

ESTUDO ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE MICROPOGONIAS FURNIERI (DESMAREST, 1823) DA COSTA SE-S DO BRASIL. 1. CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS\*

Hana SUZUKI\*\*, Anna Emília A. de M. VAZZOLER\*\*\* & PHAN Van Ngan

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

---

**Synopsis**

*Effects of different positions of sampling and different periods of preservation of the samples at -15°C on the general protein electropherograms of skeletal muscle of Micropogonias furnieri were analysed and the conditions of extraction and electrophoresis of the proteins were established. Extraction and preservation powers of four solutions, distilled water, sodium chloride 0.9%, phosphate buffer pH 7.5  $\mu=0.05$  (Connell, 1953) and glycerol-EDTA-Tris pH 8.7. (Scopes, 1968), were compared. The electrophoresis conditions were investigated using cellulose acetate membranes with six different buffer systems and starch gel with three different buffer systems. Samples of muscle collected from different positions did not show differences either in the number of bands or in their relative migrations in the electropherograms. Alterations in the electropherograms were noted according the period of sample preservation. The greatest extraction and preservation powers were found with the solution glycerol-EDTA-tris pH 8.7. In the buffer systems used, the maximum number of nine bands was obtained in cellulose acetate membranes as well as in starch gel. The best separation of the proteins in cellulose acetate membranes was found with Tris-glycine buffer pH 8.3 (Tris 0.0495M, glycine 0.3836M), and in starch gel with gel buffer constituted by Tris, EDTA and boric acid, pH 8.6 (Huehns, 1968) and electrode buffer constituted by boric acid and sodium hydroxid (Smithies, 1955).*

Descriptors: Electrophoresis, Proteins, Muscle, Methodology, South coast - Brazil, Southeast coast - Brazil, Cananéia - SP, *Micropogonias furnieri*, Sciaenidae.

Descritores: Eletroforese, Proteínas, Músculo, Metodologia, Costa sul - Brasil, Costa sudeste - Brasil, Cananéia - SP, *Micropogonias furnieri*, Sciaenidae.

---

**Introdução**

Métodos eletroforéticos têm proporcionado um grande avanço no estudo de populações de peixes, permitindo detectar produtos de diferentes genes alélicos através das bandas constituídas por proteínas de diferentes mobilidades. Através da análise de frequências gênicas

(\*) Trabalho realizado com apoio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 74/816, Proc. 75/387 e Proc. 76/262).

(\*\*) Aluna do Curso de Pós-Graduação do IOUSP.

(\*\*\*) Atualmente no INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Publ. n. 601 do Inst. oceanogr. da Usp.

obtidas de dados eletroforéticos, tem sido realizada com base genética a delimitação de populações conespecíficas de peixes, mesmo de alto-mar, onde há grande potencial de intercruzamentos (Sick, 1965a, b; Fujino & Kang, 1968; de Ligny, 1969; Fujino, 1969, 1971, 1976; Numachi, 1972; Utter *et al.*, 1972; Utter *et al.*, 1974; Morgan & Ulanowicz, 1976).

Amostras de músculo esquelético têm sido amplamente utilizadas em estudos de delimitação de populações de peixes, através de métodos eletroforéticos. Essas amostras, ao contrário do sangue, têm a vantagem de poderem ser coletadas de animais congelados e de animais de qualquer tamanho (de Ligny, *op. cit.*; Howlet & Jamieson, 1971). Além disso, a coleta das amostras de músculo é simples, requerendo poucos instrumentos, como

pinça e bisturi ou tesoura e, para o seu transporte, podem ser guardadas até mesmo em sacos plásticos.

Por outro lado, o uso do músculo exige um estudo detalhado sobre sua posição no corpo do animal onde as amostras serão coletadas, o método de preservação e as condições para extração e eletroforese. Músculos de diferentes regiões do corpo de peixes apresentam variações na largura dos miôtomos, na concentração de DNA e de íons (Love, 1970) e nas taxas de reações bioquímicas (Amano *et al.*, 1953; Kawabata, 1953; Amlacher, 1961). Ao contrário do músculo de aves e mamíferos, o de peixes é bastante susceptível à deterioração durante preservação por longo tempo a  $-15^{\circ}\text{C}$  (Connell, 1975).

Neste trabalho, como primeira parte do estudo populacional de *M. furnieri* da costa SE-S do Brasil através de eletroferogramas do músculo esquelético, investigou-se os efeitos da posição de coleta e do período de preservação das amostras sobre os eletroferogramas, assim como se procurou as melhores condições para extração e eletroforese das proteínas.

#### Material e métodos

O material utilizado, amostra de músculo esquelético, foi coletado de exemplares de *M. furnieri* capturados em Cananéia (SP). Para amostrar o músculo, removeu-se a pele da região acima da linha lateral e recortou-se a amostra com o bisturi. As amostras foram colocadas em tubos de plástico neutro com tampa e transportadas em bujões de nitrogênio líquido do local de amostragem ao laboratório em São Paulo, onde foram mantidos em congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$  até sua maceração e análise eletroforética.

Com o intuito de determinar a posição mais adequada de coleta das amostras de músculos, foram comparados os eletroferogramas e as concentrações protéicas totais de amostras coletadas de diferentes posições no corpo do peixe. Para tanto, utilizou-se 8 peixes (Tab. 1), sendo que, de cada um, foram coletadas amostras de 4 posições acima da linha lateral, no flanco direito do animal, indicadas na Figura 1. A extração das proteínas foi realizada com glicerox-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968), na proporção 1:3 (peso:volume), e a análise eletroforética desenvolvida em membrana de acetato de celulose, com o sistema de

Tabela 1. Dados dos 8 exemplares de *M. furnieri* utilizados no experimento para determinação da posição mais adequada de coleta de amostra de músculo esquelético

Exemplar (n.)	Comprimento total (mm)	Sexo	Estádio de maturidade
9	247	♀	A
10	256	♀	B
11	262	♂	B
12	226	♀	B
13	233	♀	B
14	207	♀	A
15	206	♀	B
16	207	♀	A

A = Imaturo

B = Em maturação

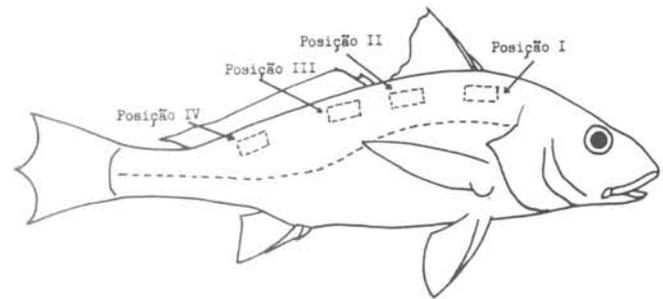


Fig. 1. Esquema indicando as diferentes posições de coleta de amostras de músculo esquelético de *M. furnieri*.

tampão 5 da Tabela 2, sob voltagem constante de 300 V, durante 20 min. A visualização das bandas de proteínas gerais foi obtida com Ponceau S (0,05 g em 100 ml de ácido tricloroacético 5%). A concentração protéica total (g/dl) dos extratos foi medida através da reação de biureto (Gornall *et al.*, 1949).

Foi realizado um experimento para verificar se diferentes períodos de preservação das amostras a  $-15^{\circ}\text{C}$  afetam os eletroferogramas e a concentração total dos extratos. Neste experimento, coletou-se amostra de músculo da posição I do corpo de 7 peixes (Tab. 3). Cada amostra foi dividida em três subamostras, as quais foram transportadas em bujões

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos de eletroforese em membranas de acetato de celulose com diferentes sistemas de tampão

Identificação do tampão	Tampão	Composição	Condições de eletroforese	Número de bandas (*)	Comprimento do eletroferograma (**)	Observação
Sistema 1	Tris-glicina pH 9,5	Tris 0,1163 M glicina 0,3010 M	300 V 30 min	8-9	28,56±0,74 (32)	-
Sistema 2	Tris-glicina pH 9,5 no ânodo e Barbital-EDTA pH 8,6 no cátodo	Sistemas 1 e 3	300 V 30 min	8-9	27,58±1,02 (64)	Diminuição no comprimento dos eletroferogramas com as vezes de uso do tampão
Sistema 3	Barbital-EDTA pH 8,6	Kit da Corning ACI Electrophoresis Systems	300 V 30 min	5	18,81±0,76 (32)	-
Sistema 4	Fosfato pH 8,0	5,3 ml de fosfato de sódio monobásico 0,2M e 94,7 ml de fosfato de sódio dibásico 0,2M	20 mA 60 min	3	16,75±0,30 (32)	-
Sistema 5	Tris-glicina pH 8,3	Tris 0,0495 M glicina 0,3836 M	300 V 30 min	9	37,50±2,76 (4)	-
Sistema 6	Tris-glicina pH 8,3	Tris 0,0388 M glicina 0,3010 M	300 V 30 min	8-9	23,50±1,59 (4)	-

(\*) = Bandas coradas por Ponceau S.

(\*\*) = Média ± intervalo de confiança a nível de significância 5%, do comprimento, em mm, desde a origem do eletroferograma até o centro da banda mais próxima ao ânodo. Entre parêntesis, encontra-se o número de eletroferogramas.

Tabela 3. Dados dos 7 exemplares de *M. furnieri* utilizados no experimento sobre os efeitos do período de preservação das amostras de músculos esqueléticos a -15°C

Exemplar (n.)	Comprimento total (mm)	Sexo	Estádio de maturidade
33	610	♀	B
34	615	♀	B
35	610	♀	D
36	710	♀	B
37	680	♀	D
38	685	♀	B
39	640	♀	B

B = Em maturação

D = Esgotada

de nitrogênio líquido para São Paulo, onde foram preservadas em congelador a -15°C. Uma das subamostras foi macerada e analisada eletroforéticamente após 10 dias, a segunda, após 20 dias, e a terceira, após 35 dias. A extração, análise eletroforética e a visualização das

proteínas foram realizadas conforme o processo descrito para o experimento sobre a amostragem de músculo esquelético de diferentes posições. A medida e concentração protéica total (g/dl) dos extratos foi feita utilizando-se refratômetro Atago para proteínas.

As condições de extração das proteínas de músculo esquelético foram estabelecidas através de experimento, visando selecionar uma solução com maior poder de extração de proteínas e maior poder de preservação dos extratos. Para tanto, coletou-se amostra da posição I do corpo de 8 peixes (Tab. 4), sendo cada amostra dividida em 4 subamostras para serem maceradas na proporção 1:3, com 4 soluções de extração diferentes: água destilada; cloreto de sódio 0,9%; tampão fosfato pH 7,5,  $\mu=0,05$  (Connell, 1953); glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968). A maceração foi realizada em macerador elétrico, a 4500 rpm durante 1 min, com temperatura entre 0 a 5°C. O macerado foi centrifugado a 3500 rpm, durante 15 min; o sobrenadante foi coletado e submetido a nova centrifugação a 10000 rpm, por 15 min, obtendo-se assim o extrato protéico. A concentração pro-

Tabela 4. Dados dos 8 exemplares de *M. furnieri* utilizados nos experimentos para seleção da solução de extração e das condições de eletroforese das proteínas do músculo esquelético

Exemplar (n.)	Comprimento total (mm)	Sexo	Estádio de maturidade
1	227	♀	B
2	197	♀	A
3	235	♀	B
4	338	♂	B
5	187	♀	A
6	194	♀	A
7	265	♀	B
8	276	♀	B

A = Imaturo

B = Em maturação

téica total (g/dl) foi medida em refratômetro Atago para proteínas.

Para verificar o poder de preservação dos extratos obtidos com as diferentes soluções, foram comparados a concentração protéica total e os eletroferogramas dos extratos recém-preparados com os obtidos de mesmas amostras após sua conservação por 7 dias em congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Os eletroferogramas foram obtidos em membrana de acetato de celulose com o sistema de tampão 1, referido na Tabela 2 (Tris-glicina pH 9,5).

Visando comparar diferentes meios de suporte, realizou-se eletroforese em membrana de acetato de celulose Cellogel (Chemetron, de dimensões  $5,7 \times 14,0$  cm) e gel de amido preparado com amido hidrolisado da Sigma, de concentração 16% e de dimensões  $20,5 \times 10,0 \times 0,4$  cm.

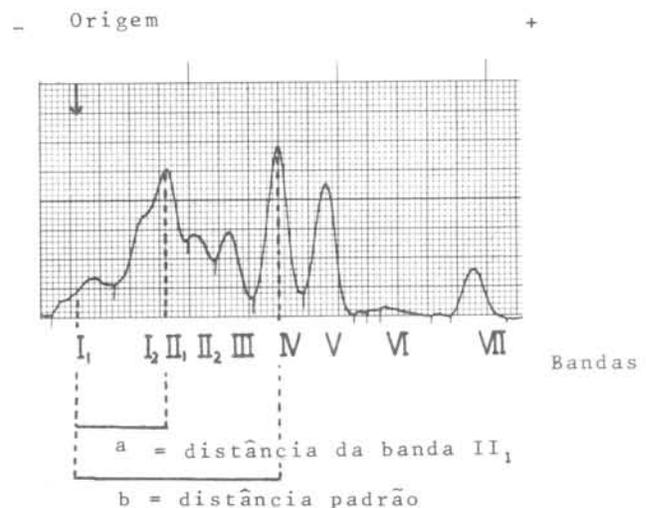
Em membrana de acetato de celulose, os extratos preparados com cada uma das 4 soluções de extrato foram analisados eletroforeticamente com os sistemas de tampão 1, 2, 3 e 4 (Tab. 2). Para comparar dois tampões Tris-glicina pH 8,3 de diferentes concentrações, os extratos preparados com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 foram, também, analisados com os sistemas 5 e 6 (Tab. 2).

Neste trabalho, as bandas de proteínas gerais separadas em membrana de acetato de celulose foram coradas com Ponceau S e, posteriormente, lavadas

em 6 banhos sucessivos de ácido acético 5%. A transparentização das membranas foi realizada segundo as instruções da Chemetron. Os eletroferogramas das membranas transparentizadas foram analisados em densitômetro Atago, com filtro 500 nm, e estimou-se a concentração relativa (%) de cada banda protéica.

As bandas protéicas principais foram designadas por algarismos romanos na sequência de aparecimento, a partir da origem em direção ao anodo (Fig. 2). Índices arábicos, seguindo também a ordem crescente em direção ao ânodo, foram utilizados para indicar os componentes das bandas principais.

A análise da variação qualitativa nos eletroferogramas baseou-se no número e na mobilidade das bandas. Para estimar a mobilidade de cada banda, calculou-se sua distância relativa através da expressão  $d=a/b$  (Fig. 2), onde  $a$  é a distância entre a projeção da origem sobre a linha de base das curvas densitométricas e a projeção do pico da curva correspondente à banda em questão sobre a mesma linha, e  $b$  é a distância entre a projeção da origem sobre a linha de base das curvas densitométricas e a projeção



$$\text{Distância relativa} = \frac{a}{b}$$

Fig. 2. Curva densitométrica de um eletroferograma de proteínas gerais de músculo esquelético de *M. furnieri*, mostrando as bandas principais e seus componentes e o método para o cálculo da distância relativa da banda  $\text{II}_1$ .

do pico da curva correspondente à banda IV sobre a mesma linha. Considerando-se que a banda IV se apresentou distinta em todos os eletroferogramas, a distância  $b$  foi tomada como padrão para cada eletroferograma, na estimativa das distâncias relativas.

Em gel de amido, extratos preparados com cloreto de sódio 0,9% e com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 foram analisados eletroforeticamente com os sistemas de tampão 4, 7 e 8 citados na Tabela 5. Os extratos foram aplicados ao gel através de tiras de papel de filtro (1,2 x 0,4 cm)

embebidas de extrato, e analisados sob amperagem de 45 mA durante 150 min, a 4°C. Depois da eletroforese, o gel foi cortado em 3 camadas, sendo a superior de 0,1 cm, a central de 0,2 cm e a inferior de 0,1 cm. A camada central foi corada com Nigrosina (Nigrosina saturada em metanol: água: ácido acético 5:5:1) e, a seguir, lavada em metanol: água: ácido acético 5:5:1.

Na comparação de valores numéricos, foi sempre considerado o nível de significância de 5%.

Tabela 5. Sistemas de tampão utilizados em eletroforese em gel de amido 16%

Identificação do tampão	Tampão	Composição
Sistema 4 (contínuo)	Fosfato pH 8,0	5,3 ml de fosfato de sódio monobásico 0,2 M e 94,7 ml de fosfato de sódio dibásico 0,2 M
Sistema 7 (descontínuo)	Gel: Tris-EDTA-ácido bórico pH 8,6 (Huehns, 1968)	Tris 0,90 M, EDTA 0,02 M, ácido bórico 0,50 M
	Cuba: ácido bórico-hidróxido de sódio (Smithies, 1955)	Ácido bórico 0,3 M, hidróxido de sódio 0,06 M
Sistema 8 (descontínuo)	Gel: ácido bórico-hidróxido de sódio (Smithies, 1955)	Ácido bórico 0,03 M, hidróxido de sódio 0,012 M
	Cuba: ácido bórico-hidróxido de sódio (Smithies, 1955)	Ácido bórico 0,3 M, hidróxido de sódio 0,06 M

## Resultados

Amostras de músculo esquelético, coletadas de diferentes posições do corpo do peixe, não apresentaram diferenças significativas na concentração protéica total dos seus extratos (Tab. 6) e seus eletroferogramas não apresentaram diferenças quanto ao número, nem quanto à posição relativa das bandas (Fig. 3).

Por outro lado, a concentração relativa (%) das bandas variaram de acordo com a posição de coleta das amostras (Tab. 7). À medida que a posição de coleta se aproximava da região caudal, as bandas I<sub>1</sub>, III e IV apresentaram concentrações relativas maiores, e as bandas V, VI<sub>1</sub>+VI<sub>2</sub> e VII, a partir da posição II, concentrações relativas menores. A banda II<sub>1</sub> apresentou sua concentração relativa decrescente, a partir da posição I em direção à posição IV. Diferenças significativas foram encontradas

nas concentrações relativas das bandas II<sub>1</sub> e VII.

Tabela 6. Concentração protéica total de amostras coletadas de diferentes posições do corpo do peixe. Cada valor representa a média de 8 peixes ± intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

Posição de coleta	Concentração protéica total (g/dl)
P I	1,46 ± 0,16
P II	1,51 ± 0,16
P III	1,54 ± 0,22
P IV	1,43 ± 0,17

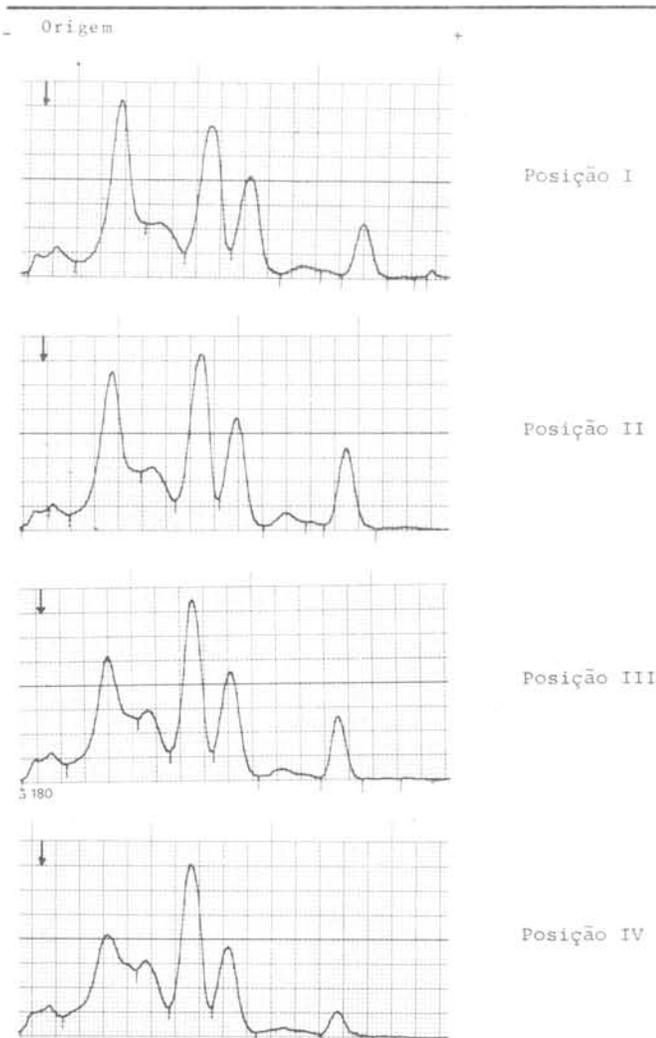


Fig. 3. Curvas densitométricas de extratos de amostras, coletadas nas quatro posições do mesmo peixe.

Diante de tais variações quantitativas, para poder padronizar os dados, determinou-se para este estudo, a posição I para a coleta das amostras de músculo esquelético, por ser a mais fácil de ser determinada no corpo do peixe.

No experimento sobre os efeitos do período de preservação das amostras de músculo esquelético foram obtidos eletroferogramas que diferem quanto a bandas  $I_1$  e  $I_2$  (Fig. 4). Eletroferogramas de porções preservadas por 10 dias apresentaram a banda  $I_2$  justaposta à  $I_1$ , e distinta da  $II_1$ . Aumentando-se o período de preservação para 20 dias, a banda  $I_2$  apresentou um aumento na migração, separando-se nitidamente da  $I_1$  e estando distinta da  $II_1$ ; após 35 dias, a sua migração foi maior ainda, apresentando-se como uma cauda da  $II_1$ . O aumento na migração da banda  $I_2$  com o período de preservação está quantificada através da sua distância relativa (Tab. 8). Quanto à banda  $I_1$ , em eletroferogramas de porções preservadas por 10 dias, apresentou-se justaposta à  $I_2$ , enquanto que, em eletroferogramas de porções preservadas por 20 e 35 dias, apresentou migração menor, estando mais próxima da origem e distinta da  $I_2$  (Fig. 4; Tab. 8).

Diferenças significativas não foram observadas na concentração protéica total de extratos preparados com glicérol-EDTA-Tris pH 8,7, após 10, 20 e 35 dias de preservação do músculo esquelético (Tab. 9).

Tabela 7. Concentração relativa (%) das bandas de eletroferogramas de amostras coletadas de diferentes posições do corpo do peixe

Posição de coleta das amostras		Concentração relativa (%) das bandas							
		$I_1$	$II_1$	$II_2$	$III$	$IV$	$V$	$VI_1+VI_2$	$VII$
Posição I	$\bar{x}$	4,73	29,90*	6,11	8,98	25,15	15,02	2,48	6,34
	$txS\bar{x}$	0,83	3,38	1,52	2,10	1,26	0,59	0,69	1,62
Posição II	$\bar{x}$	5,03	25,02	5,56	10,31	25,36	15,50	2,84	8,80
	$txS\bar{x}$	0,79	1,33	1,41	2,30	1,27	0,64	0,58	2,04
Posição III	$\bar{x}$	6,19	24,99	4,96	11,80	26,69	14,54	2,39	6,35
	$txS\bar{x}$	1,33	0,60	1,58	1,87	1,51	0,58	0,53	1,54
Posição IV	$\bar{x}$	6,96	23,62	7,87	12,32	28,13	13,87	2,10	2,93*
	$txS\bar{x}$	1,40	2,46	1,84	1,56	2,02	0,83	0,65	0,99

$\bar{x}$  = Média de 8 peixes

$txS\bar{x}$  = Intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

\* = Diferença significativa ao nível de 5%

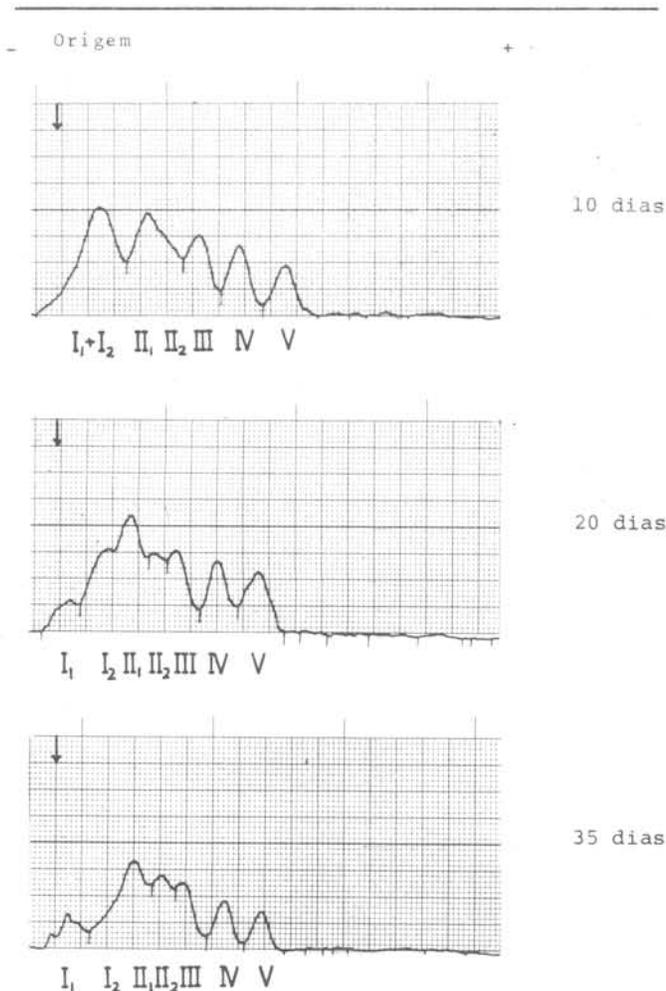


Fig. 4. Curvas densitométricas de extratos de porções de mesma amostra, analisados após 10, 20 e 35 dias de preservação das porções a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Os extratos foram preparados na proporção 1:3 (p:v) com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968).

O experimento sobre método de extração das proteínas de músculo esquelético mostrou que a solução de extração afeta não só a quantidade de proteína extraída como também a conservação dos extratos protéicos.

Na Tabela 10 encontra-se a concentração protéica total dos extratos preparados com diferentes soluções, medida antes e depois da conservação dos extratos em congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 7 dias, e a porcentagem de diminuição na concentração protéica total. Extratos preparados com água destilada apresentaram a menor quantidade de proteína extraída ( $1,83 \pm 0,11$  g/dl) e a maior porcentagem de diminuição na concentração protéica total após a conservação ( $37,87 \pm 16,92\%$ ), enquanto que extratos preparados com

Tabela 8. Distância relativa das bandas  $I_1$  e  $I_2$  de porções analisadas após 10, 20 e 35 dias de preservação, a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Cada valor representa a média de 7 peixes  $\pm$  intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

Período de preservação a $-15^{\circ}\text{C}$	Distância relativa	
	Banda $I_1$	Banda $I_2$
10 dias	-	$0,26 \pm 0,04$
20 dias	$0,0 \pm 0,0$	$0,27 \pm 0,03$
35 dias	$0,06 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,04$

- = Valor não distinto.

Tabela 9. Concentração protéica total de porções analisadas após 10, 20 e 35 dias de preservação, a  $15^{\circ}\text{C}$ . Cada valor representa a média de 8 peixes  $\pm$  intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

Período de preservação a $-15^{\circ}\text{C}$	Concentração protéica total* (g/dl)
10 dias	$3,17 \pm 0,17$
20 dias	$3,31 \pm 0,15$
35 dias	$3,06 \pm 0,18$

(\*) Concentração protéica medida através de refratômetro Atago.

glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 apresentaram a maior quantidade de proteína extraída ( $3,20 \pm 0,15$  g/dl) e relativamente baixa porcentagem de diminuição na concentração protéica total ( $21,18 \pm 10,43\%$ ).

Quanto a eletroferogramas, a conservação dos extratos alterou a concentração relativa das bandas sem, entretanto, alterar o número e a posição relativa das mesmas. Na Tabela 11, encontra-se a concentração relativa das bandas de extratos preparados com diferentes soluções, obtida antes e depois da conservação, e a porcentagem de variação na concentração relativa. A conservação dos extratos a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias, causou a ocorrência de deposição de material corado na origem dos eletroferogramas e, conseqüentemente, aumento na con-

Tabela 10. Concentração protéica total de extratos preparados com diferentes soluções de extração, medida logo após a extração e após conservação dos extratos a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias. A diminuição (%) na concentração foi calculada em relação a dados obtidos logo após a extração. Cada valor representa a média de 8 peixes  $\pm$  intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

Solução de extração de proteínas 1:3 (peso:volume)	Concentração protéica total (g/dL)*		
	Logo após extração	Após conservação do extrato	% de diminuição
Água destilada	1,83 $\pm$ 0,11	1,13 $\pm$ 0,30	37,87 $\pm$ 16,92
Tampão fosfato pH 7,5 $\mu=0,05$ (Connell, 1953)	2,0 $\pm$ 0,09	1,40 $\pm$ 0,42	29,89 $\pm$ 21,05
Cloreto de sódio 0,9%	2,40 $\pm$ 0,13	1,98 $\pm$ 0,11	17,24 $\pm$ 8,01
Glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968)	3,20 $\pm$ 0,15	2,53 $\pm$ 0,37	21,18 $\pm$ 10,43

(\*): Concentração protéica obtida através do refratômetro Atago

Tabela 11. Concentração relativa (%) de bandas de eletroferogramas de extratos preparados com diferentes soluções de extração e analisados com tampão Tris-glicina pH 9,5, antes e depois da conservação a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por uma semana, e % de variação na concentração relativa de cada banda após a conservação

Solução de extração (1:3 p:v)		Concentração relativa (%) das bandas							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
Água destilada	antes	21,85 $\pm$ 6,40	23,97 $\pm$ 5,82	11,14 $\pm$ 1,87	12,71 $\pm$ 1,65	12,35 $\pm$ 2,97	13,54 $\pm$ 0,01	1,58 $\pm$ 0,52	4,07 $\pm$ 1,28
	depois	41,32 $\pm$ 5,07	26,48 $\pm$ 3,83	6,01 $\pm$ 2,32	10,27 $\pm$ 2,77	4,61 $\pm$ 1,14	10,49 $\pm$ 2,24	0,10 $\pm$ 0,24	1,66 $\pm$ 1,17
	% var.	119,99 $\pm$ 89,12	15,80 $\pm$ 21,36	41,79 $\pm$ 27,51	20,39 $\pm$ 14,31	61,46 $\pm$ 8,25	23,38 $\pm$ 11,84	94,34 $\pm$ 13,39	64,24 $\pm$ 23,29
Tampão fosfato pH 7,5, $\mu=0,05$	antes	24,65 $\pm$ 6,59	19,71 $\pm$ 5,35	10,86 $\pm$ 1,97	12,86 $\pm$ 1,60	14,17 $\pm$ 2,72	12,29 $\pm$ 1,02	1,50 $\pm$ 0,84	3,93 $\pm$ 1,38
	depois	35,93 $\pm$ 4,68	24,56 $\pm$ 3,13	6,53 $\pm$ 1,02	11,64 $\pm$ 2,09	4,70 $\pm$ 0,98	10,30 $\pm$ 1,12	0,44 $\pm$ 0,57	2,10 $\pm$ 1,27
	% var.	76,89 $\pm$ 48,19	32,28 $\pm$ 26,90	34,19 $\pm$ 16,64	10,0 $\pm$ 8,70	66,47 $\pm$ 5,64	16,34 $\pm$ 3,83	80,42 $\pm$ 24,38	44,56 $\pm$ 25,61
Cloreto de sódio 0,9%	antes	36,14 $\pm$ 4,32	23,69 $\pm$ 2,18	6,59 $\pm$ 0,89	12,86 $\pm$ 1,35	4,82 $\pm$ 0,86	11,21 $\pm$ 1,10	1,12 $\pm$ 0,68	3,63 $\pm$ 1,64
	depois	52,32 $\pm$ 7,14	17,74 $\pm$ 5,47	6,83 $\pm$ 0,72	8,12 $\pm$ 3,49	0,68 $\pm$ 0,50	13,88 $\pm$ 2,48	0,79 $\pm$ 0,70	4,04 $\pm$ 2,17
	% var.	47,64 $\pm$ 30,57	23,51 $\pm$ 18,31	1,40 $\pm$ 14,96	39,04 $\pm$ 22,82	84,90 $\pm$ 11,66	23,42 $\pm$ 14,17	34,56 $\pm$ 41,09	13,24 $\pm$ 26,69
Glicerol-EDTA-Tris pH 8,7	antes	26,94 $\pm$ 4,08	28,04 $\pm$ 3,49	6,50 $\pm$ 1,39	12,33 $\pm$ 2,69	13,04 $\pm$ 2,89	10,96 $\pm$ 1,29	0,44 $\pm$ 0,31	2,31 $\pm$ 1,17
	depois	34,50 $\pm$ 5,06	26,02 $\pm$ 3,52	5,81 $\pm$ 0,74	13,26 $\pm$ 1,47	6,95 $\pm$ 2,74	10,87 $\pm$ 1,54	0,35 $\pm$ 0,32	2,14 $\pm$ 1,66
	% var.	29,16 $\pm$ 14,40	6,90 $\pm$ 7,85	3,26 $\pm$ 30,17	11,40 $\pm$ 14,97	43,85 $\pm$ 21,54	0,92 $\pm$ 7,29	37,44 $\pm$ 59,51	20,63 $\pm$ 36,26

Cada valor representa a média de oito peixes  $\pm$  intervalo de confiança (nível de significância, 5%)

centração relativa da banda I<sub>1</sub>. Maiores diminuições na concentração relativa foram observadas nas bandas IV e VI. Extratos preparados com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 foram, em geral, os menos afetados pela conservação.

O número de bandas obtido em eletroforese em membrana de acetato de celulose dependeu do sistema de tampão utilizado. Em cada sistema, extratos preparados com diferentes soluções não apresentaram variação no número de bandas, nem na posição relativa das mesmas.

A Figura 5 mostra curvas densitométricas de mesmo extrato, analisado com os sistemas de tampão 1, 2, 3 e 4 (Tab. 2). Em eletroforese realizada com os sistemas 1 e 2, obteve-se eletroferogramas mais compridos, evidenciando maior número de bandas, 8 ou 9, enquanto que, com o sistema 3, evidenciou-se 5 bandas; com o sistema 4, apenas 3 bandas.

Em análises eletroforéticas de mesmo extrato com os sistemas utilizados, somente com o sistema 2, foram obtidos eletroferogramas diferentes, conforme o número de vezes de uso das mesmas soluções-tampão (Fig. 6). Na segunda vez de uso das soluções-tampão, as bandas apresentaram-se mais nítidas que na primeira vez, evidenciando-se a banda II<sub>2</sub> distinta da II<sub>1</sub>; além disso, o comprimento dos eletroferogramas foi relativamente menor, indicando variação na concentração do tampão (Smith, 1968).

A Figura 7 mostra curvas densitométricas do mesmo extrato, analisado sob mesmas condições com diferentes tampões Tris-glicina, sistemas 1, 5 e 6 (Tab. 2). Melhor separação das proteínas foi obtida em eletroforese com o sistema 5, resultando em eletroferogramas mais compridos e com bandas mais nítidas.

O resumo dos resultados obtidos de

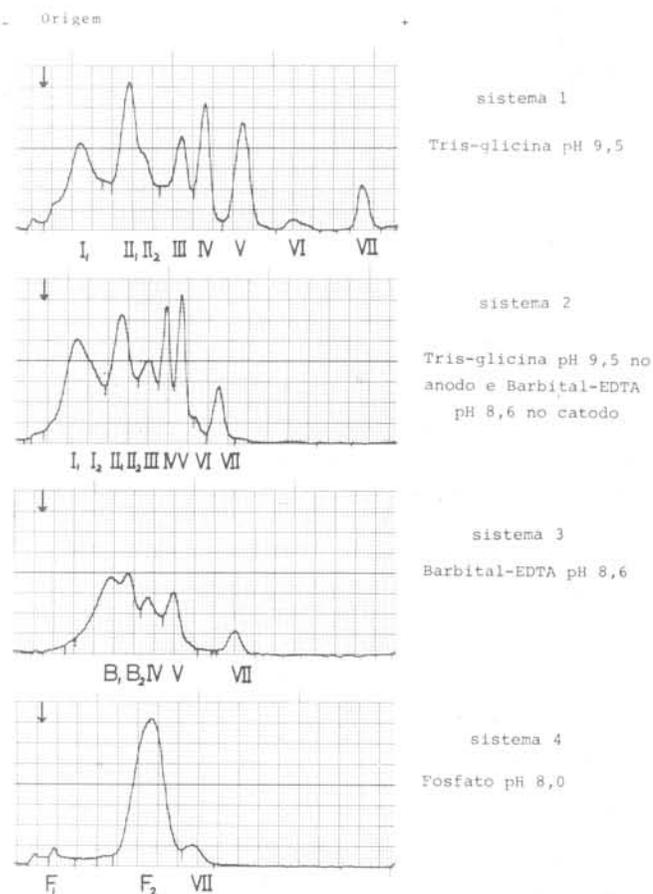


Fig. 5. Curvas densitométricas de mesmo extrato, preparado com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968) e analisado com diferentes sistemas de tampão.

eletroforese em membrana de acetato de celulose, com diferentes sistemas de tampões, encontra-se na Tabela 2.

A Figura 8 mostra eletroferogramas de mesmo extrato analisado em membrana de gel de amido com diferentes sistemas de tampão. Em eletroforese com sistema contínuo 4 as proteínas concentraram-se em única banda, muito próximo à origem (Fig. 8-1). Em eletroforese com os sistemas descontínuos, 7 e 8, obteve-se 8 ou 9 bandas, sendo que o comprimento dos eletroferogramas obtidos com o sistema 7 (Fig. 8-2) foi maior que o dos obtidos com o sistema 8 (Fig. 8-3).

Em eletroforese em gel de amido com um mesmo sistema de tampão, extratos preparados com diferentes soluções não apresentaram variação no número, nem na posição relativa das mesmas.

Eletroforese realizada tanto em membrana de acetato de celulose, como em gel de amido, resultaram ao máximo em 9 bandas.

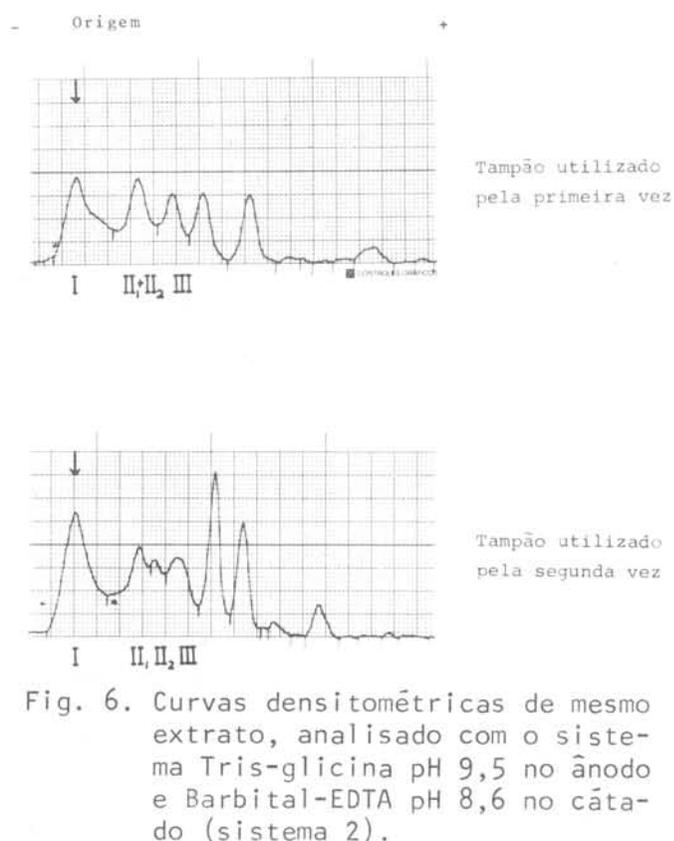


Fig. 6. Curvas densitométricas de mesmo extrato, analisado com o sistema Tris-glicina pH 9,5 no ânodo e Barbital-EDTA pH 8,6 no cátodo (sistema 2).

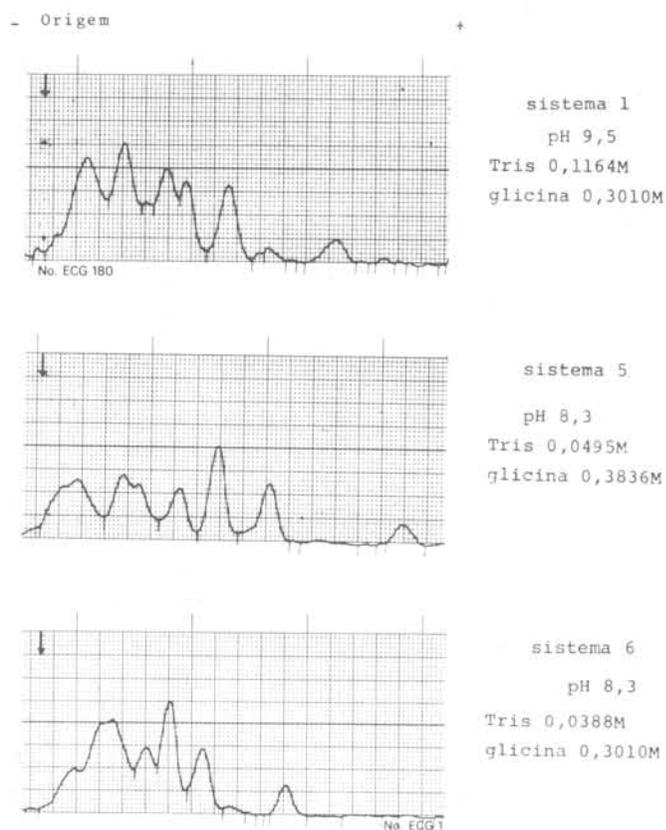


Fig. 7. Curvas densitométricas de mesmo extrato, preparado com glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968) e analisado com diferentes tampões Tris-glicina.

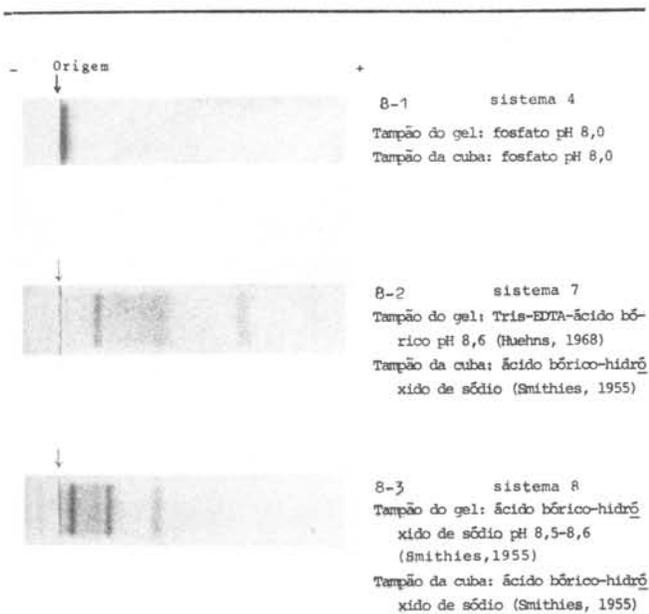


Fig. 8. Eletroferogramas de mesmo extrato, analisado em membranas de gel de amido com diferentes sistemas de tampão e corados por Nigrosina.

## Discussão

Em relação a diferentes regiões do corpo de peixes, Analytical Methods Committee (1966) e Damberg (1963) constataram que os músculos da porção próxima à cabeça em *Gadus morhua* são mais ricos em proteínas que os da mediana ou caudal, e Thurston & MacMaster (1960) encontraram a maior quantidade de proteínas nos da porção mediana de *Hippoglossus stenolepis*. No entanto, amostras de músculo coletadas de diferentes regiões do corpo de *Micropogonias furnieri* apresentaram quantidades de proteínas relativamente constantes.

Através de análise eletroforética, têm sido constatadas variações na composição proteínica de músculos de diferentes regiões do corpo de coelho (Bosch, 1951) e de peixes de água doce (Haen & O'Rourke, 1969). Dentre os peixes marinhos, várias espécies de atum foram estudadas por Tsai & Yang (1975) e nenhuma delas apresentou diferenças nos eletroferogramas de músculo de diferentes regiões do corpo. Eletroferogramas de amostras de músculo de diferentes regiões do corpo de *M. furnieri* apresentaram o mesmo número e posição relativa das bandas. Entretanto, constatou-se variações na concentração relativa de bandas de eletroferogramas de amostras de diferentes regiões do corpo, corro-

borando a importância do uso de amostras de mesma região em estudos sobre proteínas musculares, enfatizada por Haen & O'Rourke (*op. cit.*).

Neste estudo, amostras de músculo de *M. furnieri* preservadas a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 10, 20 e 35 dias apresentaram eletroferogramas que diferem quanto à mobilidade das bandas  $I_1$  e  $I_2$ . O efeito do período de preservação sobre a mobilidade de banda proteínica foi também constatado para eletroferogramas de músculo de *Gadus (Melanogrammus) aeglefinus*, em condições de preservação a  $2^{\circ}\text{C}$  por 1, 4 e 14 dias (Moore *et al.*, 1970). Bechtel & Alves (1973) analisaram eletroforéticamente músculo da mesma espécie aqui estudada e encontraram reprodutibilidade nos eletroferogramas de amostras recém-processadas, refrigeradas e congeladas. No entanto, não especificaram a temperatura nem o período de preservação das amostras, o que não permitiu comparar seus resultados aos obtidos neste trabalho.

A constatação, em *M. furnieri*, de diferentes eletroferogramas apresentados por amostras de músculo de mesmo peixe, porém preservadas por 10, 20 e 35 dias a  $-15^{\circ}\text{C}$ , elimina a possibilidade de essas diferenças serem produtos de diferentes atividades gênicas.

Os critérios geralmente empregados para a classificação das proteínas baseiam-se, essencialmente, na sua solubilidade e composição (Cantarow & Schepartz, 1962). Dentre as proteínas sarcoplasmáticas, as albuminas e as globulinas são solúveis em soluções de baixa força iônica ( $\mu \leq 0,05$ ), sendo que as albuminas são também solúveis em água, enquanto que as globulinas não o são (Connell, 1953; Hamoir, 1955; Cantarow & Schepartz, *op. cit.*; Bushana Rao *et al.*, 1969; Tsuyuki, 1974). Extratos de músculo de *M. furnieri*, preparados com água destilada, apresentaram menor quantidade de proteínas (g/dl), em relação a extratos preparados com as demais soluções sem, entretanto, apresentarem diferenças quanto a número e posição das bandas nos eletroferogramas.

Extratos musculares de *M. furnieri* mantidos a  $-15^{\circ}\text{C}$  por 7 dias apresentaram variações, tanto na concentração proteínica total dos extratos, como na concentração relativa das bandas eletroforéticas. Extratos preparados com glicérol-EDTA-Tris pH 8,7 apresentaram não

só a maior quantidade de proteínas extraídas como, também, baixa porcentagem de variação na concentração protéica total e na concentração relativa das bandas, após conservação. Howlet & Jamieson (1971) utilizaram, em testes rotineiros, extratos musculares de *Sprattus sprattus* preparados com essa solução e congelados por breve período, a  $-15^{\circ}\text{C}$ , obtendo resultados satisfatórios. O fato de os extratos musculares de *M. furnieri* preparados com glicerol-EDTA-Tris serem menos afetados pela congelação pode estar relacionado à natureza dos componentes da solução, desde que o glicerol é um anticongelante e, o EDTA, um componente estável no armazenamento de soluções aquosas (Stecher et al., 1968). Taniguchi (1969) utilizou, para extração das proteínas musculares do gênero *Saurida*, tampão veronal pH 8,6 adicionado de glicerol para manter a estabilidade da solução resultante, e os extratos foram aproveitáveis em análise eletroforética mesmo após 15 dias de preservação entre 0 e  $4^{\circ}\text{C}$ .

Taniguchi & Konishi (1971) observaram que, em eletroforese das proteínas sarcoplasmáticas, o uso da membrana de acetato de celulose é preferível na identificação de espécies do gênero *Auxis*, enquanto que o de gel de amido é na análise de variações intra-específicas em *Auxis rochei*. Entretanto, no experimento para escolha do material de suporte, o número máximo de bandas obtido em eletroferogramas de músculo esquelético de *M. furnieri* foi 9, tanto em membrana de acetato de celulose como em gel de amido. Assim sendo, escolheu-se a membrana de acetato de celulose como material de suporte neste estudo, devido a vantagens, tais como: rápida separação e coloração das bandas, rápida lavagem da membrana, e simplicidade na transparência para a sua conservação, manuseio e densitometria das bandas.

### Resumo

No presente trabalho, foram analisados os efeitos de diferentes posições de coleta e de diferentes períodos de preservação das amostras a  $-15^{\circ}\text{C}$  sobre os eletroferogramas de proteínas gerais do músculo esquelético de *Micropogonias furnieri*, e as condições para extração e a eletroforese das proteínas foram estabelecidas.

Foram comparados o poder de extração e de preservação de 4 soluções: água destilada; cloreto de sódio 0,9%; tampão fosfato pH 7,5  $\mu=0,05$  (Connell, 1953); glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 (Scopes, 1968). As condições de eletroforese foram investigadas, utilizando-se membranas de acetato de celulose com seis diferentes sistemas de tampões e gel de amido com três diferentes sistemas de tampão.

As amostras coletadas de diferentes posições não apresentaram diferenças no número nem na posição relativa das bandas nos eletroferogramas. Foram anotadas alterações nos eletroferogramas conforme o período de preservação das amostras. A solução glicerol-EDTA-Tris pH 8,7 apresentou o maior poder de extração e de preservação. Nos sistemas de tampão testados, o número máximo de 9 bandas foi obtido, tanto em membrana de acetato de celulose como em gel de amido. Melhor separação das proteínas em membrana de acetato de celulose foi obtida com tampão Tris-glicina pH 8,3 (Tris 0,0495M, glicina 0,3836M), e em gel de amido, com tampão do gel constituído por Tris, EDTA e ácido bórico, de pH 8,6 (Huehns, 1968) e tampão da cuba constituído por ácido bórico e hidróxido de sódio (Smithies, 1955).

### Referências bibliográficas

- AMANO, K.; BITO, M. & KAWABATA, T. 1953. Handling effect upon biochemical change in the fish muscle immediately after catch. I. Differences of glycolysis in the frigate mackerel killed by various methods. Bull. Japan. Soc. scient. Fish., 19(4):487-498.
- AMLACHER, E. 1961. Rigor-mortis in fish. In: Borgstrom, G., ed. - Fish as food. New York, Academic Press, v.1, p. 385-409.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE 1966. Nitrogen factor for cod fish. Report prepared by the Fish Products Subcommittee. Analyst, Lond., 91(1085): 540-542.
- BECHTEL, M. A. B. & ALVES, J. L. P. 1973. Identificação de espécies de pescado por eletroforese em acetato de celulose. Sér. Tecnol., (3)-GEDIP. Porto Alegre.

- BHUSHANA RAO, K. S. P.; FOCANT, B.; GERDAY, Ch. & HAMOIR, G. 1969. Low molecular weight albumins of cod white muscle (*Gadus callarias*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 30:33-48.
- BOSCH, M. W. 1951. Quantitative electrophoretic study of rabbit muscle proteins soluble in dilute salt solutions. *Biochem. Biophys. Acta*, 7:61-86.
- CANTAROW, A. & SCHEPARTZ, B. 1962. *Biochemistry*. Philadelphia, Maruzen Asian Edition, 854p.
- CONNELL, J. J. 1953. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. 1. Electrophoretic analysis of codling extracts of low ionic strength. *Biochem. J.*, 54:119-126.
- 1975. The role of formaldehyde as a protein crosslinking agent acting during the frozen storage of cod. *J. Sci. Fd Agric.*, 26:1925-1929.
- DAMBERGS, N. 1963. Extractives of fish muscle. 3. Amounts, sectional distributions, and variations of fat, water-solubles, protein and moisture in cod (*Gadus morhua* L.) fillets. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 20(4):909-918.
- de LIGNY, W. 1969. Serological and biochemical studies on fish populations. *Oceanogr. mar. Biol., A. Rev.*, 7:411-513.
- FUJINO, K. 1969. Atlantic skipjack tuna genetically distinct from Pacific specimens. *Copeia*, (3):626-629.
- 1971. Genetic markers in skipjack tuna from the Pacific and Atlantic Oceans. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 161, section 1:15-18.
- 1976. Subpopulation identification of skipjack tuna specimens from the southwestern Pacific Ocean. *Bull. japan. Soc. scient. Fish.*, 42(11):1229-1235.
- & KANG, T. 1968. Transferrin groups of tunas. *Genetics*, 59:79-91.
- GORNALL, A. C.; BARDAWILL, C. S. & DAVID, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751-766.
- HAEN, P. J. & O'ROURKE, F. J. 1969. Comparative electrophoretic studies of the water-soluble muscle proteins of some Irish freshwater fishes. *Proc. R. Ir. Acad.*, 68, (B7):101-108.
- HAMOIR, G. 1955. Fish proteins. In: Anson, M. L.; Bailey, K. & Edsall, J. T., ed. - *Advances in protein chemistry*, New York, Academic Press, v. 10, p.227-288.
- HOWLET, G. & JAMIESON, A. 1971. A system of muscle esterase in the variants in the sprat (*Sprattus sprattus*). *Rapp. p.-v. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 161, section 2:45-47.
- HUEHNS, E. R. 1968. Starch gel electrophoresis, section 4 Hemoglobins. In: Smith, I., ed. - *Chromatographic and electrophoretic techniques*. William Heinemann Medical Books, v. 2, p.291-319.
- KAWABATA, T. 1953. Studies on trimethylamine oxide-reductase. I. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic condition. *Bull. japan. Soc. scient. Fish.*, 19(4):505-512.
- LOVE, R. M. 1970. *The chemical biology of fishes*. London, Academic Press, 547p.
- MOORE, G. S.; PETERS, H. A. & LEVIN, R. E. 1970. Alterations in the electrophoretic patterns of refrigerated fish. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 27:31-38.
- MORGAN, R. P. & ULANOWICZ, N. I. 1976. The frequency of muscle protein polymorphism in *Menidia menidia* (Atherinidae) along the Atlantic coast. *Copeia*, (2):356-360.
- NUMACHI, K. I. 1972. Genetic polymorphism in enzymes and its research applications in fisheries biology. *The 2nd International Ocean Develop-*

- ment Conference. Preprints (2):1813-1822. Tokyo, October 5-7. Tokyo, Keidanren Kaikan.
- SCOPES, R. K. 1968. Methods for starch gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. An investigation of the relative mobilities of the glycolytic enzymes from the muscles of a variety of species. *Biochem. J.*, 107:139-150.
- SICK, K. 1965a. Haemoglobin polymorphism of cod in the Baltic and Danish Belt Sea. *Hereditas*, 54(2): 19-48.
- 1965b. Haemoglobin polymorphism of cod in the North Sea and North Atlantic Ocean. *Hereditas*, 54(3):49-73.
- SMITH, I. 1968. General principles of zone electrophoresis. *In*: Smith, I., ed. - *Chromatographic and electrophoretic techniques*, v. 2, p. 1-16.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum protein of normal human adults. *Biochem. J.*, 61:629-641.
- STECHER, P. G.; WINDHOLZ, M. & LEAHY, D. S. 1968. *The Merck index. An encyclopedia of chemicals and drugs.* 8th ed. Rahway, N.J., Merck & Co., Inc., 1713p.
- TANIGUCHI, N. 1969. Comparative electropherograms of muscle proteins of three species of lizard fishes referable to the genus *Saurida*. *Bull. japan. Soc. scient. Fish.*, 35(9):885-890.
- TANIGUCHI, N. & KONISHI, Y. 1971. Muscle protein polymorphism in frigate mackerel collected from the coastal region of Kochi Pref., Japan. *Bull. japan. Soc. scient. Fish.*, 37(7):571-576.
- TSAI, H. J. & YANG, R. T. 1975. Electropherograms of muscle extracts of tunas from the waters around Taiwan. *Acta oceanogr. taiwan.*, (5):131-138.
- TSUYUKI, H. 1974. Muscle proteins of fishes. *In*: Florkin, N. & Scheer, B. T., ed. - *Chemical zoology*. New York, Academic Press, v. 3, p. 287-305.
- THURSTON, C. E. & MacMASTER, P. P. 1960. Variations in chemical composition of different parts of halibut flesh. *Fd Res.*, 25:229-236.
- UTTER, F. M.; HODGINS, H. O. & ALLENDORF, F. W. 1974. Biochemical genetic studies of fishes: potentialities and limitations. *In*: Mallins, D. C. & Sargent, J. R., ed. - *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*, London, Academic Press, v. 1, p. 213-238.
- & JOHNSON, A. G. 1972. Biochemical studies of genetics differences among species and stocks of fish. *Rep. int. N. Pacif. Fish. Commn.*, :98-101.

(Recebido 09-maio-1983;  
aceito 10-fev-1984)