

# UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTÊOMICAS PARA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DA BROMELINADO TALO E DO FRUTO DO ANANAS *COMOSUS* (ABACAXI) DA VARIEDADE PÉROLA.

Silvia Maria de Souza<sup>1</sup>; Maria do Carmo Barros Pimentel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas-CCB- UFPE; E-mail: silvia\_souza20@yahoo.com <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Departamento de Bioquímica-Lika-UFPE; E-mail: mcbarneiro@yahoo.com.br

**Sumário:** A bromelina é uma protease de origem vegetal, obtida de diversas espécies da família Bromeliaceae, que está presente principalmente no fruto e no talo do abacaxi. Desta forma, a proposta abordada foi de caracterizar as bromelinas extraídas do fruto e do talo de abacaxi utilizando as técnicas de proteômica. A bromelina foi extraída do caldo obtido por prensagem manual do fruto ou do talo. A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton *et al.*, (1973). O zimograma foi obtido de acordo com Garcia - Carreño *et al.*, (1993). Na eletroforese SDS-PAGE foram preparadas malhas de 12,5%, 15% e 18%. Para a primeira dimensão da eletroforese bidimensional foram utilizadas tiras de 13 cm de DryStrips Immobiline não-linear de pH de 3-10. A segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 15%, o padrão de peso molecular variou de 225-12 kDa. O cromatograma foi visualizado com solução azul Coomassie Brilliant - 250. A extração das bromelinas foi confirmada pela determinação da atividade enzimática. O zimograma dos extratos do fruto e do talo mostrou atividade proteolítica da bromelina na banda de 24 kDa de ambos extratos. Na eletroforese bidimensional, o extrato do fruto mostrou 14 spots, um com cerca de 24 kDa e 13 abaixo de 12 kDa, enquanto que o extrato do talo mostrou 21 spots, três de 24 kDa, um abaixo de 17 kDa e 17 abaixo de 12 kDa. Foi possível extrair bromelina em sua forma ativa, os extratos do fruto e do talo mostraram perfis bidimensionais diferentes. Os resultados serão complementados por análise de espectrometria de massa.

**Palavras-chave:** Bromelina; Eletroforese SDS-PAGE e bidimensional; Zimograma.

## INTRODUÇÃO

Abromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é o mais conhecido (Maurer, 2001; Nadizarah *et al.*, 2013), sendo inclusive considerado como uma das frutas tropicais mais populares do mundo. Esta enzima é utilizada em diferentes setores, todos baseados em sua atividade proteolítica, dentre as quais se destacam a propriedade de facilitar a digestão de proteínas, sendo por isso adicionada em medicamentos digestivos, e a amaciantes de carnes (Borracini, 2006). Na medicina, foi demonstrado que a bromelina é capaz de reduzir o crescimento de tumores; pode ser de interesse para os cirurgiões plásticos pela sua capacidade de reduzir dor, edema e inflamação, além de potencializar a ação de antibióticos, o que pode ser benéfico no pós-operatório (Orsini, 2006). A bromelina é conhecida quimicamente desde 1875 e em 1957 foi introduzida como um composto terapêutico (Kelly, 1996; Pavan *et al.*, 2012). Como ainda existem dúvidas sobre as estruturas químicas dos componentes ativos do complexo enzimático chamado bromelina, nossa proposta foi a de caracterizar o proteoma do *Ananas comosus* variedade pérola que ainda é pouco estudado, com enfoque na caracterização

proteômica das bromelinas do fruto e do talo, análise de atividade proteolítica usando zimograma e a estabilidade das enzimas à temperatura de armazenamento.

### MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de bromelina foram extraídas do abacaxi (*Ananas comosus*), variedade Pérola, adquirido no mercado regional. Foram extraídos os caldos de dois abacaxis, separando-os em bromelina do fruto (BF) e do talo (BT), utilizando a metodologia do caldo prensado e os extratos obtidos foram denominados (EBF e EBT). Os extratos foram centrifugados a 10.000 xg, durante 30 minutos a 4°C para a eliminação dos debris celulares, sendo chamados de extratos brutos centrifugados (EBFC e EBTC). Em seguida as amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C para posteriores experimentos. Amostras de 50mL e 30mL dos respectivos extratos (EBFC e EBTC) foram dialisadas contra água destilada, usando membrana seletiva para 3,5 kDa, passando a ser chamadas de EBFCd e EBTCd (extrato bruto fruto/talo centrifugado e dialisado). Em paralelo foram dosadas as atividades proteolíticas dessas amostras pelo método de Leighton *et al.*, (1973). Foi realizado o acompanhamento semanal das estabilidades ao armazenamento a -20°C dos extratos EBFC, EBTC e EBFCd, EBTCd no qual foram calculadas as suas atividades proteolíticas. A concentração de proteínas foi obtida pelo método de Lowry *et al.*, (1951), e também pelo 2-D Quanti Kit da GE. Para as eletroforeses em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foram preparados respectivamente os géis com malha 12,5%, 15% ou 18% (p/v) de poliacrilamida. Alíquotas dos extratos de bromelina do fruto ou talo contendo 100µg, 300µg e 500µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostras Laemmli da Sigma e aplicadas nos respectivos poços dos géis. Após o término da corrida, os géis foram corados com 0,25% (p/v) de azul de Coomassie R250 em 25% (v/v) de metanol e ácido acético a 10% (v/v) e descorados com 25% (v/v) metanol e ácido acético a 10% (v/v). Posteriormente, de acordo com os resultados obtidos, foram realizadas eletroforeses em géis a 15% e com amostras de 100µg, 200µg e 300µg. O zimograma da atividade proteolítica das bandas proteicas dos extratos foi obtido pelo método de Garcia-Carreño *et al.*, (1993) nas condições da eletroforese acima citada. Foram usadas concentrações diferentes de amostras, com volume 10 vezes menor em relação as que foram aplicadas na eletroforese, 10µg, 20µg e 30µg ou 5µg, 10µg e 15µg de proteínas. Para avaliação do perfil proteômico da bromelina em gel nas condições citada anteriormente, foi realizado uma eletroforese bidimensional. Na preparação das amostras foram utilizados dois valores de concentrações de proteínas 250 e 300µg dos EBFCd e EBTCd. As amostras foram hidratadas utilizando fitas ImmobilineDryStrips (13 cm, pH 3-10). A focalização isoelétrica das amostras embebidas nas fitas ocorreu no aparelho IPG Phor III (GE HealthcareCorp., Piscataway, USA). A 2ª dimensão foi realizada pela corrida em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e os géis foram corados em 0,1% de solução de Comassie Brilliant BlueR-250. Posteriormente as imagens foram digitalizadas com auxílio de um foto documentador (Molecular Imaging, Locus biotecnologia) e analisadas pelo software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE HealthcareCorp., USA).

### RESULTADOS

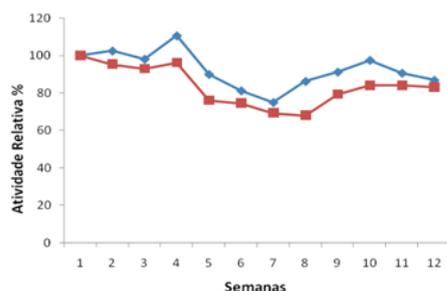
As médias das concentrações de proteínas dos extratos adequadamente diluídos (50x para EBFC, EBTC, e 10x para EBFCd, EBTCd) foram: EBFC= 5,2mg/mL; EBTC= 2,6mg/mL; EBFCd= 0,57mg/mL; EBTCd= 0,29mg/mL.

Os resultados mostrados na Tabela-1 ilustram que os valores totais de proteínas do EBFC e EBTC diminuíram após a diálise passando de 260mg para 38,19mg e 78mg para 13,92mg, respectivamente.

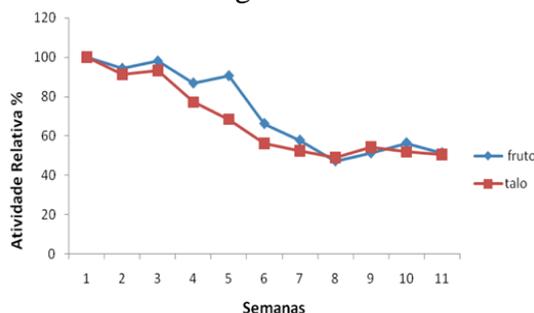
**Tabela-1.** Purificação parcial após a diálise dos extratos brutos de bromelina do fruto e do talo.

Amostras	Volume de Amostra ( mL )	Concentração de Proteína ( mg/mL)	Proteínas Totais ( mg )	Atividade Relativa ( U/mL )	Atividade Específica ( U/mg proteína )	Purificação Parcial
EBFC	50	5,2	260	1,6	0,3	1
EBTC	30	2,6	78	2,12	0,81	1
EBFCD	67	0,57	38,19	2,96	5,19	17,3
EBTCD	48	0,29	13,92	2,06	7,1	8,76
EBFC	75	—	—	—	—	—
EBTC	75	—	—	—	—	—
EBFCD	82	0,236	19,35	—	—	—
EBTCD	86	0,253	21,76	—	—	—

No segundo momento onde houve uma nova extração de amostras, observou-se para as proteínas totais obtidas pelo 2-D Quanti Kit 19,35mg e 21,76mg do EBFCD e EBTCD respectivamente. Em paralelo, foi realizado o teste de estabilidade da enzima ao armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e de acordo com a Figura-1 pode-se observar que no EBFC até a quarta semana continua a 100% de atividade, a partir da quinta semana há uma caída para 90% e na sétima semana para 85%, estabilizando-se entre 80% e 90% até a décima segunda semana. O EBTC manteve atividade até quarta semana com decréscimo de 75% na quinta semana, estabilizando-se aos 80% até a décima segunda semana.



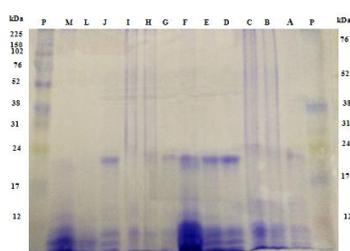
**Figura1.** Estabilidade ao armazenamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) do EBFC e EBTC da bromelina.



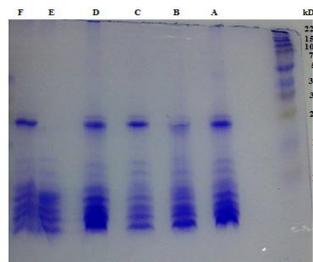
**Figura2.** Estabilidade ao armazenamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) do EBFCD e EBTCD da bromelina

A (Figura-2) mostra que o EBFCD e EBTCD permanecem com cerca de 100% da atividade até a terceira semana. Já a partir da quarta semana esta atividade começa a cair para 90% (fruto) e 80% (talo). Na quinta semana ambos caem para 65% e na sétima semana mantêm-se constante, estabilizando-se em 50% de atividade até a décima primeira semana. A eletroforese SDS-PAGE com malha 12,5%, para as amostras EBC e EBCD do fruto e do talo, usando 100 $\mu\text{g}$ , 300 $\mu\text{g}$ , 500 $\mu\text{g}$  de proteínas mostrou os seguintes resultados (Figura3). Ambos os extratos apresentaram 5 bandas, 2 com peso molecular entre 24 e 17kDa, 3 entre 17 e 12 kDa e outras não bem definidas abaixo de 12kDa.

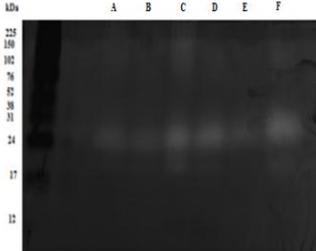
Nestas condições foram realizados outros dois géis com malha 15% e 18%, porém obteve-se melhor resultado para ambas bromelinas com o gel de 15%, como visto na (Figuras-4).



**Figura-3.** Eletroforese SDS-PAGE 12,5%, EBFC-A(100 $\mu\text{g}$ ), B(300 $\mu\text{g}$ ), C(500 $\mu\text{g}$ ), EBFCD D(100 $\mu\text{g}$ ), E(300 $\mu\text{g}$ ),F(500 $\mu\text{g}$ ). EBTC-G(100 $\mu\text{g}$ ), H(300 $\mu\text{g}$ ), I(500 $\mu\text{g}$ ), EBTCD J(100 $\mu\text{g}$ ), L(300 $\mu\text{g}$ ) M(500 $\mu\text{g}$ ). P (marcador molecular).

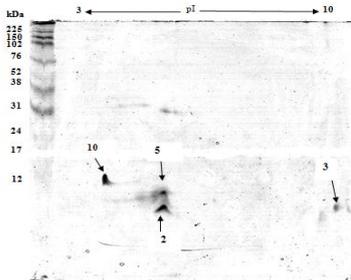


**Figura-4.** Eletroforese SDS-PAGE 15%.EBTCD-A(100 $\mu\text{g}$ ), B(200 $\mu\text{g}$ ), C(300 $\mu\text{g}$ ). EBFCD- D(100 $\mu\text{g}$ ), E(200 $\mu\text{g}$ ), F(300 $\mu\text{g}$ )

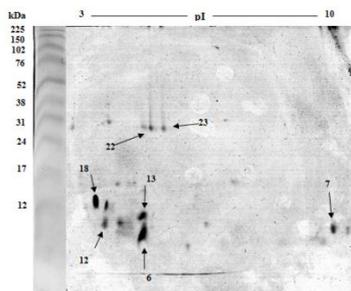


**Figura-5.** Zimograma 15%. EBFCD-A(5 $\mu\text{g}$ ), B(10 $\mu\text{g}$ ), C(15 $\mu\text{g}$ ); EBTCD-D(5 $\mu\text{g}$ ), E(10 $\mu\text{g}$ ), F(15 $\mu\text{g}$ ). Detecção da actividades proteolíticas

No zimograma, foram testadas varias concentrações de proteína nos EBFCD e EBTCD (5µg, 10µg, 15µg, 20µg, 30µg). Porém, o melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 5µg, 10µg e 15µg como observada na (**Figura-5**).



**Figura-6.** Eletroforese 2D. EBFCD-250µg, corado com Prata.



**Figura-7.** Eletroforese 2D. EBTCD-250µg, corado com Prata.

**Tabela-2.** Análise dos spots da eletroforese bidimensional.

Eletroforese 2D EBFCD-250µg			
	Spot N <sup>o</sup>	pI	MW/kDa
	2	5.40	8
	3	10	8
	5	5.40	9
	10	3.81	11
Eletroforese 2D EBTCD-250µg			
	6	5.15	8
	7	10	9
	12	4.22	9
	13	5.15	10
	18	3.99	11
	22	5.38	22
	23	5.71	22

Análise da eletroforese para o EBFCD revelou um total de 11 spots distintos com massas moleculares aparentes entre 8 e 11 kDa (**Figura-6**). Como mostrado na (**Tabela-2**), foi detectado no spot 2, com uma massa molecular de 8 kDa e pI de 3,40, para os spots seguintes 3, 5, 10 as massas moleculares corresponderam a 8, 9 e 11 kDa respectivamente e potenciais isoelétricos (pI) de 10, 5.40, e 3.81 respectivamente.

Para o EBTCD como observado na (**Figura-7**) revelou um total de 23 spots distintos, sendo os mais expressos 6, 12, 13, 18 com massa molecular 8, 9, 10 e 12 kDa respectivamente e para o pI de 5.15, 4.22, 5.15 e 3.99 respectivamente. Houve o aparecimento de dois spots abaixo do peso molecular marcado para 31 kDa, que no EBFCD não apareceu. Correspondendo para estes novos spots 22 e 23 uma massa molecular de 22 kDa para ambos e pI de 5.38 e 5.71 respectivamente.

## DISCUSSÃO

Os resultados mostrados na (**Tabela-1**), ilustram que para os valores totais de proteínas do EBFC e EBTC, diminuíram após a diálise, devido a perda de proteínas/peptídeos menores que 3,5 kDa, que foram liberados durante a diálise como produtos de autocatálise da bromelina. O que mostra que apesar da bromelina ser uma protease e conseqüentemente catalisar hidrólise de sua própria estrutura, houve indiscutivelmente uma purificação excelente da atividade proteolítica com aumento de 2.318,2% para EBFCD e 1.402,47% EBTCD, que mostra a eficiência de purificação após uma simples diálise.

A amostra dialisada tornou-se menos estável (Figura-2) que o extrato não dialisado porque houve retirada dos açúcares e outras moléculas que protegem a estrutura proteica da enzima e também uma redução na concentração de proteína que protegia a bromelina do processo de autocatálise devido à bromelina ser uma protease.

Em relação aos resultados das SDS-PAGES (Figuras 3 e 4), as amostras dialisadas mostraram maior nitidez devido a ausência de açúcares e proteínas e peptídeos contaminantes.

Para o zimografia, a atividade proteolítica da bromelina foi apresentada pela banda proteica de 24 kDa para amostras de fruto e talo.

### CONCLUSÕES

Foi possível a extração da bromelina em forma ativa do *Ananas comosus* variedade pérola. A estabilidade da enzima ao armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  teve durabilidade maior em semanas para os extratos brutos, quando comparados aos extratos dialisados. A eletroforese SDS-PAGE mostrou que a bromelina do *Ananas comosus* variedade pérola apresenta peso molecular próximo de 24 kDa, confirmado pelo zimograma onde foi observado atividade proteolítica das bandas proteicas bromelinas com 24 kDa. A eletroforese bidimensional apresentou spots distintos para ambos os extratos dialisados de fruto ou talo, com pesos moleculares abaixo de 12 kDa (fruto) e apenas spots abaixo de 24 kDa para os extratos dialisados do talo.

Em vista disso, dados da eletroforese bidimensional serão complementados por análise de espectrometria de massa.

### AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. A minha mãe. A minha orientadora pela ajuda e orientação, aos professores Roberto, Marcela pelas dicas, ensinamentos. Ao meu namorado Sillas, por ter me dado forças e acreditado em mim, e por fim aos órgãos competentes que sem eles esse trabalho não teria acontecido, CNPq, UFPE, LIKA, meu muito obrigada.

### REFERÊNCIAS

Borracini, H. M. P. Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

Nadzirah, K. Z.; Zainal, S.; Noriham, A.; Normah, I. Efficacy of selected purification techniques for bromelain. *International Food Research Journal*. Selangor, v. 20, n.1, p. 43-4, 2013.

Orsini, R. A. Bromelain. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 118, n. 7, p. 1640-1644, 2006.

Pavan, R., S. Jain, Kumar A. The properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnol. Res. Int.*, 2012 (2012).