

FLÁVIA ASSUNÇÃO CAMPELO

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
ESTRUTURADORAS DE GELO OBTIDAS DE FOLHAS DE
TRIGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C193e
2014
Campelo, Flávia Assunção, 1985-
Extração e purificação de proteínas estruturadoras de gelo
obtidas de folhas de trigo / Flávia Assunção Campelo. – Viçosa,
MG, 2014.
xv, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Mônica Ribeiro Pirozi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-48.

1. Trigo - Folhas. 2. Gelo - Extração. 3. Gelo - Purificação.
4. Gelo - Estrutura - Proteína. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 633.11

FLÁVIA ASSUNÇÃO CAMPELO

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
ESTRUTURADORAS DE GELO OBTIDAS DE FOLHAS DE
TRIGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Aprovada: 27 de Junho de 2014.

José Benício Paes Chaves

Claudia Regina Vieira

Eduardo Basílio de Oliveira

Frederico Barros

Mônica Ribeiro Pirozi

Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança; o seu anjo da guarda.

Joseph Addison

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação de mestrado à minha mãe Isabel Cristina de Assunção Campelo, ao meu pai Marco Antônio Pinto Campelo, à minha irmã Camila Assunção Campelo e aos meus familiares e amigos. Com toda certeza sem o carinho, generosidade, apoio e conselhos de todos eu não teria concluído mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente, sem Ele, não poderia estar aqui agradecendo a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Aos meus pais, Isabel Cristina de Assunção Campelo e Marco Antônio Pinto Campelo, exemplos de humildade e trabalho, pela educação, pelo apoio incondicional, amor, motivação, broncas quando necessárias, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, sem eles não teria conseguido chegar aonde cheguei e nada teria a importância que tem, também agradeço à minha irmã, Camila Assunção Campelo pelo carinho, amor e inestimável encorajamento, essas três pessoas são os pilares da minha vida, a razão da minha batalha diária ao longo desses anos, sem eles essa conquista não teria o valor que tem para mim, eles são as pessoas que busco sempre orgulhar, as pessoas mais importantes da minha vida, resumindo são meu tudo.

Aos meus familiares por compreenderem minha ausência nas comemorações, por estarem sempre me apoiando e me lembrando da família incrível e única que eu tenho com quem eu sempre pude contar. Em especial agradeço a minha prima Isabela Campelo de Queiroz por me ajudar diretamente nesse trabalho, por ser minha parceira de aulas e trabalhos, ouvir e me ajudar nos momentos de incertezas ao longo desse mestrado.

A minha orientadora e amiga Mônica Ribeiro Pirozi, agradeço pelo acompanhamento ao longo desses anos, por ter feito parte da minha formação acadêmica, pelos puxões de orelha, conselhos, ensinamentos, resumindo por me mostrar o tipo de profissional que quero ser um dia.

Aos meus coorientadores Claudia Regina Vieira (grande amiga e exemplo ímpar de profissional) e José Benício Paes Chaves, pela colaboração e apoio ao longo desse trabalho, as opiniões de vocês ao longo do desenvolvimento só enriqueceram minha pesquisa. Também agradeço ao Professor Eduardo Basílio de Oliveira pela enorme contribuição na redação do meu trabalho e também por aceitar fazer parte da minha banca.

A todos meus amigos de Viçosa e Belo Horizonte, que tantas vezes me viram reclamar das dificuldades, e por inúmeras vezes me mostraram o real

significado da palavra amizade, agradeço pelas conversas, os momentos de lazer e pelas lembranças que estarão na minha memória para sempre. À Julia Lopes e Laís Maria, que moraram comigo durante o mestrado e estavam sempre me ajudando, acompanhando minhas conquistas e frustrações ao longo do meu trabalho eu agradeço de todo coração. Aos amigos Guilherme Monteiro e Breno Barbosa pelas inúmeras risadas, pelas várias broncas e pelas diversas manifestações de amor e amizade que ambos tiveram comigo ao longo desses anos. E em especial às minhas amigas “Lulus” (Layane Gontijo, Sarah Ituassu, Marianne Carvalho, Raphaela Gomes, Luciana Andrade, Adriana Dias, Marina Bonde, Mari Castro e Ligia Clarine) que estão na minha vida desde sempre e lá permaneceram, minhas conselheiras e companheiras de uma vida, que me acompanharam de longe, mas ao mesmo tempo de perto com muito carinho e amizade.

Aos grandes amigos e parceiros do LAFA: Natanielli, Ana Paula, Tatiana, Antônio Maradini, Adriz, Ana Claudia, Caroline, Barbara, pela convivência diária e auxílio no laboratório, mas em especial agradeço ao Vitor por se dedicar muito a esse projeto e ser uma ajuda valiosa em todas as suas etapas.

Agradeço ao Dr. Scott Bean pelo auxílio técnico através do fornecimento do material experimental, e pela contribuição intelectual ao longo de todo o trabalho.

Aos funcionários do DTA/UFV, pelas contribuições na realização das etapas desse projeto e pelo apoio técnico fornecido em todos os momentos.

A Professora Maria Goreti Almeida por permitir a utilização do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos para realização de partes desse trabalho. Em especial agradeço aos seus doutorandos Camila e Eduardo e ao seu técnico Gustavo pela disponibilidade de tempo e por me auxiliarem durante as análises.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) obrigada pelo apoio financeiro mediante a concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, a todos aqueles que estiveram envolvidos de forma direta ou indireta e contribuíram para o presente resultado.

Obrigada.

BIOGRAFIA

Flávia Assunção Campelo, filha de Marco Antônio Pinto Campelo e Isabel Cristina de Assunção Campelo, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 19 de outubro de 1985. Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, onde estudou de maio de 2006 à julho de 2011. Ingressou no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, em Agosto de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Breve histórico sobre as proteínas estruturadoras de gelo	4
3.2 Classificação das proteínas estruturadoras de gelo	5
3.3 Proteínas estruturadoras de gelo em cereais	7
3.4 Estrutura dos cristais de gelo	8
3.4.1 Mecanismo de cristalização do gelo	10
3.4.2 Mecanismo de recristalização do gelo	10
3.5 Mecanismo de ação das proteínas estruturadoras de gelo.....	11
3.6 Métodos de extração e purificação das proteínas estruturadoras de gelo	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Instalações para o experimento.....	16
4.2 Equipamentos	16
4.3 Reagentes e solventes	17
4.4 Delineamento experimental.....	17
4.5 Material experimental	18
4.5.1 Obtenção das folhas de trigo.....	18
4.6 Metodologia.....	19
4.6.1 Extração das proteínas estruturadoras de gelo	19
4.6.2 Detecção da presença das proteínas estruturadoras de gelo	21
4.6.3 Caracterização físico-química dos extratos brutos	22
4.6.3.1 Análise do teor de sólidos totais	22

4.6.3.2	Análise do teor de proteínas brutas totais.....	22
4.6.3.3	Análise do teor de cinzas totais	23
4.6.4	Métodos de purificação das proteínas estruturadoras de gelo.....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Avaliação dos métodos de extração das proteínas estruturadoras de gelo	26
5.1.1	Teor de sólidos totais, cinzas e proteínas brutas dos extratos proteicos.....	26
5.1.2	Detecção das proteínas estruturadoras de gelo	30
5.2	Avaliação dos métodos de purificação	34
5.2.1	Teor de proteínas brutas	34
5.2.2	Detecção de proteínas estruturadoras de gelo nos extratos purificados.....	37
6.	CONCLUSÕES.....	41
7.	REFERÊNCIAS	43
8.	ANEXOS.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de equipamentos utilizados. _____	16
Tabela 2 - Lista de reagentes e solventes utilizados. _____	17
Tabela 3 - Teores de sólidos totais dos extratos obtidos à partir das metodologias de extração E1 e E2. _____	26
Tabela 4 - Teores de proteínas brutas dos extratos obtidos à partir das metodologias de extração E1 e E2. _____	27
Tabela 5 - Teores de cinzas dos extratos obtidos à partir das metodologias de extração E1 e E2. _____	28
Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão dos teores de proteínas brutas (mg/mL) dos extratos purificados obtidos a partir da metodologia E1. _____	35
Tabela 7 - Valores médios e desvios padrão dos teores de proteínas brutas (mg/mL) dos extratos purificados obtidos a partir da metodologia E2. _____	35
Tabela 8 - Resumo da análise de variância dos teores de cinzas totais dos extratos obtidos por E1 e E2 _____	50
Tabela 9 - Resumo da análise de variância dos teores de sólidos totais dos extratos obtidos por E1 e E2 _____	50
Tabela 10 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos obtidos por E1 e E2 _____	50
Tabela 11 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos obtidos por E1 e E2 _____	50
Tabela 12 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E1. _____	51
Tabela 13 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E1. _____	51
Tabela 14 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E2. _____	51
Tabela 15 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E2. _____	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Identificação das estruturas das Glicoproteínas estruturadoras de gelo e das proteínas estruturadoras de gelo dos tipo I – IV. a) AFGP (modelo teórico). b) Tipo I de AFP. c) Tipo II AFP. d) Tipo III AFP. e) Tipo IV AFP (modelo teórico). b) Tipo I de AFP. c) Tipo II AFP. d) Tipo III AFP. e) Tipo IV AFP (modelo teórico). Adaptada de Hassas-Roudsari, 2011. _____ 5

Figura 2 - Morfologia Hipotética do Cristal de Gelo. Adaptada de Hassas – Roudsari, 2011. _____ 9

Figura 3 - Formação dos Cristais de Gelo em presença das ISP. Fonte: Hoshino et al., 1999. _____ 12

Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos de extração. _____ 20

Figura 5 - Fluxograma dos procedimentos de purificação. _____ 24

Figura 6 - Extratos brutos das folhas aclimatadas das cultivares Pioneiro, OK Bullet e Endurance, obtidos pelas metodologias de extração E1 e E2. _____ 29

Figura 7 – Perfis Proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E1 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (OK Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC) e não aclimatadas (NA). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados e ausentes nos extratos não aclimatados. _____ 30

Figura 8 – Perfis Proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (OK Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC) e não aclimatadas (NA). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados e ausentes nos extratos não aclimatados. _____ 32

Figura 9 – Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E1 e E2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (OK Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados. _____ 33

Figura 10 – Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos das cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance purificados por acetona (ACET), éter de

petróleo/éter etílico (ETER), clorofórmio (CLOR) para o método de extração E1. Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados. _____ 37

Figura 11 - Géis de eletroforese em SDS-PAGE dos extratos obtidos pela extração 2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (OK Bullet e Endurance) e purificados por acetona (ACET), éter de petróleo/éter etílico (ETER), clorofórmio (CLOR). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados. _____ 38

Figura 12 - Extratos controle e purificados obtidos pela metodologia de extração E1 _____ 39

Figura 13 - Extratos controle e purificados obtidos pela metodologia de extração E2 _____ 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF – Aclimatadas ao frio

AFGP – Glicoproteínas anticongelante (Antifreeze Glicoprotein)

AFP – Proteína anticongelante (Antifreeze Protein)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E1 – Metodologia de extração por solvente Tris-HCl (pH=7,4)

E2 – Metodologia de extração por impregnação à vácuo

EB1 – Extrato controle obtido pela metodologia de extração com solvente Tris-HCl (pH=7,4)

EB2 – Extrato controle obtido pela metodologia de extração por impregnação à vácuo

ISP – Proteína estruturadora de Gelo (Ice Structuring Protein)

kDa – Dalton (unidade de massa atômica)

NA – Não aclimatado ao frio

Ok Bullet – Oklahoma Bullet

PAR – Radiação fotossinteticamente ativa (Photosynthetically Active Radiation)

P1 – Metodologia de purificação com acetona

P2 – Metodologia de purificação com éter etílico: éter de petróleo

P3 – Metodologia de purificação com clorofórmio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

UR – Umidade Relativa

RESUMO

CAMPELO, Flávia Assunção, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2014. **Extração e purificação de proteínas estruturadoras de gelo obtidas de folhas de trigo.** Orientadora: Mônica Ribeiro Pirozi. Coorientadores: José Benício Paes Chaves e Claudia Regina Vieira.

Quando certos organismos são submetidos a temperaturas baixas, eles tendem a desenvolver mecanismos de sobrevivência, como a produção de proteínas específicas, conhecidas como proteínas estruturadoras de gelo (ISP, por sua denominação em inglês, ice structuring proteins. Pertencem a uma classe de polipeptídeos capaz de inibir o crescimento dos cristais de gelo durante a nucleação, reduzindo assim os danos na estrutura celular desses organismos causados pela formação dos cristais. Em alimentos processados submetidos ao congelamento, o controle do crescimento dos cristais de gelo é crítico na prevenção de danos à qualidade final do produto, sendo, portanto, objeto de interesse pelas indústrias e pesquisadores do setor. Apesar de as ISP já terem sido extraídas de folhas de trigo e de outros cereais, ainda não se definiu uma metodologia de extração e purificação adequada e eficiente, objetivo pelo qual o presente estudo foi realizado. Cultivares de inverno (Ok Bullet e Endurance) e de primavera (Pioneiro) foram semeadas em potes plásticos com três repetições de cada, cresceram em condições controladas em câmara de crescimento com sistema de refrigeração, com temperaturas entre 4 e 7 °C (plantas aclimatadas ao frio). Outras três repetições de cada cultivar foram mantidas em condições ótimas de crescimento (plantas sem aclimação ao frio), em temperaturas de 23 à 25 °C. Um pote de cada repetição, aclimatadas e não aclimatadas, foi retirado da câmara a cada sete dias, e suas folhas foram colhidas durante um período de 49 dias de crescimento. As folhas de cada cultivar, após liofilizadas, foram divididas em dois grupos, E1 ou E2, que se diferenciavam pelo processo de extração. Na metodologia E1, as folhas foram cortadas, trituradas com Tris-HCl (pH=7,4), centrifugadas e filtradas para obtenção do extrato. Em E2, as folhas foram trituradas com solução tampão de ácido ascórbico: cloreto de cálcio (pH=3,0) e passaram por um processo de impregnação à vácuo. Os extratos brutos obtidos por E1 e E2 foram submetidos a três processos de purificação, P1, P2 e P3. Na metodologia P1, as amostras foram tratadas com acetona, em P2 com éter etílico: éter de petróleo (1:1) e em P3, foi utilizado clorofórmio. Na metodologia P1, os extratos foram agitados em vórtex, centrifugados e o precipitado ressuspenso para obtenção do extrato purificado. Em P2, foram agitados em vórtex e decantados. Em P3, os extratos foram agitados em vórtex e centrifugados. Os extratos brutos e purificados

foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O teor de sólidos variou de 1456,00 a 1543,00 mg/100g para E1 e de 850,00 a 980,00 mg/100g, para E2 . Pela metodologia E1, os teores de proteína foram de 201,84 mg/100g, 217,71 mg/100g e 270,49 mg/100g, para as cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance, respectivamente. Para a extração E2 esses valores foram de 118,45 mg/100g, 357,96 mg/100g e 395,33 mg/100g. Os extratos obtidos por E1 e E2 apresentaram teores de cinzas de 2,0 % e 1,98 % para cultivar Pioneiro, para Ok Bullet (2,11 % e 2,07 %) e para Endurance (2,13 % e 2,10 %) respectivamente. Nos extratos de folhas aclimatadas ao frio, obtido pela extração E1 foram identificadas uma proteína na faixa de 45,0 - 66,0 kDa e outra de 30,0 - 45,0 kDa para cultivar Pioneiro. Para Ok Bullet e Endurance, além dessas, foi observada uma terceira banda de 20,1 - 30,0 kDa e outras duas, uma na faixa de 66,0 - 97,0 kDa e outra de 45,0 - 66,0 kDa. Pela extração E2 foi observada apenas uma proteína na faixa de 20,1 - 30,0 kDa para as três cultivares. Comparada aos extratos controles de E1 e E2, a metodologia de purificação P1 produziu efeito significativo ($p < 0,05$) somente para a cultivar Pioneiro, resultando em menor teor de proteína bruta após a purificação. O procedimento P3, produziu efeito similar nas cultivares Ok Bullet e Endurance, em relação a ambos os controles. O método de purificação P2 não é indicado para nenhuma cultivar, pois reduziu o teor proteico nos extratos E1 e E2. Após a purificação para cultivar Pioneiro, foram identificadas proteínas na faixa de 20,1-30,0 kDa e de 45,0-66,0 kDa, para as cultivares Ok Bullet e Endurance. Além das duas observadas na Pioneiro, constatou-se também a presença de mais duas proteínas, uma na faixa de 66,0-97,0 kDa e outra de 45,0-66,0 kDa, as mesmas faixas visualizadas nos perfis eletroforéticos dos extratos brutos obtidos por E1. Para os géis dos extratos purificados as mesmas proteínas observadas nos extratos brutos de E2, com massa molecular de 20,1 – 30,0 kDa foram visualizadas. A metodologia de extração E1 foi a mais eficiente para a cultivar Pioneiro enquanto que E2 foi a melhor para as cultivares Ok Bullet e Endurance. A purificação com clorofórmio (P3) foi mais eficiente na cultivar Pioneiro, enquanto a acetona (P1) foi melhor para as cultivares OK Bullet e Endurance. O presente trabalho indica que resultados de pesquisas desenvolvidas no exterior, não são necessariamente adequados às cultivares de trigo no Brasil. Trigos nacionais são essencialmente de primavera, e demandam pesquisas específicas, visto que demonstram potencial para obtenção de ISP com características diferentes daquelas produzidas por trigos de inverno.

ABSTRACT

CAMPELO, Flávia Assunção, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2014. **Extraction and purification of ice structuring proteins obtained from wheat leaves.** Advisor: Mônica Ribeiro Pirozi. Co-Advisors: José Benício Paes Chaves and Claudia Regina Vieira

When certain organisms are subjected to low temperatures, they tend to develop survival mechanisms, such as the production of specific proteins, known as ice structuring proteins (ISP). These proteins belong to a class of polypeptides capable of inhibiting the growth of ice crystals during the nucleation, thereby reducing the damage to the cell structure of these organisms caused by the formation of crystals. In processed food subjected to freezing, the control of ice crystals growth is critical in preventing damage to the final product quality, and, therefore, it is an area of interest to industry researchers. In spite of ISP having already been extracted from wheat and other cereals, a methodology for appropriate and efficient extraction and purification has not been defined, which is the purpose of this study. Winter cultivars (Ok Bullet and Endurance) and spring (Pioneer) were sown in plastic pots. Three replications of each cultivar were grown in controlled conditions, in a growth chamber with cooling system, with temperatures between 4 - 7 °C (cold acclimated plants). Another three replicates were kept under optimal growth conditions, at temperatures of 23 – 25 °C. One pot per replicate was withdrawn from the chamber every seven days, and their leaves were collected for study. This process was repeated over a period of 49 days of growth, with and without acclimatization. The lyophilized leaves of each cultivar were divided into two groups and each passed through an extraction process, E1 or E2. In the E1 group, leaves were cut, ground with Tris -HCl (pH=7.4), centrifuged, and filtered to obtain a crude extract containing the proteins. E2 leaves were ground with ascorbic acid: calcium chloride (pH=3.0) and passed through an impregnation process in a vacuum for the extraction of proteins. The extracts obtained by E1 and E2 were subjected to three purification processes, P1, P2 and P3. In the P1 methodology, samples were treated with acetone, P2 with ethyl ether: petroleum ether (1:1), and in the P3 methodology chloroform was used. In the P1 methodology, extracts were stirred in vortex, centrifuged and the precipitate resuspended for obtaining purified extract. In P2 they were stirred in vortex and decanted. In P3 the extracts were stirred in vortex and centrifuged. The crude extracts were purified and analyzed by electrophoresis in SDS - PAGE. The solids content ranged from 1446.00 to 1543.00 mg/100g for E1, and for E2 the values ranged from 850.00 to 980.00 mg/100g. In the E1 group, the Pioneiro cultivar showed protein content of 201,84 mg/100 g, Ok Bullet and Endurance 217.71

and 270.49 mg/100g respectively. In the E2 group these values were 118,45, 357.96 and 395.33 mg/100g. The extracts obtained from the Pioneiro cultivar for E1 and E2 showed ash content of 2.0% and 1.98% respectively, Ok Bullet (2.11% and 2.07 %) and Endurance (2.13 % and 2.10 %). In extracts of Pioneiro wheat acclimated to cold, it was obtained by extraction methodology E1, one protein in the range from 45.0 to 66.0 kDa, and another in the range 30.0 to 45.0 kDa. For Ok Bullet and Endurance, as well as the above conditions, a third band of 20.1 – 30.0 kDa was observed, as well as two others, one in the range 66.0 – 97.0 kDa and the other in the range 30.0 – 45.0 kDa. For the E2 extraction methodology, only one protein range was observed from 20.1 to 30.0 kDa for the three cultivars. In gels of both extractions (E1 and E2), the presence of ISP in range from 20.1 to 30.0 kDa was observed. Compared to the control extracts from E1 and E2, the P1 purification methodology produced a significant effect only for the Pioneiro cultivar, resulting in a lower content of crude protein after purification. The P3 procedure produced similar effect in the Ok Bullet and Endurance cultivars, compared to both controls. The P2 purification method reduced the protein content for all varieties in the E1 and E2 extracts, so it is not recommended for any variety. After the process of purification for Pioneiro cultivar, a protein was identified in the range of 20.1 to 30.0 kDa and another in the range of 45.0 to 66.0 kDa. For the Ok Bullet and Endurance cultivars, in addition to the two found in the Pioneiro, the presence of two more proteins were identified, one in the range of 66.0 to 97.0 kDa and the other 45.0 to 66.0 kDa, the same ranges that were observed in the extracts electrophoretic profiles obtained from the E1 group. For the gels of the purified extracts, the same proteins observed in the crude extracts of the E2 group, with molecular mass from 20.1 to 30.0 kDa were observed. The E1 extraction methodology was the most efficient for the Pioneiro cultivar while E2 was best for the Ok Bullet and Endurance cultivars. Purification with chloroform (P3) was more effective for the Pioneiro cultivar while acetone (P1) was better for the OK Bullet and Endurance cultivars. This study indicates that research results undertaken abroad are not necessarily suited to wheat cultivars in Brazil. Brazilian wheat cultivars are essentially spring-harvested, and require specific research, whereas they demonstrate to be potential sources for obtaining ISP with different characteristics from those produced by winter-harvested wheat.

1. INTRODUÇÃO

A formação de cristais de gelo em sistemas biológicos residentes em ambiente frios pode representar uma grande ameaça ao seu bom funcionamento, especialmente por resultar em indisponibilidade de água para reações bioquímicas essenciais a sobrevivência e manutenção das células. Durante o congelamento, eletrólitos e outros solutos podem ficar mais concentrados na parte congelada que na fase fluida, condição que pode ser letal a célula. Além disso, o processo de congelamento pode provocar danos aos componentes celulares como as membranas e as proteínas (WHATEN e JIA, 2005).

Em determinados ambientes naturais muitos organismos são expostos a baixas temperaturas e, buscando se adaptarem, desenvolvem diferentes métodos de defesa. Um deles é a produção de proteínas específicas, atualmente conhecidas como proteínas estruturadoras de gelo ou ice structuring proteins (ISP) (GRIFFITH e EWART, 2005). Essas pertencem a uma classe de polipeptídeos capazes de inibir o crescimento dos cristais de gelo durante a nucleação, reduzindo assim os danos que esses cristais podem causar na estrutura celular desses organismos. As ISP são encontradas naturalmente em alguns insetos, plantas e peixes de regiões muito frias (JACKMAN et al., 2007).

O controle dos cristais de gelo em produtos que passam pelo congelamento é um dos principais problemas que a indústria alimentícia enfrenta, pois o crescimento desses cristais ocasiona prejuízos na qualidade final desses produtos, como rompimento de estrutura e perda de nutrientes. Para minimizar esse problema, estudos sobre a viabilidade do uso de ISP em alimentos congelados vêm sendo realizados. Hassas-Roudsari e Goff (2012), seguindo essa linha de pesquisa, elucidaram as principais funções das ISP extraídas das folhas de trigo de inverno (*Triticum aestivum* L.) como: redução do ponto de congelamento sem alteração do ponto de fusão, mantendo assim o equilíbrio (histerese térmica), interação com as nucleações do gelo e inibição à recristalização do gelo. Resultados de pesquisas mostraram que, ao reduzir o tamanho dos cristais de gelo, as ISP uniformizam sua distribuição, melhorando a textura de alimentos congelados durante o armazenamento e transporte a

baixas temperaturas, aproximadamente de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REGAND e GOFF, 2006; KONTOGIORGOS e GOFF, 2007; ZANG et al., 2008).

As ISP extraídas de folhas de trigo de inverno podem se tornar importantes aliadas das indústrias alimentícias por serem obtidas de uma matéria prima rentável. Pequenas quantidades dessas proteínas já são consideradas eficientes no controle do crescimento dos cristais de gelo (VIEIRA, 2011). Além disso, são compostos naturais, e sua preparação para ser utilizada como agente crioprotetor é considerada relativamente acessível e fácil (KONTOGIORGOS et al., 2007).

A pesquisa em questão buscou elucidar mecanismos que permitam, futuramente, conhecer a estrutura e mecanismo de ação dessas proteínas, que podem ser úteis para as indústrias alimentícias (melhoria sensorial e redução da perda do teor nutricional), na medicina (criocirurgia e crioproteção de órgãos), além de beneficiar culturas agrícolas (aumentando a resistência a temperaturas baixas). Apesar das ISP já terem sido extraídas de diferentes fontes como peixes, insetos, vegetais e plantas, e já terem sido utilizadas com êxito em alimentos, ainda não se definiu a melhor metodologia de extração, nem o melhor processo de purificação para essas proteínas. Por essa razão o presente trabalho foi realizado, para se determinar os métodos mais adequados de extração e purificação de ISP obtidas de folhas de trigo, uma vez que nenhum trabalho comparando as metodologias já utilizadas foi desenvolvido até o momento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de diferentes métodos de extração e purificação das proteínas estruturadoras de gelo (ISP), obtidas de folhas de trigo de inverno e de primavera.

2.2 Objetivos específicos

- Empregar dois métodos de extração das ISP obtidas de folhas de trigo, por solvente Tris-HCl e por impregnação a vácuo.
- Caracterizar os extratos obtidos quanto ao conteúdo de sólidos totais, proteínas e cinzas;
- Testar métodos de purificação das ISP obtidas de extratos de folhas de trigo baseados na separação progressiva com os solventes: acetona; clorofórmio; éter etílico e éter de petróleo.
- Detectar a presença das ISP nos extratos brutos e purificados, utilizando eletroforese em SDS-PAGE.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Breve histórico sobre as proteínas estruturadoras de gelo

Os mares Antártico e Ártico são frios, com temperaturas subzero. No entanto peixes polares e outros organismos que habitam essas regiões possuem a capacidade de sobreviverem em tais condições de temperatura, muitas vezes essas chegando a $-1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (YEH e FEENEY, 1996). Tal habilidade de sobrevivência foi relatada primeiramente por Scholander et al. (1957) e essa capacidade foi relacionada à presença de macrossolutos presentes no sangue desses peixes em questão. Os componentes encontrados nesses animais foram então chamados de anticongelantes (LILLIFORD e HOLT, 1994). Ao longo dos estudos com determinadas espécies de peixes foi descoberto que tais compostos são polipeptídeos responsáveis pela redução da temperatura sanguínea para um valor inferior ao da água do mar em que habitam, garantindo assim a sua sobrevivência (WATHEN e JIA, 2005).

Lilliford e Holt (1994) relataram que as proteínas anticongelantes, como foram chamadas inicialmente, foram identificadas primeiramente por Devries et al. (1969) no sangue de peixes que habitam a região da Antártica. Os trabalhos pioneiros desses pesquisadores levaram ao isolamento e caracterização de glicoproteínas anticongelantes que poderiam promover a alteração do comportamento do congelamento, tamanho e formação e dos cristais de gelo.

A partir dessas descobertas, as proteínas estruturadoras de gelo (ISP), como são atualmente chamadas, vêm sendo identificadas em diversos tipos de organismos vivos. Proteínas com atividades semelhantes às encontradas em peixes marinhos e com função de inibição ao crescimento de cristais de gelo têm sido obtidas de insetos e plantas, principalmente daquelas espécies altamente tolerantes ao frio (CHENG, 1998). No entanto, mesmo com tais pesquisas inovadoras, os peixes ainda são os organismos que apresentam a maior quantidade de informações dessas proteínas, além disso, e é a fonte mais reconhecida das ISP.

3.2 Classificação das proteínas estruturadoras de gelo

Existem duas famílias de ISP, que são classificadas baseadas na presença ou ausência de carboidratos (HEW e YANG, 1992): as glicoproteínas anticongelantes (AFGP) e as proteínas anticongelantes (AFP), que apresentam propriedades similares. Ambas são capazes de reduzir a temperatura de congelamento e de inibir o crescimento dos cristais de gelo (YEH e FEENEY, 1996; FEENEY e YEH, 1998).

O principal aminoácido encontrado nas estruturas proteicas de ambas as famílias é a alanina (Ala) seguida da treonina (Thr) (BARRETT, 2001). Os tipos I e II dessas famílias possuem aproximadamente 67 % deste aminoácido. Entretanto, estruturalmente, as AFGP e as AFP são distintas como pode ser observado na Figura 1.

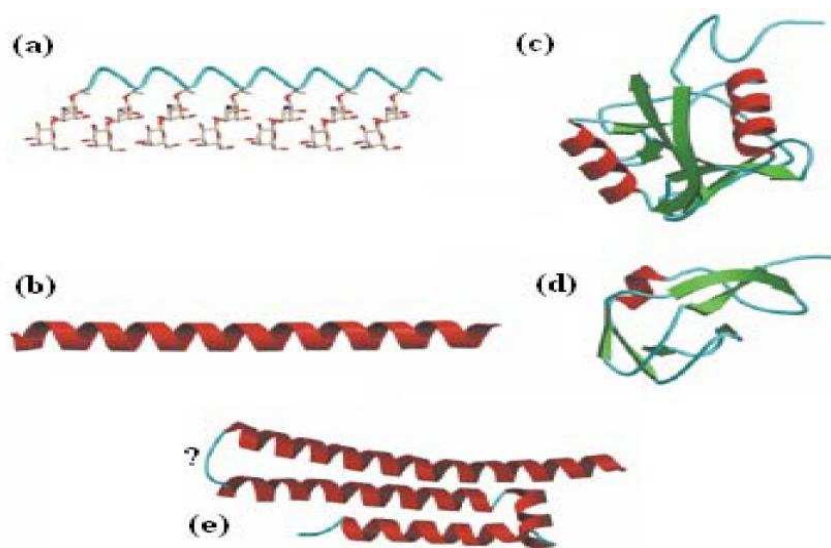


Figura 1 - Identificação das estruturas das Glicoproteínas estruturadoras de gelo e das proteínas estruturadoras de gelo dos tipo I – IV. a) AFGP (modelo teórico). b) Tipo I de AFP. c) Tipo II AFP. d) Tipo III AFP. e) Tipo IV AFP. Fonte: Adaptada de HASSAS-ROUDSARI, 2011.

Na molécula de AFGP o aminoácido mais abundante é a Thr com uma estrutura primária contendo uma sequência de tripeptídeos de Ala-Ala-Thr. Já nas moléculas menores possuem prolina ao invés da alanina depois de algumas treoninas. Considerando à configuração espacial, as AFGP apresentam uma estrutura expandida sem conformações definidas, ao passo que as AFP apresentam organizações em α -hélice e folhas- β . Esta diferença

conformacional garante as funções específicas de cada família (HASSAS-ROUDSARI, 2011).

A família das AFP pode ser dividida em quatro subgrupos principais que são evidenciadas abaixo:

- AFP do Tipo I: É a menor e a mais simples das proteínas estruturadoras de gelo é encontrada em peixes. Sua fonte mais abundante é o peixe linguado (*Pseudopleuronectes americanus*). Apresenta massa molar de 3 a 5 kDa e estrutura em α -hélice. A conformação é mantida devido ao elevado conteúdo de alanina (superior a 60 %), presença de pontes salinas internas e dos grupos N e C terminais, além de exibem forma monomérica em solução (BAARDSNES et al., 1999; DAVIES e SYKES, 1997).
- AFP Tipo II: Caracterizada pela estrutura globular e pela predominância do aminoácido alanina, também possuindo uma grande quantidade de cisteína (LILLIFORD e HOLT, 1994; BARRETT, 2001). Esta proteína é encontrada em peixes da espécie *Hemitripterus americanus*, também conhecido como teleósteo marinho, e no Arenque (*Clupea harengus*). Apresenta massa molar entre 14 e 24 kDa e conformação em folhas- β (HON et al., 1994; LILLIFORD e HOLT, 1994).
- AFP Tipo III: Tem sido encontrada principalmente em peixes da espécie *Zoarces americanu*, mas também na *Macrozoarces americanu*. Sua massa molar é em torno de 6 a 7 kDa, não possuindo composição específica, e nem predominância de um aminoácido específico entre seus resíduos. No entanto, apresentam conformação espacial (estrutura secundária e terciária) muito bem definida, além de resíduos hidrofóbicos distribuídos uniformemente ao longo da proteína (HON et al, 1994; YEH e FEENEY, 1996; MISHRA e PATTNAIK, 1999).
- AFP Tipo IV: Em sua composição apresenta cerca de 26 % de glutamina e de ácido Glutâmico. Possui teor médio de alanina (em torno de 10 %). Apresenta massa molar de aproximadamente 12,3 kDa. Algumas análises realizadas nesse tipo de proteína demonstraram que seus resíduos de aminoácidos adotam uma conformação helicoidal e completamente distinta dos outros tipos de ISP descritas acima. É

comumente encontrada em peixes *Longhorn sculpin* (CREVEL, FEDYK e SPURGEON; 2002; DAVIES e SYKES, 1997).

Atici e Nalbantoglu (2003) relataram, em uma revisão sobre o assunto, que cenoura, couve, milho, repolho, canola (inverno e primavera), aveia (primavera) e especialmente as folhas de centeio (inverno e primavera), trigo (inverno e primavera), cevada (inverno) podem biossintetizar ISP quando submetidas à aclimação ao frio. Essas proteínas estão associadas ao aumento da tolerância dessas plantas às temperaturas abaixo de 0 °C nos espaços intercelulares, onde ocorrem a formação dos cristais de gelo (ANTIKAINEM e GRIFFITH, 1997).

3.3 Proteínas estruturadoras de gelo em cereais

Dentre os cereais estudados em relação à presença das ISP, o centeio tem sido o mais explorado. A proteína extraída dessa fonte apresenta massa molar em torno de 11 e 36 kDa, e sem predominância de aminoácido específico (CREVEL, FEDYK e SPURGEON; 2002).

Hon et al. (1994), visando estudar as ISP, extraíram, isolaram, identificaram e caracterizaram as proteínas individuais presentes no extrato apoplástico obtido das folhas de centeio de inverno. Tais pesquisadores observaram que uma maior concentração e maior atividade anticongelante foram obtidas quando o processo de extração foi realizado com ácido ascórbico acrescido de cloreto de cálcio ou sulfato de magnésio. Concluíram, ainda, que a aclimação das folhas ao frio proporcionou a produção de múltiplos polipeptídeos com atividade anticongelante com características distintas daqueles obtidos de peixe e insetos.

Antikainem e Griffith (1997) examinaram o acúmulo de proteínas na região do apoplasto de plantas durante a aclimação ao frio por sete semanas, por meio de eletroforese (SDS-PAGE). Analisaram a tolerância ao frio destas plantas, assim como a relação com a atividade anticongelante. Após a etapa de aclimação ao frio, o centeio e o trigo de inverno demonstraram serem as plantas mais tolerantes a essas condições, sendo capazes de sobreviverem a temperaturas de - 27 °C e - 20 °C, respectivamente. Além disso, constataram

que as folhas de todos os cereais, tanto de primavera quanto de inverno, foram tolerantes ao frio nas faixas de - 10 °C até - 27 °C, e seus extratos exibiram atividade anticongelante. Concluiu-se que o acúmulo das proteínas obtidas do apoplasto está relacionada com a tolerância ao frio pelos cereais.

Atici e Nalbantoglu (2003) investigaram o efeito das proteínas produzidas no apoplasto de trigo de inverno e repolho e a relação destas na tolerância das folhas ao congelamento durante a aclimação ao frio. Lesões provocadas devido ao congelamento e à atividade de nucleação do gelo também foram determinadas durante as condições de aclimação. As proteínas do apoplasto foram precipitadas e utilizadas na investigação da atividade de nucleação de gelo. O resultado desse estudo demonstrou que a atividade de nucleação de gelo é menor quando as proteínas utilizadas são extraídas das folhas que passaram por aclimatadas ao frio. Concluiu-se que as folhas de ambas as plantas são capazes de acumular proteínas anticongelantes.

3.4 Estrutura dos cristais de gelo

O cuidado e atenção em relação à produção e formação de cristais de gelo no interior de organismos são de extrema importância, isso porque esse fenômeno pode promover rupturas nas membranas celulares, assim como outros problemas letais a sobrevivência celular, tais como desidratação. A formação dos cristais de gelo acontece em todas as temperaturas inferiores a de congelamento. O gelo consiste em um arranjo especial das moléculas de água, em que cada molécula de água estabelece uma ligação de hidrogênio com a molécula mais próxima resultando em um sólido molecular (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012). Essa disposição das moléculas de água promove o crescimento orientado do cristal de gelo ao longo de duas fases, fase basal e fase prisma (Figura 2) (WHATEN e JIA, 2005).

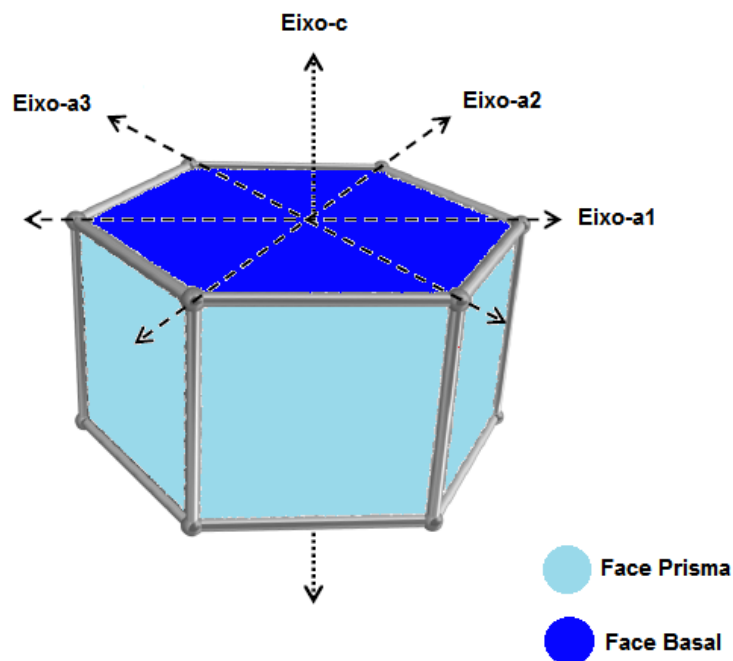


Figura 2 - Morfologia Hipotética do Cristal de Gelo. Fonte: Adaptada de Hassas-Roudsari, 2011.

A formação dos cristais de gelo não ocorre a uma taxa constante. Por exemplo, o crescimento no eixo do prisma do gelo ocorre mais rapidamente que no plano basal. Essa diferença na taxa de crescimento é devido ao fato de que cada plano contém uma configuração distinta de ligações de hidrogênio e de moléculas de água, o que proporciona diversas características de superfície, alterando assim o comportamento do cristal durante sua formação (WHATEN e JIA, 2005).

O conhecimento da morfologia final dos cristais de gelo em alimentos congelados é muito importante. O tamanho dos cristais e sua localização asseguram à sobrevivência e manutenção dos organismos biológicos, assim como a qualidade final dos produtos congelados. A formação de cristais maiores promove exsudação de líquidos, e durante o descongelamento ocorre perda de nutrientes e conseqüentemente de qualidade nutricional (PETZOLD e AGUILERA, 2009).

3.4.1 Mecanismo de cristalização do gelo

A cristalização consiste na formação de uma fase sólida, ou seja, uma estrutura mais organizada. A formação de cristais envolve dois passos principais: nucleação, que é a criação de um núcleo estável para o desenvolvimento do cristal; e a propagação que representa o crescimento desses núcleos (COLLA e PRENTICE-HERNANDEZ, 2003).

A nucleação é dividida em dois tipos: a nucleação heterogênea, cujo processo de formação de núcleos ocorre ao redor de uma molécula “estranha”; e a nucleação homogênea, em que os núcleos são formados espontaneamente, como é o caso da água pura. A nucleação heterogênea acontece a temperaturas mais elevadas do que a nucleação homogênea (ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN, 2000).

A segunda fase da cristalização refere-se ao crescimento do núcleo recém-formado pela incorporação de moléculas de água às suas superfícies. Durante um processo rápido de congelamento, ocorre maior remoção de calor e os núcleos formados são menores e mais estáveis. Consequentemente os cristais de gelo formados são menores, o que em sistemas biológicos ocasiona menor destruição celular. Em contraste, uma baixa taxa de remoção de calor, ou seja, um congelamento lento provoca um aumento no crescimento dos cristais, o que faz com que os cristais de gelo sejam maiores e mais nocivos às estruturas celulares (HASSAS-ROUDSARI, 2011).

3.4.2 Mecanismo de recristalização do gelo

A recristalização ocorre a temperaturas inferiores a 0 °C e pode acontecer por mecanismos distintos, tais como o desaparecimento de cristais menores e aparecimento de cristais maiores (GRIFFITH e EWART, 1995). Com o aumento na variação da temperatura ocorre uma maior taxa de recristalização, levando ao aumento do número de ciclos de descongelamento e congelamento, esse processo leva a formação de cristais de gelo de tamanhos maiores. Os cristais maiores causam danos mecânicos acentuados aos tecidos e células quando comparados aos menores (TOKAREW, 2011). A

literatura descreve vários mecanismos de recristalização, os mais comuns são a isomassa, migratória e acretiva.

A recristalização isomassa é um fenômeno que promove o arredondamento dos cristais de gelo. Envolve alterações na superfície ou na estrutura interna do cristal provocando a conversão dos cristais de gelo com superfícies dendríticas para formas mais suaves e estáveis, mantendo constante a massa de gelo (SUN e WEY, 2012; HASSAS-ROUDSARI, 2011).

Já a recristalização migratória refere-se a um processo que normalmente acontece em temperatura e pressão constantes, onde ocorre o crescimento de cristais de gelo com maiores dimensões em detrimento aos pequenos cristais (FENNEMA, 1973). Esse processo de recristalização pode ser aprimorado quando a temperatura passa por flutuações induzindo o comportamento de fusão-recongelamento, podendo levar ao desaparecimento completo de pequenos cristais durante o aquecimento e o crescimento de grandes cristais durante o resfriamento, ou na redução do tamanho dos cristais durante o derretimento parcial e o crescimento de cristais já existentes durante o resfriamento (SUN e WEY, 2012).

A recristalização acretiva consiste na fusão de dois ou mais cristais de gelo vizinhos resultando em cristais maiores, mas em menor número. Esse mecanismo de recristalização está relacionado a difusão na superfície dos cristais sem que esses sofram algum movimento (ZARITZKY, 2006). O processo de agregação refere-se à tendência natural dos cristais em se aproximarem e se fundirem, originando cristais mais arredondados com formas mais esféricas (GOFF, 2005).

3.5 Mecanismo de ação das proteínas estruturadoras de gelo

O processo de ligação entre as ISP e a superfície do gelo sugere um modelo para a inibição do crescimento dos cristais, em que as moléculas de ISP se unem à superfície do gelo permitindo assim o crescimento dos cristais apenas entre as moléculas de ISP; reduzindo assim a estabilidade e conseqüentemente o contato entre superfície do gelo e a interface da água. A adição de água na superfície do gelo é então desfavorecida, e o crescimento

do cristal de gelo é inibido. No entanto, em nível molecular o mecanismo de interação entre os diferentes tipos de ISP e a superfície dos cristais de gelo ainda é pouco elucidado (BRODEL et al., 2013).

Durante o crescimento dos cristais as ISP se ligam na face prisma do cristal, deixando a face basal liberada para o crescimento. Em soluções ausentes de ISP, o crescimento dos cristais de gelo acontece ao longo do *eixo a*, originando cristais mais arredondados; já na presença das ISP, o crescimento ocorre ao longo do *eixo c*, resultando assim em cristais na forma piramidal (Figura 2) (HOSHINO et al., 1999). Ao longo dos estudos, tem se observado que o formato e o tamanho dos cristais de gelo estão relacionados com a acomodação dos líquidos ao redor da interação cristais de gelo e ISP (HASSAS-ROUDASARI, 2011).

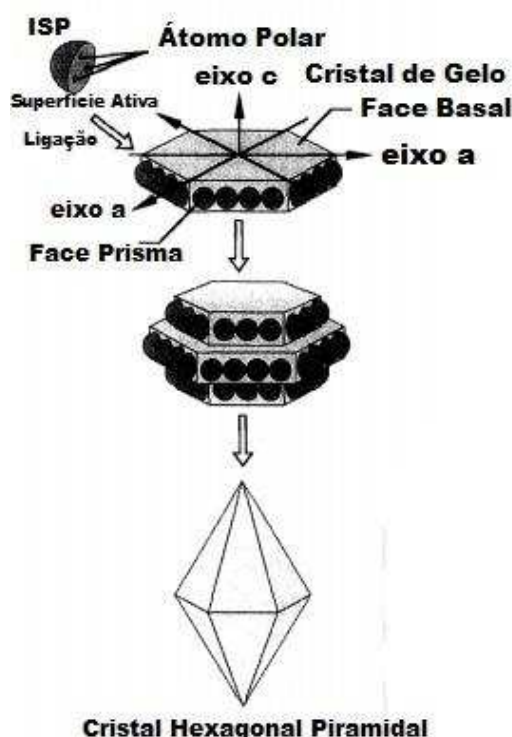


Figura 3 - Formação dos Cristais de Gelo em presença das ISP. Fonte: Hoshino et al., 1999.

Para a maioria das ISP relacionadas na literatura, o mecanismo de ação principal da recristalização é o mecanismo migratório (ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN, 2000; ATICI e NALBANTOGLU, 2003), no entanto, todos os mecanismos abordados podem ocorrer ao mesmo tempo. Portanto, alguns

estudiosos sugerem que o conceito de recristalização deva ser reformulado para um processo que gera o crescimento de cristais de gelo maiores ao custo da reestruturação dos cristais menores (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

Diversas pesquisas têm mostrado que as ISP diminuem a temperatura de expansão macroscópica do gelo abaixo da temperatura de congelamento, sem afetar o ponto de fusão e a pressão osmótica, o que poderia ter efeitos letais em organismos vivos. A elucidação deste mecanismo de inibição tem envolvido estudos sobre a massa molecular, a sequência de aminoácidos e as estruturas de conformação (BARRETT, 2001).

Segundo Pirozi e MacRitchie (2002), as ISP são principalmente reconhecidas por sua capacidade em reduzir o ponto de congelamento da água sem alterar o equilíbrio com o ponto de fusão; esse mecanismo acontece de uma forma não coligativa. Outra propriedade dessas proteínas é o retardamento da recristalização durante o armazenamento em temperaturas de congelamento. A recristalização já discutida anteriormente promove o aparecimento de cristais maiores à custa de cristais menores que tendem a desaparecer ao longo desse processo (HASSAS-ROUDSARI e GOFF, 2012).

Outras características do mecanismo de atuação das ISP incluem a inibição da recristalização de soluções congeladas em presença de concentrações muito baixas de ISP, além de uma predominância de crescimento de cristais de gelo na forma de agulha, em detrimento ao formato dendrítico usual (FEENEY e YEH, 1998).

3.6 Métodos de extração e purificação das proteínas estruturadoras de gelo

A extração por solvente é uma técnica de separação de compostos, baseia-se na diferença de solubilidade dos componentes de interesse e dos outros compostos ditos indesejáveis. Esse processo de isolamento varia em função do solvente utilizado. Já a purificação de proteínas consiste no isolamento de componentes, sendo uma etapa que antecede os estudos de suas características físico-químicas, estrutura tridimensional e compreensão das propriedades biológicas. Inicialmente, a estratégia de purificar uma

proteína é empírica, ou seja, baseada em tentativa e erro, e deve ser desenvolvida para cada proteína individualmente (CAI et al., 2011).

A eliminação de interferentes, como fitatos, oxalatos e pigmentos bem como a prevenção da reagregação secundária dos analitos durante a separação são de extrema importância. A extração geralmente é feita em uma solução tampão contendo surfactantes, agentes redutores e inibidores de proteases. Entretanto, modificações na composição do tampão ou no método utilizado para remover os interferentes são estratégias utilizadas para melhorar o preparo da amostra (SUSSULINI et al., 2006). Muito frequentemente, são incluídos diversos aditivos durante a obtenção do extrato bruto, com o intuito de evitar a degradação química ou enzimática da proteína de interesse. Isso se deve ao fato de que, com a ruptura celular, são liberados vários compostos oxidantes como peróxido de hidrogênio ou enzimas proteolíticas. Aditivos comumente utilizados são os agentes redutores (β -mercaptoetanol), estabilizantes (glicerol) e inibidores de proteases (o ácido etilenodiamino tetracético, EDTA, é um inibidor de enzimas dependentes de íons metálicos divalentes) (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002). Diversos métodos e aditivos para extração das ISP em folhas de cereais vêm sendo estudados com o objetivo de garantir sua melhor separação (GRIFFITH et al., 1992; HON et al., 1994; VIEIRA, 2011; HASSAS-ROUDSARI, 2011).

No estudo de Hassas-Roudsari e Goff (2012), verificou-se que uma solução de ácido ascórbico e cloreto de cálcio aumentou a solubilidade das proteínas no extrato de apoplasto, diminuindo a possibilidade de escurecimento enzimático ou reações oxidativas, sem causar desnaturação das proteínas. Da mesma forma, Hon et al. (1994) já haviam verificado que o uso do ácido ascórbico acrescido de cloreto de cálcio ou sulfato de magnésio garantem uma maior concentração e atividade anticongelante das proteínas.

A extração de ISP não possui uma metodologia definida. Vários solventes e diferentes procedimentos podem ser utilizados visando à obtenção das mesmas. Nos estudos de Zhang et al. (2008); Xu et al. (2009) e de Vieira (2011), foi utilizada uma solução de tris-HCl, combinado etapas de trituração e centrifugação. No trabalho de Griffith et al. (1992), foi aplicado o mesmo procedimento físico, porém com uma mistura de EDTA, ácido ascórbico, mercaptoetanol, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), ácido caproico e

benzoamidina. Já Hassas-Roudsari (2011), utilizou um sistema de impregnação a vácuo combinado com ácido ascórbico e cloreto de cálcio. Todos os estudos conseguiram obter ISP de folhas de trigo; no entanto, não se sabe qual das metodologias é a mais eficiente.

Xu, Chen e Huang (2009), desenvolveram uma pesquisa com o objetivo de purificar as ISP. Utilizaram o reagente Triton X-114 em um sistema aquoso bifásico. No estudo, fenóis reativos presentes na amostra foram removidos dos extratos obtidos das folhas de trigo e ficaram na fase de detergente, já as ISP ficaram retidas na fase aquosa devido ao seu caráter predominantemente hidrofílico. Concluiu-se que a técnica de separação aquosa em duas fases é um procedimento capaz de remover os compostos fenólicos dos complexos de ISP, obtendo assim um composto mais puro.

Hassas-Roudsari (2011) estudou outras três metodologias de purificação para obtenção de amostras de proteínas isoladas. Foi realizado tratamento com etanol, cromatografia por exclusão molecular e cromatografia de troca iônica. Neste trabalho, a purificação utilizando etanol levou a eliminação de constituintes não proteicos do conteúdo total presente no extrato. Os extratos tratados com etanol demonstraram serem mais vantajosos quando comparado aos extratos que não passam por esse tratamento, isso porque apresentaram maior teor de proteínas e continuaram indicando a presença de ISP no extrato, fato esse observado pela análise em SDS-PAGE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalações para o experimento

O experimento foi conduzido na United States Department of Agriculture (USDA – Manhattan, KS), no Laboratório de Pesquisa de Cereais, de Amido, Farinha e Panificação Experimental, e no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada á Agropecuária, ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

4.2 Equipamentos

Tabela 1 - Lista de equipamentos utilizados.

Equipamentos	Marca
Balança analítica	BEL - Modelo UMARK 250 ^a
Banho Maria	Cientec – Modelo 267
Câmara de crescimento	EletroLab – Modelo EI 202/4
Centrífuga refrigerada	NOVA ÉTICA – Modelo NT 815
Centrífuga de Eppendorf	Centrifuge 5418
Cuba de eletroforese	Bio Rad – Modelo Mini Protean Tetra
Estufa	NOVA ÉTICA - Modelo FANEM 320
Leitor de placas ELISA	Anthos 2010
Liofilizador	Lablonco - Modelo Freezone 6 Plus
Mufla	TECNAL – Modelo TE 387
Processador de Alimentos	Mixer Philips Walita
Refrigerador	Electrolux – Modelo duplex DC 43
Agitador de tubos Vortex	Phoenix - Modelo AP 56

4.3 Reagentes e solventes

Tabela 2 - Lista de reagentes e solventes utilizados.

Reagente e Solventes	Marca
Acetona	Proquimios – UV/HPLC
Ácido Ascórbico	Vetec – P.A A.C.S
β – mercaptoetanol	Sigma Aldrich – P.A A.C.S
Cloreto de cálcio	Vetec – P.A A.C.S
Clorofórmio	Vetec – UV / HPLC
Comassie Blue Brilliant	Sigma Aldrich – P.A A.C.S
Dodecil Sulfato de Sódio	Sigma Aldrich – P.A A.C.S
EDTA	Vetec – P.A A.C.S
Éter Etilico	Vetec – P.A A.C.S
Éter de Petroleo	Sigma Aldrich – P.A A.C.S
Osmocote Plus 15-9-12	Scotts Fertilizer
Tris-HCl	Sigma Aldrich – P.A A.C.S
Padrões para eletroforese	GE Healthcare

4.4 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em duas etapas. Primeiramente foi conduzido um fatorial 3 X 2 em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com três repetições, relacionando as cultivares (Pioneiro, Ok Bullet e Endurance) com os métodos de extração (E1 e E2). Posteriormente foi executado um fatorial 4 X 3, em DIC, com três repetições, correlacionando as metodologias de purificação e os extratos controle com as cultivares de trigo.

A análise estatística de ambas as etapas foi realizada no software SAS System v 9.3. Na primeira parte do experimento foram avaliados os teores de proteínas totais, sólidos totais e cinzas, esses foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os resultados para os quais se observou diferenças significativas ($p < 0,05$), foram analisados pelo teste “t”, a 5% de probabilidade. Para a segunda etapa, foi avaliado o teor de proteína total dos extratos. Os

resultados encontrados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) foram comparados pelo teste de Dunnett, em nível de significância de 5 %.

4.5 Material experimental

Foram utilizadas sementes de três cultivares de trigo: Pioneiro, Ok Bullet e Endurance. A cultivar Endurance é uma cultivar de trigo vermelho (*Triticum aestivum* L.) classificado como duro e de inverno. Possui a capacidade de resistir a pH baixos do solo e de ser tolerante ao frio. A cultivar Ok Bullet é um trigo vermelho duro de inverno, mas ao contrário da Endurance, não é tolerante ao frio. Já a Pioneiro é um trigo nacional de primavera classificado como grãos semiduros, de coloração clara e conhecido como trigo pão. Os trigos de inverno foram fornecidos pela USDA e o de primavera pela Universidade Federal de Viçosa.

4.5.1 Obtenção das folhas de trigo

Para cada cultivar, de 8 a 10 sementes foram semeadas em potes plásticos de aproximadamente 3 litros, contendo mistura de solo Osmocote Plus 15-9-12. As plantas foram irrigadas diariamente apenas com água, independentemente do regime de luz e temperatura.

As plantas cresceram em condições aclimatadas em regime de luz (200 PAR) de 10/14 h (dia/noite) em câmara de crescimento com sistema de refrigeração (4 – 7 °C, UR ≈ 80 %). Em intervalos semanais, durante o período de 7 a 49 dias de aclimação, as folhas foram colhidas e enxugadas em papel toalha. Posteriormente essas foram misturadas e as amostras contendo todos os tempos foram armazenadas em tubos Falcon de tampa perfurada, os quais foram colocados em jarros de vidro (máximo de 10 tubos/jarro) próprios do equipamento liofilizador. A liofilização aconteceu sob temperatura de - 89 °C e vácuo de 0,014 mbar por 24 horas. Após esse tempo, os tubos foram

removidos e a tampa perfurada substituída pela convencional. O material desidratado foi então estocado em freezer até o envio para Viçosa – MG.

Tratamento idêntico, no entanto sem a etapa de aclimação, foi realizado as mesmas cultivares. As plantas não aclimatadas (NA) cresceram em câmaras de crescimento com condições ideais (regime de luz 10/14h dia e noite e UR \approx 80%) com temperatura variando de 23 °C a 25 °C, para o seu desenvolvimento, e foram utilizadas como controle na identificação da presença das ISP por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4.6 Metodologia

4.6.1 Extração das proteínas estruturadoras de gelo

Os extratos brutos das ISP foram obtidos aplicando-se duas metodologias distintas de extração, que serão denominadas E1 e E2, para efeito de discussão nesse trabalho, conforme fluxograma mostrado na Figura 4.

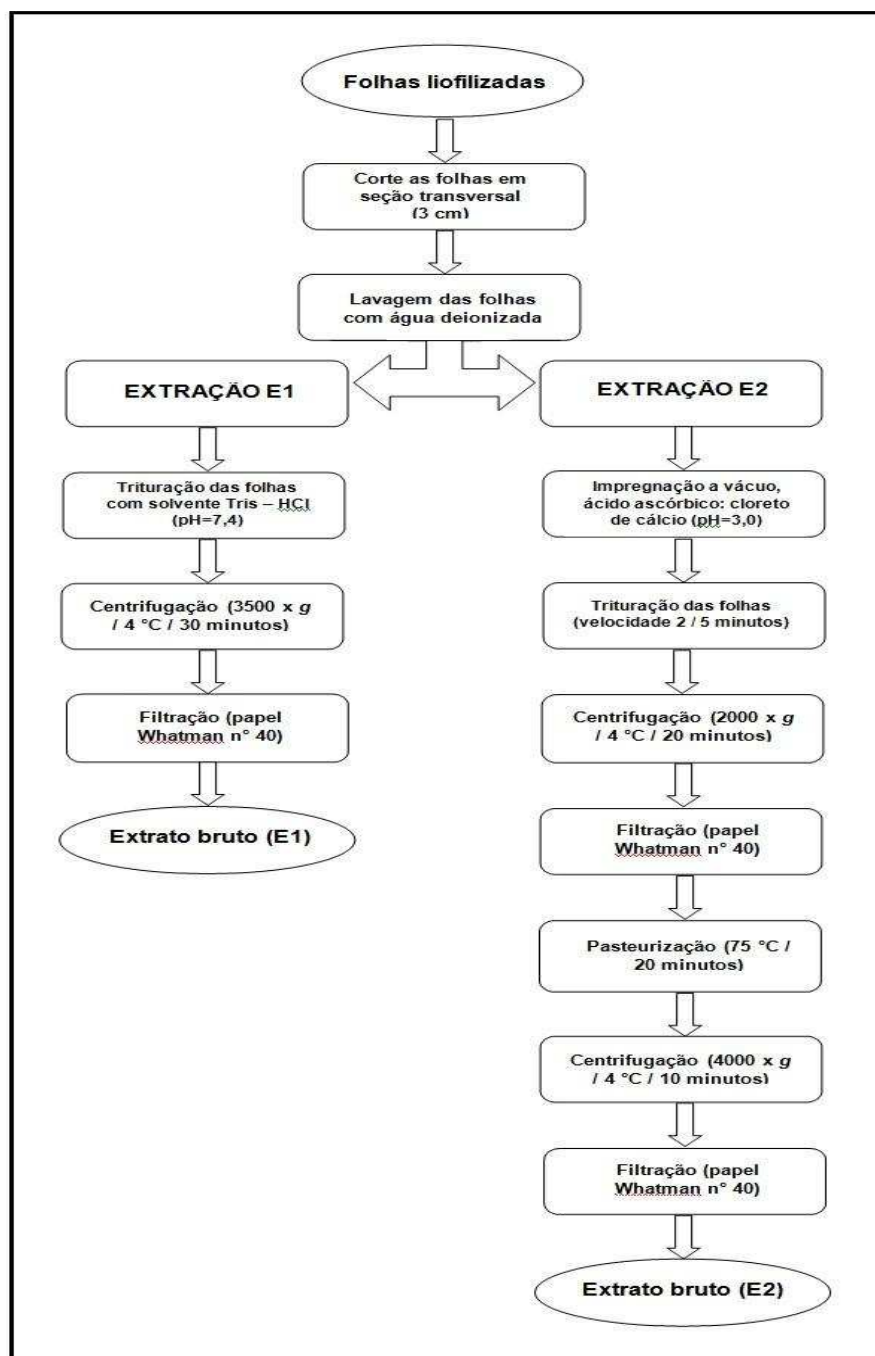


Figura 4 - Fluxograma dos procedimentos de extração. Fonte: Do Autor, 2014.

O procedimento E1, extração por solvente Tris-HCl (pH=7,4), foi descrito por Vieira (2011) e realizado com algumas modificações. As folhas liofilizadas foram cortadas com tesoura em 3 seções no sentido transversal, lavadas com água deionizada e trituradas em processador de alimentos na velocidade 1 por 5 minutos, com solução tampão de Tris-HCl (pH 7,4) na proporção de 1:5 (amostra:tampão g/mL). A mistura então foi centrifugada a 3500 x g a 4 °C por 30 minutos e filtrada em papel de filtro Whatman n° 40. Os

filtrados contendo as ISP foram acondicionados em tubos para centrifugação tipo Falcon, devidamente identificados e mantidos em refrigerador com temperatura em torno de 5 °C .

O procedimento E2, de impregnação a vácuo, foi baseado no método descrito por Hassas-Roudsari (2011) e realizado com algumas modificações. As folhas colhidas foram lavadas com água destilada, cortadas com tesoura em seções de 3 cm de tamanho e impregnadas a vácuo por 30 minutos com uma solução tampão de 20 mM de ácido ascórbico (pH 3) e 20 mM de CaCl₂, na proporção de 1:5 (amostra g:tampão g/mL). Posteriormente foram trituradas em processador de alimentos, com velocidade 1 por aproximadamente 2 minutos. A mistura foi centrifugada a 2000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante removido por filtração em papel filtro Whatman nº40. O filtrado foi pasteurizado em banho térmico a 75 °C por 20 minutos, seguido de uma centrifugação a 4000 x g por 20 minutos e novamente filtrados. Os extratos assim obtidos foram acondicionados em tubos tipo Falcon de centrifugação, identificados e mantidos sob-refrigeração (5 °C) até realização das análises.

Os extratos obtidos pelos procedimentos E1 e E2 serão denominados extratos brutos para efeito de discussão nesse trabalho.

4.6.2 Detecção da presença das proteínas estruturadoras de gelo

A distribuição das ISP nos extratos obtidos foi estudada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o método em placa vertical, com placas 10 x 10 cm, descontínuo de baixa resolução em SDS-PAGE, descrito por Vieira (2011). Foi utilizado gel de empilhamento (“stacking gel”) de poliacrilamida a 4 % (p/v) e gel de fracionamento (“running gel”) a 15% (p/v). A eletroforese foi conduzida em voltagem constante de 80 V por 4 horas e 30 minutos. Os padrões de baixa massa molecular utilizados foram: Fosforilase b 97,0 kDa; albumina bovina 66,0 kDa; albumina de ovo 45,0 kDa; anidrase carbônica 30,0 kDa; indicador de tripsina 20,1 kDa; lisozima purificada da clara de ovo 14,4 kDa. A coloração dos géis foi realizada com solução azul brilhante de comassie blue. Os géis

foram avaliados qualitativamente, sendo as bandas de proteínas foram identificadas visualmente.

4.6.3 Caracterização físico-química dos extratos brutos

4.6.3.1 Análise do teor de sólidos totais

Foi pesada uma quantidade de $2 \pm 0,05$ g de amostra em placas de vidro previamente taradas e pesadas. Essas foram aquecidas em estufa a 105°C por 1 hora, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e novamente pesada. A operação de aquecimento, resfriamento e pesagem foi repetida até obtenção de peso constante, os teores foram determinados pela Equação 1 (AOAC, 1997).

$$\% U_{105^\circ\text{C}} = \frac{100 \times p}{p'} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo:

$\% U_{105^\circ\text{C}}$ = Umidade a 105°C

p = massa da amostra - massa da amostra após secagem

p' = massa da amostra em gramas

4.6.3.2 Análise do teor de proteínas brutas totais

A quantificação do teor de proteínas foi realizada pelo método sensível de Bradford. Em placa ELISA, foram adicionados, em cada poço, $210 \mu\text{L}$ de água, $30 \mu\text{L}$ de extrato e $200 \mu\text{L}$ de reagente de Bradford, para o branco os volumes foram de $240 \mu\text{L}$, $0 \mu\text{L}$ e $60 \mu\text{L}$ respectivamente, a placa foi então movimentada por 1 minuto, deixada em repouso por 15 minutos. Após esse tempo foi realizada leitura no comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas (BRADFORD, 1976). As leituras encontradas foram utilizadas para

obtenção dos teores de proteínas brutas através da curva de quantificação (Equação 2).

$$Y=0,0211X + 0,0256 \quad R^2 = 0,9987 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

Y = Leitura no leitor de microplacas

X = Teor de proteínas em $\mu\text{g/mL}$

4.6.3.3 Análise do teor de cinzas totais

Para essa análise, cadinhos de porcelana (50 mL) foram previamente aquecidos em mufla a 600 °C, resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Posteriormente foi pesada uma quantidade de $2 \pm 0,05$ g de amostra nos cadinhos e esses foram incinerados em mufla a 600 °C. Os cadinhos contendo as amostras passaram por resfriamento em dessecador até temperatura ambiente e posteriormente pesada. Os teores são determinados pela Equação 3 (AOAC, 1997).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{100 \times p}{p'} \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:

p = massa de cinzas (g) = (massa do cadinho com a amostra - massa do cadinho vazio)

p' = massa da amostra em gramas.

4.6.4 Métodos de purificação das proteínas estruturadoras de gelo

Os extratos obtidos como descrito na seção 4.3.1 foram submetidos a três métodos de purificação, como demonstrado na Figura 5.

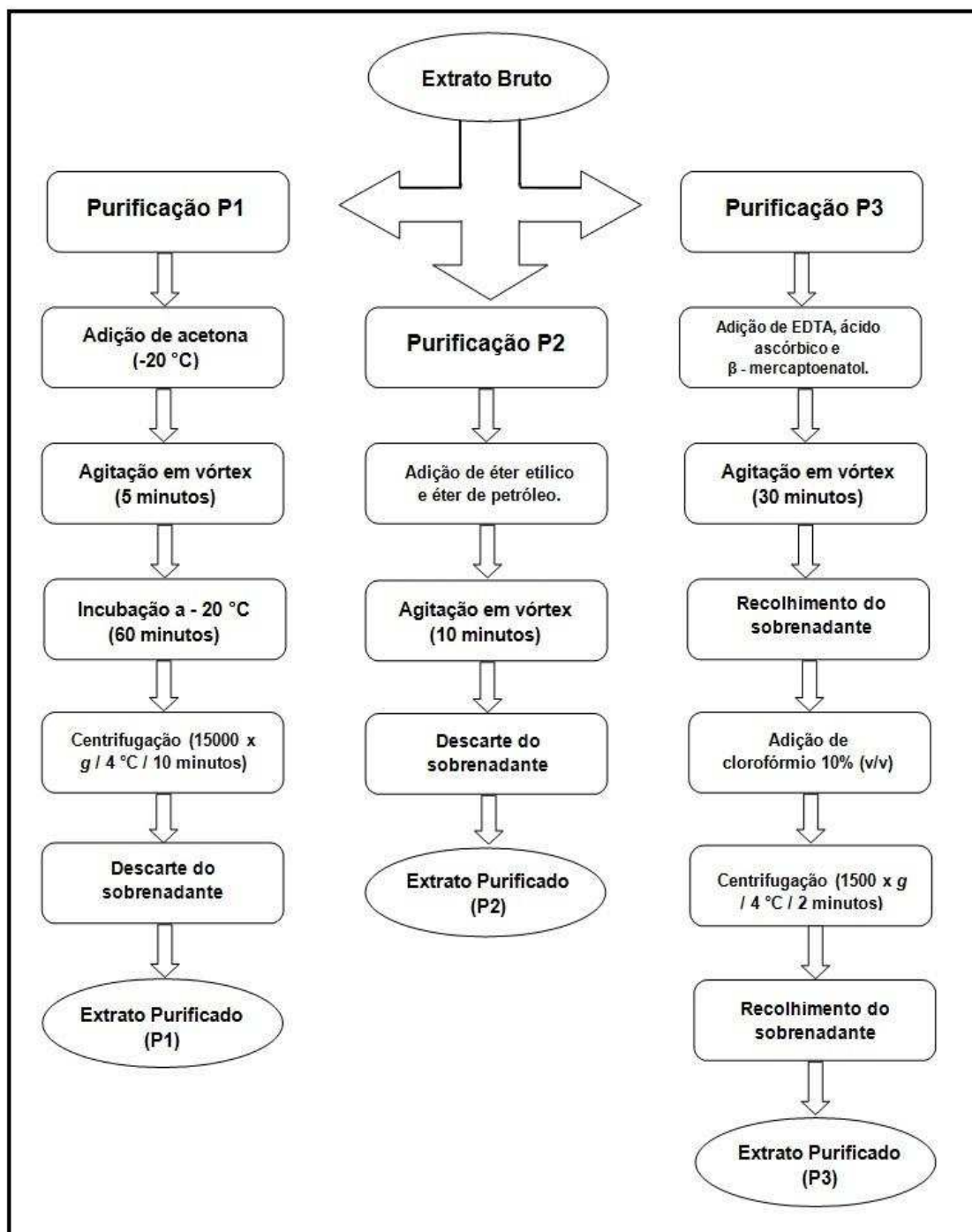


Figura 5 - Fluxograma dos procedimentos de purificação. Fonte: Do autor, 2014.

A purificação com acetona foi denominada P1 para efeito de discussão desse trabalho. A um volume de extrato bruto, foi adicionado de quatro vezes esse mesmo volume de acetona, a uma temperatura de -20 °C. A mistura foi agitada em vórtex por aproximadamente 5 minutos e incubada a -20 °C por 60 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a uma velocidade de 15000 x g e decantada; o sobrenadante foi descartado e o frasco

mantido aberto no ambiente para evaporação da acetona por 30 minutos. O precipitado foi então ressuspensionado em 200 μ L de uma solução tampão de Tris-HCL (pH=7,4) para a o método de extração E1, e em uma solução de ácido ascórbico e cloreto de cálcio (pH=3,0) para o método de extração E2 (EVANS et al., 2009).

Na metodologia de purificação P2, aos extratos obtidos, foi adicionada uma mistura de éter de petróleo e éter etílico (1:1). Agitando-se em vórtex por 5 minutos, e deixando decantar por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado destinado à análise (STREIT et al., 2005; BARROS e STRINGHETA, 2006).

O método P3 de purificação seguiu um procedimento que esta em desenvolvimento no Laboratório de Pesquisa em Cereais do DTA/UFV, em colaboração com pesquisadores do Grain Quality and Structure Reseach Unit (USDA). Dos extratos brutos obtidos foram retirados 1 mL de extrato e esse dissolvido em 250 μ L de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico e 10mM β -mercaptoetanol. Essa mistura foi agitada em vórtex por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido em tubo de eppendorf, a este foi adicionada uma solução de clorofórmio a 10 % (v/v), os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos, e centrifugados por 2 minutos a uma velocidade de 15000 x *g*. Em seguida o sobrenadante foi separado para análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos métodos de extração das proteínas estruturadoras de gelo

5.1.1 Teor de sólidos totais, cinzas e proteínas brutas dos extratos proteicos

Na Tabela 3, 4 e 5 constam os valores do teor de sólidos totais, proteínas brutas, e cinzas dos extratos brutos das cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance obtidos pelas metodologias de extração E1 (por solvente Tris-HCl) e E2 (por impregnação a vácuo).

Tabela 3 - Teores de sólidos totais dos extratos obtidos a partir das metodologias de extração E1 e E2.

Cultivar	Sólidos totais (mg/100g) ¹	
	E1	E2
Pioneiro	1456,00 ± 5,77 ^{b(A)}	850,00 ± 10,00 ^{c(B)}
Ok Bullet	1490,00 ± 10,00 ^{a(A)}	920,00 ± 10,00 ^{b(B)}
Endurance	1543,00 ± 25,77 ^{a(A)}	980,00 ± 20,00 ^{a(B)}

¹ Os resultados estão expressos em matéria seca. Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna e maiúsculas numa mesma linha entre as médias das populações mostram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t. Fonte: Do autor, 2014.

Foram observadas diferenças significativas entre as metodologias de extração E1 e E2 nas cultivares estudadas. Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre as cultivares e os métodos de extração nos teores de sólidos totais. A extração E1 levou a teores de sólidos totais de 1456,00 a 1543,00 mg/100g, superiores aos encontrados por E2, que variaram de 850,00 a 980,00 mg/100g como mostrado na Tabela 1.

O maior teor de sólidos totais dos extratos de E1 pode indicar uma maior capacidade de extração de proteínas, porém dentro do total de sólidos obtido as variedades Pioneiro, Ok Bullet e Endurance apresentaram 13,86 %, 14,61 % e 17,53 % de proteínas respectivamente para E1, enquanto que as

mesmas cultivares, pela metodologia E2, apresentaram valores de 13,93 %, 38,90 % e 40,33 %. Analisando as porcentagens de proteínas extraídas do material de cada cultivar e em cada extração observam-se porcentagens inferiores de proteínas às encontradas pelo método E2, demonstrando maior concentração de outros componentes como pigmentos, oxalatos e fitatos, ao invés de maior capacidade de extração pelo procedimento E1.

Tabela 4 - Teores de proteínas brutas dos extratos obtidos a partir das metodologias de extração E1 e E2.

Cultivar	Proteínas brutas (mg/100g) ¹	
	E1	E2
Pioneiro	201,84 ± 1,43 ^{c(A)}	118,45 ± 2,63 ^{c(B)}
Ok Bullet	217,71 ± 2,96 ^{b(A)}	357,96 ± 2,87 ^{b(B)}
Endurance	270,49 ± 2,64 ^{a(A)}	395,33 ± 1,43 ^{a(B)}

¹ Os resultados estão expressos em matéria seca. Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna e maiúsculas numa mesma linha entre as médias das populações mostram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t. Fonte: Do autor, 2014.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as metodologias de extração e as cultivares em relação aos teores de proteína bruta. Em ambas as extrações foi observado um menor teor de proteínas nos extratos obtidos do trigo de primavera em relação aos obtidos a partir dos trigos de inverno. A cultivar Pioneiro apresentou maior teor de proteína pela metodologia E1, comparado ao método E2, enquanto que para OK Bullet e Endurance o conteúdo proteico foi maior nos extratos obtidos por E2 como apresentado na Tabela 2.

O procedimento de extração E2 possui etapas adicionais em sua realização comparado a E1, como aquecimento em condições de pasteurização (75 °C / 20 min) e centrifugação (4000 x g por 10 min a 4 °C). O processo de impregnação a vácuo é usualmente utilizado para acelerar a infiltração de líquidos nas estruturas porosas de tecidos vegetais sob-baixas pressões, resultando na saída de gases e na entrada de líquidos (ZHAO e XIE, 2004). Durante essa etapa, o contato entre solvente de extração e as ISP, localizadas no apoplasto da célula, é favorecido, de modo que o poder de extração do solvente é aumentado, e conseqüentemente o teor de proteínas

extraído é maior. O emprego das outras etapas de calor e de força centrífuga pode eliminar compostos orgânicos, fitatos, oxalatos e fibras do extrato bruto, reduzindo assim os teores de sólidos.

A diferença observada entre as cultivares de primavera e inverno pode ser devido ao processo de aclimação ao frio pelo qual os trigos passaram. Submeter o trigo a baixas temperaturas é indispensável aos trigos de inverno para que esses entrem no período reprodutivo, enquanto que para o trigo de primavera a aclimação atrasa desenvolvimento da planta, reduzindo assim seus componentes como proteínas e sólidos totais.

A diferença de pH nas soluções de extração também pode influenciar na solubilidade das proteínas, isso porque dependendo da sequência de aminoácidos as proteínas têm sua solubilidade reduzida ou aumentada em pH ácido, neutro ou básico. Dessa forma, os valores encontrados sugerem que as proteínas da cultivar primavera (Pioneiro) possuem uma sequência distinta de aminoácidos comparada às proteínas das cultivares de inverno, visto que essas foram mais solúveis pela extração E1 (pH=7,4) enquanto que as outras das cultivares Ok e Endurance apresentaram maior solubilidade por E2 (pH=3,0).

Tabela 5 - Teores de cinzas dos extratos obtidos a partir das metodologias de extração E1 e E2.

Cultivar	Cinzas (%)	
	E1	E2
Pioneiro	2,00 ± 0,01 ^{b(A)}	1,98 ± 0,02 ^{b(B)}
Ok Bullet	2,11 ± 0,01 ^{a(A)}	2,07 ± 0,02 ^{a(B)}
Endurance	2,13 ± 0,02 ^{a(A)}	2,10 ± 0,02 ^{a(B)}

Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna e maiúsculas numa mesma linha entre as médias das populações mostram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t. Fonte: Do autor, 2014.

Não houve interação significativa para as cultivares e as metodologias de extração quanto ao teor de cinzas. Os extratos da cultivar Pioneiro obtidos por E1 e E2 apresentaram teores de cinzas de 2,0 % e 1,98 % respectivamente, e foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores encontrados para as cultivares Ok Bullet (2,11 % e 2,07 %) e Endurance

(2,13% e 2,10 %) como mostrado na Tabela 3. O processo de aclimação ao frio reduz os teores de cinzas dos extratos, por afetar o crescimento das plantas e influenciar no processo de síntese de nutrientes (VIEIRA, 2011), condição que deve afetar mais drasticamente a cultivar Pioneiro, de primavera.

Cabe destacar que, apesar de não ter sido objeto de estudo, foi observado, visualmente, grande diferença na coloração apresentada pelos extratos brutos obtidos por E1 e por E2 como apresentado na Figura 6.

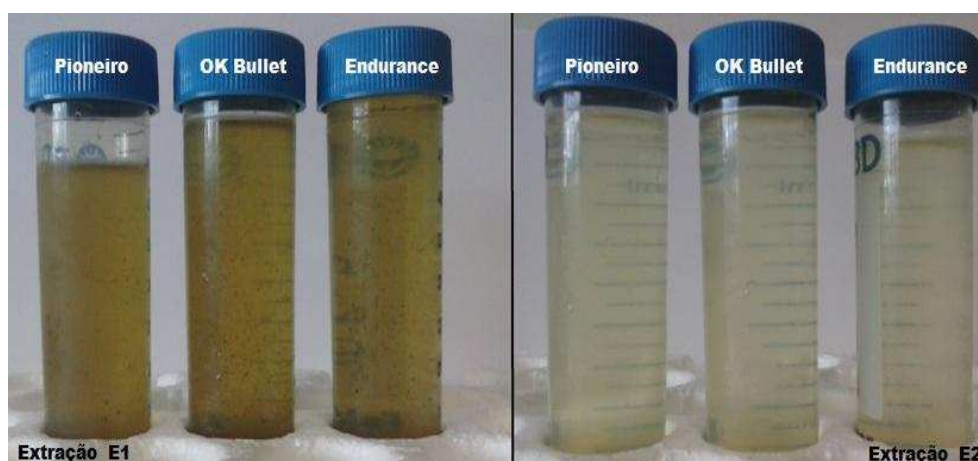


Figura 6 - Extratos brutos das folhas aclimatadas das cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance, obtidos pelas metodologias de extração E1 e E2. Fonte: Do Autor, 2014.

Os extratos obtidos por E2 apresentaram coloração mais clara comparada aos extratos de E1. A combinação dos solventes, ácido ascórbico e cloreto de cálcio (pH=3,0) com as condições de aquecimento, resulta na decomposição da clorofila, promovendo assim, a substituição da coloração verde escura da clorofila pela cor verde amarelada.

A decomposição da clorofila é influenciada pelo pH do meio, assim como dos tecidos. Em pH básico (9,0), esse pigmento torna-se mais estável ao aquecimento, quando comparada ao pH ácido (3,0). Na presença de ácidos, o magnésio presente no centro da molécula de clorofila é removido e substituído pelo H^+ proveniente do ácido, originando assim um composto chamado feofitina, gerando uma mudança de coloração, de verde intenso para o verde amarelado (VON ELBE, 2000, STREIT et al., 2005; OLIVEIRA e MAIA, 2007).

Os resultados encontrados demonstram que a metodologia E2 é mais eficiente para os trigos de inverno, sendo a melhor extração para obtenção de extratos com maiores teores de proteínas, menos interferentes e mais claros,

os extratos das cultivares Ok Bullet e Endurance apresentaram teores de proteínas de 357,96 mg/100g e 395,33 mg/100g respectivamente, numa quantidade inferior de sólidos totais, enquanto que para cultivar de primavera a melhor extração foi E1, com teor de 201,84 mg/100g de proteína.

5.1.2 Detecção das proteínas estruturadoras de gelo

Nas Figuras 7 e 8, estão representados os géis obtidos das diferentes extrações, amostras aclimatadas (AC) e não aclimatadas (NA), das três cultivares estudadas: Pioneiro, Ok Bullet e Endurance. As amostras NA foram utilizadas como amostra controle na comparação entre as bandas de proteínas, visando demonstrar a diferença nos géis provocada pelo processo de aclimação ao frio.

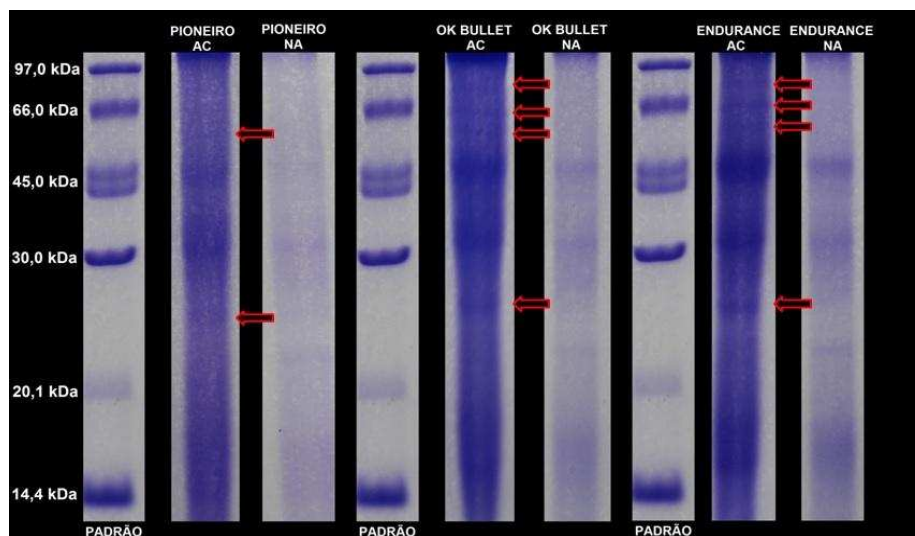


Figura 7 – Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E1 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (Ok Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC) e não aclimatadas (NA). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados e ausentes nos extratos não aclimatados. Fonte: Do autor, 2014.

Na Figura 7, observa-se que nas amostras AC, obtidas pela extração E1, foram identificadas proteínas que não estavam presentes nas amostras NA. Nesses extratos para a cultivar Pioneiro observou-se uma banda de proteína na faixa de 45,0 - 66,0 kDa e uma de 30,0 - 45,0 kDa. Já para as

faixas das cultivares Ok Bullet e Endurance, além dessas, foi observada uma terceira banda de 20,1 - 30,0 kDa e outras duas, uma na faixa de 66,0 - 97,0 kDa e outra de 45,0 - 66,0 kDa.

O extrato do trigo de primavera obtido pela extração E1 apresentou um menor número de bandas proteicas comparado aos géis de trigos de inverno, confirmando os dados encontrados para teores de proteína, em que a cultivar Pioneiro exibiu os menores teores de proteínas comparados à Ok Bullet e Endurance. Além disso, observou-se também que a cultivar Endurance apresentou bandas de proteínas com coloração mais intensa às observadas no outro trigo de inverno (Ok Bullet). Essa diferença, assim como anteriormente, corrobora os valores de teores de proteínas, e pode ser justificado pelo fato de a Endurance ser tolerante ao frio, possuindo assim maior capacidade de desenvolvimento.

O maior número de bandas exibidas pelo material das cultivares de inverno em relação à de primavera, não indica necessariamente uma atividade de ISP maior e mais eficiente. Alguns pesquisadores como Hon et al. (1994) relataram que a atividade das ISP está relacionada não apenas com a concentração de proteínas mas também com o tipo de proteína presente. Nesse estudo, com a mesma metodologia de extração, foram detectadas por eletroforese em SDS-PAGE a presença de sete proteínas, das quais apenas cinco, de massas moleculares de 14,4 a 45,0 kDa apresentavam alto grau de atividade de ISP, sendo capazes de alterar o crescimento dos cristais de gelo.

Vieira (2011) investigou a presença de ISP em extratos de folhas de cultivares de trigo aclimatadas ao frio. Observou a presença de maior número de proteínas na faixa de 14,4-66,0 kDa para as cultivares de inverno, enquanto que nas das cultivares de trigo de primavera foram identificadas apenas bandas com 20,1 kDa, de 20,1-30,0 kDa e de 45,0 kDa, o mesmo comportamento em relação ao número de bandas foi observado no presente trabalho, com as cultivares de inverno exibirem um maior número de bandas que a de primavera.

Na Figura 8, estão representados os géis obtidos dos extratos (AC e NA) pela metodologia de extração E2. Para as três cultivares, nos extratos de folhas NA, nenhuma banda de proteína foi identificada. Já nos extratos de folhas AC, foi observada apenas uma proteína na faixa de 20,1 – 30,0 kDa.

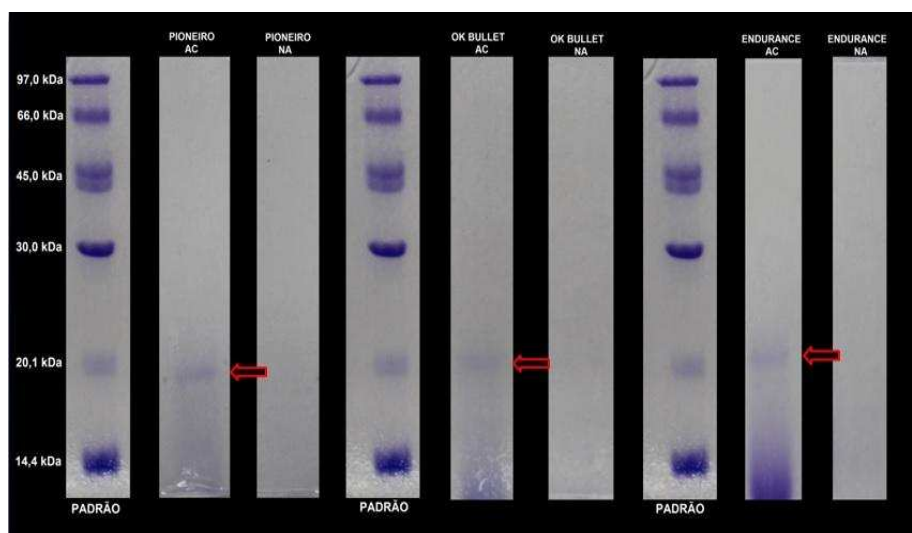


Figura 8 – Perfis Proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (Ok Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC) e não aclimatadas (NA). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados e ausentes nos extratos não aclimatados. Fonte: Do autor, 2014.

O procedimento de extração E2, por sistema de impregnação a vácuo em solução de ácido ascórbico e cloreto de cálcio foi utilizado em outros trabalhos que visavam a obtenção de ISP para posterior análise e identificação. Em estudo também envolvendo o acúmulo de ISP em cultivares de trigo, Antikainen e Griffith (1997) utilizaram o mesmo processo de extração para identificar ISP presentes em cereais por meio de eletroforese em SDS-PAGE. Os autores observaram nos extratos de trigo de inverno a presença de ISP com massa molecular de 31,0 - 45,0 kDa, outras duas de 21,5 – 31,0 kDa, uma 14,4 kDa e uma menor que 14,4 kDa. Os extratos de trigo de primavera apresentaram as mesmas ISP com exceção da proteína de 31,5 - 45,0 kDa, Durante o estudo, notaram que essas proteínas demonstravam capacidade em alterar as formas dos cristais de gelo.

Kontogiorgos et al. (2007) isolaram ISP à partir de folhas de trigo de inverno, visando a identificação de ISP capazes de inibir a recristalização do gelo. A determinação da massa molecular das proteínas pelo processo de espectrofotometria de massa indicou a presença de proteínas de 12,9 kDa, 21,3 kDa e 40,0 kDa identificadas por eletroforese em SDS-PAGE nos extratos de folhas aclimatados, sendo uma delas semelhante à proteína encontrada na faixa de 20,1 – 30,0 kDa da Figura 8. Notou-se, do mesmo modo no presente

trabalho, que nenhum dos extratos NA exibiram ISP, indicando que esses extratos não são capazes de expressar atividade de inibição à recristalização.

Faixa de proteína semelhante à encontrada foi reportada por Hassas-Roudsari (2011), ao identificar a presença de ISP nos extratos de folhas de trigo aclimatadas ao frio com massa molecular de 21,5 – 31,0 kDa. Nesse estudo, os extratos NA também não apresentaram nenhuma banda na eletroforese. Durante a pesquisa notou-se a capacidade dessas proteínas na inibição da recristalização dos cristais de gelo. Além disso, notaram a redução do tamanho dos cristais de gelo formados em solução de sacarose em presença dessas ISP.

Os trabalhos citados também utilizaram trigo de inverno, de primavera ou ambos para detecção de ISP e identificaram a presença dessas na faixa de 21,5 – 31,0 kDa, e comprovaram a atividade da ISP. Com base nos resultados encontrados pode-se dizer que as proteínas identificadas no presente trabalho podem vir a demonstrar atividade estruturadora de gelo, como nos outros estudos analisados.

Nota-se em comum nos géis de ambas as extrações (E1 e E2) a presença de ISP na faixa de 20,1 a 30,0 kDa, como visualizado na Figura 9, que de acordo com estudos anteriores consiste em uma das faixas de atividade das ISP.

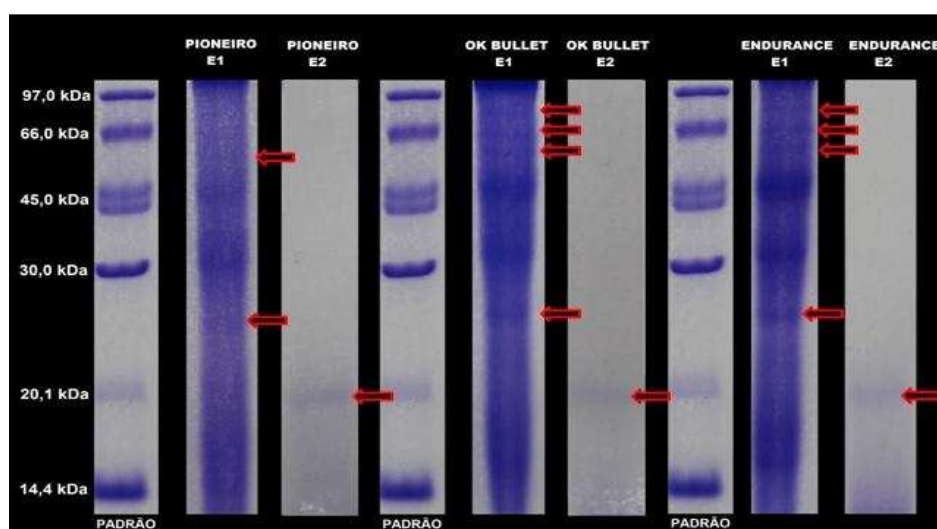


Figura 9 – Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos obtidos por E1 e E2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (Ok Bullet e Endurance), aclimatadas ao frio (AC). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados. Fonte: Do autor, 2014.

Além da presença das ISP, conforme identificadas por eletroforese em SDS-PAGE, o tipo e concentração de proteínas presentes são importantes na determinação de sua atividade estruturadora de gelo. Considerando apenas as imagens da eletroforese, o melhor método de extração parece ser o E2, uma vez que este permitiu a identificação de banda proteica exclusivamente nos extratos aclimatados ao frio, e na faixa de uma ISP já reportada em literatura.

5.2 Avaliação dos métodos de purificação

5.2.1 Teor de proteínas brutas

Os extratos brutos, E1 e E2, após serem submetidos a três procedimentos distintos de purificação, foram quantificados em relação ao teor de proteínas. Os valores estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Os processos de purificação empregados visaram à eliminação de interferentes, objetivando extratos de proteínas mais puros. Todas as metodologias de purificação testadas utilizaram solventes apolares (acetona, solução de éter de petróleo e éter etílico, e clorofórmio), explorando a solubilidade das proteínas. Os procedimentos empregados visaram desestabilizar as interações proteínas-proteínas e proteínas com outros compostos orgânicos (pigmentos, lipídeos, fenóis e outros), permitindo assim a liberação dos compostos de interesse nos extratos purificados.

Na Tabela 4, foram expressos os teores de proteínas dos extratos brutos obtidos pela metodologia de extração E1, e purificadas pelos processos denominados P1 (acetona), P2 (éter etílico: éter de petróleo) e P3 (clorofórmio). Resultados análogos para a metodologia de extração E2 estão apresentados na Tabela 5. Para efeito de discussão na presente seção deste trabalho os extratos brutos EB1 e EB2 serão chamados de controle.

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão dos teores de proteínas brutas (mg/mL) dos extratos purificados obtidos a partir da metodologia E1.

Cultivar	EB1	P1	P2	P3
Pioneiro	2,92 ± 0,03 ^c	2,73 ± 0,03 ^{c(*)}	2,83 ± 0,03 ^{c(*)}	2,89 ± 0,02 ^{c(ns)}
Ok Bullet	3,25 ± 0,02 ^b	3,20 ± 0,04 ^{b(ns)}	3,09 ± 0,02 ^{b(*)}	3,16 ± 0,06 ^{b(*)}
Endurance	4,06 ± 0,01 ^a	3,97 ± 0,03 ^{a(ns)}	3,88 ± 0,03 ^{a(*)}	3,92 ± 0,03 ^{a(*)}

[†] Os resultados estão expressos em base úmida. EB1: Extrato controle obtido pela extração E1 P1: Purificação com acetona; P2: Purificação com éter etílico: éter de petróleo; P3: Purificação com clorofórmio. Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna entre as médias demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste "t". Na mesma linha, os (*) indicam diferença significativa, os (^{ns}) diferença não significativa entre as purificações e o extrato controle a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett. (Dms_{pioneiro} = 0,0525 / Dms_{Ok Bullet} = 0,0779 / Dms_{Endurance} = 0,0576). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 7 - Valores médios e desvios padrão dos teores de proteínas brutas (mg/mL) dos extratos purificados obtidos a partir da metodologia E2.

Cultivar	EB2	P1	P2	P3
Pioneiro	1,01 ± 0,02 ^c	0,79 ± 0,03 ^{c(*)}	0,84 ± 0,02 ^{c(*)}	0,96 ± 0,01 ^{c(ns)}
Ok Bullet	3,27 ± 0,02 ^b	3,23 ± 0,03 ^{b(ns)}	3,06 ± 0,04 ^{b(*)}	3,15 ± 0,02 ^{b(*)}
Endurance	3,89 ± 0,04 ^a	3,85 ± 0,03 ^{a(ns)}	3,78 ± 0,03 ^{a(*)}	3,81 ± 0,02 ^{a(*)}

[†] Os resultados estão expressos em base úmida. EB2: Extrato controle, obtido pela extração E2; P1: Purificação com acetona; P2: Purificação com éter etílico: éter de petróleo; P3: Purificação com clorofórmio. Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna entre as médias demonstram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste "t". Na mesma linha, os (*) indicam diferença significativa, os (^{ns}) diferença não significativa entre as purificações e o extrato controle a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett. (Dms_{pioneiro} = 0,0525 / Dms_{Ok Bullet} = 0,0665 / Dms_{Endurance} = 0,0665). Fonte: Do autor, 2014.

Observou-se interação significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as cultivares e as metodologias de purificação, indicando que a cultivar influencia no processo de purificação. Comparando-se os dados dos extratos purificados de uma mesma cultivar com o respectivo controle, notou-se que alguns tratamentos diferiram pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 5%, demonstrando que alguns processos de purificação reduziram os teores de proteínas, ou seja, dependendo do tratamento empregado pode ocorrer um decréscimo significativo no teor total de proteínas, indicando que determinado procedimento de purificação não é adequado para aquela cultivar.

O teor de proteína bruta é significativamente maior para a cultivar de inverno tolerante ao frio, Endurance, seguida da não tolerante Ok Bullet, e menor para a cultivar de primavera, Pioneiro ($p < 0,05$), independente do método de purificação.

Comparada aos extratos controle de E1 e E2, a metodologia de purificação P1 produziu efeito significativo somente para a cultivar Pioneiro, resultando em um menor teor de proteína bruta após a purificação. O procedimento P3 produziu efeito similar nas cultivares Ok Bullet e Endurance, em relação a ambos os controles. O método de purificação P2 reduziu o teor proteico para todas as cultivares nos extratos E1 e E2, não sendo indicado para nenhuma cultivar.

Para as cultivares de inverno, Ok Bullet e Endurance, o procedimento de purificação mais adequado foi P1, visto que os teores de proteínas obtidos por esse método foram superiores aos demais e estatisticamente iguais ao controle ($p < 0,05$), para essas cultivares a acetona foi capaz de remover compostos indesejáveis sem alterar a quantidade de proteína presente no extrato. A utilização de solventes orgânicos para remoção de interferentes pode reduzir a solubilidade das proteínas ocasionando assim a desnaturação desses compostos (CAMPBELL, 2001). Tais solventes, como acetona, são capazes de precipitar proteínas, aumentando a atração entre as elas e removendo moléculas de água pelo processo de solvatação. Além disso, forças eletrostáticas favorecem a atração de cargas opostas presentes nas proteínas, dessa maneira a água é removida tanto pela presença do solvente orgânico, como pela estruturação ao redor da molécula orgânica (STOCKNES e RUSTAD, 1995; SILVA, 2009). A acetona também é utilizada para solubilização de compostos fenólicos, triglicérides e pigmentos como a clorofila, promovendo a remoção desses compostos (CROWELL, WALL e DOUCETTE, 2013).

Ao analisar a cultivar Pioneiro, trigo de primavera, observou-se que a melhor metodologia de purificação foi a P3, na qual os seus teores de proteínas não diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Resultados similares aos encontrados, relativos à separação de componentes, foram observados por Mitra et al. (2009) em estudo envolvendo o isolamento de proteínas dos tecidos vegetais utilizando a técnica com adição de clorofórmio 10% para extração de

componentes contaminantes (fitoquímicos) e outros compostos orgânicos como os lipídeos. Observaram que inicialmente a amostra apresentava coloração verde intensa, indicando a presença de clorofila. No entanto, após extração com clorofórmio notaram uma separação de fases no extrato, onde a camada superior apresentou cor verde clara e a inferior coloração verde escura, caracterizando a separação dos pigmentos das proteínas. Pelos resultados obtidos das três metodologias de purificação, pode-se afirmar que compostos indesejáveis foram eliminados durante as etapas de purificação, porém alguns procedimentos reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) os teores proteicos dos extratos brutos indicando não serem os métodos adequados para tal procedimento.

5.2.2 Detecção de proteínas estruturadoras de gelo nos extratos purificados

Para avaliar a eficiência dos processos de purificação foram realizadas análises em eletroforeses em SDS-PAGE. As imagens obtidas dos extratos purificados foram apresentadas nas Figuras 10 e 11.

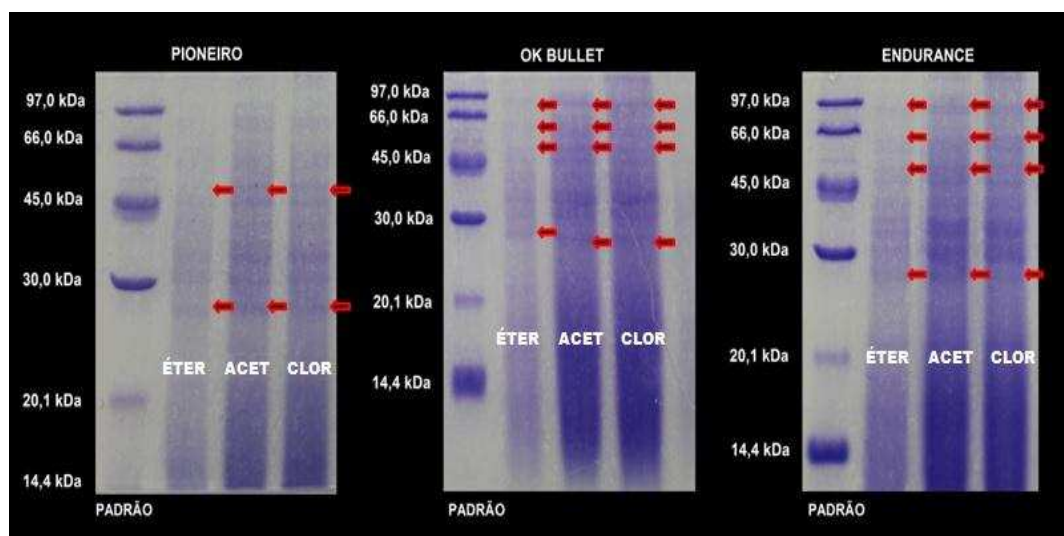


Figura 10 – Perfis proteicos em SDS-PAGE dos extratos das cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance purificados por acetona (ACET), éter de petróleo/éter etílico (ETER), clorofórmio (CLOR) para o método de extração E1. Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam as bandas de proteínas presentes nos extratos purificados e também no extrato controle. Fonte: Do autor, 2014.

Na Figura 10, estão representados os perfis eletroforéticos dos extratos purificados para o método de extração E1. Para as três metodologias de purificação, observou-se um maior número de bandas proteicas em relação às visualizadas nos extratos controle. Para Pioneiro identificou-se uma banda de proteína na faixa de 20,1-30,0 kDa e uma 45,0-66,0 kDa, para as cultivares Ok Bullet e Endurance além das duas observadas na Pioneiro, constatou-se a presença de mais duas bandas proteicas, uma na faixa de 66,0-97,0 kDa e uma de 45,0-66,0 kDa, as mesmas faixas visualizadas nos perfis eletroforéticos dos extratos brutos obtidos por E1. Porém, outras bandas não visualizadas anteriormente foram detectadas, sugerindo que a remoção de interferentes como clorofilas e alguns outros compostos orgânicos facilitou a separação das proteínas, favorecendo o isolamento das proteínas de interesse no presente estudo.

As proteínas presentes após purificação nos extratos obtidos pela metodologia E2 estão identificadas na Figura 11.

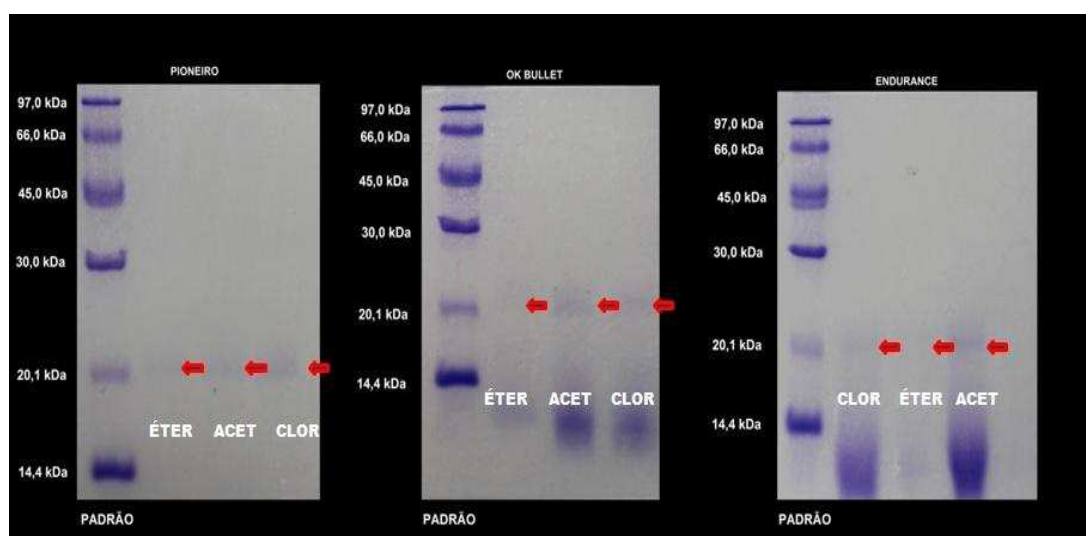


Figura 11 - Géis de eletroforese em SDS-PAGE dos extratos obtidos pela extração 2 das cultivares de trigo de primavera (Pioneiro) e trigo de inverno (Ok Bullet e Endurance) e purificados por acetona (ACET), éter de petróleo/éter etílico (ETER), clorofórmio (CLOR). Padrão: Fosforilase b (97,0 kDa); albumina bovina (66,0 kDa); albumina de ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); lisozima purificada da clara de ovo (14,4 kDa). Setas vermelhas indicam bandas de proteínas presentes nos extratos aclimatados. Fonte: Do autor, 2014.

Notam-se nesses géis as mesmas bandas de proteínas observadas nos extratos brutos de E2, com massa molecular de 20,1 – 30,0 kDa. Para

esses extratos, a eliminação de possíveis compostos interferentes não afetou de forma significativa a separação proteica por eletroforese, sugerindo que as únicas proteínas presentes nos extratos brutos foram àquelas identificadas como ISP.

Similar à observação feita para as metodologias de extração, a coloração dos extratos também foi nitidamente diferente entre os solventes de purificação testados, como observados nas Figuras 12 e 13.

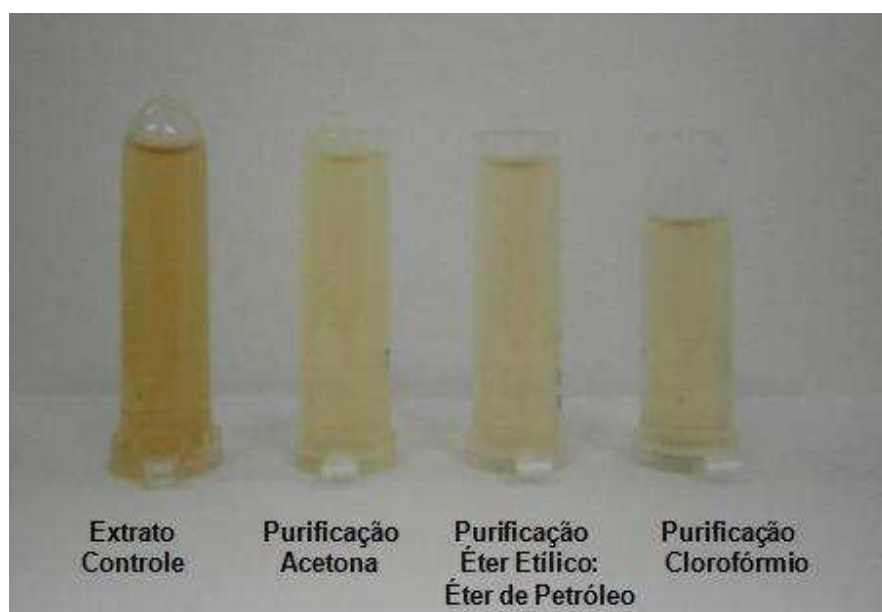


Figura 12 - Extratos controle e purificados obtidos pela metodologia de extração E1.
Fonte: Do autor, 2014

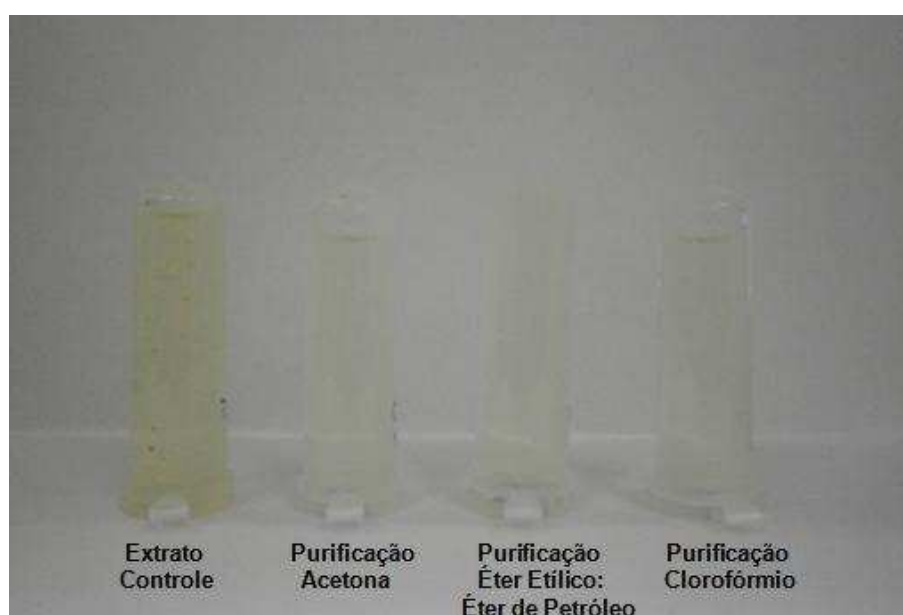


Figura 13 - Extratos controle e purificados obtidos pela metodologia de extração E2.
Fonte: Do autor, 2014

Os procedimentos de purificação foram eficientes na remoção de pigmentos e possivelmente alguns outros compostos indesejáveis nos extratos brutos obtidos tanto pela metodologia E1 quanto por E2, o que pode vir a favorecer sua utilização em produtos alimentícios (Figuras 12 e 13).

A utilização de metodologias de purificação com solventes orgânicos como acetona, éter de petróleo e éter etílico, e clorofórmio favoreceu a eliminação de interferentes e a subsequente separação das ISP por SDS-PAGE. Para cultivar Pioneiro o melhor solvente de purificação foi o clorofórmio, enquanto que o procedimento com utilização de acetona foi o mais eficiente para Ok Bullet e Endurance. Sugere-se que as formas metabólicas do trigo (de primavera e de inverno) influenciam no tipo de ISP desenvolvida pelas plantas aclimatadas, de modo que estas proteínas são mais eficientemente separadas por solventes distintos no processo de purificação.

6. CONCLUSÕES

Nas duas metodologias de extração testadas, foi identificado um maior número de bandas de proteínas nos extratos de folhas aclimatadas em relação às não aclimatadas, indicando a presença de proteínas estruturadoras de gelo (ISP), que se desenvolveram devido ao tratamento com frio.

A extração com Tris-HCl (E1) foi a mais eficiente para o material da variedade Pioneiro enquanto a extração por impregnação a vácuo (E2) foi a melhor para as variedades Ok Bullet e Endurance.

Um maior número de bandas proteicas foi visualizado no perfil eletroforético dos extratos brutos obtidos pela metodologia de extração com solvente Tris-HCl (E1), essas com massas molares entre 20,1 - 66,0 kDa. Nos extratos obtidos por impregnação a vácuo (E2) foi identificada apenas uma banda de proteína de 20,1 - 30,0 kDa

Em relação aos métodos de purificação, houve diferença em relação a melhor metodologia entre às cultivares. A purificação com clorofórmio (P3) foi a mais eficiente para a cultivar Pioneiro, enquanto a com acetona (P1) foi a melhor para as cultivares Ok Bullet e Endurance, ambas conseguiram eliminar interferentes sem reduzir significativamente os teores de proteínas.

Os extratos purificados a partir de E1 apresentaram um maior número de bandas de proteínas no perfil proteico, além das proteínas visualizadas nos extratos brutos foram visualizadas mais nove bandas proteicas no intervalo de 20,1 - 97,0 kDa, indicando que a separação foi mais eficiente devido a eliminação de componentes indesejáveis. Já para os extratos purificados obtidos através de E2 as mesmas bandas foram visualizadas no intervalo de 20,1 - 30,0 kDa, comprovando que as proteínas não foram eliminadas no processo e que a extração foi mais específica em relação as proteínas estruturadoras de gelo.

Pode-se dizer que os processos de extração e purificação são influenciados pelas cultivares, e, portanto, procedimentos distintos para extração e purificação proteínas são requeridos.

O presente trabalho indica que resultados de pesquisas desenvolvidas no exterior, não são necessariamente adequados às cultivares de trigo no Brasil. Trigos nacionais são essencialmente de primavera, e demandam

pesquisas específicas, visto que demonstram potencial para obtenção de ISP com características diferentes daquelas produzidas por trigos de inverno.

A escolha das melhores metodologias de extração e purificação influencia no rendimento e qualidade das proteínas estruturadoras de gelo, a obtenção dessas e isolamento dessas proteínas são de extrema importância visto que podem ser amplamente utilizadas em inúmeros setores. Pode ser beneficiado com as ISP o setor sócio econômico aplicando essas proteínas na preservação de culturas agrícolas e na piscicultura, o campo da medicina que incorporaria as ISP na criocirurgia, preservando órgãos e tecidos para transplantes, e principalmente o setor alimentício melhorando a qualidade sensorial e a conservação de produtos congelados.

Pensando nas possibilidades de aplicação novas pesquisas devem ser desenvolvidas, explorando a toxicidade das proteínas estruturadoras de gelo, bem como o seu comportamento em alimentos congelamento e principalmente seus efeitos juntamente com micro organismos vivos.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E. Como Purificar Proteínas? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.24, p.254-259 , 2002.

ANTIKAINEM, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, v.99, p. 423-432, 1997.

ATICI, O.; NALBANTOGLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, v.64, p.1187-1196, 2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 16a. ed. 3a. rev. Gaithersburg, MD: AOAC International, 1997.

BAARDSNES, J.; KONDEJEWSKI, L. H.; HODGES, R.S., CHAO, H., KAY, C., DAVIES P. L. New ice-binding face for type I antifreeze protein. **Federation of European Biochemical Societies**, v.463, p. 87-91, 1999.

BARRETT, J. Thermal hysteresis proteins – Review. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.33, p.105-107, 2001.

BARROS, F.A.R. ; STRINGHETA, P.C. Microencapsulamento de antocianinas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.36, p.18-24, 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**, v.72, p.248-254, 1976.

BRODEL, A.K ; RAYMOND, J.A. ; DUMAN, J.G. ; BIER, F.F. ; KUBICK, S. Functional evaluation of candidate ice structuring proteins using cell-free expression systems. **Journal of Biotechnology** v.163, p.301-310, 2013.

CAI, Y. ; LIU,S ; LIAO, X. ; DING. ; SUN, J ; ZHANG, D. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum Ait.* **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p. 98-102, 2011.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, p.752, 2001.

CHENG, C.C. Evolution of the diverse antifreeze proteins. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.8, p. 715-721, 1998.

COLLA, L.M. ; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Congelamento e descongelamento – Sua influência sobre os alimentos. **Vetor**, v.13, p.53-66, 2003.

CREVEL, R.W.R. ; FEDYK, J.K ; SPURGEON, M.J. Antifreeze proteins : characteristics, occurrence and human exposure – Review. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p. 828-834, 2002.

CROWELL, A.M.J.; WALL, M.J;DOUCETTE, A.A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**. v.796, p.48-54, 2013.

DAVIES, P.L.; SYKES, B.O. Antifreeze proteins. **Current Opinion in Structuring Biology**, v.7, p 828-834, 1997.

DEVRIES, A.L., WOHLISCHLAG, D.E.; Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes. **Science**, v.163, p. 1074-1075, 1969.

EVANS, R.H.D.; ROMERO, K,J.; WESTOBY, M. Concentration of proteins and removal of solutes. In: Burgess, Richard R.; Deutscher, Murray P. eds. *Methods in Enzymology*, v. 463, 2nd ed., p.97-120. 2009.

FEENEY, R.E., OSUGA, D.T.; YEH, Y. Antifreeze Proteins: From Purely Scientific Interest to Possible Uses in Agriculture, Fish Culture, Foods, and Medicine' in Comments. **Agricultural Food Chemistry**, v.3, p.155-174, 1996.

FEENEY, R.E.; YEH, Y. Antifreeze proteins: Current status and possible food uses. **Trends in Food Science e Technology**, v.9, p.102-106, 1998.

FENEMMA, O.R. Nature of the freezing process. In: O.R.Fennema, W.D.Powrie E. H. Marth, Ed. *Low Temperature Preservation of Foods and Living Matters*. Marcel Dekker Inc. New York, p.151-227, 1973.

GOFF, H.D. Food at subzero temperature. In: J. R. Dutcher and A. G. Marangoni, Ed. *Soft Materials Structure and Dynamics*. Marcel Dekker Inc. New York. p.229-320, 2005.

GRIFFITH, M. EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential uses in frozen foods. **Biotechnonology Advances**, v.13, p. 375-402, 1995.

GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D.S.C.; HON, W.C.; MOFFATT, B.A. Antifreeze Protein Produced Endogenously in winter rye leaves. **Plant Physiol**, v.100, p. 593-596, 1992.

HASSAS - ROUDSARI, M.; Extraction, Purification and study of mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves. 2011.168p. Tese de Doutorado. University of Guelph. Canadá, 2011.

HASSAS - ROUDSARI, M,; GOFF, H.D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. **Food Research International**. v.46, p 425-436, 2012.

HEW, C.L.; YANG, D.S.C.. Protein interaction with ice. **European Journal of Biochemistry**, v. 203, p.33-42, 1992.

HON, W.C.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D.S.C. Extraction and Isolation of antifreeze Proteins from Winter Rye (*Secale cereal L.*) Leaves. **Plant Physiology**, v.104, p. 971-980, 1994.

HOSHINO, T., ODAIRA, M., YOSHIDA, M., AND TSUDA, S. Physiological and biochemical significance of antifreeze substances in plants. **Journal of Plants Research**. v.112, p.255-261, 1999.

JACKMAN, J; NOESTHEDEN, M; MOFFAT, D.; PEZACHI, J. P.; FINDLAY, S.; BEN, R.N. Assessing antifreeze activity of AFGP 8 using domain recognition software. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.354, p.340-344, 2007.

KONTOGIORGOS, V.; REGAND, A.; YADA, R.Y.; GOFF, H.D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat

grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. **Journal of food Biochemistry**, v.31, p. 139-160, 2007.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice structuring proteins on the physical properties of frozen flour-water mixture. **Food Hydrocolloids**, v.22, p. 1135-1147, 2008.

KONTOGIORGOS, V.; GOFF, H.; KASAPIS, S. Effect of aging and ice structuring proteins on the morphology of frozen hydrated glúten networks. **Biomacromolecules**, v.8, p. 1293-1299, 2007.

LILLIFORD, P.J; HOLT, C.B. Antifreeze proteins. **Journal of Food Engineering**, v.22, p. 475-482, 1994.

MISHRA, V; PATTNAIK, P. Antifreeze proteins: prospects and perspectives in food sector. **Indian Food Industry**, v.18, p.238-244, 1999.

MITRA,S.K.; WALTERS, B.T.; CLOUSE,S.D.; GOSHE,M.B. An efficient organic solvent based extraction method for the proteomic analysis of Arabidopsis plasma membranes. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.2752-2767, 2009.

OLIVEIRA, M.F.; MAIA, E.C.P. Alterações de cor dos vegetais por cozimento: Experimento de química inorgânica biológica. **Química Nova na Escola**, v.25, p.24-25, 2007.

PETZOLD, G.; AGUILERA, J.M. Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods. **Food Biophysics**, v.4, p.378-396, 2009.

PIROZI, M.R.; MACRITCHIE, F. Antifreeze proteins from winter wheat and its potential application in frozen bread doughs (Oral Presentation). KSU Graduate Research Forum. Kansas State University, Manhattan, KS, April 2002.

PIROZI, M. R.; BEAN, S.; BLACKWELL, D.; CAMPELO, F.A. Purification protocol for ice structuring proteins from wheat leaves. Documentos do LAFA/DTA/UFV, s/d.

REGAND, A., GOFF, H. D. Ice Recrystallization Inhibition in Ice Cream as Affected by Ice Structuring Proteins from Winter Wheat Grass. **Journal of Dairy Science**, v.89, p 49-57, 2006.

SCHOLANDER, P.F., VAN DAM, L., KANWISHER, J.W., HAMMEL, H.T., GORDON, M.S.; Supercooling and osmoregulation in Arctic fish. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**. v.49, p 5-24, 1957.

SUSSULINI, A.; GARCIA, J.S.; MESKO, M.F.; MORAES, D.P.; FLORES, E.M .M.; PEREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. Otimização da extração das proteínas de soja para estudos metalômicos empregando SR-XRF, ICP OES e ICP-MS, após a separação por eletroforese em gel. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo. 2006.

SILVA, J.F. Purificação e caracterização de uma protease alcalina do resíduo de processamento da carapeba prateada (*Diapterus rhombeus*). 2009. 72p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE, 2009.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Revista Ciência Rural**, v.35, p.748-755, 2005.

STOCKNES, I.; RUSTAD, T. Purification and characterization of multicatalytic proteinase from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.4, p.587-595, 1995.

SUN, J; WEY, J.S. Modeling the Batch Crystallization Process. The Ice- Brine System. **Industrial e Engineering Chemistry Process Design and Development**. v. 12, p.236-246, 2012

VIEIRA, C. R.; Proteína Estruturadora de Gelo em Cultivares Brasileiras de Trigo e Centeio: Ocorrência, Caracterização e Aplicação em Massas Congeladas. 2011. 90p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2011.

TOKAREW, J. Investigating the Relationship Between Structure, Ice Recrystallization Inhibition Activity and Cryopreservation Ability of Various

Galactopyranose Derivatives. 2011. p.198. Dissertação de Mestrado. University of Ottawa. Canadá.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin – Madison. Cap.10, p.782-799, 2000.

XU, H.N., CHEN, H., HUANG, W. Purification of ice structuring protein complexes from winter wheat using Triton X-114 phase partitioning. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v.3(4), p 250-253, 2009.

XU, H.N., HUANG, W., JIA, C., KIM, Y., LIU, H. Evaluation of water holding capacity and bradmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat. **Journal of cereal science**, v.49, p 383-385, 2009.

YEH, Y., FEENEY, R.E. Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function. **Chemical Reviews**, v.96, n.2, 1996.

WATHEN, B., JIA, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. Emerging Technologies for Food Processing, **Elsevier**, London, p 653-674. 2005.

ZACHARIASSEN, K. E.; KRISTIANSEN,E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. **Cryobiology**, v.41,p.257–279, 2000.

ZHAO, Y., XIE, J. Pratical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. **Trends in Food Science and Technology**. v. 15, p. 434-451, 2004.

ZHANG, C.; ZHANG, H.; WANG, L.; GUO, X Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. **LWT Food Science and Technology**, v.41, p.1029-1036, 2008.

ZARITZKY, N. Physical-chemical principles in freezing. In: D. Sun, editor. Handbook of Frozen Food Packaging and Processing. Taylor and Francis Group. Florida. p.23-25, 2006.

ANEXOS

ANEXO – Análises de sólidos totais, proteínas brutas e cinzas nos extratos de ISP das cultivares Pioneiro, Ok Bullet e Endurance.

Tabela 8 - Resumo da análise de variância dos teores de cinzas totais dos extratos obtidos por E1 e E2

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Extração	1	0,00435556 *
Cultivar	2	0,02550556 *
Extração vs Cultivar	2	0,00023889 ^{ns}

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância dos teores de sólidos totais dos extratos obtidos por E1 e E2

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Extração	1	1513800,000 *
Cultivar	2	17616,667 *
Extração vs Cultivar	2	816,667 ^{ns}

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos obtidos por E1 e E2

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Extração	1	16242,62801 *
Cultivar	2	47863,32255 *
Extração vs Cultivar	2	23719,91417 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos obtidos por E1 e E2

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	47863.32255 *
Extração / Pioneiro	1	23380 *
Extração / Ok Bullet	1	29502 *
Extração / Endurance	1	10800 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 12 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E1.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	4,05950278 *
Purificação	3	0,03552130 *
Cultivar vs Purificação	6	0,01228796 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 13 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E1.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	4,05950278 *
Purificação / Pioneiro	3	0,019667 *
Purificação / Ok Bullet	3	0,017431 *
Purificação / Endurance	3	0,023000 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 14 - Resumo da análise de variância dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E2.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	28,41268611 *
Purificação	3	0,04124722 *
Cultivar vs Purificação	6	0,01261944 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.

Tabela 15 - Resumo da análise de variância com decomposição de fatores dos teores de proteínas brutas dos extratos purificados e extrato controle obtido pela extração E2.

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Cultivar	2	28,41268611 *
Purificação / Pioneiro	3	0,007386 *
Purificação / Ok Bullet	3	0,027656 *
Purificação / Endurance	3	0,031444 *

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Fonte: Do autor, 2014.