

Foto: Caroline Mellinger Silva



## Extração de Proteínas do Fruto e da Folha do Morangueiro e Preparo da Amostra para Aplicação em Eletroforese SDS-PAGE

Caroline Mellinger Silva<sup>1</sup>  
Marília Penteado Stephan<sup>2</sup>  
Alexsandro Araujo dos Santos<sup>3</sup>  
Tatiana de Lima Azevedo<sup>4</sup>  
Marcos José de Oliveira Fonseca<sup>5</sup>  
Rodrigo da Silveira Campos<sup>6</sup>

### Introdução

O morango (*Fragaria ananassa*, Duch) é um fruto muito apreciado em todo o mundo. É uma cultura em expansão no Brasil por existir alta demanda de mercado e boa aceitação do produto (SPECHT; BLUME, 2009).

Apesar da alta produtividade, um dos maiores desafios para os produtores está na minimização das perdas por doenças que acometem os frutos, tanto no cultivo como no período pós-colheita. Nesse sentido, visando prolongar a vida útil do fruto após a colheita, estratégias agrícolas alternativas têm sido desenvolvidas, com o intuito de promover maior resistência do fruto a patógenos, sem o uso extensivo de pesticidas. O uso de agentes indutores da resistência sistêmica adquirida (RSA) tem sido uma das estratégias de sucesso (MAZARO et al., 2008). Nesse mecanismo, sinalizações bioquímicas promovem alterações na biossíntese de proteínas de defesa vegetal, tornando o fruto mais resistente ao ataque por patógenos (AMIL-RUIZ et al., 2011), e, assim, prolongando a vida útil do produto.

Dentre as análises químicas capazes de avaliar tratamentos realizados em campo, encontra-se a

análise de perfil proteico comparativo, que pode ser realizada de diversas formas, compreendendo técnicas de eletroforese uni- e bidimensionais. As técnicas unidimensionais, tais como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), são de fácil execução e baixo custo, sendo úteis quando aplicadas em triagens iniciais, onde o grande número de amostras é limitante para o uso de técnicas proteômicas mais elaboradas, como a eletroforese bidimensional de proteínas (BIANCO et al., 2009).

Uma das etapas mais importantes na realização de diferentes tipos de eletroforese é a preparação da amostra, pois amostras insolúveis ou molecularmente agregadas geram resultados insatisfatórios. Tecidos vegetais, especialmente frutos e folhas, apresentam como maiores dificuldades o baixo percentual proteico e a coextração de pectinas e compostos fenólicos com as proteínas, dificultando o processo de migração destas últimas no gel de eletroforese (BARRACLOUGH et al., 2004; ZHENG et al., 2007).

Desta forma, este comunicado apresenta uma adaptação metodológica para a extração de proteínas do fruto e da folha do morango visando a análise do perfil proteico por eletroforese SDS-PAGE.

<sup>1</sup>Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, caroline@ctaa.embrapa.br

<sup>2</sup>Farmacêutica, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, stephan@ctaa.embrapa.br

<sup>3</sup>Técnico em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, alsantos@ctaa.embrapa.br

<sup>4</sup>Licenciada em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiana@ctaa.embrapa.br

<sup>5</sup>Agrônomo, D.Sc. em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, mfonseca@ctaa.embrapa.br

<sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc. em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, camposrs@ctaa.embrapa.br

## Extração de Proteínas e Preparo das Amostras

As amostras de frutos e folhas de morangueiro (*Fragaria ananassa*, Duch), com aparência saudável, foram adquiridas em mercado local (Rio de Janeiro) e mantidas congeladas (-20 °C) até seu uso no laboratório. Os frutos foram selecionados de acordo com o grau de maturação, determinado com base na coloração. Neste estudo, os morangos estavam totalmente vermelhos. Os frutos e folhas foram separadamente homogeneizados em *blender*, por 30 segundos. A 2g de cada material foram adicionados 12 mL de tampão de extração (Quadro 1) para o fruto e 20 mL para a folha. Em seguida, os materiais foram incubados por 8 minutos a 90°C e depois centrifugados a frio (4 °C), a 8000 g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 25mL de solução de precipitação (Quadro 1) e as amostras foram mantidas a -20°C, por 90 minutos. Após nova centrifugação (13000g, 15 min, 4 °C) o precipitado foi lavado 3 vezes com 7,5 mL de solução de lavagem (Quadro 1) e resfriado a -20°C por 60 minutos em 35mL desta solução. O material foi então novamente centrifugado (ZHENG et al., 2007). O precipitado proteico foi seco com ar comprimido e, previamente à aplicação da amostra no gel de eletroforese, o material foi ressuspensionado sob vigorosa agitação por 3h, em 200µL de uma solução de ureia (7M) e tiourea (2M). Em seguida, foram adicionados 100µL de tampão de amostra (Quadro 1). O método de extração das proteínas e preparo das amostras está representado na Figura 1.

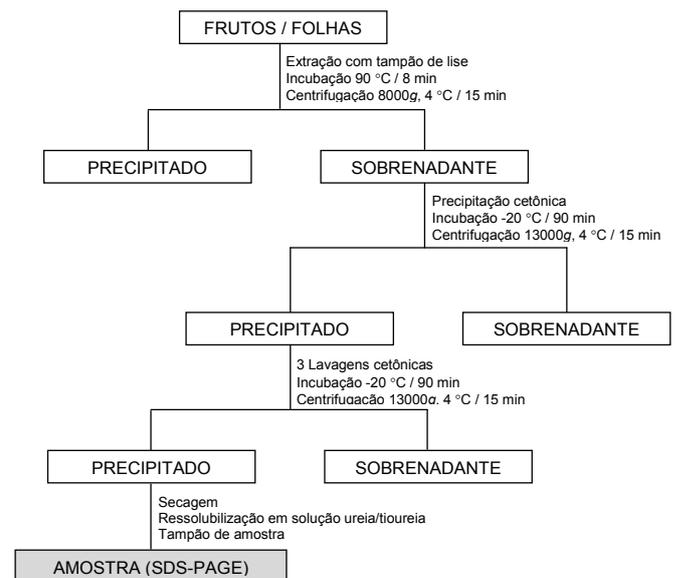
**Quadro 1.** Soluções usadas na extração de proteínas de frutos e folhas de morangueiro.

SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO	
Reagente	Concentração
SDS	2%(p/v)
Glicerol	20%(v/v)
Tris-HCl	40 mM, pH 8,5
DTT	60 mM
SOLUÇÃO DE PRECIPITAÇÃO	
Reagente	Concentração
TCA	10%(p/v)
DTT	20 mM
q.s.p. Acetona fria	
SOLUÇÃO DE LAVAGEM	
Reagente	Concentração
DTT	20 mM
q.s.p. Acetona fria	
TAMPÃO DE AMOSTRA	
Reagente	Concentração
Tris-HCl pH 6,8	0,0625M
Glicerol	10%
SDS	2%
Mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,025%

## Eletroforese de Proteínas em SDS-PAGE

Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical (BioRad) e a metodologia de preparação dos géis, conforme Laemmli (1970). A concentração de acrilamida usada no gel de separação foi de 12% e no gel de empilhamento, 8%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba grande, durante 7 h, sob a tensão de 100V.

Os marcadores de alto peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): miosina 202,44;  $\beta$ -galactodisidase 116,58; albumina de soro bovino 98,08 e ovalbumina 47,11. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos a partir dos seguintes padrões de proteínas (em kDa): fosforilase B 105,20; albumina de soro bovino 84,17; ovalbumina 50,44; anidrase carbônica 36,81; inibidor de tripsina de soja 29,06 e lisozima 20,49. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor "coomassie blue R250", durante 12h, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água destilada (40: 10: 50) por 3h.



**Figura 1.** Esquema de extração de proteínas de frutos e folhas de morangueiro e preparo da amostra para aplicação em gel de eletroforese SDS-PAGE.

## Dosagem de Proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas de acordo com o método de Bradford (1976).

## Considerações

A maior dificuldade em realizar uma análise proteica em tecidos vegetais é dada pelo baixo teor de proteínas e pela alta concentração de substâncias interferentes, como polifenóis e pectinas, muito abundantes em frutos. Assim, especial atenção deve ser dada às etapas de extração das proteínas do material bruto e do preparo da amostra a ser analisada.

Durante a extração das proteínas, deve-se atentar para técnicas que rompam as células do vegetal, liberando seu conteúdo proteico intracelular. Com isso, tem-se não só um aumento no teor de proteínas, como também na diversidade destas, gerando análises comparativas mais fiéis. Logo após a extração, é preciso preparar a amostra de maneira adequada para que sejam preservadas as moléculas extraídas, mantendo-as solúveis na solução de aplicação no gel de eletroforese.

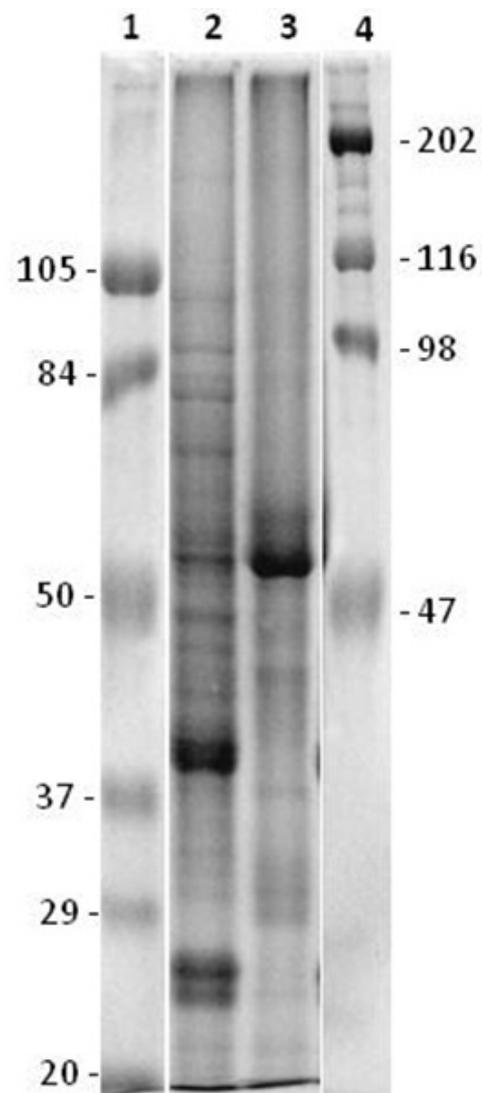
Neste estudo recomenda-se a utilização de uma metodologia adaptada de estudos de frutos e tecidos vegetais analisados por eletroforese bidimensional (BARRACLOUGH et al., 2004; ZHENG et al., 2007). Nesse sentido, a extração proteica foi realizada usando-se um tampão de lise celular contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) e ditioneitol (DTT). O SDS é um detergente aniônico desnaturante, que rompe as interações não-covalentes das estruturas terciária e secundária das proteínas. Ainda, como apresenta carga negativa, carrega as proteínas negativamente, superando as cargas intrínsecas das mesmas. Já o DTT age como um agente redutor, que auxilia nesta desestruturação molecular, e deste modo reduz os grupos sulfidrilas das cisteínas e rompe as pontes dissulfeto dos dímeros de cistina (CAÑAS et al., 2007).

Após a extração a quente, os extratos proteicos foram precipitados com uma solução contendo ácido tricloroacético (TCA) e DTT em acetona a frio. Com esta etapa, os interferentes de baixa massa molecular, como os polifenóis, podem ser eficientemente separados das proteínas. As etapas de lavagem favorecem a desagregação molecular entre proteínas e estes interferentes. Por fim, as amostras secas foram ressolubilizadas em uma solução com agentes caotrópicos, como a ureia e tiourea, que auxiliam na desestabilização das estruturas terciárias e secundárias das proteínas e promovem maior interação entre as proteínas e o meio, facilitando o processo de ressolubilização da amostra.

Ao analisar o extrato proteico, pôde-se perceber que o teor de proteínas observado nos frutos e folhas do

morangueiro aumentou consideravelmente, sendo encontrados 12 e 10 % de proteínas, respectivamente. Este dado é interessante, pois estas matrizes apresentam normalmente, em média, 1% de proteína. Desta forma, o processo de extração de proteínas proposto foi eficiente, pois aumentou em 10 vezes o conteúdo proteico identificado das amostras.

A análise de eletroforese em SDS-PAGE dos extratos (Figura 2), obtida de acordo com o método proposto, apresentou um rico perfil proteico nas amostras testadas, totalizando 19 bandas identificadas, com ampla faixa de massa molecular, variando de 98,53 a 20,88 kDa. Observou-se também o aparecimento de bandas fortemente coradas nas regiões de 41, 28, 28,59 e 27,75 kDa, mostrando intensa quantidade de proteínas de baixa massa molecular.



**Figura 2** – Perfil eletroforético de proteínas de frutos e folhas de morangueiro.

Padrão de proteínas de baixa massa molecular (1); extrato do fruto (2); extrato da folha (3); padrão de proteínas de alta massa molecular (4). Geis corados com Comassie-Blue R250.

A metodologia proposta possibilitou a extração de proteínas de frutos e folhas de morangueiro para serem aplicadas em gel de eletroforese unidimensional, viabilizando uma análise de triagem inicial em grandes amostragens, especialmente no início do desenho experimental de tratamentos a serem aplicados no campo.

## Referências

- AMIL-RUIZ, F.; BLANCO-PORTALES, R.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. **Plant Cell Physiology**, v. 52, n. 11, p. 1873-1903, Nov. 2011.
- BARRACLOUGH, D.; OBENLAND, D.; LAING, W.; CARROLL, T. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit sample. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 2, p. 175-181, May 2004.
- BIANCO, L.; LOPEZ, L.; SCALONE, A. G.; DI CARLI, M.; DESIDERIO, A.; BENVENUTO, E.; PERROTTA, G. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 4, p. 586-607, May 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**, v. 72, p. 248-254, May 1976.
- CAÑAS, B.; PIÑEIRO, C.; CALVO, E.; LÓPEZ-FERRER, D.; GALLARDO, J. M. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 235-258, Jun. 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- MAZARO, S. M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L. L. M.; BIASI, L. A.; GOUVEIA, A.; SAUTTER, C. K. Post harvest behavior of strawberry fruits after pré harvest treatment with chitosan and acibenzolar-S-methyl. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 185-190, mar. 2008.
- SPECHT, S.; BLUME, R. Competitividade e segmento de mercado à cadeia do morango: algumas evidências sobre o panorama mundial e brasileiro. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações: **anais**. Brasília, DF: SOBER, 2009. 1 CD-ROM.
- ZHENG, Q.; SONG, J.; DONCASTER, K.; ROWLAND, E.; BYERS, D. Qualitative and quantitative evaluation for apple and strawberry fruit sample for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1663-1673, Mar. 2007.

## Comunicado Técnico, 183

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) 3622-9600

**Fax:** (0XX21) 3622-9713

**Home Page:** <http://www.ctaa.embrapa.br>

**E-mail:** [sac@ctaa.embrapa.br](mailto:sac@ctaa.embrapa.br)

**1ª edição**

1ª impressão (2012): tiragem (50 exemplares)

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta

**Membros:** Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

## Expediente

**Supervisão editorial:** Daniela De Grandi C. Freitas

**Revisão de texto:** Renata Valeriano Tonon

**Normalização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo

**Editoração eletrônica:** André Luis do Nascimento Gomes, Chris Maciel e Marcos Moulin.