

Interferência na quantificação de proteínas em cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio semi-sólido contendo glicose

Renata Jorge da Silva¹
Marília Penteado Stephan²
Kátia Regina dos Santos Teixeira³

Introdução

Um dos parâmetros indicativos de multiplicação de microrganismos em cultivos é o acúmulo de proteínas ao longo do tempo.

Diversos métodos espectrofotométricos podem ser utilizados para a quantificação de proteínas (LOWRY et al., 1951; ITZHAKI e GILL, 1964; BRADFORD, 1976; SMITH et al., 1985). Porém, a maioria apresenta interferência de reagentes utilizados para extração de proteínas e outros compostos, como detergentes, polímeros e ácidos, como tampões (CHAPS, Tris, MOPS, etc), além de outras substâncias presentes em amostras de fluídos biológicos e em meios de cultivo, como açúcares e diversos sais (JI et al., 1973; KROHN, 2001; BARBOSA et al., 2009). Para determinar a atividade específica "in vitro" de uma enzima, é essencial determinar em que quantidade ela está presente em uma reação. O método de Lowry foi validado para quantificação de proteínas em culturas

de bactérias diazotróficas cultivadas em diversos meios de cultivo semi-sólido (GUEDES et al., 2007).

Embora um dos grandes problemas do método de Lowry seja a susceptibilidade da reação à interferência de inúmeros compostos, dentre eles os açúcares, não foi detectada interferência da quantificação de proteínas em cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio LGI-P semi-sólido, na presença de 100 g de açúcar cristal como fonte de carbono. No entanto, recentemente, durante cultivo de *G. diazotrophicus* em meio contendo sais de LGI-P suplementado com 50 g L⁻¹ de glicose, a aplicação do método de Lowry para dosagem de proteínas foi prejudicada devido à presença de agentes interferentes. Em decorrência disso, este comunicado técnico apresenta observações sobre os efeitos interferentes da glicose, e fornece subsídios para uma abordagem alternativa para dosagem de proteínas, quando glicose estiver presente no meio de cultivo em determinadas condições.

¹ Bolsista de Iniciação Científica - PIBIC - Graduação em Química, UFRRJ. E-mail: renata_jsilva@yahoo.com.br.

² Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br.

³ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. BR 465, Km 7, Seropédica, RJ. E-mail: katia@cnpab.embrapa.br.

Ação interferente de glicose na determinação de proteína pelo método de Lowry

A interferência da glicose foi evidenciada durante o preparo da curva de calibração, com diferentes concentrações de Albumina de Soro Bovina (BSA), em meio contendo sais de LGI-P e suplementado com 50 g L^{-1} de glicose, e em sua utilização como ponto de referência de diferentes concentrações de proteínas.

A curva de calibração foi preparada conforme recomendado por Guedes et al. (2007). Porém, foi observada a formação de produto com cor que variou de ferrugem a marrom escuro, logo após adição de NaOH nas amostras de referência (0 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e aquecimento a 65°C (Fig. 1A).

O uso de uma alíquota da amostra de referência sem adição de BSA (também considerado o "Branco" da reação), utilizado como um dos pontos de referência para a calibração do método, resultou na formação de uma cor azul escuro intensa, na presença de meio líquido e também de semi-sólido contendo glicose, ao contrário da cor azulada de tons variáveis observada na curva de calibração preparada em meio LGI-P (Fig. 1B).

Diante dos dados experimentais apresentados, o método de Lowry não deve ser aplicado para quantificação de proteínas em culturas de *G. diazotrophicus* em meio semi-sólido contendo 50 g L^{-1} de glicose. Isso se deve ao fato de açúcares,

principalmente os redutores, entrarem em reação com o reagente cúprico e o reativo de Folin-Ciocalteu, principal constituinte do reagente de Lowry, produzindo um falso positivo (ZAIA et al., 1998). É importante salientar que não foram realizados testes adicionais para determinar a concentração mínima de glicose que interfere na quantificação de proteínas pelo método de Lowry nas condições experimentais aplicadas neste estudo.

Teste do método de Bradford como alternativa para quantificar proteínas em presença de meio semi-sólido contendo glicose

Como alternativa ao método de Lowry foi testado o método de Bradford, considerado mais resistente à ação de agentes interferentes e que apresenta maior sensibilidade em relação ao nível de detecção da proteína (ZAIA et al., 1998; GEORGIU et al., 2009).

De acordo com diversos autores, o método de Bradford pode ser utilizado em presença de diversos sais e açúcares, inclusive 10% de sacarose e 1M de glucose (KROHN, 2001; ANTHARAVALLY et al., 2009).

Para a curva de calibração, foram preparados diversos pontos de referência, tendo sido utilizados $100 \mu\text{L}$ de soluções de BSA de concentrações pré-definidas ($100 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguidos de adição de $400 \mu\text{L}$ de meio semi-sólido contendo sais de LGI-P, suplementado com glicose 50 g L^{-1} e pH inicial 5,5. Posteriormente, as amostras de referência foram tratadas com 1 volume de NaOH 1N e aquecidas em banho-maria a 65°C .

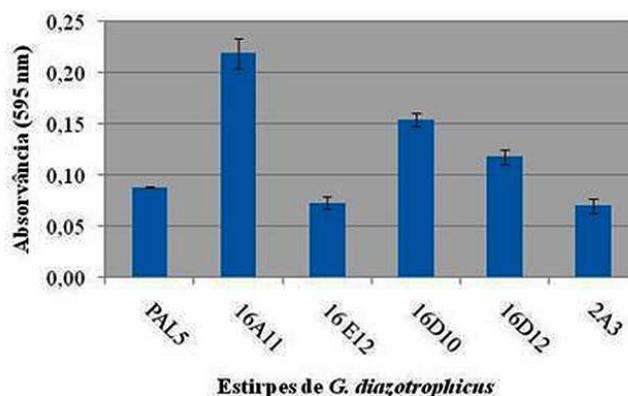


Fig. 2. Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford em culturas de *G. diazotrophicus* sete dias após inoculação em meio semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementado com 50 g L^{-1} de glicose.

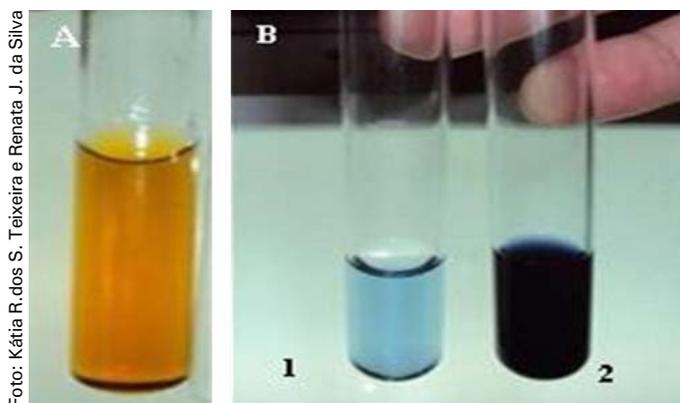


Fig. 1. Preparação da amostra (A) e reação de Lowry (B) em meio semi-sólido contendo sais de LGI-P suplementados com 100 g L^{-1} de açúcar cristal (1) ou 50 g L^{-1} de glicose (2). As imagens apresentadas se referem ao comportamento observado em relação ao ponto de referência zero (sem BSA), considerado o Branco da reação.

A complexação do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 com a proteína ocorreu após a adição de 5 mL de reagente de Bradford e a dosagem de proteína foi feita imediatamente, em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 595 nm.

Os valores obtidos variaram linearmente entre as concentrações de proteínas do padrão, conforme observado pelo valor de coeficiente de correlação da reta (R^2), que foi de 0,989.

O método de Bradford permitiu quantificar proteínas em culturas com sete dias de incubação (Fig. 2). No entanto, foram observadas interferências durante a quantificação de proteína em culturas de estirpes coletadas entre o terceiro e quinto dia de cultivo.

Em ambos os casos, as culturas foram submetidas ao tratamento com NaOH 1M, na proporção de 1:1, homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria, a 65°C por 30 min. Porém, nas amostras coletadas entre o terceiro e quinto dia de cultivo, logo após a adição de NaOH, ocorreu a formação de coloração marrom ferrugem, como descrito durante a preparação da curva de calibração do método de Lowry. Outra observação foi a formação de precipitado, poucos minutos após a homogeneização, o que também interferiu na quantificação. Relatos encontrados em revisões de literatura têm indicado que esse método também está sujeito a interferências de agentes surfactantes e caotrópicos entre outros, principalmente aqueles utilizados no preparo de extratos proteicos para isoeletrofocalização (KROHN, 2001; CHIAL e SPLITTGERBER, 1993).

Avaliação de possíveis interferentes na quantificação pelo método de Bradford

Para identificar qual(ais) fator(es) presente(s) na cultura interfere(m) na dosagem de proteínas, foram realizadas curvas de calibração em presença de sais em meio contendo diferentes concentrações de glicose e em dois pHs distintos: pH 5,5 (correspondente ao inicial do meio em que a bactéria é inoculada) e pH 3,5 (correspondente ao observado durante a condição de cultivo, após o crescimento da bactéria).

As soluções foram tratadas com NaOH 1M, na proporção de 1:1, como descrito no item 2, e

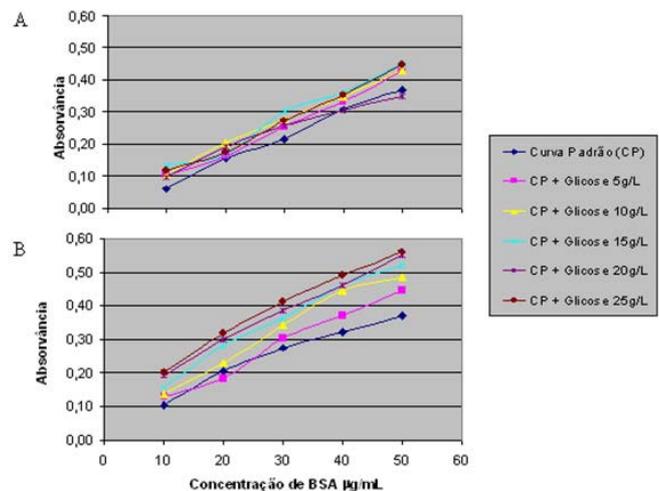


Fig. 3. Influência do pH 5,5 (A) e pH 3,5 (B) sobre a quantificação de proteínas em presença de diferentes concentrações de glicose.

incubadas em banho-maria, a 65°C, por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi realizada com 400 µL de solução a ser testada, 100 µL dos padrões de BSA e 5mL de reagente de Bradford.

Houve efeito do pH sobre o potencial de interferência da glicose (figura 3A e 3B). Em pH 3,5, houve uma crescente elevação de absorvância, concomitante à elevação da concentração de glicose em solução. Isso se deve, possivelmente, ao fato da mesma apresentar-se suscetível ao estabelecimento de reação com o reagente de Bradford em condições de baixo pH. Por outro lado, pode ser observado que, em pH 5,5, a glicose apresentou efeito interferente mínimo, nas diversas concentrações de glicose testadas, diferindo, entretanto, da curva padrão na ausência de glicose.

Os resultados mostram que a glicose, mesmo em concentração inferior à citada na literatura, foi identificada como principal interferente na dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford em cultivos semi-sólidos.

Para entender o mecanismo de reação desse método colorimétrico, é importante esclarecer que o corante Coomassie Brilhant Blue G-250 se liga efetivamente aos aminoácidos com grupos radicais básicos ou aromáticos de polipeptídeos, quando está em suas formas neutras e aniônicas (cor verde e azul). No entanto, em solução em meio ácido, a forma predominante do corante é a protonada, que apresenta cor avermelhada e absorve luz em comprimento de onda de 470 nm. Portanto, quando ocorre complexação das formas verde e azul com as proteínas, por interações hidrofóbicas e

eletrostáticas, há alteração de absorvância no comprimento de 595 nm (CHIAL e SPLITTGERBER, 1993; GEORGIU et al., 2008).

Uma nota técnica publicada recentemente comprovou o poder sequestrante da glicose, da sacarose e de outros açúcares sobre o reagente de Bradford, durante a formação do complexo Coomassie - protein (BANIK et al., 2009). No entanto, esse efeito pode ter sido maior do que o observado anteriormente, devido à influência do pH. Durante a quantificação de proteínas nas culturas utilizadas como amostras, a influência pode ter sido direta ou indireta, considerando que, durante o cultivo em presença de glicose, *G. diazotrophicus* é capaz de produzir ácidos glicônicos e cetoderivados (STEPHAN et al. 1991). O ácido glicônico é termoestável e apresenta um poder quelante semelhante ou melhor que EDTA e NTA, em pH alcalino, sendo portanto capaz de quelar cálcio e outros íons metálicos di e trivalentes (RAMACHANDRAN et al., 2006).

Conclusões

A glicose interfere na quantificação de proteínas pelo método de Bradford quando sob acidificação do meio de cultivo semi-sólido.

Em pH 3,5, ocorre efeito interferente da glicose, desde a concentração mínima de 5 g L⁻¹.

O efeito interferente é menor em pH 5,5. Portanto, em cultivos semi-sólidos, onde não há alteração no pH ou acidificação significativa do meio, o método de Bradford pode ser utilizado para quantificação de proteínas, desde que a curva de calibração seja feita em presença de glicose.

Referências Bibliográficas

- ANTHARAVALLY, B. S.; MALLIA, K. A.; RANGARAJ, P.; HANEY, P.; BELL, P. A. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 385, p. 342-345, 2009.
- BANIK, S. P.; PAL, S.; GHORAI, S.; CHOWDHURY S.; KHOWALA, S. Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 386, n. 1, p.113-115, 2009.
- BARBOSA, H.; SLATER, N. K. H.; MARCOS, J. C. Protein quantification in the presence of poly(ethylene glycol) and dextran using the Bradford method. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 395, p. 108-110, 2009.
- 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**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHIAL, H. J.; SPLITTGERBER, A. G. A Comparison of the binding of coomassie brilliant blue to proteins at low and neutral ph. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 213, n. 2, p. 362-369, September 1993.
- GEORGIU, C. D.; GRINTZALIS, K.; ZERVOUDAKIS, G.; PAPAPOSTOLOU, I. Mechanism of coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, New York, v. 391, p. 391-403, 2008.
- GUEDES, H. V.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. **Quantificação de proteínas totais de bactérias diazotróficas crescidas em meio de cultivo semi-sólido**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007 (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 95).
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 9, p. 401-410, 1964.
- Jl, T. H. Interference by detergents, chelating agents, and buffers with the Lowry protein determination. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 52, n. 2, p. 517-521, 1973.
- KROHN, R. I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- LOWRY, O. H.; NIRA, J.; ROSENBROUGH, A.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-276, 1951.
- RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. **Food Technology Biotechnoly**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. H.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOIKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 150, p. 76-85, 1985.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTÍNEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, p. 67-72, 1991.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n. 6, p. 787-793, 1998.

Comunicado Técnico, 121

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agrobiologia
Endereço: BR465, km7 - Caixa Postal 74505
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br
1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares



Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek
Secretária-Executiva: Carmelita do Espírito Santo
Membros: Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.

Expediente

Revisão de texto: Stefan Schwab e José Ivo Baldani
Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo
Tratamento das ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia