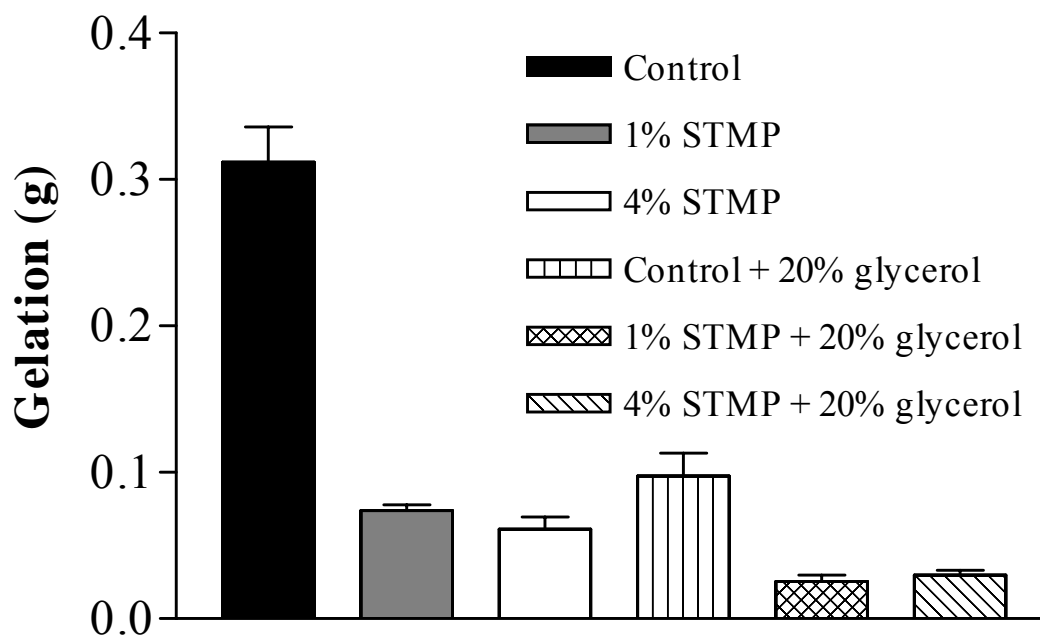
Casanova, et al., 2006, Figure 3.



Casanova, et al., 2006, Figure 4.



Casanova, et al., 2006, Figure 5.



Casanova, et al., 2006, Figure 6.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)