

**COMPARAÇÃO DE DUAS
SOLUÇÕES EXTRATORAS NA RESOLUÇÃO
DE CINCO SISTEMAS EMZIMÁTICOS
EM FOLHAS JOVENS DE CUPUAÇUZEIRO**

(Theobroma grandiflorum Schum.)

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

**Dante Daniel Giacomelli Scolari
Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha
José Roberto Rodrigues Peres**

Chefia da Embrapa Amazônia Oriental

**Emanuel Adilson Souza Serrão - Chefe Geral
Jorge Alberto Gazel Yared - Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Antonio Carlos Paula Neves da Rocha - Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio
Antonio Ronaldo Teixeira Jatene - Chefe Adjunto de Administração**

**COMPARAÇÃO DE DUAS
SOLUÇÕES EXTRATORAS NA RESOLUÇÃO
DE CINCO SISTEMAS ENZIMÁTICOS
EM FOLHAS JOVENS DE CUPUAÇUZEIRO
(*Theobroma grandiflorum* Schum)**

Maria Rosa Costa
José Maria Demetrio Gaia
Marli Costa Poltronieri



Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (91) 276-6653, 276-6333

Fax: (91) 276-9845

e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

Caixa Postal, 48

66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente

Joaquim Ivanir Gomes

Antonio de Brito Silva

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Antonio Pedro da S. Souza Filho

Maria de N. M. dos Santos – Secretária Executiva

Expedito Ubirajara Paixoto Galvão

Revisores Técnicos

Gláucia Salles Cortopassi Buço – Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia

Márcio de Carvalho Moretzrohu – Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia

Osmar Alves Lameira – Embrapa Amazônia Oriental

Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira

Normalização: Rosa Maria Melo Dutra

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

COSTA, M.R.; GAIA, J.M.D.; POLTRONIERI, M.C. **Comparação de duas soluções extratoras na resolução de cinco sistemas enzimáticos em folhas jovens de cupuaçuzeiro** (*Theobroma grandiflorum* Schum). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 17p. (Embrapa Amazônia Oriental. Circular Técnica, 4).

ISSN 1517-221X

1. Cupuaçu – Folha – Extração de enzima. 2. Eletroforese de isoenzima. 3. Substância extratora. I. Gaia, J.M.D., colab. II. Poltronieri, M.C., colab. III. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental (Belém, PA). IV. Título. V. Série.

CDD: 634.65

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
METODOLOGIA	6
BANDEAMENTO IZOENZIMÁTICO	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

COMPARAÇÃO DE DUAS SOLUÇÕES EXTRATORAS NA RESOLUÇÃO DE CINCO SISTEMAS ENZIMÁTICOS EM FOLHAS JÓVENS DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum* Schum)

Maria Rosa Costa¹
José Maria Demétrio Gaia²
Marli Costa Poltronieri¹

INTRODUÇÃO

O Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd Spreng) (Schum)) é uma espécie de grande importância no contexto socioeconômico do Estado do Pará. Coleções desta espécie são mantidas em banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, com a finalidade de conservar a diversidade genética e disponibilizar genótipos para programas de melhoramento genético.

Uma das maneiras de se caracterizar coleções de germoplasma é através da eletroforese de isoenzimas. Esta técnica consiste na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico (Alfenas et al. 1991).

A etapa de extração das enzimas, utilizando soluções denominadas de extratoras, é uma das mais importantes da técnica de eletroforese, visto que o uso de métodos inadequados compromete os passos subsequentes.

Um dos maiores problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos, liberados durante a trituração do tecido.

¹Eng.- Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66.017-970-Belém, PA.

²Pós-graduando da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará-FCAP, Caixa Postal 917, CEP 66077-530, Belém, PA.

Métodos de extração devem ser desenvolvidos de modo a separar especificamente fenóis das proteínas e, ao mesmo tempo, prevenir a oxidação dos compostos fenólicos (Alfenas et al. 1991).

A composição da solução extratora e o tipo de tecido a ser utilizado devem ser previamente determinados, para que se obtenha o máximo de atividade enzimática no extrato.

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de duas soluções extradoras na resolução de cinco sistemas enzimáticos, visando otimizar o protocolo de extração de isoenzimas de cupuaçuzeiro.

METODOLOGIA

Foram utilizadas amostras de folhas jovens de 20 clones de cupuaçuzeiro, coletadas no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, as quais foram acondicionadas em sacos de plástico e colocadas em isopor com gelo. O extrato foi obtido triturando-se manualmente 50 mg de tecido foliar, em almofariz e pistilo previamente resfriados. Utilizou-se 1 ml de solução tampão de extração, 70 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e nitrogênio líquido, suficiente para congelar o tecido foliar. Em seguida as amostras trituradas foram transferidas para tubos de Eppendorf (1,5 ml) e submetidas à centrifugação por 40 minutos, em rotação de 15.000 rpm, a 4°C, para separar o extrato enzimático do precipitado vegetal. Após esta etapa, as amostras foram aplicadas em géis de poliácridamida (vertical) e submetidas à eletroforese, sob condições de 16 mA e 250 V, a temperatura de 4°C durante 4 a 6 horas. As isoenzimas foram reveladas através de corantes histoquímicos específicos, sendo utilizados os seguintes sistemas: Diaforase, Aspartato Amino Transferase, Menadiona Redutase, Fosfatase Ácida e Fosfoglicose Isomerase. Os sistemas tampão gel-eletrodo e de coloração foram os citados por Tsumura et al. (1990). As composições das soluções extradoras utilizadas encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1. Composição da solução extratora zero (0).

Componentes		Quantidade
Solução 1	Trizma preset pH 7,5	7,54 g
	EDTA	560 mg
	H ₂ O	100 ml
	Glicerol	126 g
	H ₂ O (q.s.p.)	250 ml
Solução 2	Tween 80	7,88 g
	H ₂ O (q.s.p.)	250 ml
Solução 3	DTT	9,26 mg/ml
Solução 4	NAD	6 mg/ml
Solução 5	NADP	6,6 mg/ml
β-mercaptoetanol		0,07 ml
BSA		12 mg

Fonte: Tsumura et al. (1990).

*As soluções, o β-mercaptoetanol e o BSA foram misturados na proporção: 14:6:6:2:2: 0,14:24 para 20 amostras.

TABELA 2. Composição da solução extratora um (1).

Componentes (concentração final)	Quantidade
Fosfato de sódio monobásico dihidratado	0,6 g
Sacarose (0,2 M)	7 g
PVP-40 (2,56%)	2,56 g
DTT (3mM)	50 mg
L-Ácido ascórbico (5,7 mM)	100 mg
DIECA (trihidratado)	109, 514 mg
Bisulfito de sódio (2,6 mM)	130, 674 mg
Borato de sódio (2,5 mM)	50 mg
β-mercaptoetanol (0,2%)	0,2 ml
H ₂ O (q.s.p.)	100 ml

Modificado de Alfenas et al. 1991.

BANDEAMENTO IZOENZIMÁTICO

Para a enzima Aspartato Amino Transferase (AAT), houve bandeamento indicando atividade enzimática, em todos os indivíduos analisados, nas duas soluções extratoras utilizadas. As bandas de Aspartato Amino Transferase, provenientes do tratamento com a solução zero, foram mais nítidas e de melhor resolução (Fig. 1).

Géis corados para a enzima Menadiona Redutase (MNR) apresentaram arraste utilizando a solução extratora zero. Tal fato pode ser atribuído à ocorrência de degradação de proteínas durante o processo de extração (Alfenas et al. 1991). Para a solução extratora 1, a resolução foi um pouco melhor, em relação ao arraste. As duas soluções foram eficientes, com nítido bandeamento na maioria dos indivíduos analisados (Fig. 2).

Para a enzima Diaforase (DIA), houve bandeamento indicando atividade enzimática para a maioria dos indivíduos analisados, com as duas soluções extratoras. Em relação ao arraste, a solução zero foi um pouco melhor (Fig. 3).

O bandeamento obtido com a solução zero para a enzima Fosfatase Ácida (ACP) foi de atividade máxima, indicando eficiência no componente removedor de fenóis presentes no tecido vegetal. A nitidez do bandeamento com a solução 1, foi menos eficiente, havendo presença de bandas fracas no gel (Fig. 4).

Géis corados para Fosfoglucoase Isomerase (PGI) com a solução extratora 1, formaram manchas que dificultaram a visualização das bandas, indicando baixa eficiência na extração. Com a solução extratora zero houve bandeamento, porém pouco nítido, com a presença de bandas fracas e baixa atividade enzimática (Fig. 5).

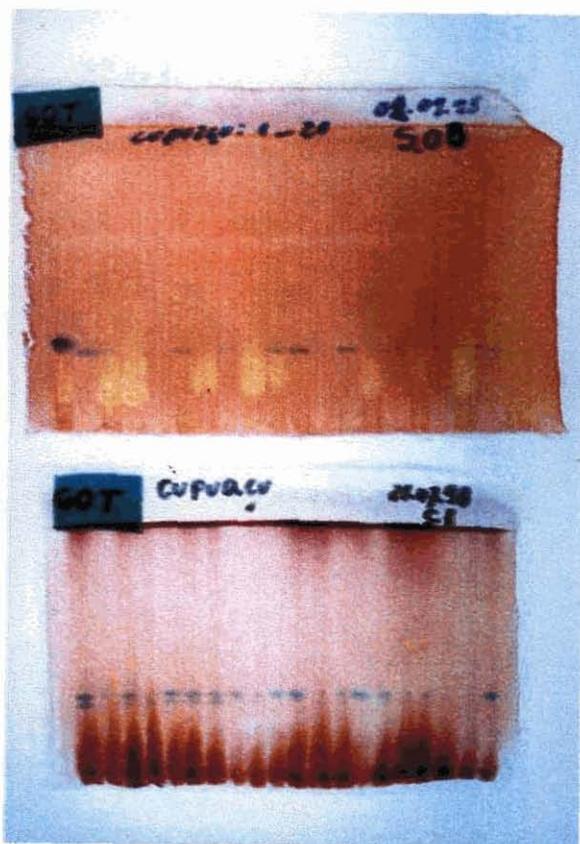


FIG. 1. Bandejamento isoenzimático para 20 amostras de cupuaçuzeiro utilizando dois tipos de solução de extração (solução zero S.0-gel superior e solução um S.1-gel inferior), em Aspartato Amino Transferase.

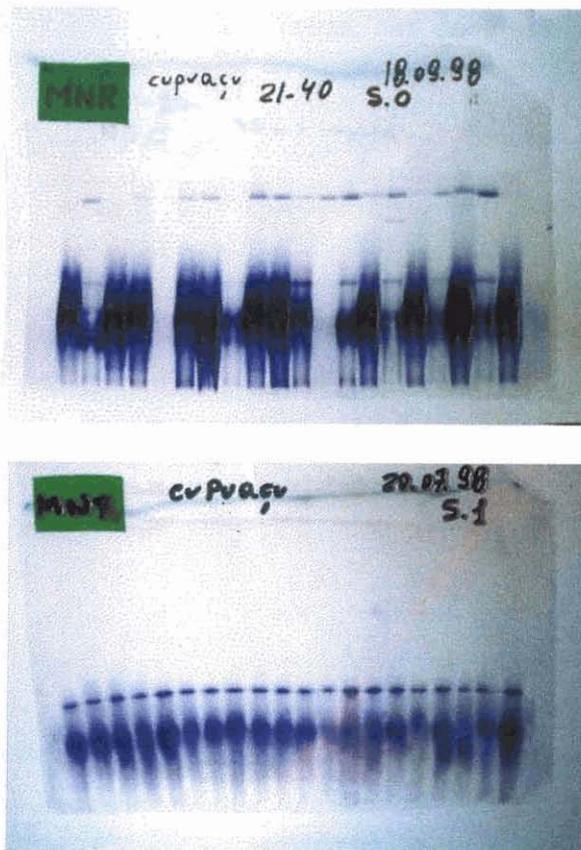


FIG. 2. Bandeamento isoenzimático para 20 amostras de cupuaçuzeiro, utilizando dois tipos de solução de extração (solução zero -S.0 e solução um -S.1), para Menadiona Redutase.

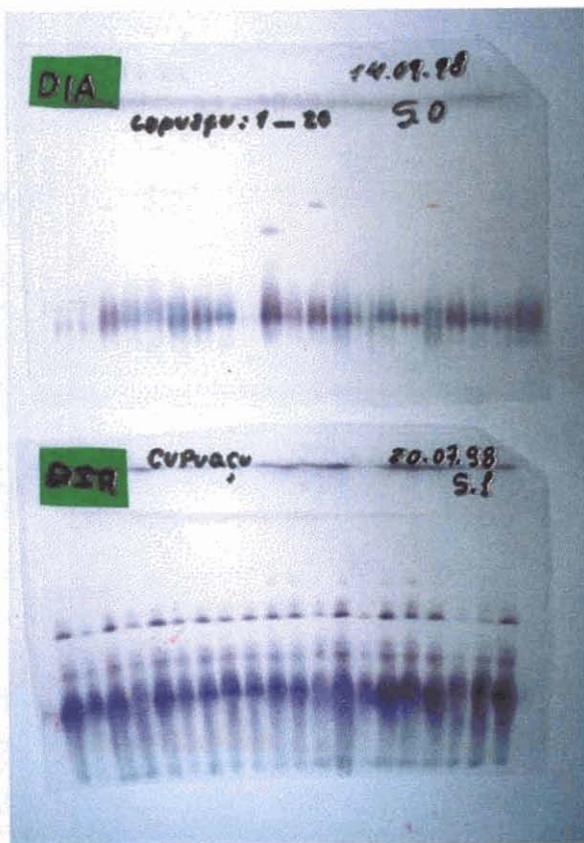


FIG. 3. Bandejamento isoenzimático para 20 amostras de cupuaçuzeiro utilizando dois tipos de solução de extração (solução zero -S.0 e solução um -S.1), para Diaforase.



FIG. 4. Bandeamento isoenzimático para 20 amostras de cupuaçuzeiro utilizando dois tipos de solução de extração (solução zero- S.0 e solução um- S.1), para Fosfatase Ácida.

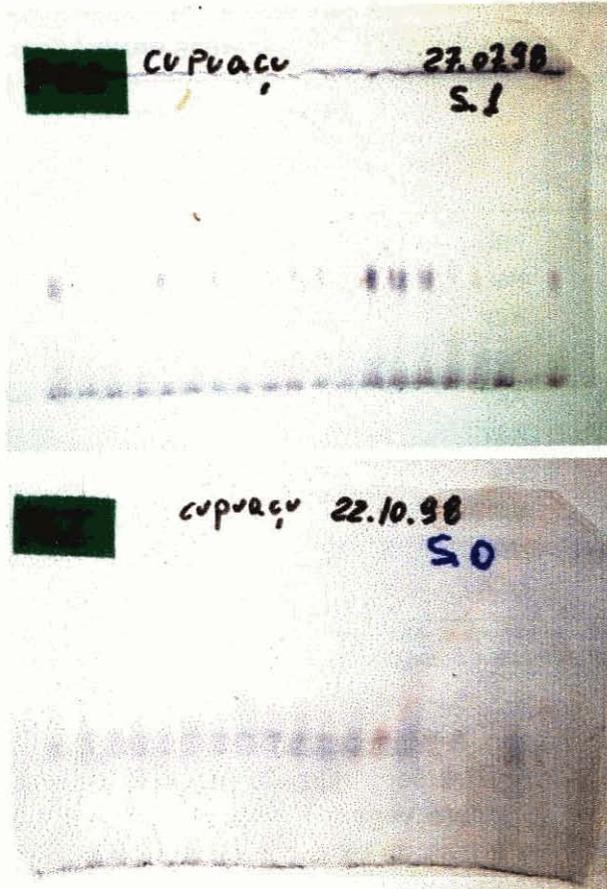


FIG. 5. Bandeamento isoenzimático para 20 amostras de cupuaçuzeiro, utilizando dois tipos de solução de extração (solução zero -S.0 e solução um -S.1), para Fosfoglucoase Isomerase.

Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 3.

TABELA 3. Avaliação da eficiência de duas soluções de extração em cinco sistemas enzimáticos.

Solução extratora	Enzima	Bandeamento		Atividade		Resolução	
		Presente	Ausente	Bandas fortes	Bandas fracas	Boa	Regular
Zero	PGI	X			X		
Um	PGI		X				
Zero	ACP	X		X		X	
Um	ACP	X			X		X
Zero	AAT	X		X		X	
Um	AAT	X		X		X	
Zero	DIA	X		X		X	
Um	DIA	X		X			X
Zero	MNR	X		X			X
Um	MNR	X		X		X	

PGI - Fosfoglucoase Isomerase; AAT - Aspartato Amino Transferase; MNR - Menadiona Redutase; ACP - Fosfatase Ácida; DIA - Diaforase.

Wilson & Hancock (1978) citam que o procedimento de extração a ser utilizado depende da enzima a ser analisada e do tecido vegetal. Mecanismos para diminuir a interferência de fenóis na extração de proteínas têm sido discutidos por Loomis & Battaile (1966), Pierpoint (1966), Anderson & Rowan (1967), Anderson (1968), Loomis (1969, 1974), King (1971) e Kelley & Adams (1977). Pode-se utilizar alguns aditivos ao tampão de extração para se obter um extrato com qualidade, incluindo agentes complexadores de fenóis (borato de sódio, polivinilpirrolidona, albumina de soro bovina), inibidores de polifenoloxidasas (dietilditiocarbamato de sódio, polivinilpirrolidona e polivinilpolipirrolidona), além de agentes antioxidantes (mercaptoetanol, bissulfito de sódio, DTT).

Os resultados obtidos indicam que, de uma maneira geral, a solução extratora zero foi a que apresentou maior eficiência na extração de enzimas em folhas jovens de cupuaçuzeiro, preservando sua atividade, proporcionando melhor resolução de bandas na maioria dos sistemas enzimáticos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV-Imprensa Universitária, 1991. 242p.
- ANDERSON, J.W. Extraction of enzymes and subcellular organelle from plant tissues. **Phytochemistry**, n.7, p.1973-1988, 1968
- ANDERSON, J.W.; ROWAN, K.S. Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. **Phytochemistry**, n. 6, p. 1047-1056, 1967.
- KELLEY, W.A; ADAMS, R.P. Preparation of extracts from juniper leaves for electrophoresis. **Phytochemistry**, n.16, p.513-516, 1977.
- KING, E.E. Extraction of cotton leaf enzymes with borate. **Phytochemistry**, n.10, p.2337-2341, 1971.
- LOOMIS, W.D.; BATAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochemistry**, n.5, p.423-438, 1966.
- LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, n.31, p.528-544, 1974.
- LOOMIS, W.D. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. **Methods in Enzymology**, n.13, p.555-563, 1969.
- PIERPOINT, W.S. Enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. **Biochemical Journal**, n.98, p.567-580, 1966.

TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y; NAIM, M.; OHBA, K. Método de análise de isoenzimas. In: TSUKUBA. Universidade Sexto Relatório sobre treinamento de estudos florestais. Texto em japonês. Tsukuba, 1990, p.63-95.

WILSON, R.E.; HANCOCK, J.F. Comparison of four techniques used in the extraction of plant enzymes for electrophoresis. Bulletin of the **Torrey Botanical Club**, Oxford, v.105, n.4, p.318-320, 1978.