

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL POR BRADFORD REVELA DIFERENÇAS NO METABOLISMO DE PLANTAS DE ORA-PRO-NOBIS EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO¹

Dimitrius Santiago P. Simões Fróes Guimarães^{2,5}, Maria Regina de Miranda Souza^{3,5}, Rafael T. Hirano³, Paulo Roberto Gomes Pereira⁴, Maria Cristina Baracat-Pereira²

RESUMO – O ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) é um alimento rico em proteínas, muito utilizado no meio rural e com importância crescente na indústria de alimentos e farmacológica. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de proteínas pelos métodos de Bradford e Kjeldahl, em folhas de plantas de ora-pro-nobis submetidas a diferentes doses de adubação nitrogenada, comparando estes métodos. As folhas das plantas de ora-pro-nobis adubadas com diferentes doses de N (0, 50, 100, 200 e 400 kg de N/ha) foram coletadas aos 423 dias após o plantio (DAP). Para o método de Bradford, as folhas foram trituradas com nitrogênio líquido e maceradas em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, o homogenato centrifugado e a proteína solúvel determinada no sobrenadante. Para avaliar o perfil proteico, as amostras dos diferentes tratamentos foram separadas por SDS-Tricina-PAGE 14%. O método de Kjeldahl tradicional foi realizado usando-se o fator de correção 6,25. Os resultados por ambos os métodos indicaram que houve alterações nas concentrações e composição de proteínas presentes em função da disponibilidade de N no solo. A proteína total por Kjeldahl aumentou até a dose de 100 kg de N/ha, e a proteína solúvel por Bradford aumentou nas doses de N entre 50 e 200 kg/ha. Pelo SDS-Tricina-PAGE, verificou-se aumento da intensidade das bandas consonante com o método de Bradford. Estes resultados sugerem que a avaliação de proteínas solúveis pelo método de Bradford permite detectar diferenças no metabolismo das plantas de ora-pro-nobis, expressando informações biológicas relevantes para estudos fisiológicos e nutricionais.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, Bradford, concentração de proteínas, Kjeldahl, ora-pro-nobis, proteômica.

SOLUBLE PROTEIN CONCENTRATION BY BRADFORD REVEALS DIFFERENCES IN THE METABOLISM OF ORA-PRO-NOBIS PLANTS AT DIFFERENT NITROGEN LEVELS

ABSTRACT – *Ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata* Mill.) is a protein-enriched food, widely used in rural communities, presenting increasing importance in the food and pharmaceutical industries. The aim of this study was to determine the protein concentration by the Bradford and Kjeldahl methods in plant leaves of ora-pro-nobis under different nitrogen fertilizer levels, comparing these methods. Leaves of ora-pro-nobis from plants fertilized with different nitrogen levels (0, 50, 100, 200, and 400 kg N/ha) were harvested at 423 days after planting (DAP). For the method of Bradford, the leaves were grounded in liquid nitrogen and macerated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, the homogenate was centrifuged and the soluble proteins were determined in the supernatant. To evaluate the protein profile, samples of the different treatments were separated by 14% SDS-Tricine-PAGE. The traditional method of Kjeldahl was performed using the correction factor 6.25. For both methods, the results indicated that there were changes in the concentration and composition of proteins present for different availability of N in the soil. The total protein by Kjeldahl increased up to the level of 100 kg N/ha, and the

¹ Recebido para publicação em 30/04/2013 e aprovado em 18/06/2013.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG.

³ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 36570-000, Viçosa-MG.

⁴ Departamento de Fitotecnia/Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa-MG. baracat@ufv.br

⁵ Os dois autores contribuíram igualmente para a reavaliação desse trabalho.



soluble protein by Bradford increased in N levels between 50 and 200 kg/ha. By SDS-Tricine-PAGE, there was an increase in intensity of bands in line with the Bradford method results. These results suggest that the evaluation of the soluble protein by the Bradford method allows assessing differences in the metabolism of ora-pro-nobis plants, expressing biological information that was relevant to physiological and nutritional studies.

Keywords: Bradford, Kjeldahl, nitrogen fertilization, ora-pro-nobis, protein concentration, proteomics.

1. INTRODUÇÃO

Em uma agricultura sustentável, além da correta recomendação de adubação que promova maior produção com um mínimo de *input* de energia, deve-se avaliar a qualidade biológica do alimento produzido. Assim, a concentração de proteínas totais em folhas de vegetais é a característica mais usada em estudos que relacionam a influência das condições de cultivo da planta com o seu estado fisiológico (Parent et al., 2013). O ora-pro-nobis é uma planta que se destaca pelo seu alto teor de proteínas, alto potencial de uso e facilidade de produção, podendo contribuir para uma maior segurança alimentar. A quantificação de proteína em folhas de plantas é especialmente importante quando são usadas para a alimentação animal, já que a ingestão de quantidades adequadas de proteínas é essencial para a correta manutenção das funções do organismo (Sartori & Guardieiro, 2010).

A determinação de proteína total em vegetais, também denominada proteína bruta (PB), feita pelo método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), é baseada na digestão ácida da folha em temperaturas altas e posterior titulação da amônia gerada no processo de degradação dos compostos nitrogenados. Dessa forma, o método de Kjeldahl apresenta baixos limites de detecção se comparado a outros métodos disponíveis (Asuhara & Nokihara, 2001). Apresenta também baixa seletividade quando o interesse é determinar a proteína bruta, já que não há distinção entre a amônia proveniente dos resíduos de aminoácidos daquela gerada por outros metabólitos nitrogenados.

O valor nutritivo das plantas e seu estado fisiológico são alterados sob condições de estresse nutricional, que alteram os teores de proteína bruta, fibras solúveis e matéria seca total (Andrade et al., 2003), e essas alterações são advindas de mudanças na expressão gênica, que altera tipos e quantidades de proteínas expressas na planta. Entretanto, alterações na quantidade e diversidade das proteínas nem sempre são detectáveis por Kjeldahl, em função da baixa sensibilidade da técnica.

Além disto, esse método utiliza compostos tóxicos, que geram resíduos e risco ambiental e para a saúde humana (Jung et al., 2003). O método de Bradford (Bradford, 1976) é amplamente utilizado em análises bioquímicas para quantificação de proteínas solúveis (Aminian et al., 2013), e se baseia no efeito hipsocrômico de 465 nm para 595 nm, decorrente da ligação seletiva do corante Coomassie® Brilliant Blue G-250 a proteínas, especificamente a aminoácidos aromáticos e básicos (Wenrich & Trumbo, 2012). O presente trabalho teve como objetivo comparar o método de Bradford na determinação de proteína solúvel com o método de Kjeldahl na determinação de proteína total, como indicador de alterações metabólicas de plantas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) cultivadas em diferentes doses de adubação nitrogenada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) foram cultivadas em canteiros, em área experimental da Universidade Federal de Viçosa, e foram adubadas com 0, 50, 100, 200 e 400 kg de N/ha na forma de ureia. Aos 423 dias após o plantio (DAP), as folhas expandidas de plantas de cada tratamento foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Parte das folhas foi seca em estufa (ventilação forçada a 60 °C até peso constante) para obtenção dos valores de percentual de matéria seca, utilizados para cálculo e expressão das concentrações de proteína em g de proteína/100 g de folhas frescas. Para quantificar a proteína total pelo método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), as folhas secas de cada tratamento (0,2 g) foram digeridas em ácido sulfúrico concentrado com sulfato de cobre como catalisador. Os valores obtidos foram convertidos para teores de proteínas utilizando o fator de correção de 6,25.

Para o preparo dos extratos solúveis de cada tratamento, folhas de ora-pro-nobis foram trituradas em nitrogênio líquido utilizando-se almofariz e pistilo,



e ao pó fino obtido foi adicionado tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM, benzamidina 1 mM, tiourea 2 mM e EDTA 10 mM) e polivinilpolipirrolidona 2 % (m/v). O homogenato obtido foi centrifugado a 15.000 x g, por 30 min e 4 °C, e o sobrenadante resultante constituiu o extrato solúvel utilizado para quantificação de proteínas por Bradford (Bradford, 1976). O ensaio foi adaptado para microquantidades, em placa de 96 poços e realizado em triplicata. Volumes de 40 mL de amostra devidamente diluída foram misturados a 160 mL de reagente de trabalho de Bradford, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 min e a absorbância a 595 nm foi mensurada utilizando-se fotômetro (TP-Reader, Thermoplate, Brasil). Para a quantificação das proteínas solúveis, preparouse uma curva padrão ajustada por regressão linear, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como proteína padrão entre zero e 75 mg de BSA ($Y=0,0829x+0,0809$, $R^2=0,99$).

Para acompanhar o perfil proteico dos diferentes tratamentos, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 14 % T desnaturante, em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) (Judd, 1994) com 7 µL dos extratos solúveis de cada tratamento como amostras. Os marcadores de massa molecular foram *Ultra-Low Range* (SIGMA, EUA) e *Broad Range* (Bio-Rad, EUA). As proteínas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R-250 por três horas e o corante residual foi removido com solução de ácido acético 5 % por uma hora.

3. RESULTADOS

As concentrações de proteína total obtidas pelo método de Kjeldahl e de proteína solúvel pelo método de Bradford aumentaram com as doses de nitrogênio (N) adicionadas ao solo para o cultivo do ora-pro-nobis. Os resultados por ambos os métodos indicaram que houve alteração na composição de proteínas presentes em função da disponibilidade de N no solo. As concentrações de proteína total por Kjeldahl foram cerca de 50 vezes superiores às determinadas de proteína solúvel por Bradford (Figura 1A). Houve, entretanto, diferença na síntese de proteínas totais e de proteínas solúveis em função da disponibilidade de N para a planta. Em doses de 0 e 50 kg de N/ha, a proteína total por Kjeldahl aumentou, o que não ocorreu para a proteína solúvel por Bradford. Para doses de N acima de 100 kg/ha, a proteína por Kjeldahl apresentou variações

menores com as doses, enquanto a proteína solúvel por Bradford apresentou variações crescentes com as doses (Figura 1A). Considerando que o volume aplicado em cada canaleta do gel foi o mesmo (7mL), as maiores intensidades das bandas proteicas nas maiores doses de N observadas por SDS-Tricina-PAGE corroboram as concentrações de proteína solúvel (Figura 1B). É ainda possível verificar que muitas proteínas apresentam bandas de intensidades semelhantes para as diferentes amostras, próximas a 14, 20 e 30 kDa (Figura 1B), enquanto que outras bandas estão presentes apenas nas canaletas de algumas amostras, em especial bandas acima de 30 kDa para as doses de 200 e 400 kg N/ha.

4. DISCUSSÃO

Os valores de proteína total avaliados por Kjeldahl e os de proteína solúvel avaliados por Bradford estão compatíveis com os trabalhos de Aguiar et al. (2000) e Andrade et al. (2003), nos quais foi comprovado o aumento do teor de proteína total em gramíneas com o aumento das doses de nitrogênio na adubação. Os autores do último trabalho propõem que o aumento nos teores de proteína total decorre do aumento na quantidade de nitrogênio absorvido, que é reduzido para a forma amoniacal e utilizado para a síntese do ácido glutâmico, precursor na síntese de outros aminoácidos.

Em baixas doses de N, pode-se afirmar que a planta sintetizou preferencialmente proteínas estruturais, o que é evidenciado pelo aumento apenas dos valores de proteína total por Kjeldahl. Para doses de N acima de 100 kg/ha, os resultados sugerem menor síntese de proteína estrutural em favorecimento da maior síntese de proteínas solúveis, que correspondem a proteínas metabólicas funcionais. Esse resultado é ratificado no trabalho de Liao et al. (2012) em estudos de proteoma de espigas de milho (*Zea mays* L.), utilizando espectrometria de massas e eletroforese bidimensional. Os autores relataram que a deficiência de nitrogênio leva a uma resposta generalizada ao estresse, com variações nas concentrações e tipos de proteínas expressas relacionadas ao metabolismo de carbono, nitrogênio e hormônios e que as proteínas diferencialmente expressas eram majoritariamente proteínas solúveis.

As plantas têm a capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, de fornecimento de nutrientes, água, luz e temperatura, a estresses bióticos

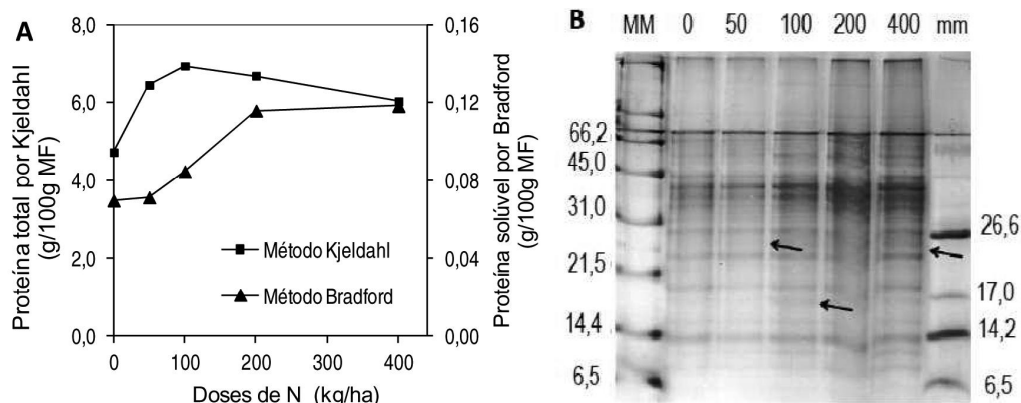


Figura 1 - A) Concentração de proteína total por Kjeldahl e proteína solúvel por Bradford em folhas de ora-pro-nobis em função de doses de N adicionadas ao solo. B) SDS-Tricina-PAGE dos tratamentos referentes a 0, 50, 100, 200 e 400 kg N/ha. As setas indicam bandas proteicas diferencialmente presentes nos tratamentos. Marcadores de massa molecular: MM (*Broad Range*) e mm (*Ultra-Low Range*).

causados por fitopatógenos ou por outras pragas que afetam a utilização desses fatores ambientais (Almeida et al., 2012; Qu et al., 2013). No processo de adaptação ao estresse, o metabolismo vegetal deve ser alterado direcionando-o para a produção de metabólitos primários e secundários em quantidades suficientes para evitar que uma doença se instale, o que pode levar a uma menor produção, problemas de reprodução e morte da planta (Waraich et al., 2012). O perfil proteico obtido por SDS-Tricina-PAGE demonstrou alteração no metabolismo de *Pereskia aculeata* Mill. com a variação nas doses de N, o que foi demonstrado pela quantificação de proteínas solúveis por Bradford. Não foram perceptíveis relações entre o perfil protéico do gel e o teor de proteína total avaliado por Kjeldahl, demonstrando limitações desta técnica para estudos de metabolismo de proteínas em plantas.

Como o método de Bradford detectou concentrações de proteína 50 vezes menores do que aquelas identificáveis pelo método de Kjeldahl, este método se mostrou especialmente importante para estudos de genômica funcional, incluindo-se a proteômica. Almeida et al. (2012) verificaram distinção entre genótipos de soja resistente e susceptível à ferrugem asiática ao avaliar a proteína solúvel por Bradford em folhas. Estudos de genômica funcional auxiliam na criação de cultivares com maior eficiência na absorção e metabolismo de nutrientes e/ou que apresentem resistência a pragas e patógenos, melhorando o aproveitamento do solo e reduzindo a necessidade de defensivos agrícolas,

o que impacta positivamente na produção vegetal sustentável (McLaren, 2000).

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista que as proteínas do metabolismo primário e secundário são majoritariamente proteínas solúveis no citosol, os resultados são um indício de que o método de Bradford pode detectar diferenças no estado metabólico das plantas de ora-pro-nobis, expressando informações biológicas relevantes para estudos fisiológicos e nutricionais.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, à CAPES, ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro, e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, pela infra-estrutura.

7. LITERATURA CITADA

- AGUIAR, R.S.; VASQUEZ, H.M.; SILVA, J.F.C. Produção e composição química-bromatológica do capim-furacão (*Panicum repens* L.) sob adubação e diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.9, p.325-333, 2000.
- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.E. et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e susceptível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.163-172, 2012.



- AMINIAN, M.; NABATCHIAN, F.; VAISI-RAYGANI, A. et al. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to cetyltrimethylammonium bromide: An interference with the Bradford assay. **Analytical Biochemistry**, v.434, p.287-291, 2013.
- ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M.; QUEIROZ, D.S. et al. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1643-1651, 2003.
- ASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4581-4583, 2001.
- 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, 1976.
- JUDD, R.C. Electrophoresis of peptides. In: Walker, J.M. (Ed.). **Methods in molecular biology: basic protein and peptide protocols**. Totowa: Humana Press, 1994. p.49-55.
- JUNG, S.; RICKERT, D.A.; DEAK, N.A. et al. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.80, p.1169-1173, 2003.
- KJELDAHL, J. Neue methode zur bestimmung des stick-stoffs in organischen korpfern. **Zeitschrift für Analytische Chemie**, v.22, p.366-382, 1883.
- LIAO, C.; PENG, Y.; MA, W. et al. Proteomic analysis revealed nitrogen-mediated metabolic, developmental, and hormonal regulation of maize (*Zea mays* L.) ear growth. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.5275-5288, 2012.
- MCLAREN, S.J. Future renewable resource needs: will genomics help? **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.75, p.927-932, 2000.
- PARENT, S.E.; PARENTE, L.E.; EGOZCUE, J.J. et al. The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.1-10, 2013.
- QU, A.-L.; DING, Y.-F.; JIANG, Q. et al. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.432, n.2, p.203-207, 2013.
- SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.422-432, 2010.
- WARAICH, E.A.; AHMAD, R.; HALIM, A. et al. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.12, p.221-244, 2012.
- WENRICH, R.B.; TRUMBO, T.A. Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay. **Analytical Biochemistry**, v.428, p.93-95, 2012.

