

Estudos proteômicos em *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae): avaliação de diferentes protocolos de extração em planta adulta.

Andrea N. L. Batista^{1*} (PQ), João M. Batista Jr.¹ (PG), Massuo J. Kato² (PQ), Silvia N. López³ (PQ) e Maysa Furlan¹ (PQ).

*andrluca@yahoo.com.br

¹Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, SP 14800-900, Brasil. ²Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP 05508-000, Brasil. ³Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario S2002LRK, Argentina.

Palavras Chave: Piperaceae, *Peperomia obtusifolia*, Proteoma, Extração protéica, SDS-PAGE.

Introdução

O gênero *Peperomia* consiste na segunda melhor fonte de metabólitos secundários bioativos em Piperaceae.¹ Estudos fitoquímicos em *P. obtusifolia* levaram ao isolamento de cromanos prenitados racêmicos com potente atividade tripanocida,² o que desperta interesse com relação às etapas biossintéticas tanto da adição de unidades prenila quanto de ciclização e formação do anel 3,4-diidro-2H-pirano. Assim, essa espécie se configura em uma interessante matriz para estudos proteômicos. Para o sucesso da análise proteômica, a otimização dos procedimentos experimentais é crucial. Com relação à extração de proteínas vegetais, dois principais tipos de protocolos podem ser utilizados: extração com tampões e extração com solventes orgânicos.³ Portanto, no presente trabalho objetivou-se avaliar diferentes protocolos de extração protéica em folhas, caules e raízes de *P. obtusifolia* adulta.

Resultados e Discussão

Avaliou-se diferentes protocolos^{1,4} (Tabela 1) para extração das proteínas de folhas, caules e raízes de exemplares adultos de *P. obtusifolia*. A seleção do protocolo mais eficiente baseou-se na quantificação protéica pelo método de Bradford modificado (Tabela 2) e em análises por SDS-PAGE.

Tabela 1. Composição das soluções extrativas utilizadas nos protocolos de extração protéica.

Protocolo	Solução extrativa
1	10% de TCA e 0,07% de 2-ME em acetona
2	20% de PVPP, 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA em tampão Citrato 100 mM (pH 5)
3	20% de PVPP, 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA em tampão Fosfato 100 mM (pH 7)
4	20% de PVPP, 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA em tampão TRIS-HCl 100 mM (pH 8,8)
5	20% de PVPP, 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA em tampão Glicina-NaOH 100 mM (pH 8,8)

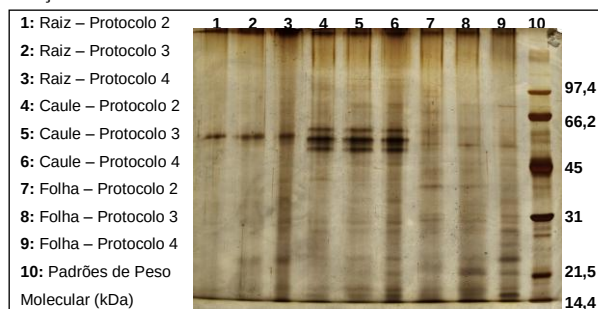
Inicialmente, utilizou-se folhas como material de partida. Como o protocolo 1 gerou baixo rendimento e os dois tampões de pH básico apresentaram resultados semelhantes, apenas os protocolos 2-4 foram avaliados para caules e raízes. Para os três órgãos estudados, o melhor protocolo foi o 4. Além

disso, análises qualitativas por SDS-PAGE (Figura 1) e 2D-PAGE revelaram que a constituição protéica é distinta nos diferentes órgãos de *P. obtusifolia* e que as proteínas de maior expressão em caules e raízes se encontram na faixa de massa molecular entre 45 e 66 kDa. Nessa mesma faixa, além da subunidade maior da enzima Rubisco⁵, encontram-se as preniltransferases (56–58 kDa).¹

Tabela 2. Concentração de proteína obtida com diferentes protocolos de extração (mg de proteína/g de material vegetal).

Órgão vegetal	Proteínas (mg/g) Protocolos				
	1	2	3	4	5
Folha	0,01	0,45	0,32	0,85	0,88
Caulé	-	0,23	0,24	0,43	-
Raiz	-	0,08	0,14	0,37	-

Figura 1. SDS-PAGE dos extratos protéicos de folhas, caules e raízes de *P. obtusifolia* obtidos com diferentes protocolos de extração.



Conclusões

Esse trabalho permitiu a seleção do método que utiliza tampão TRIS-HCl (pH 8,8) para a extração das proteínas dos diferentes órgãos de *P. obtusifolia*. Além disso, a análise por SDS-PAGE, principalmente de caules e raízes, revelou um perfil eletroforético sugestivo da presença de preniltransferases (56–58 kDa).

Agradecimentos

FAPESP e CNPq.

¹ López, S. N. et al. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4251.

² Mota, J. S. et al. *Planta Med.* **2009**, *75*, 620.

³ Jorjín-Novo, J. V. et al. *J. Proteomics* **2009**, *72*, 285.

⁴ Saravanan, R. S.; Rose, J. K. C. *Proteomics* **2004**, *4*, 2522.

⁵ Krishnan, H. B.; Natarajan, S. S. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1958