

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Monique Reis de Santana^{1*}, Adriadna Souza Santos³, Carlos Henrique De Carvalho Neto², Carlos Priminho Pirovani⁴, Virgínia Lúcia Fontes Soares⁵

1. Estudante de IC da Universidade Estadual de Santa Cruz, Bacharelado em Ciências Biológicas da UESC

2. Estudante de IC da Universidade Estadual de Santa Cruz, Agronomia da UESC

3. Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC

4. Pesquisador da Universidade Estadual de Santa Cruz

5. UESC - Departamento de Ciências Biológicas/ Orientador

Resumo:

O urucum (*Bixa orellana* L.), é uma espécie nativa da América Tropical e comercialmente importante por ser a única fonte do corante natural bixina. Pouco se conhece sobre as enzimas envolvidas na biossíntese da bixina. Assim, a caracterização do proteoma de urucum, auxiliará na elucidação desses processos. A dificuldade encontrada na obtenção de proteínas de sementes de urucum relaciona-se principalmente aos altos níveis de interferentes associados às proteínas no momento de extração, separação e resolução destas em mapas 2D. Por esse motivo, fez-se necessário a otimização de um protocolo que possibilite a extração de proteínas totais de sementes de urucum, para utilização em eletroforese bidimensional. Com um protocolo otimizado, proteínas de alta quantidade e qualidade foram isoladas de sementes de urucum e, por primeira vez, são mostrados padrões de proteínas em eletroforese unidimensional e bidimensional, bem resolvidos, de órgãos vegetais de urucum.

Autorização legal: Número de Protocolo do CGEN: A80CA98

Palavras-chave: Bixina, Delipidação, Proteoma.

Apoio financeiro: FAPESB

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UESC

Introdução:

O urucum (*Bixa orellana* L.), é uma espécie de grande importância econômica por ser a única fonte do corante natural bixina (RIVERA-MADRID et al., 2006), um pigmento encontrado principalmente no pericarpo de suas sementes, conferindo-lhes a coloração vermelha (KOVARY K. et al., 2001). A bixina é um apocarotenóide monometil éster carboxílico, (MERCADANTE; PFANDER, 1997) largamente utilizado nas indústrias têxtil, de cosmético, farmacêutica e de alimentos. A produção comercial tem sido documentada desde 1870 na Europa e nos EUA e seu uso na indústria alimentícia aumentou significativamente no mundo após 1960, com a proibição do uso de vários corantes sintéticos considerados cancerígenos (RODRIGUES et al., 2007). No entanto, pouco se conhece sobre os processos e enzimas envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários em urucum, especialmente de bixina. Assim, a caracterização do proteoma do urucum, auxiliará na elucidação das rotas de biossíntese de bixina e de outros metabólitos secundários

A eletroforese bidimensional (eletroforese 2D) é uma técnica muito eficiente e predominantemente utilizada para estudos de proteoma de plantas (VERLENGIA R. et al., 2012, v.1, p.261). A escolha do método de preparo da amostra, que antecede o processo de eletroforese bidimensional, é essencial para a obtenção de bons resultados em termos quantitativos e qualitativos de proteínas (PIROVANI et al., 2008). A solubilização e separação das proteínas associadas a componentes não proteicos é um dos principais problemas relacionados à resolução e reprodutibilidade dos spots visualizados em mapas 2D (MALDONADO et al., 2008). As sementes de *B. orellana* apresentam altos níveis de compostos que interferem na extração, separação e resolução de proteínas, como polifenóis, polissacarídeos e pigmentos. Dentre estes, destaca-se a bixina que compõe 80% dos componentes totais encontrados nessas sementes (CARVALHO et al., 2016; GARCIA et al., 2012). Isso pode explicar a ausência de dados na literatura para a obtenção de proteínas em quantidade e qualidade e estudos de análise de proteoma a partir da técnica de eletroforese bidimensional.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a otimização de um protocolo de extração de proteínas em sementes de urucum, que envolva o manejo mínimo das amostras e que seja adequado para a comparação de padrões de eletroforese em gel 2D em termos de quantidade de proteínas extraídas, qualidade de imagem e quantidade de spots observados.

Metodologia:

As proteínas de sementes de urucum foram extraídas seguindo o protocolo descrito por Pirovani et al. (2008) (Método A) e Pirovani et al. (2008) com modificações (Métodos B e C). Primeiramente, as sementes de urucum liofilizadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e 7% polivinilpirrolidona. Para o Método A duas repetições (0,2g cada) foram ressuspensas em 1,5mL de acetona gelada e 0,07% 2-mercaptoetanol e centrifugada a 10.000g/ 8 min. a 4°C. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e o precipitado seco a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona e 0,07% 2-mercaptoetanol e sonicado em gelo utilizando o ultra-som Processador (Gex 130, 130W, EUA). A amostra foi centrifugada a 14.000g/8 min. a 4°C. O precipitado foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) 10% em água e 0,07% 2-mercaptoetanol e centrifugado. O precipitado foi lavado com acetona 80% e completamente ressuscendido por sonicação em gelo, centrifugado a 10.000g/8 min. a 4°C e seco a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscendido em 0,8mL de tampão de extração de dodecilsulfato de sódio (SDS) denso e 0,8mL de fenol (tamponado com Tris, pH 8,0). As amostras foram misturadas e centrifugadas a 10.000g/ 15 min a 4°C. A fase superior foi coletada para um tubo tipo Falcon de 15ml e foi adicionado 5 vezes a quantidade coletada de acetato de amônio 1M em metanol e incubadas durante a noite a -20 ° C. As proteínas foram recuperadas por centrifugação a 10.000g/ 15 min. a 4°C, em seguida, lavadas duas vezes com acetato de amônio 1M em metanol e duas vezes com acetona 80%. Por fim o precipitado foi naturalmente seco à temperatura ambiente. Em cada lavagem, a amostra foi centrifugada a 10 000 g e 4 ° C durante 5 min. O precipitado final foi ressuscendido em 800µL de tampão [Uréia 6M; tiourea 2M; CHAPS 2%; azul de bromofenol 0,002%] e estocado a -20°C até o uso. Para o método C, as amostras delipidadas foram submetidas imediatamente a extração com Fenol e SDS-denso. Nos Métodos B e C, o pó seco (0,2g) foi submetido a uma delipidação segundo o protocolo analítico descrito por Rodrigues-Neto et al. (2015). As amostras foram ressuscendidas em 500µL de 1-butanol:clorofórmio (1:9), a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 13.400g/ 5 min a 4°C. Esse procedimento foi repetido. Posteriormente, o precipitado gerado por centrifugação foi lavado duas vezes com 500µL de acetona 100% e centrifugado. Por fim, foi lavado com 500µL de éter de petróleo e centrifugado a 13.400g/ 5 min a 4°C. Após a finalização da delipidação, para o Método B, as amostras foram submetidas a precipitação e extração de proteínas de acordo com o protocolo descrito por Pirovani et al. (2008). Para as amostras do Método C foi realizada a extração das proteínas com fenol/SDS-denso. As proteínas foram quantificadas usando o 2-D Quant Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A primeira dimensão, focalização isoeétrica (IEF), das proteínas foi realizada em um sistema Ettan IPGphor (Ge Healthcare). A segunda dimensão foi realizada em um sistema Ruby SE600 (GE Healthcare) nas seguintes condições: 15mA por 45 min, 40mA/ 30 min, 50mA/ 3h para cada *strip* em temperatura constante de 11°C.

Resultados e Discussão:

O protocolo de extração de proteínas descrito por Pirovani et al. (2008) e aplicado em diferentes materiais vegetais como raiz (BERTOLDE et al., 2014) e folha (PIROVANI et al., 2008) de *Theobroma cacao*, mostrou-se ineficiente quando aplicado às sementes de urucum (*Bixa orellana*). As amostras extraídas com o Método A, apresentaram concentrações de proteínas muito baixas e com pouca visibilidade das bandas do gel unidimensional. Essa dificuldade na extração era esperada, devido aos altos níveis de compostos interferentes presentes em sementes de *B. orellana*, como o pigmento bixina.

Comprovamos que as sucessivas lavagens com ácido tricloroacético (TCA) em acetona para a precipitação de proteínas (Método A), não foram suficientes para a remoção da grande quantidade de pigmentos presentes nas sementes de urucum. Além disso, a baixa concentração de proteínas obtidas usando o Método A é, provavelmente, um resultado da quantidade de lavagens necessárias para a remoção destes pigmentos. A grande quantidade de proteínas perdidas durante estas lavagens foi, provavelmente, um dos fatores que impossibilitaram a visualização de bandas em gel de poliacrilamida 12%. Em função disso, houve a necessidade de buscar outros métodos que possibilitassem a extração de proteínas em quantidade e qualidade de sementes de urucum.

De acordo com Mastro (1999), a utilização de solventes orgânicos para remoção da quantidade excessiva de lipídios, torna-se uma alternativa mais viável quando uma grande quantidade de detergentes é necessária para a remoção destes lipídios. Diante disso, a delipidação das amostras foi realizada e uma combinação de solventes orgânicos foi utilizada na tentativa de eliminar a maior quantidade possível de pigmentos. Estes pigmentos são lipossolúveis (LIMA et al., 2001) , assim, ao retirar os lipídeos por meio da delipidação, retiramos também os pigmentos. Os Métodos B e C corroboraram que com a delipidação foi possível realizar a remoção da maior parte dos pigmentos presentes na amostra. Como observado na Fig. 1, as amostras cujo os pigmentos foram removidos por delipidação, apresentaram um precipitado muito mais claro.

As concentrações de proteínas extraídas utilizando os Métodos B e C mostraram que as metodologias foram eficientes na obtenção de proteínas em quantidade para a aplicação da técnica de eletroforese bidimensional. No gel unidimensional, além das bandas de proteínas extraídas com estes métodos, foi observado um arraste característico da presença de componentes não proteicos nas amostras. Uma vez que, este arraste mostra-se mais intenso nas amostras do Método C, podemos constatar que a delipidação sozinha não é suficiente para remoção de contaminantes.

Apenas os métodos B e C apresentaram quantidade de proteínas suficiente (entre 350 e 500 µg) para a realização da técnica de eletroforese em gel bidimensional. Nos géis 2D das amostras submetidas ao Método C, não foi observada uma distribuição ampla dos spots. Isso pode estar relacionado com a presença

de lipídios, que se ligam às proteínas reduzindo a solubilidade e afetando sua migração durante a focalização isoelétrica, alterando também seu peso molecular (VERLENGIA et al., 2012). Além disso, Islam et al. (2004) observou que altos níveis de compostos interferentes presentes em folhas de arroz (*Oryza sativa* L. japonica) prejudicaram a eletroforese bidimensional, mostrando um alto grau de marcas horizontais e uma fraca resolução de spots de proteínas nos géis, assim como observado nos géis de eletroforese bidimensional carregados com proteínas extraídas utilizando o Método C.

Como observado em outros trabalhos (ISLAM, 2004; MASTRO, 1999; WANG, 2003;) a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) em acetona, para remover contaminantes não proteicos, melhora a extração e solubilização de proteínas. Quando comparados os géis obtidos com os Métodos de extração B e C, as repetições B1 e B2, que foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) em acetona, apresentaram uma melhor resolução e distribuição das manchas de polipeptídeo em pH variando de 3,0 a 10,0 (Figura 1). Isso ocorre porque, as lavagens com ácido tricloroacético (TCA) em acetona realizadas nas amostras submetidas à esse método de extração contribuíram para a eliminação de componentes interferentes, que não foram eliminados durante o processo de delipidação realizada no Método C.

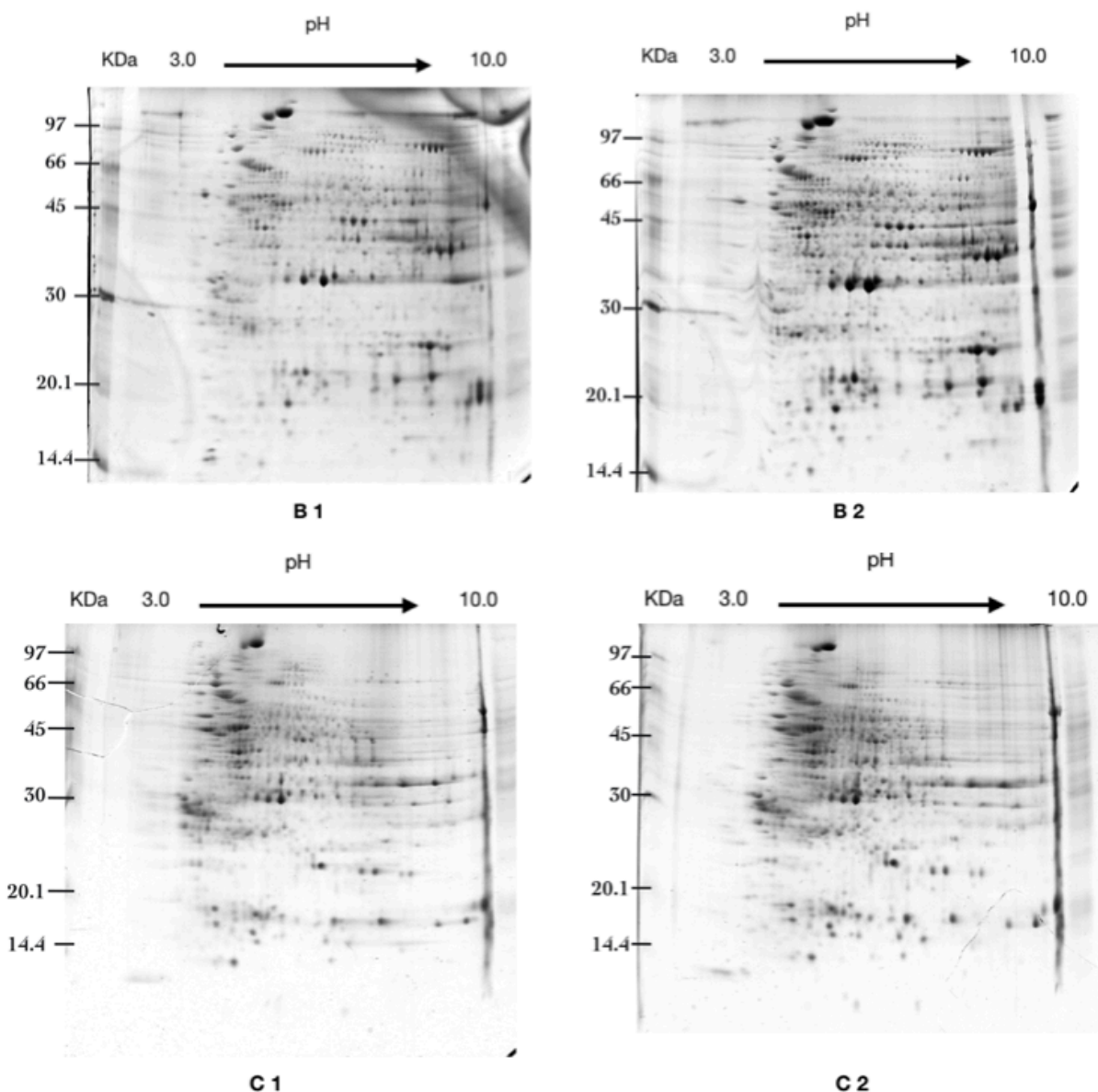


Figura 1: Padrões representativos de eletroforese 2D de proteínas de semente de urucum. Método B, repetições 1 (B1) e 2 (B2) e Método C, repetições 1 (C1) e 2 (C2). Cada gel foi carregado com 500 mg de proteína total e corado com Coomassie *blue*.

A maior quantidade de proteínas de maior e menor peso molecular presentes nos géis carregados com amostras extraídas pelo Método B confirmam que este método foi mais eficiente na obtenção de proteínas em quantidade e qualidade, uma vez que a resolução e migração das proteínas nos géis 2D das repetições C1 e C2 foi prejudicada devido a maior quantidade de interferentes na amostra.

Conclusões:

As modificações realizadas no protocolo possibilitam a remoção da maior quantidade de compostos interferentes presentes nas sementes de urucum, proporcionando a melhor solubilização e resolução de proteínas na aplicação da técnica de eletroforese bidimensional. Apresentamos um protocolo otimizado para a extração de proteínas que proporcionará uma nova oportunidade para comparar os padrões proteômicos do urucum, permitindo aumentar os conhecimentos sobre as rotas de biossíntese de metabólitos secundários, especialmente bixina.

Referências bibliográficas

- BERTOLDE, F. Z. et al. **Efficient method of protein extraction from Theobroma cacao L. roots for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analyses.** Genetics and Molecular Research, 2014. 13, 5036–5047.
- CARVALHO, P. et al. **Concentração de lípidos, carotenóides totais, geranylgeraniol e tocotrienol em diferentes acessos de urucum (Bixa orellana L.) da coleção do Instituto Agronômico (IAC).** Bragantia, Campinas, 2010. 69, 519–524. Disponível em: <<https://www.ourucum.com.br>>. Acesso em: 28 abr. 2017.
- GARCIA, C. E. et al. **Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como antioxidantes em produtos cárneos.** Ciência Rural, 2012. 8, 1510-1517.
- ISLAM, N. et al. **Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis.** Proteomics, 2004. 4, 1903–1908.
- KOVARY, K. et al. **Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species.** British Journal of Nutrition, 2001. 85, 431.
- LIMA, A, et al. **Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2001. 38, 196- 200
- MALDONATO, A. M. et al. **Evaluation of three different protocols of protein extraction for Arabidopsis thaliana leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis.** Journal of Proteomics, 2008. 71, 461–472.
- MASTRO, R.; HALL, M. **Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis.** Analytical Biochemistry, 1999. 273, 313–5.
- MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. **Isolation and Identification of New Apocarotenoids from Annatto (Bixa orellana) Seeds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. 45, 1050–1054.
- PIROVANI, C. P. et al. **Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophthora perniciosa, the causal agent of the witches' broom disease.** Electrophoresis, 2008. 29(11), 2391–2401.
- RIVIERA-MADRID, R. et al. **Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (Bixa orellana L.).** Scientia Horticulturae, 2006. 109, 165–172.
- RODRIGUES, S. M. et al. **Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (Bixa orellana L.).** Molecular Biotechnology, 2007. 37, 220–224.