



Adequação de Metodologia para Detecção de Proteínas em Casca do Mamão Verde Utilizando Eletroforese (SDS-PAGE)

Marília Penteado Stephan¹
Edna Maria M. de Oliveira²
Izabela Miranda de Castro³
Renata Bandarra M. Costa⁴
Marcos J. de O. Fonseca⁵

Introdução

Um dos problemas relacionados à qualidade do mamão (*Carica papaya*) exportado pelo Brasil é a ocorrência de doenças pós-colheita. As etapas de armazenamento refrigerado e transporte são críticas para a manutenção da integridade dos frutos destinados à comercialização. Alternativas devem ser buscadas no sentido de inferir modificações na etapa de refrigeração durante a comercialização, pois, à medida que os frutos são submetidos à temperatura ambiente, as doenças pós-colheita vão se manifestando e causando perdas que variam entre 30 a 70%. Adicionalmente, outra característica que chama a atenção para este fruto é o fato de ser o único a possuir em sua composição química o glicosinolato, que se encontra distribuído tanto na polpa quanto na casca e na semente (ROSSETTO, 2005; KERMANSHAI *et al.*, 2001). O conhecimento da presença de glicosinolatos em mamão data da década de 70 e seu potencial tóxico torna-o capaz de combater alguns tipos de fungos, além de diminuir a infestação por ovos e larvas de mosca das frutas (PATIL; TANG, 1970). Estudos do mecanismo de defesa das plantas têm sido abordados e já é de conhecimento que um deles é o sistema glicosinolato-mirosinase, que está presente principalmente nas brássicas. É importante ressaltar que o mamão parece

ser o único fruto portador deste sistema. (ROSSETTO, 2005). O estudo da participação da enzima mirosinase (β tioglicosidase) na conversão de glicosinolatos em isotiocianato tem sido alvo de diversos trabalhos científicos. Os isotiocianatos são moléculas que conferem ao mamão a resistência ao ataque de fungos e insetos, devido à sua capacidade tóxica (ROSSETTO, 2005). Por outro lado, apesar de tóxico, o isotiocianato tem sido mencionado em muitas bibliografias pelo seu potencial quimioprotetor na prevenção de câncer (BRADLOW *et al.*, 1991; COLL *et al.*, 1997).

A expressão gênica da mirosinase, assim como de outras proteínas sintetizadas em resposta a situações adversas, pode ser observada em eletroforese (ROSSETTO, 2005). Em relação a problemas de pós-colheita, em que os frutos são acondicionados em câmaras frigoríficas, destacam-se alguns trabalhos sobre aclimatação de frutas em que são citadas diferenças nos níveis de proteínas totais, que podem ser atribuídas à expressão de proteínas de choque térmico (HSPs-“Heat Shock Proteins”). Dentre as HSPs, as sHSPs (“small HSPs”) são encontradas em maior abundância em tecidos vegetais (VIERLING, 1991). As HSPs desempenham um papel de “chaperones”, protegendo as proteínas do organismo, quando este sofre um estresse. Nesse sentido, a mirosinase pode estar sendo protegida e ativada sob

¹ Farmac.-bioquím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

² Eng. Quím., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: edna@ctaa.embrapa.br

³ Quím., Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: imcastro@ctaa.embrapa.br

⁴ Bolsista da Escola Técnica Federal de Química. E-mail: renatabandarra@ctaa.embrapa.br

condições de estresse térmico. A mirosinase é constituída de subunidades de 70 kDa, podendo ser facilmente detectada em eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE). A presença desta enzima nos extratos pode ser um fator indicativo da presença de isotiocianato na casca de mamão, o que sinalizaria o potencial de utilização desta casca como alimento funcional, pelo fato deste composto ser um agente quimioprotetor na prevenção de câncer (BRADLOW *et al.*, 1991; COLL *et al.*, 1997). Este trabalho teve como objetivo a implantação de um método de extração de proteínas de casca de mamão para a quantificação do teor de proteínas e do perfil de cadeias polipeptídicas em eletroforese SDS-PAGE. Os resultados obtidos serão úteis para a detecção da síntese de proteínas de baixas massas moleculares presentes em casca de mamão, em resposta ao tratamento pós-colheita (refrigeração) e/ou da enzima mirosinase, evidenciando possível utilização deste produto como alimento funcional.

Eletroforese de proteínas

Para o presente estudo, foi utilizado o sistema de eletroforese da Biorad e a metodologia de preparação de géis descrita por Laemmli (1970). Para o gel de corrida, foi utilizada acrilamida na concentração de 12% e 4% no gel de aplicação da amostra. A corrida foi realizada durante sete horas sob uma tensão de 100V. Os marcadores de alta massa molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 200–miosina; 116– β -galactosidase; 97–fosforilase b; 66–soralbumina; 45–ovalbumina. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): 97–fosforilase b; 66–soralbumina; 45–ovalbumina; 30–anidrase carbônica; 20–inibidor de tripsina; 14,4–lisozima. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “coomassie blue R250”, durante uma noite, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água (40: 10: 50), durante três horas.

Preparação da amostra de extrato protéico de casca de mamão para quantificação de proteína solúvel e análise protéica em eletroforese SDS-PAGE

Para este estudo, foram utilizados frutos de dois grupos de mamão, Solo e Formosa, comercializados em mercado na cidade do Rio de Janeiro. Utilizou-se 10g de casca destes frutos e 30 mL de solução extratora (Tabela 1) para realização da extração em blender durante 2 minutos. Após esta homogeneização, o extrato bruto foi filtrado em tecido de algodão e, posteriormente, centrifugado a 3000rpm. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais solúveis. A albumina

de soro bovino foi utilizada como proteína padrão após solubilização em diferentes soluções extradoras, como descrito na Tabela 1. Foram feitas diluições de modo a obter padrões nas seguintes concentrações: 0,100mg/mL; 0,200mg/mL; 0,300mg/mL; 0,400mg/mL e 0,500mg/mL. Foi observado que as maiores concentrações de proteína foram extraídas de mamão da variedade Formosa, verificando-se uma variação de 7,05 a 32,66 mg de proteína extraída/grama de massa seca de casca e, para a variedade Solo, foi observada uma variação de 5,58 a 31,06. As soluções aquosas que permitiram a maior extração de proteína foram NaOH 1M e NaCl 0,3M, que mostraram, respectivamente, os teores de proteína abaixo descritos (Tabela 1). Estudos realizados anteriormente, com extração de proteínas de casca de maçã, mostraram um percentual de extração de 1,4 mg de proteína/100g de massa seca de casca, que é bem menor do que o verificado na casca de mamão em estudo (VALDERRAMA; MARANGONI; CLEMENTE, 2001). Na Tabela 1, pode ser observado que valores maiores foram obtidos para casca de mamão da variedade Formosa, mostrando valores máximos de extração de 3,266g de proteína/100g de massa seca de casca, quando o NaOH 1M é usado como líquido extrator. Paralelamente a este estudo de proteína solúvel, foi avaliado o perfil molecular das cadeias polipeptídica destes extratos (Fig. 1 e 2), onde foi observado que, para as duas variedades estudadas, a presença de bandejamento protéico só ocorre quando se usa como líquido extrator SDS 1% e NaCl 0,3M (Fig.1 A e B, poços, 2 e 5).

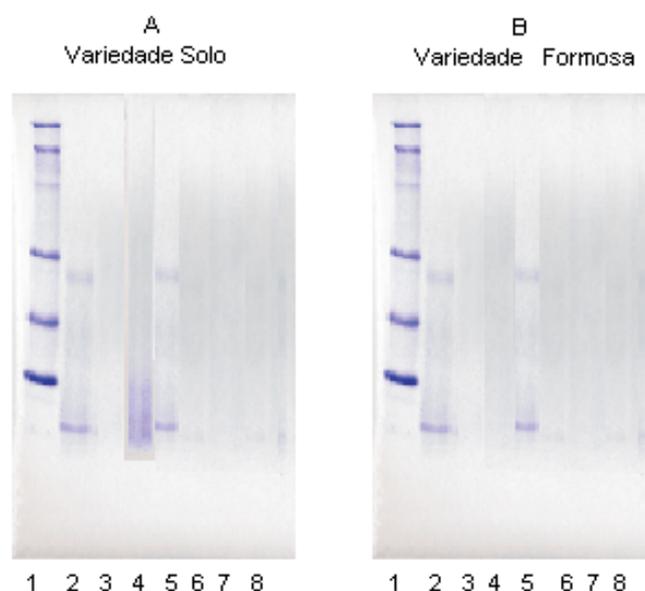


Fig.1. Perfil eletroforético das cadeias polipeptídicas presentes em diversos extratos aquosos de casca de mamão verde. Poços: 1 (Padrão), 2 (NaCl 0,3M), 3 (EDTA 1 mM), 4 (Tampão F), 5 (SDS 1%), 6 (NaOH 0,01M), 7 (NaOH 0,1M), 8 (NaOH 1M).

Este fato pode ser explicado através de duas hipóteses: a) ocorrência de hidrólise protéica, que pode acontecer quando se usa NaOH 1M e NaOH 0,1M como líquidos extratores, gerando cadeias polipeptídicas detectáveis pelo método de Bradford (1976); b) presença de baixo teor de proteína nos extratos, impossibilitando a detecção destas quando se usa NaOH 0,01M, EDTA 0,5mM, tampão F (tampão fosfato 100 mM pH 7,5, contendo EDTA 1mM e mercaptoetanol 3 mM) e NaOH 0,01M como líquidos extratores. Optou-se, entretanto, pela utilização dos extratos de NaCl 0,3M pelo fato deste mostrar melhor resolução de bandas (Fig. 1, poço 2). Estes resultados serão úteis tanto para futuros estudos de síntese protéica em resposta ao tratamento pós-colheita como para avaliação da síntese da enzima mirosinase (converte glicosinolato

em isotiocianato). Na Fig. 2 (A), observa-se três bandeamentos, duas bandas fortemente coradas (30 kDa e outra de massa molecular não calculada por estar abaixo do padrão de lisozima 14,4 kDa), além de uma banda fracamente corada (20 kDa), que só aparece com maior nitidez no material concentrado com acetona (B). A ocorrência de cadeias polipeptídicas de massa molecular abaixo de 14,4 kDa foi também descrita como possível em látex de mamão com tecido danificado (AZARKAN et al., 2004). Sugere-se, finalmente, que o método a ser utilizado deve seguir a marcha utilizando NaCl 0,3M como líquido extrator, com posterior precipitação das proteínas com acetona e concentração das mesmas após solubilização dos precipitados (após centrifugação) em um volume de NaCl 0,3M duas vezes menor que o anterior.

Tabela 1. Teor de Proteína Solúvel extraída de Casca de Mamão (Variedades Solo e Formosa) em diferentes soluções aquosas.

Solução Extratora	mg de proteína. (g de massa seca) ⁻¹	
	Formosa	Solo
NaOH 0.01M	7,05	5,58
NaOH 0.1M	21,86	10,69
NaOH 1M	32,66	31,06
EDTA 0,5mM	10,08	6,58
Tampão Fosfato 100mM pH 7,5 EDTA 1mM Mercaptoetanol 3mM	10,80	9,56
SDS 1%	ND	ND
NaCl 0,3M	18,68	13,42

ND- Não determinado porque a solução extratora interferiu com o reagente colorimétrico de Bradford. O teor de proteína solúvel foi determinado pelo método de Bradford (1976).

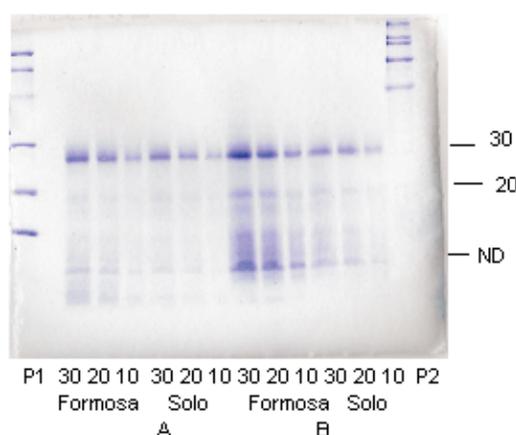


Fig. 2. Perfil protéico (SDS-PAGE) dos extratos de casca de mamão obtidos com NaCl 0,3M. P1- padrão de baixa massa molecular, P2- padrão de alta massa molecular. A (sem concentrar), B (concentrado duas vezes)

Considerações finais

O método se mostrou adequado ao tipo de matriz utilizada e também bastante preciso; com isto, bandeamentos típicos de enzimas presentes em casca de mamão puderam ser observados. A obtenção destes padrões de identidade será útil para futuros trabalhos que visem o monitoramento de possíveis modificações deste perfil protéico em resposta ao tratamento pós-colheita e também no monitoramento da síntese da enzima mirosinase. A presença desta enzima no fruto pode conferir a este uma característica de funcionalidade, pelo fato desta ser mediadora da conversão de glicosinolato em isotiocianato (agente quimioprotetor na prevenção do câncer).

Referências bibliográficas

AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZE, Y.; BAEYENS-VOLANT, D. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Phytochemistry*, v. 65, p. 525-534, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLOW, H. L.; MICHNOVICK, J.; TELANG, N. T.; OSBORNE, M. P. Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 1571-1574, 1991.

COLL, D. A.; ROSEN, C. A.; AUBORN, K.; POTSIK, W. P.; BRADLOW, H. L. Treatment of recurrent respiratory papillomatosis with indole-3-carbinol. *American Journal of Otolaryngology*, v. 18, p. 283-285, 1997.

KERMANSYAI, R.; McCARRY, B. E.; ROSENFELD, J.; SUMMERS, P. S.; WERETILNYK, E. A.; SORGER, G. J. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry*, v. 57, p. 427-435, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

PATIL, S. S.; TANG, C. S. Inhibition of ethylene evolution in papaya pulp tissue by benzyl isothiocyanate. *Plant Physiology*, v. 53, p. 585-588, 1974.

ROSSETO, M. R. M. **Teores de benzilglicosinolato, benzilisotiocianato e expressão da mirosinase durante o desenvolvimento e amadurecimento do mamão.** 2005. 117 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 3, p. 1-9, 2001.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, v. 42, p. 579-620, 1991.

Comunicado Técnico, 95

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 2410-9500
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9513
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Márcia Nitschke, Ronoel Luiz de O. Godoy e André Luis do Nascimento Gomes*
Secretárias: *Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes*

Expediente

Supervisor editorial: *André Luis do N. Gomes*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Guimarães de Souza e André Luis do N. Gomes*