ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE PLÂNTULAS DE *CEREUS HILDMANNIANUS*

Shams Mohamed Elgasim Abbaker (PIC/CNPq/FA/UEM), Claudete Aparecida Mangolim (Orientadora). E-mail: camangolim@uem.br. Silvana Alves Rosa (Coorientadora). E-mail: pg55927@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Biotecnologia /Biotecnologia Vegetal.

Palavras-chave: Proteômica; Cactacae; Eletroforese.

RESUMO

A família Cactaceae reúne espécies adaptadas a ambientes secos, apresentando expressiva diversidade biológica e metabólica. *Cereus hildmannianus* destaca-se pelo potencial ornamental, nutricional e farmacológico. O estudo do proteoma dessa espécie é fundamental para compreender suas respostas fisiológicas; contudo, a extração de proteínas em cactáceas representa um desafio devido ao alto teor de mucilagem e compostos interferentes. Este trabalho teve como objetivo estabelecer e otimizar um método eficaz para a extração de proteínas totais a partir de plântulas de *Cereus hildmannianus* germinadas *in vitro*. Sementes de três morfologias distintas (eretos, tortuosos e monstruosos) foram germinadas em meio Knudson C. e as plântulas submetidas à extração proteica. O protocolo modificado (Teste 1) utilizou 200 mg de tecido vegetal de *C. hildmannianus* homogeneizado em tampão de extração, seguido de precipitação a −20 °C por 24 horas em solução de TCA e Acetona (1:1 v/v). Após a precipitação, o *pellet* foi lavado com acetona acrescida de 0,2% de DTT e solubilizado em tampão contendo ureia, Triton X-100 e DTT. A análise por SDS-PAGE (12%) demonstrou que a metodologia removeu interferentes de forma eficiente, garantindo extratos de alta qualidade com boa resolução de bandas proteicas. Assim, o método adaptado provou ser eficaz para a extração de proteínas totais de plântulas da espécie, estabelecendo uma base sólida para futuras análises proteômicas comparativas.

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae compreende cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, destacando-se pela diversidade morfológica, adaptação a solos pobres e baixa

demanda de água (Stivanin et al., 2025). O gênero *Cereus* tem grande relevância agrícola e ornamental. A espécie *Cereus hildmannianus* K. Schum. é um cacto colunar nativo do Sul e Sudeste do Brasil, com frutos comestíveis sem espinhos e ocorrência nos biomas Pampa e Mata Atlântica (Becker et al., 2020).

Entretanto, a extração de proteínas em cactáceas enfrenta obstáculos técnicos devido à abundância de heteropolissacarídeos complexos e compostos fenólicos, que aumentam a viscosidade e dificultam a solubilização proteica (Fernandes et al., 2020). Diante disso, este trabalho buscou estabelecer um método eficiente para a extração de proteínas totais de plântulas de três morfologias de *C. hildmannianus* obtidas *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de *Cereus hildmannianus* foram submetidas à quebra de dormência por imersão em água destilada por 24 horas. Em seguida, foram lavadas, desinfestadas com hipoclorito de sódio e enxaguadas com água destilada autoclavada. Posteriormente, em condições assépticas, foram inoculadas em meio de cultura Knudson C. (1946) para germinação e obtenção de plântulas.

A extração total de proteínas foi realizada a partir de plântulas de *C. hildmannianus* germinadas *in vitro* e de plantas adultas. Esse processo foi dividido em duas etapas, fracionando-se em dois dias. Primeiramente, preparou-se o tampão de extração contendo sacarose, Tris-HCL (Tris Hidroximetil Aminometano e ácido clorídrico), EDTA (Ácido etilenediaminetetraacético), PMSF (Fenilmetilsulfonil Fluoreto), Triton X-100 e β-Mercaptoetanol. Após isso, amostras das plântulas de *C. hildmannianus* germinadas das sementes coletadas de plantas com três diferentes morfologias e de plantas adultas (eretas e monstruosas) foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas em alíquotas de 200 mg por microtubo. Adicionou-se 1,5 mL de tampão a cada amostra, homogeneizando-se por alguns minutos em agitador vórtex.

As amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. No segundo dia, os materiais biológicos foram lavados três vezes com solução de acetona/DTT (1,4-ditiotreitol) 2% e centrifugados a 15.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido (aproximadamente 1 a 1,5 mL) e adicionou-se acetona e TCA (ácido tricloroacético) (1:1 v/v; 3 g de TCA para 3 mL de acetona). Logo em sequência, ocorreu a solubilização do precipitado em tampão contendo ureia, Triton X-100 e DTT e as amostras foram armazenadas a -20 °C. A separação das proteínas foi realizada por SDS-PAGE, utilizando géis de empilhamento (5%) e de separação (12%), preparados com bis-acrilamida, Tris-HCl,

SDS (dodeciil sulfato de sódio), PSA (persulfato de amônio) e TEMED (N′-tetrametiletilenodiamina).

A eletroforese foi conduzida a 200 V por aproximadamente 3,5 h e posteriormente, os géis foram fixados e corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 para a visualização e avaliação do perfil proteico obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo de extração baseado em precipitação com TCA/acetona demonstrou eficiência na recuperação de proteínas totais de *Cereus hildmannianus*, permitindo a visualização de bandas definidas no gel de SDS-PAGE. Esse resultado é semelhante ao observado por Fernandes et al. (2020), que também verificaram maior número de bandas proteicas bem definidas no gel, utilizando o método de extração com TCA/acetona em comparação aos métodos de extração com fenol.

Como adaptação do protocolo de extração, o período de precipitação foi estendido de 2 horas para *overnight* a −20 °C, condição empregada em diferentes protocolos de extração proteica vegetal e que pode contribuir para a precipitação das proteínas (WU et al., 2014).

A análise do perfil proteico por SDS-PAGE revelou diferenças na intensidade e definição das bandas entre as plântulas e as plantas adultas (Figura 1).

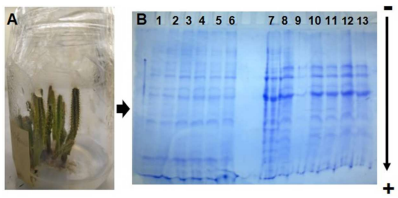


Figura 1 – Amostras das plântulas de *C. hildmannianus* germinadas *in vitro* em meio Knudson (A). Perfil eletroforético das proteínas extraídas de plântulas e plantas adultas de *Cereus hildmannianus*, evidenciado por SDS-PAGE, 1 a 6 constam amostras de plântulas eretas; 7 a 9 são plantas adultas da morfologia monstruosa e 10 a 13 referem-se a plantas adultas eretas (B).

Ao comparar as amostras, observou-se uma ordem crescente na intensidade das bandas, partindo das plântulas eretas, que apresentaram menor intensidade, seguidas pelas plantas adultas monstruosas, até as plantas adultas eretas, que apresentaram maior intensidade. A menor densidade observada nas plântulas sugere menor recuperação proteica, podendo indicar que, para tecidos jovens cultivados *in vitro*, o aumento da massa inicial de 200 para 300 mg pode favorecer a obtenção de um perfil proteico mais representativo. Em contraste, os tecidos adultos

apresentaram maior acúmulo proteico, resultando em perfis de bandas mais densos e nítidos.

CONCLUSÕES

Com base nos testes realizados até o momento visando o estabelecimento de um protocolo para extração de proteínas totais, diversos métodos mostraram-se pouco eficazes, uma vez que requereram modificações e apresentaram resultados insatisfatórios, com baixa quantidade ou ausência de bandas proteicas no gel de SDS-PAGE. O protocolo de Fernandes *et al.* (2020) com adaptações apresentou, até o momento, os melhores resultados para a extração de proteínas totais. Alterações na quantidade de material vegetal utilizado em plântulas poderão ser consideradas em extrações posteriores, visando à obtenção de um perfil proteico mais representativo.

REFERÊNCIAS

BECKER, Rafael; DAL RI, Leandro; FARIAS-SINGER, Rosana; SINGER, Rodrigo Bustos. Unveiling the germination requirements for *Cereus hildmannianus* (Cactaceae), a potential new crop from southern and southeastern Brazil**. Acta Botanica Brasilica**, v. 34, n. 4, p. 765–771, 2020. DOI: 10.1590/0102-33062020abb0263.

FERNANDES, V. N. A.; MANGOLIN, C. A.; NEVES, A. F.; SOUSA NOGUEIRA, F. C.; ZENI NETO, H.; MACHADO, M. F. P. S. Extraction of total protein from shoots of *Cereus* morphological variants (Cactaceae) for proteomic analysis. **Advances in Horticultural Science**, v. 34, n. 2, p. 233–240, 2020. DOI: 10.13128/ahsc-7848.

STIVANIN, Amanda Ben; NOVAIS, Vitória Fernanda Belmonte; GINDRI, Amanda Leitão. *Cereus hildmannianus*: composição química e atividade antioxidante. **Revista Multiciência Online**, v. 8, n. 3, 2025. Disponível em: http://urisantiago.br/multicienciaonline. Acesso em: 23 ago. 2026.

WU, Xiaolin; GONG, Fangping; WANG, Wei. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. **Proteomics,** v. 14, n. 6, p. 645–658, 2014. DOI: 10.1002/pmic.201300239.