

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



Análise do perfil proteômico de diferentes órgãos de *Bixa orellana* L.

MONIQUE REIS DE SANTANA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

MONIQUE REIS DE SANTANA

Análise do perfil proteômico de diferentes órgãos de *Bixa orellana* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

MONIQUE REIS DE SANTANA

Análise do perfil proteômico de diferentes órgãos de *Bixa orellana* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Aprovada: 19 de fevereiro de 2020

Dra. Viviane Santos Moreira
(IFBA-Campus Euclides da Cunha)

Dra. Helena Costa
(UESC)

Dra. Fátima Cerqueira Alvim
(UESC)

Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares
(UESC – Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ely Lisboa dos Reis e Douglas Pereira de Santana, por todo o apoio, amor, cumplicidade, presença e constante incentivo na minha vida.

Aos meus irmãos, Diego, Malu e Arthur, pelo companheirismo e carinho, por estarem sempre me encorajando em todos os momentos.

A todos os meus familiares (avós, primos, tias e tios) que sempre me apoiam muito.

A minha orientadora professora Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares, por sua orientação, pelas oportunidades desde a graduação e por todo incentivo e confiança.

Ao professor Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela confiança, acolhimento e apoio durante toda a jornada.

A todos os professores, doutores e mestres do PPGGBM que contribuíram para o meu crescimento intelectual e que são exemplos de profissionais dedicados e competentes.

Aos colegas e técnicos dos laboratórios, pelas contribuições e grande ajuda na execução deste trabalho, por todo o apoio e incentivo.

Aos meus amados amigos pelos momentos agradáveis compartilhados, pelos conselhos e palavras de carinho e estímulo, meu muito obrigada por tudo.

**"Não existe outro dia. Todos os dias
estão presentes agora. Este momento
contém todos os momentos."**

O Grande Abismo (C. S. Lewis)

ÍNDICE

EXTRATO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Caracterização botânica de <i>Bixa orellana</i> L.....	13
2.2 Importância econômica de <i>B. orellana</i>	14
2.3 Rota de biossíntese de bixina.....	19
2.4 Estudos proteômicos de plantas.....	24
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	27
3.1 Hipótese.....	27
3.2Objetivos.....	27
3.2.2 Geral.....	27
3.2.3 Específicos.....	27
CAPÍTULO 1An improved protein extraction protocol for 2D-SDS-PAGE for seeds rich in interfering compounds.....	28
ABSTRACT	28
1 INTRODUCTION	29
2 MATERIAL AND METHODS	30
2.1 Plant material.....	30
2.2 Protein extraction.....	31
2.3 Protein profile in 2D-SDS-PAGE.....	32
2.4 Statistical analysis.....	33
3 RESULTS.....	33
4 DISCUSSION.....	37
5 CONCLUSIONS.....	40
6 REFERENCES	41
CAPÍTULO 2Análise do perfil proteômico global de diferentes órgãos de <i>Bixa orellana</i> L. por eletroforese em gel bidimensional.....	44
RESUMO.....	44
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Coleta das sementes.....	47
2.2 Obtenção das proteínas.....	47
2.3 Eletroforese 2D.....	48

2.4 Visualização dos <i>spots</i> e análise de imagens.....	48
2.5 Predição teórica do Peso Molecular e Ponto Isoelétrico (pI) das principais enzimas envolvidas na rota de biossíntese de bixina.....	49
3 RESULTADOS	49
4 DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÃO.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	58
7 REFERÊNCIAS.....	60

EXTRATO

SANTANA, Monique, R., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2020.
Análise do perfil proteômico de diferentes órgãos de *Bixa orellana* L. Orientadora: Prof^a.
Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani.

Bixa orellana L., conhecida popularmente no Brasil como urucum, é uma espécie tropical, nativa da América do Sul, que apresenta altas concentrações de pigmentos avermelhados no arilo de suas sementes. Esses pigmentos possuem importância econômica reconhecida por serem uma alternativa aos corantes sintéticos e por isso, são amplamente utilizados por indústrias de alimentos, na pigmentação de manteigas, queijos, iogurtes, biscoitos, salsichas, balas, salgadinhos, dentre outros. Além do seu uso no ramo de alimentos, também é bastante utilizado nas indústrias têxteis, de cosméticos e farmacêuticas. Sabe-se que *B. orellana* é a única espécie a acumular o pigmento bixina em suas sementes e do ponto de vista econômico ocupa a segunda colocação dentre os corantes naturais mais utilizados pela indústria. No entanto, ainda não são bem estabelecidas as rotas de biossíntese, catabolismo e regulação do acúmulo desse pigmento, bem como de outros metabólitos secundários com aplicável potencial biotecnológico. Com a otimização de um protocolo de extração, descrito no capítulo 1, foi possível obter um alto rendimento de proteínas de alta qualidade e estabelecer, pela primeira vez, o perfil proteico de sementes de *B. orellana* em 2D-SDS-PAGE. O protocolo foi validado na espécie *Carpotroche brasiliensis*. No capítulo 2, amostras de botão floral e de três diferentes estágios de desenvolvimento das sementes (S2, S5 e S7), resolvidas em 2D-SDS-PAGE, apresentaram diferenças no perfil proteico quanto a distribuição de *spots*, bem como diferenças numéricas dos *spots* detectados, com 262 para a primeira e 279, 272 e 245 *spots* para as respectivas amostras de sementes estudadas. Também, foi obtidos resultados de predição do peso molecular e ponto isoelétrico (análise *in silico*) de produtos de genes envolvidos na rota de biossíntese do metabólito secundário bixina. Esse estudo pioneiro possibilitará alavancar as pesquisas sobre urucum, destacando seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: 2D-SDS-PAGE; metabólitos secundários; bixina, urucum

ABSTRACT

SANTANA, Monique, R., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, february, 2020.
Proteomic profile analysis of different organs from *Bixa orellana* L. Advisor: Prof.^a Dr.^a Virgínia Lúcia Fontes Soares. Advisor Committee Members: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani.

Bixa orellana L., known in Brazil as *urucum*, is a tropical species, native to South America, which has high rates of reddish pigments in the aryl of its seeds. These pigments have recognized economic importance for being an alternative to synthetic dyes. For this reason, they are widely used by food industries, in the pigmentation of butters, cheeses, yoghurts, cookies, sausages, candies, snacks, among others. In addition to its use in food industry, it is also widely used in the textile, cosmetics and pharmaceutical industries. It is known that *B. orellana* is the only species to accumulate bixin in its seeds and from an economic point of view it occupies the second position among the natural dyes most used by the industry. However, biosynthesis, catabolism and regulation of the accumulation of this pigment, as well as other secondary metabolites with applicable biotechnological potential in *B. orellana* are not yet well established. With the optimization of an extraction protocol, described in chapter 1, it was possible to obtain a high yield of high quality proteins and to establish, for the first time, the protein profile of *B. orellana* seeds in 2D-SDS-PAGE. The protocol was validated in the species *Carpotroche brasiliensis*. In chapter 2, samples of floral buds and three different stages of seed development (S2, S5 and S7), resolved in 2D-SDS-PAGE, showed differences in the protein profile in terms of spot distribution, as well as numerical differences in spots detected, with 262 for the first and 279, 272 and 245 spots for the respective seed samples studied. Also, results of prediction of molecular weight and isoelectric point (in silico analysis) of gene products involved in the biosynthesis pathway of the secondary metabolite bixin were obtained. This pioneering study will make it possible to leverage research on annatto, highlighting its biotechnological potential.

Keywords: 2D-SDS-PAGE; secondary metabolites; bixin, annatto

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1950, estudos relacionados aos metabólitos secundários têm aumentado significativamente, uma vez que, representam um grupo de substâncias com importantes propriedades farmacológicas e de grande valor econômico. Esses compostos contribuem para odores, sabores e cores específicos das plantas. Além disso, esses compostos são conhecidos por suas propriedades biológicas que promovem a proteção das plantas contra possíveis nocividades. Muitos dos metabólitos secundários são antibióticos, antifúngicos e antivirais. Portanto, além de serem conhecidos como moléculas importantes na adaptação das plantas ao ambiente, são fontes únicas de aditivos alimentares naturais e representam bioativos com grande potencial de aplicação medicinal (BOURGAUD et al., 2001; ZHAO et al. 2005; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Dentre as espécies que acumulam metabólitos secundários em seus tecidos destaca-se o urucum (*Bixa orellana* L.). Essa espécie apresenta grande importância econômica por ser a fonte exclusiva do corante natural bixina (RIVERA-MADRID et al., 2006), um metabólito secundário encontrado principalmente no pericarpo de suas sementes, conferindo-lhes a coloração vermelha (KOVARY et al., 2001). A bixina é um apocarotenoide monometil éster carboxílico, largamente utilizado nas indústrias têxtil, de cosmético, farmacêutica e de alimentos (MERCADANTE & PFANDER, 1997; RIVERA-MADRID et al., 2016).

A produção comercial do corante natural do urucum tem sido documentada desde 1870 na Europa e nos EUA e seu uso na indústria alimentícia aumentou significativamente no mundo após 1960, com a proibição do uso de vários corantes sintéticos por serem considerados cancerígenos (RODRIGUES et al., 2007). A principal aplicação da bixina está na indústria de alimentos, sendo utilizada para colorir queijos e outros produtos lácteos, como misturas de manteiga, iogurte, assim como salsichas, molhos, doces e salgadinhos (MERCADANTE&PFANDER, 1997; NAMITHA& NEGI, 2010).

Além da bixina tem sido relatado que outros metabólitos secundários, produzidos pelo urucum, vêm sendo utilizados desde a composição de rações para animais até no combate a doenças coronarianas, redução do colesterol total e manutenção dos níveis de colesterol-HDL (HARDER, 2005). Dentre esses, estão a norbixina (C₂₄H₂₈O₄), derivado desmetilado da bixina; e em quantidades inferiores, outros pigmentos como luteína, zeaxantina, fitoflueno e neurosporeno (MERCADANTE&PFANDER, 1997). Acredita-se que as propriedades medicinais do urucum se relacionam com a presença não só da bixina, mas também em

função desses outros compostos presentes na composição dos extratos da planta (RIVIERA-MADRID et al., 2016).

Os processos e enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários em urucum ainda precisam ser melhor esclarecidos, especialmente do composto bixina. Estudos sugerem que a rota de biossíntese da bixina inicia-se a partir da clivagem do carotenoide de 40 carbonos licopeno, e assim como na maioria dos processos de degradação e síntese de outros apocarotenoides, enzimas como as dioxigenases da clivagem do carotenoide (CCD), desidrogenase do aldeído (ALDH) e metiltransferases estariam envolvidas nesse processo (JAKO et al., 2002; BOUVIER et al., 2003; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015; RIVERA-MADRID et al., 2016).

Com a finalidade de elucidar os mecanismos moleculares associados a biossíntese de metabólitos secundários, a caracterização do perfil proteico de órgãos onde esses compostos são acumulados, torna-se indispensável. Estudos como este possibilitam a compreensão do acúmulo diferencial de proteínas possivelmente envolvidas nas rotas de biossíntese desses compostos e suas potenciais funções (JACOBS et al., 2000). Muito eficiente e predominantemente usada para estudos proteômicos de plantas a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) é uma ferramenta que juntamente com a espectrometria de massas contribui para a identificação de proteínas de vias que levam a síntese de metabólitos secundários (HESKETH et al., 2002; VERLENGIA et al., 2012). A escolha do método de preparo da amostra e a extração de proteínas, que antecede a separação em 2D-SDS-PAGE são essenciais para a obtenção de bons resultados na caracterização do proteoma (PIROVANI et al., 2008). Nesse contexto, o principal problema relacionado à obtenção de proteínas das sementes de urucum são os altos níveis de corantes, considerados compostos interferentes e que impedem a extração, solubilização e resolução das proteínas em 2D-SDS-PAGE (ROSE et al., 2004; ISAACSON et al., 2006). Assim, um protocolo otimizado para a espécie é indispensável em termos de quantidade de proteínas extraídas, qualidade de imagem e quantidade de *spots* observados (WANG, et al., 2004; PIROVANI et al., 2008).

Até o momento não há registro de análise do perfil proteômico de órgãos de *B. orellana*, e tampouco foram comparados perfis proteicos das sementes de urucum em diferentes estádios de desenvolvimento. No presente estudo, o capítulo um descreve um protocolo de extração de proteínas otimizado para sementes de urucum, que envolve o manejo mínimo das amostras e que é adequado para a comparação de padrões em 2D-SDS-PAGE. No capítulo dois, uma análise comparativa dos perfis proteicos de botão floral e diferentes estágio de desenvolvimento das sementes de *B. orellana*, identificou diferenças numéricas e de

distribuição de *spots* detectados em 2D-SDS-PAGE. Com isso, pretende-se ampliar a compreensão das bases moleculares do acúmulo de metabólitos secundários em urucum e verificar se há alterações proteômicas do metabolismo durante o desenvolvimento das sementes, bem como, correlacionar o proteoma com os perfis de expressão de genes de enzimas da rota de biossíntese de metabólitos secundários em *B. orellana*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização botânica de *Bixa orellana* L.

Bixa orellana é uma espécie vegetal pertencente à família *Bixaceae* e inserida na ordem Malvales. Essa planta é nativa da América tropical e amplamente cultivada nas Américas Central e do Sul em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (MUHINDI, 2013). Algumas referências indicam que a primeira menção a respeito do urucum foi encontrada na carta de Pero Vaz de Caminha quando informava a descoberta do Brasil. Em seus registros foram mencionadas as sementes, pequenas e vermelhas, utilizadas na pintura corporal, e os frutos com aspecto que lembravam ouriços devido a seus espinhos (CORREA, 1975; MARTORELL, 1975; CARVALHO, 1989).

B. orellana é uma planta perene, arbustiva e de crescimento rápido, variando de 3 e 5 metros de altura, mas podendo atingir até 9 metros. Com o tronco medindo entre 20-30 cm de diâmetro essa planta apresenta a casca externa marrom escuro, resistente, as vezes fissurada; a casca interna é rosada com seiva laranja, ligeiramente amarga; galhos verdes com escamas minúsculas, marrom-avermelhadas, tornando-se marrom-escuras. As folhas são simples, de coloração verde-clara com dimensões de média a grande e dispostas em espiral. As flores são hermafroditas, dispostas em panículas ramificadas terminais; com 4-7 pétalas, podendo ter tonalidade rosadas, esbranquiçadas ou arroxeadas. Os frutos são do tipo cápsula, dispostos em panículas, apresentam coloração desde o verde ao vermelho e variam entre os formatos globular e oval. Esses frutos são recobertos de espinhos flexíveis, longos, verdes, marrons esverdeados ou vermelhos quando maduros. Com base na flor, cor e forma do fruto, *B. orellana* é classificada em variedades distintas; com flores brancas e cápsulas verdes, com flores roxas e cápsulas vermelhas acastanhadas e com flores rosas e cápsulas vermelhas (ORWA et al., 2009; AKSHATHA et al., 2011; PARIMALAN et al., 2011).

As sementes de urucum podem variar quanto a forma e medir de 0.3 a 0.5 cm de largura e 0.2 a 0.3 cm de diâmetro. No arilo dessas sementes são acumulados pigmentos conferindo-lhes a coloração avermelhada, podendo haver variação na quantidade de pigmento acumulado em relação a variedade (AKSHATHA et al., 2011). A Figura 1 mostra fotos de uma das variedades de *B. orellana* utilizada nesse trabalho, denominada Embrapa 37, sendo visualizados frutos e flores (1A) e sementes (1B). O número de sementes encontradas nos frutos também pode variar conforme o tipo e variedade mas, em média cada cápsula pode conter entre 30 e 45 sementes, com plantas podendo apresentar até 60 sementes por cápsula (MANTOVANI et al., 2013). Nas sementes, os compostos são distribuídos quimicamente em 40 a 45 % de celulose, 3,5 a 5,2 % de açúcares, 0,3 a 0,9 % óleo essencial, 3 % de óleo fixo, 13 a 16 % de proteínas e 4,5 a 5,5 % de pigmentos, (REITH AND GIELLEN, 1971; PRESTON AND RICKARD, 1980).

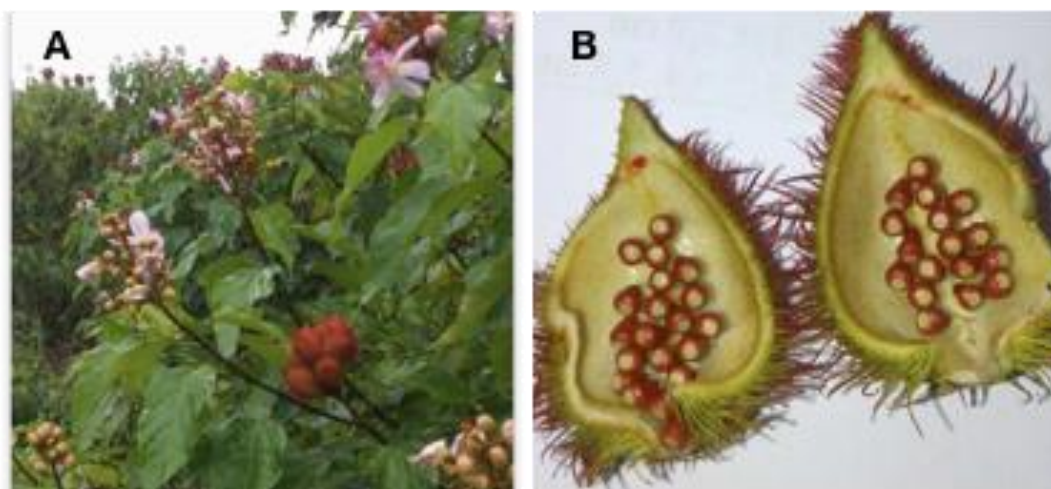


FIGURA 1. Fotos de *Bixa orellana*, variedade Embrapa 37. A: frutos e flores; B: sementes.

2.2 Importância econômica de *B. orellana*

Das sementes do urucum são extraídos pigmentos com amplo espectro de cores, variando do laranja ao vermelho, que possuem sua importância reconhecida como um dos principais corantes naturais mais utilizados no mundo (PARIMALAN et al. 2011; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2018). Dentre os principais grupos dos corantes naturais, destacam-se os carotenóides que são intensamente coloridos e amplamente distribuídos na natureza (HIRSCHBERG, 2001; CUNNINGHAM, 2002; TANAKA et al. 2008).

Os carotenoides são metabólitos secundários de uma subclasse de terpenoides produzidos por organismos fotossintetizantes como bactérias, algas e plantas, além de

algumas bactérias e fungos não fotossintetizantes (BRITTON, 1995). Esses compostos desempenham importantes funções biológicas e são a mais interessante e bem distribuída classe de pigmentos naturais, fornecendo uma variação de cores que vai do amarelo ao vermelho, sendo ótimos atrativos para polinizadores e dispersores de sementes (ARMSTROG AND HEARST, 1996). No entanto, os carotenoides se destacam também por apresentarem propriedades relacionadas principalmente à função antioxidante e juntamente com os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) representam um importante grupo de bioativos funcionais envolvidos na prevenção de doenças como alergias, inflamações, doenças cardiovasculares, arteriosclerose, doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, além da redução dos riscos de catarata e câncer (KNIGHT , 1995; GORI et al., 2011; NATIVIDAD & RAFAEL, 2014; ZERRERS et al., 2019).

A aplicação dos carotenoides do urucum como corante natural tem sido observada desde o descobrimento do Brasil, sendo utilizado por indígenas tanto na culinária como na pintura de ferramentas de caça e pesca, coloração de cerâmicas e vestimentas, pinturas corporais, além de ser usado também como repelente e protetor solar (CONSTANT et al., 2002). Ainda, é uma planta com propriedades terapêuticas e utilizada na medicina tradicional por muitas comunidades no Brasil, bem como, em países como Colômbia, Filipinas, Índia, México (KUMAR et al., 2009). Seu uso tem sido relatado no tratamento de diferentes tipos de erupções cutâneas, para curar doenças urinárias, reumatismo e ainda como agente antisséptico e antibacteriano (CICERO et al., 2017). As propriedades mais documentadas são as atividades antioxidantes, antimicrobianas e antivirais (CÁCEREZ et al., 1995; FLEISHER et al., 2003; SHILP et al., 2006; ISLAN et al., 2011; STOHS, 2013; NATIVIDAD AND RAFAEL et al., 2014).

B. orellana é fonte do aditivo alimentar natural que possui relevância socioeconômica no Brasil. No país, a produção de *B. orellana* destina-se principalmente à extração dos corantes naturais e produção de colorífico (FABRI & TERAMOTO, 2015). Os corantes do urucum podem ser extraídos com óleo vegetal ou com solução alcalina aquosa, obtendo-se principalmente bixina (lipossolúvel) e sais da norbixina (hidrossolúvel) (NAKANO, 1998). O colorífico produzido a partir das sementes de urucum é popularmente conhecido como colorau e é bastante empregado na culinária doméstica das regiões Norte e Nordeste, principalmente (FERREIRA, 2011). Esses pigmentos possuem uma aplicação industrial bem diversificada. As indústrias de alimentos são as principais utilizadoras dos corantes naturais de urucum para pigmentar, por exemplo, manteigas, queijos, iogurtes, salsichas, sorvetes, salgadinhos entre outros (GIULIANO et. al., 2003; PARIMALAN et al., 2011; SOUMYA et

al., 2010). Em carnes e derivados, os corantes naturais do urucum são aplicados em embutidos e cozidos como mortadelas e salsichas e alguns cortes de frango, por sua qualidade, estabilidade e coloração atrativa (FRANCO, 2002; HARDER et al., 2010).

Uma análise criteriosa das funções bioativas, relacionadas com parâmetros de segurança do uso de corantes de sementes *B. orellana*, revelou que estes não são tóxicos e nem cancerígenos, mesmo em concentrações altas chegando até 400 mg/kg (PAUMGARTTEN et al., 2002; NATHAN et al., 2017). Estes resultados viabilizam ainda mais a exploração desses compostos que recebem destaque como uma alternativa aos corantes sintéticos que podem gerar graves danos à saúde incluindo alergias, vasoconstrição e disritmia, além de possíveis efeitos no desenvolvimento neurológico e o comprovado potencial mutagênico e cancerígeno (SASAKI et al., 2002; SINHA et al., 2013; AMCHOVA et al., 2015).

Devido a sua não toxicidade e por não alterar o sabor dos alimentos o Ministério da Saúde aprova o uso dos carotenoides de urucum em vários produtos alimentícios que abrange gelados comestíveis, caldos, sopas, molhos, condimentos, balas, bombons, confeitos, geleias, cereais e produtos à base de cereais, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, carnes e produtos cárneos, fórmulas para nutrição enteral, suplementos não vitamínicos, entre outros. Os percentuais que podem ser adicionados nesses alimentos variam em um limite máximo de 0,001 a 0,005% de bixina ou norbixina (ANVISA, 2017).

Além do seu uso no setor de alimentos, esse pigmento é bastante utilizado pelas indústrias têxteis e de cosméticos, principalmente relacionados a produtos para proteção da pele dos raios solares, bem como, tinturas para o cabelo, maquiagem e na confecção de tecidos (GROLIER et al., 1991; KAPOOR et al., 2008; TAY-AGBOZO et al., 2018).

Outro significativo mercado, que faz uso de *B. orellana* é a indústria farmacêutica. Além da utilização como fonte de um corante natural, *B. orellana* apresenta importantes compostos bioativos e um potencial medicinal como fonte promissora para novos complementos nutracêuticos e medicamentos para uma variedade de condições e prevenção de doenças. Estudos relatam aplicações medicinais para esta planta como agente anti-inflamatório, antiasmático, antibacteriano, antidiabético, anticonvulsivo, hepatoprotetor, antifúngico e anticâncer. Estudos sugerem que os efeitos antitumorais do urucum são atribuídos a compostos como geranilgeraniol, esqualeno e beta-sistosterol (ANTUNES et al., 2005; EGGERSDORFE&WYSS, 2018). Outros estudos realizados com a bixina, um dos principais carotenóides encontrados nas sementes de *B. orellana*, mostraram uma diminuição

na viabilidade e proliferação celular em uma das linhagens celulares (K562) de leucemia (HIROSE et al., 1972).

Extratos bioativos de *B. orellana* mostraram-se úteis no tratamento de distúrbios metabólicos, como o diabetes. Análises mostraram que a suplementação com esses extratos, no tratamento e prevenção de complicações diabéticas, é capaz de modular a produção de espécies reativas do oxigênio, que tem sido apontado como papel central nestas desordens (NATHAN et al., 2017). Artigos científicos divulgaram estudos de investigação das atividades antimicrobianas, antibacterianas, antifúngicas e anti-leishmanioses conferidas por extratos de *B. orellana*. Por exemplo, extratos etanólicos de folhas e sementes de *B. orellana* foram testados *in vitro* em microrganismos como *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* sendo possível observar a inibição do crescimento dos fungos e bactérias testados (CASTELLO et al., 2002; FLEISCHER et al., 2003; COGO et al., 2010; SUMATHI et al., 2011; PILLAI et al., 2018).

Devido às propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres, os extratos de *B. orellana* são considerados como agentes de proteção UV e antienvelhecimento (GOOLIER et al., 1991; LIMA et al., 2001; GARCIA et al., 2012). Norbixina também mostrou ser um agente eficaz de mudança de cor da pele quando ingerido (KAZUYUKI et al., 1999). Além disso, estudos revelaram sua eficiente atividade protetora contra os mosquitos *Aedes aegypti* (GIORGI et al., 2013). Além dos derivados de carotenoides, bixina e norbixina, o urucum também apresenta uma alta concentração de outros compostos, a exemplo de flavonoides, taninos, saponinas, esteroides, antraquinonas, alcaloides, esteróis e flavonas que contribuem para as propriedades terapêuticas da espécie (RIVIERA-MADRID et al., 2016; TELRANDHE et al., 2016). Desta forma, ampliar o conhecimento a respeito da composição e a produção de metabólitos em *B. orellana* permitirá a exploração e manipulação de vias importantes para expandir o seu potencial, tanto no tratamento e/ou prevenção de doenças, quanto para as demais aplicações (PILLAI et al., 2018).

Em 2015, a utilização global de urucum foi estimada em cerca de 789 milhões de toneladas. O consumo é liderado pela América do Norte atribuindo a esta região 24,2% do total de sementes consumidas nos anos de 2015, seguida da Europa com 21,92% e do Japão com 18,40%. (ABSOLUTE REPORTS, 2019). Os países que se destacam como os maiores produtores de urucum são o Quênia, Peru, Brasil, Guatemala, Equador e México (MUHINDI, 2013; FABRI & TERAMOTO 2015).

Segundo FABRI & TERAMOTO (2015) o mercado de urucum atende aproximadamente 90% da demanda de todo o consumo de corantes naturais no Brasil e a 70% de corantes naturais no mundo. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), o Brasil chegou a produzir em torno de 16.613 toneladas de sementes em 2018, com área cultivada de 16.371 hectares. Pelos dados divulgados, houve um aumento de aproximadamente 24% na produção de sementes em relação ao ano anterior (13.363 toneladas). A Figura 2 apresenta a evolução da produção de sementes de 2009 a 2018 por região do Brasil. As regiões Sudeste e Norte foram as que apresentaram maior safra de urucum em 2018, com 6.097 e 5.782 toneladas, respectivamente (IBGE, 2019).

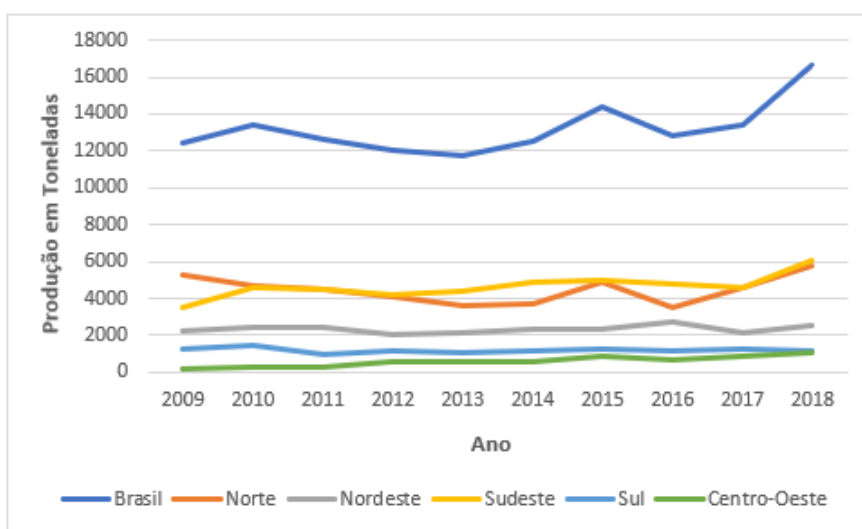


FIGURA 2. Produção de grãos de urucum por região brasileira de 2009 a 2018. Fonte: IBGE, Produção Agrícola Municipal 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

Dados do IBGE de 2007 apontam que nos anos de 1995 a 2000, o Nordeste chegou a produzir mais de 50% de toda a produção nacional, em especial o estado da Bahia. No entanto, em um período de 10 anos este quadro vem sofrendo alterações que apontam um forte crescimento da produção do estado de São Paulo tornando a Bahia o terceiro maior produtor de urucum no país (Figura 3). Os plantios comerciais de urucum vêm se expandindo e, atualmente, o Brasil conta com 16 estados produtores. Os estados de São Paulo, Rondônia, Bahia e Pará se destacam como maiores produtores do país (IBGE, 2019).

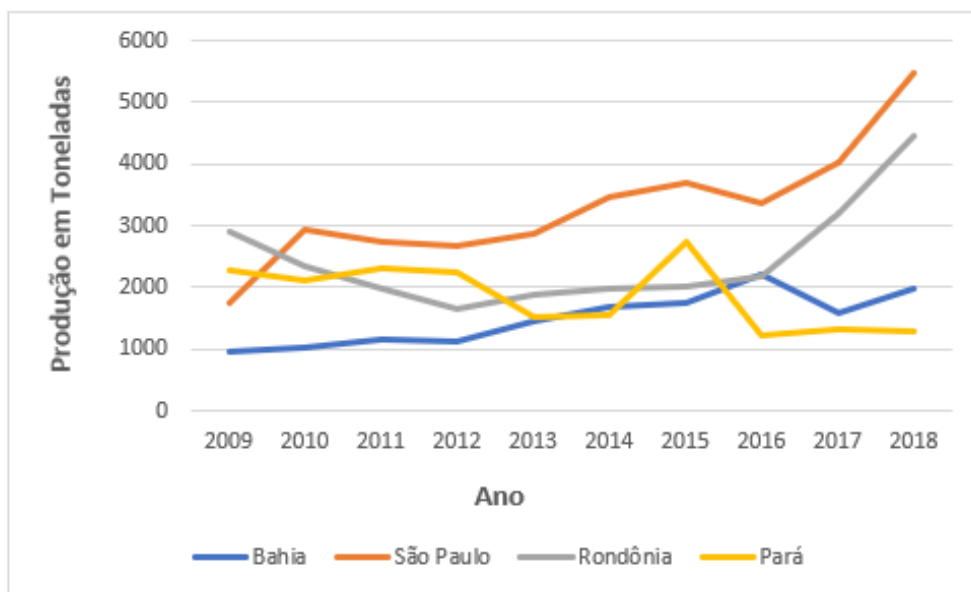


FIGURA 3. Produção de grãos de urucum nos principais estados produtores de 2009 a 2018. Fonte: IBGE, Produção Agrícola Municipal 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

Na Bahia, principalmente no extremo Sul do estado, a comercialização do urucum representa uma fonte de renda para pequenos agricultores e moradores das zonas rurais, onde percebe-se um aumento no seu cultivo, devido ao seu fácil manejo (MANGANELLI et al., 2018). Segundo dados do IBGE (2018), as microrregiões que mais se destacam na produção de urucum são Valença, Teixeira de Freitas, Prado e Porto Seguro, que no ano de 2018 produziram 500, 340, 292 e 150 toneladas de sementes, respectivamente. No *ranking* nacional de produtores de sementes, a cidade de Valença ocupa atualmente o décimo primeiro lugar.

Em certa medida, pode-se verificar que nos últimos anos a dispersão dos cultivos em quase todo o território nacional imprime à cultura uma boa perspectiva no mercado. Assim, o grande valor comercial do urucum abre espaço para que novas tecnologias sejam desenvolvidas a fim de potencializar a capacidade terapêutica e de coloração da planta (MANGANELLI et al., 2018).

2.3 Rota de biossíntese de bixina

Dentre os carotenoides encontrados, presentes principalmente nas sementes de *B. orellana*, a bixina recebe destaque por compor mais de 80% dos carotenoides totais

(SATYANARAYANA et al., 2003). A bixina é um apocarotenóide monometil éster carboxílico, (MERCADANTE& PFANDER, 2001), lipossolúvel, formado por 25 átomos de carbono dispostos linearmente e com 9 ligações duplas conjugadas. Além da bixina, também é encontrado, em menor quantidade um derivado desmetilado da bixina, a norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$), sendo este um composto solúvel em água (FIGURA 2) (PRETSON AND RICKARD, 1980).

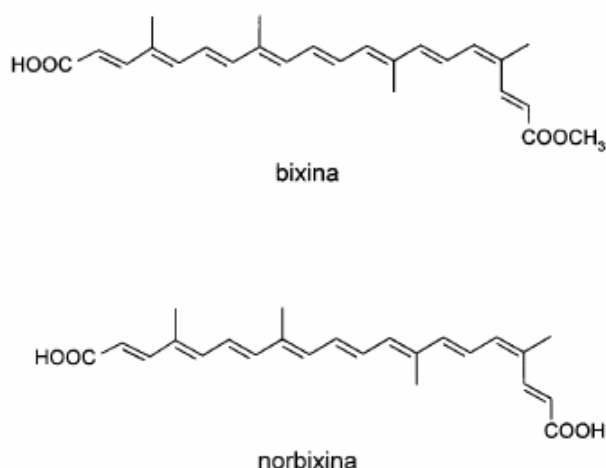


FIGURA 4. Estrutura química dos pigmentos bixina e norbixina. Fonte: TOCCHINI& MERCADANTE, 2001.

No geral, os apocarotenóides são formados a partir da degradação de carotenóides catalisada pelas dioxigenases de clivagem (CCDs) (RIVERA-MADRID et al., 2016). Portanto, estudos sugerem que a rota de biossíntese da bixina inicia-se a partir da clivagem do carotenóide de 40 carbonos, licopeno, e assim como na maioria dos processos de degradação e síntese de outros apocarotenóides, enzimas como as desoxigenases da clivagem do carotenóide (CCD), desidrogenases do aldeído (ALDH) e metiltransferases estão envolvidas nesse processo (FIGURA 5) (JAKO et al., 2002).

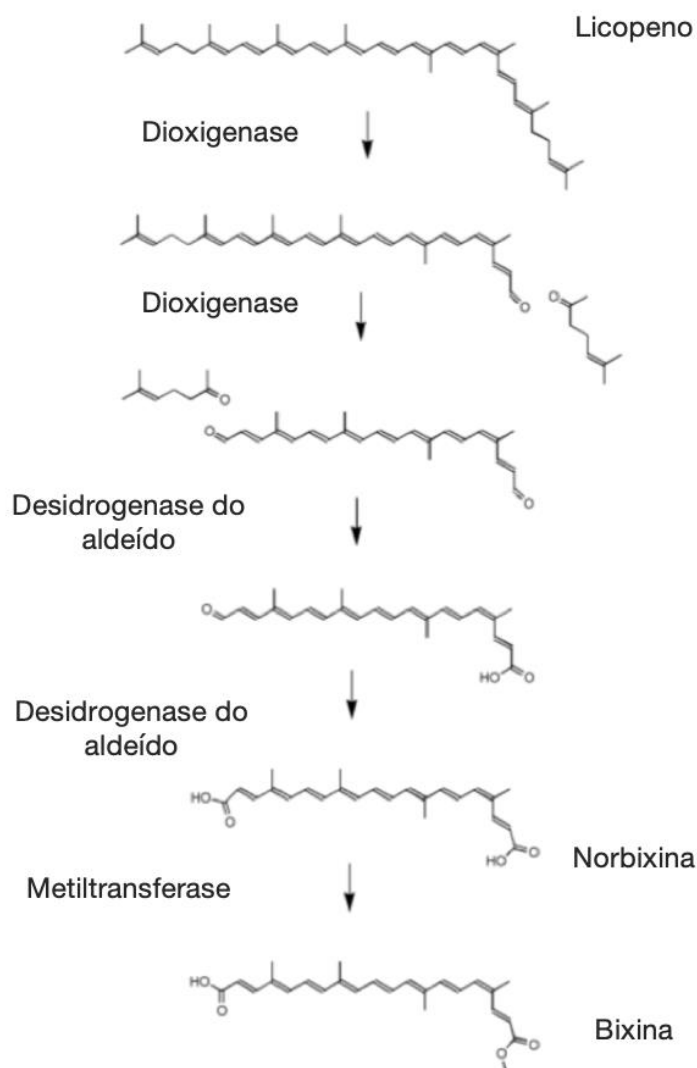


FIGURA 5. Rota de biossíntese da bixina a partir do licopeno proposta por JAKO et al., 2002.

Alguns dos genes envolvidos nas vias metabólicas de carotenóides e na síntese de bixina foram identificados e caracterizados (JAKO et al., 2002; BOUVIER et al., 2003; SOARES et al., 2011; RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2011a b; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015). Nesse cenário, a literatura aponta a ação de três tipos de enzimas para a rota de síntese da bixina: dioxigenases, desidrogenase do aldeído e metiltransferases. Assim, como consequência da atividade dessas enzimas acontece a conversão do licopeno gerando o aumento das concentrações de bixina durante o desenvolvimento das sementes de urucum (SOARES et al., 2011).

O primeiro trabalho a investigar e sugerir uma via para o pigmento bixina em urucum foi publicado por JAKO et al. (2002). Nesse estudo, foram analisadas bibliotecas de sequências expressas (ESTs) de sementes imaturas, estágio de desenvolvimento que apresenta maior produção de bixina. Os agrupamentos de genes foram relacionados principalmente aos que codificam enzimas dioxigenases, desidrogenase do aldeído e metiltransferases e com isso foi proposto que a via da bixina tem início com o carotenoide licopeno em um ponto de ramificação na via dos carotenóides. Além disso, nesse trabalho, foi proposto que a bixina apresenta uma rota de síntese semelhante a via do ácido abscísico. Foram encontrados grupos de genes relacionados à 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato reductoisomerase (DXR), 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintase (HDS) e 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase (HDR), a partir de metil-D-eritritol 4- via fosfato (MEP) e fitoeno sintase (PSY), fitoeno dessaturase (PDS) e ζ-caroteno dessaturase (ZDS), todos relacionados à via dos carotenóides.

Posteriormente, BOUVIER et al. (2003) propuseram que a rota de biossíntese da bixina deveria ser semelhante à do pigmento extraído da espécie *Crocus sativus* mostrando que no processo de conversão do licopeno em bixina estão envolvidas uma dioxigenase, um desidrogenase do aldeído e uma enzima metil transferase. Eles identificaram e isolaram os genes da família 4 dioxigenase (BoLCD), desidrogenase do aldeído (BoBADH) e metiltransferase (BonBMT). E esses genes foram introduzidos em bactérias *Escherichi coli* produtoras de licopeno. Com isso, bactérias transformadas foram capazes de converter licopeno em bixina (BOUVIER et al., 2003). Estudos realizando a caracterização de genes candidatos da via da bixina, BoCCD e BoOMT, pertencentes às famílias da dioxigenase 4 de clivagem de carotenóides (CCD4) e do ácido cafeico O-metiltransferase (COMT), respectivamente, mostraram uma regulação destes durante o desenvolvimento das sementes (SOARES et al., 2011).

Em 2015, CÁRDENAS-CONESO et al. (2015), em análises do transcriptoma de *B. orellana*, identificaram genes relacionados à via MEP e síntese de carotenóides. Foram analisados transcritos de sementes e folhas e, interessante, foi observada a superexpressão dos genes BoDXS2a, BoPDS1 e BoZDS em sementes imaturas, enquanto que o contrário aconteceu com genes que antecedem a síntese do licopeno na via de carotenóides.

Os autores também relataram que as sequências de genes anteriormente propostas por BOUVIER et al. (2003) como sendo dos genes da via de bixina, não foram identificadas no transcriptoma e afirmam que essa discrepância pode ser explicada por espaços filogenéticos dessas proteínas, uma vez que, as enzimas propostas anteriormente

correspondem a clados de espécies monocotiledôneas. As sequências propostas por CÁRDENAS-CONEJO et al. (2015) aparecem no mesmo ramo filogenético de espécies como algodão e cacau, plantas dicotiledôneas. Também foi realizada uma amplificação por PCR dessas sequências, usando amostras independentes de RNA de *B. orellana*, confirmando que elas pertenciam a essa espécie (CÁRDENAS- CONEJO et al., 2015).

Uma vez que a rota de biossíntese da bixina tenha sido estabelecida, compreender como a expressão dos genes relacionados a produção desse composto é regulada, torna-se um importante passo para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela variação do acúmulo exclusivo de bixina em sementes de *B. orellana* (RIVERA-MADRID et al., 2016). Nesse contexto, sugere-se que o controle da expressão desses genes pode estar relacionado com a disponibilidade de substratos produzidos na via do MEP e principalmente, por alterações na expressão de genes que codificam as enzimas PSY e ciclases (CUNNINGHAM, 2002).

Diante disso, foi proposto um modelo de rota de síntese da bixina envolvendo a expressão coordenada dos genes das vias MEP, carotenóide e bixina em sementes imaturas. Resumida em três etapas moleculares, a síntese da bixina foi proposta juntamente com a regulação dos genes responsáveis pela conversão do licopeno em bixina. O primeiro passo é a indução da expressão dos transcritos de genes envolvidos na síntese de carotenóides em tecidos não fotossintéticos (sementes imaturas). Posteriormente, a ciclização do licopeno é bloqueada pela desativação da enzima licopeno ciclase (Bo β -LYC1, Bo β -LYC1 e Bo ϵ -LYC). Consequentemente, a expressão de BoPDS1 e BoZDS é induzida devido as baixas concentrações de β -caroteno e xantofila e promovendo a produção de licopeno em células imaturas de sementes. Durante esse processo, acredita-se que PSY deve ser regulada e por fim, o conjunto de genes (BoCCDs) relacionados a conversão de licopeno são ativados para finalmente ocorrer a biossíntese da bixina nos plastoglobulos ou citosol (CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015). A figura 6 mostra um esquema da possível rota de biossíntese de bixina a partir do licopeno, destacando as potenciais enzimas propostas por CÁRDENAS-CONEJO et al. (2015) e RIVERA-MADRID et al. (2016a) e por BOUVIER et al. (2003).

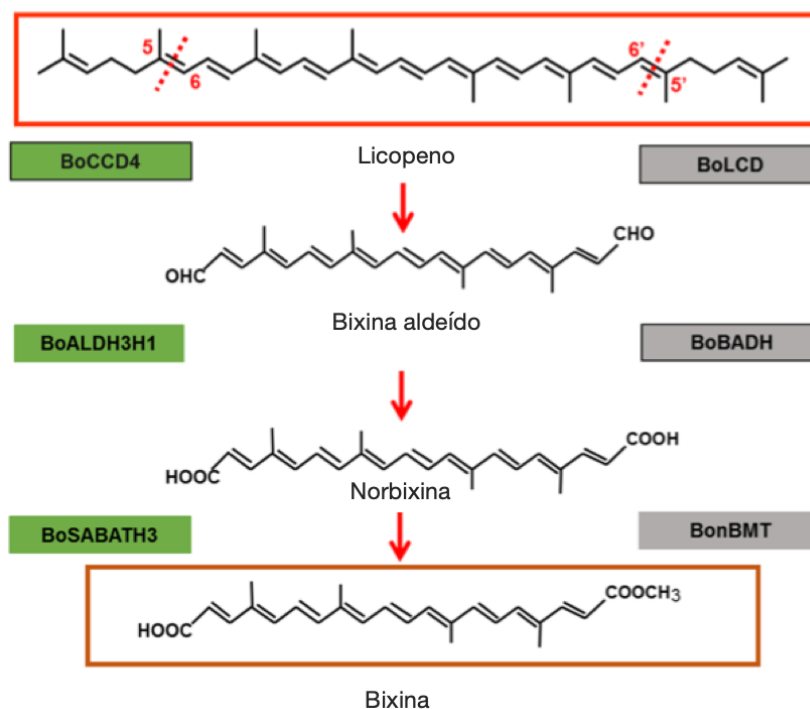


FIGURA 6. Rota de biossíntese de bixina a partir do licopeno proposta por TEIXEIRA DA SILVA et al., 2018. Os locais de clivagem na molécula de licopeno são indicados por linhas pontilhadas em vermelho. .

2.4 Estudos proteômicos de plantas

Estudos proteômicos fornecem uma abordagem de alto aproveitamento na caracterização de muitas proteínas de uma única amostra. A proteômica provou ser fundamental, uma vez que os níveis de mRNA podem não corresponder aos níveis de proteínas ou de sua atividade na célula (WILKINS et al., 1996; KOLLER et al., 2002). Assim, em conjunto com dados transcritoômicos, as abordagens proteômicas tornam-se poderosas para o entendimento de vias metabólicas regulatórias, permitindo avaliar as proteínas individualmente bem como suas funções em uma faixa mais ampla de atuação (HE et al., 2001).

Os primeiros trabalhos envolvendo estudos de proteínas de plantas aplicando a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) surgiram em 1977, com um aumento significativo de publicações nos anos 80 (CREMER AND C VAN DEWALLE, 1985). No entanto, a técnica apresenta limitações relacionadas com a preparação das amostras, tornando a extração uma etapa importante para a obtenção de proteínas em quantidade e qualidade satisfatórias. Ainda

assim, a eletroforese 2D contribuiu, por uma perspectiva molecular, para o conhecimento da biologia vegetal e apresenta respostas relevantes a respeito de processos biológicos (crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa) tanto de forma descritiva como comparativa.

A análise proteômica de tricomas de *Nicotiana tabacum* identificou proteínas envolvidas no metabolismo secundário e na resposta ao estresse biótico. Foram detectadas enzimas envolvidas na síntese de precursores de terpenoides e na produção de açúcar. Alguns transportadores também foram descobertos, dos quais podem estar envolvidos no transporte secundário de metabólitos (CUTSEM et al., 2011). Com base em dados proteômicos da parede celular, foi possível identificar proteínas possivelmente relacionadas ao metabolismo lipídico extracelular, que contribuem para a proteção das células contra ataques de patógenos ou estresses abióticos em plantas e regulam processos fisiológicos, principalmente em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* (JACQ et al., 2018).

Uma outra pesquisa revelou descobertas sobre a biossíntese de tanshinonas em raízes de *Salvia miltiorrhiz*. Esses compostos possuem relevantes propriedades terapêuticas e os resultados de identificação de enzimas como candidatas a serem envolvidas em suas vias biossintéticas possibilitam novos caminhos para melhorar a produção das tanshinonas por meio de abordagens biotecnológicas (CONTRERAS et al., 2019). Além disso, proteínas alergênicas, previamente caracterizadas, foram identificadas a partir de levantamento proteômico de vias metabólicas, indicando o potencial da proteômica em pesquisas de amostras de alimentos em relação à ocorrência de alérgenos. Estes resultados fortalecem a importância de estudos proteômicos como uma ferramenta útil para identificação de compostos ativos em plantas (KOLLER et al., 2002).

Os projetos proteômicos dependem fortemente de bancos de dados de computadores para armazenar informações sobre todas as proteínas expressas de um organismo. Com o avanço da bioinformática, análises de dados baseados em espectrometria de massa, a partir de predições por redes e modelos podem revelar informações importantes relacionados a diferentes aspectos da organização e metabolismo celular. Assim, o estabelecimento de redes de interação proteica tornou-se indispensável para a compreensão, tanto da função de uma proteína, quanto da sua associação com um processo metabólico (COX & MANN, 2011). Diferentes bancos de dados baseados em eletroforese bidimensional em gel estão disponíveis para *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, e *Musa*, encontrados em WORLD-2DPAGE (<http://www.expasy.org/ch2d/2d-index.html>) e SWISS-

2DPAGE (<http://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/>), fornecendo informações relevantes para o campo da agricultura e do meio ambiente (JORRIN-NOVO et al., 2018)

Por ser um sistema dinâmico em que as proteínas são interconectadas e funcionam de forma coordenada e simultânea, um proteoma celular pode ser estudado de maneira que seja possível abranger, em diferentes escalas, a complexidade dos organismos (BOSE et al., 2019). Portanto, estudos proteômicos associados a biologia de sistemas são valorizados por fornecerem oportunidades de ampliação dos conhecimentos no que se diz respeito ao entendimento do campo pós-genômico da espécie (YANG et al., 2014).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

As proteínas acumuladas nos órgãos de *Bixa orellana* estão relacionadas com diferentes rotas de biossíntese de metabólitos secundários.

3.2 Objetivos

3.2.2 Geral

Ampliar a compreensão das bases moleculares do acúmulo de metabólitos secundários em *Bixa orellana*.

3.2.3 Específicos

a- Otimizar protocolo de extração de proteínas de botão floral e sementes em diferentes estágios de desenvolvimento de *B. orellana*;

b- Obter e comparar perfis proteicos de botão floral e sementes em diferentes estágios de desenvolvimento de sementes diferentes órgãos de *B. orellana*.

CAPÍTULO 1

An improved protein extraction protocol for 2D-SDS-PAGE for seeds rich in interfering compounds

Monique Reis de Santana, Letícia Maróstica de Vasconcelos, Adriadna Souza Santos, Virgínia Lúcia Fontes Soares, Fernanda Amato Gaiotto, Carlos Priminho Pirovani

ABSTRACT

The difficulty in obtaining the protein profile of seeds is mainly related to high levels of interfering compounds such as lipids, pigments, polyphenols and polysaccharides that associated with proteins makes some species recalcitrant for protein extraction. For this reason, it became necessary to establish a protocol for extracting contaminant-free proteins from *B. orellana* seeds in order to isolate proteins with high quality and yield for 2D-SDS-PAGE. Protein extraction was performed following three extraction methods for *B. orellana* seeds. Method II allowed obtaining a protein profile with good resolution and a greater number of spots on 2D-SDS-PAGE of *B. orellana* seeds.. This method comprises performing three steps: delipidation by petroleum ether (1), depigmentation by TCA / acetone washes (2) and a phenol / SDS-dense final step (3). Also, proteins with high quality and yield were isolated from *C. brasiliensis* seeds using Method II, attesting that this method is indicated for the extraction of proteins from seeds of species rich in lipids. Thus, this extraction method can be used to characterize the proteome of *B. orellana* and *C. brasiliensis* seeds using the two-dimensional electrophoresis technique and will contribute to elucidate the processes involved in the biosynthesis of the main secondary metabolites of these two species. For the first time, it is shown the protein profile in 2D-SDS / PAGE, well resolved from *B. orellana* and *C. brasiliensis* seeds.

Key words: *Bixa orellana*, *Carpotroche brasiliensis*, delipidation, TCA / acetone precipitation, proteomics.

1 INTRODUCTION

Some tree species may exhibit large amounts of lipids, pigments, polyphenols and polysaccharides in their seeds (ISAACSON et al., 2006). Such compounds make it difficult to obtain two-dimensional electrophoresis gel (2D-SDS-PAGE) profiles, since they prevent the protein extraction with satisfactory quality and yield for the application of the technique. The optimization of a protocol for removing interfering compounds allows the use of proteomic approaches, and makes it possible, for example, to elucidate the biosynthetic pathways of secondary metabolites of these species.

Among these interfering compounds, there is bixin, a secondary metabolite that makes up about 80% of the total carotenoids of seeds from the tropical species *Bixa orellana* L. (Bixaceae) (GARCIA et al., 2012; CARVALHO et al., 2016). Bixin is a natural pigment, exclusively biosynthesized by *B. orellana* L. and of great economic importance due to its wide use as an alternative to synthetic dyes in the textile, cosmetic, pharmaceutical and food industries (NAMITHA; NEGI, 2010; MANTOVANI et al., 2013; CARDENAS-CONEJO et al. 2015; VINHA et al., 2018). Although many of the processes included in the biosynthesis of secondary metabolites have been elucidated, little is known about the biosynthetic pathway of these metabolites in *B. orellana*. Thus, the characterization of the proteome will aid in the understanding of the secondary metabolites in *B. orellana*, specially bixin.

Carpotroche brasiliensis (Raddi) A. Gray (Achariaceae) is another tropical species of great economic importance that has a high content of lipids and mineral residues in its seeds and therefore it was used in this study with the objective of attesting the efficiency of the optimized extraction method tested in *B. orellana*. In seeds of *C. brasiliensis* the major component found is chaulmoogra oil, which corresponds to about 70% of its constitution (PINTO et al., 2012). This oil can be used as a raw material in the pharmaceutical industry and cosmetics manufacture, attributing economic value to the production of this native tree in family agriculture (BITTENCOURT et al., 2015). Similarly, high levels of lipids in seeds make it difficult to obtain the protein profile of this species. Also, knowing the proteins present in seeds of *C. brasiliensis* will enable advances in the knowledge of chaulmoogra oil biosynthesis.

The proteome is the set of proteins expressed in each organism and can be highly diversified due to post-translational modifications of the proteins in response to various factors such as stage of development, treatments and environmental conditions (AMME et al., 2006). Two-dimensional electrophoresis (2-DE) is a technique widely used to investigate the

expression of total proteins in any sample, being predominantly used for proteomic studies in plants (VELENGIA et al., 2012; ALIAS et al., 2017). The choice of the sample preparation method, which precedes the electrophoresis, is essential to obtain good quantitative and qualitative results of proteins (PIROVANI et al., 2008). Plant cells contain large amounts of non-protein compounds, such as polysaccharides, lipids and organic acids (WANG et al., 2003). These substances have a significant influence on the protein extracts quality and consequently on the results in 2D-SDS-PAGE (ROSE et al., 2004).

To determine the most appropriate method of extracting proteins, which eliminates interfering compounds present in seeds and isolates proteins with high quality and yield for 2D-SDS-PAGE, it was established the use of organic solvents that promote the removal of these compounds, mainly the lipids (delipidation) (RODRIGUES-NETO et al., 2015). Therefore, increasing the extraction yield and purity of the protein extract, reducing the interference that can result in artificial stains in gels, mainly horizontal streaks due to the displacement of the buffer during isoelectric focusing.

The optimized protocol for protein extraction offers an opportunity to study the proteomic profiles of *B. orellana* and *C. brasiliensis*, allowing to increase the knowledge on biosynthesis pathways of secondary metabolites, especially bixin and chaulmoogra oil. In this way, new targets can be unraveled and used to improve these species. This is the first report of a two-dimensional gel proteomic profile of *B. orellana* and *C. brasiliensis*.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant material

Samples of seeds of *Bixa orellana* L. var. ‘Bico-de-Pato’ at different developmental stages were collected in a vegetation area of the Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) in Ilhéus, BA, Brazil and *C. brasiliensis* fruit at different developmental stages, were collected in a Cabruca region in Camamu-BA, Brazil, and stored at -80 ° C until use.

2.2 Protein extraction

Initially, a pool of lyophilized mature seeds of *B. orellana* were ground to a fine powder using liquid nitrogen and 7% polyvinylpolypyrrolidone. Three protein extraction methods were tested using two replicates of 0.2 g each.

For Method I, protein extraction was performed as described in Pirovani et al. (2008). The final pellet was resuspended in 800 µl of buffer [Urea 6M; thiourea 2M; CHAPS 2%; bromophenol blue 0.002%] and stored at -20 °C until use.

For Methods II and III, the seeds fine powder was subjected to a delipidation according to the analytical protocol described by Rodrigues-Neto et al. (2015). The fine powder was resuspended in 500 µl of 1-butanol: chloroform (1:9), the mixture vortexed and centrifuged at 13.400 g for 5 min at 4 °C. This procedure was repeated twice. Subsequently, the pellet generated by centrifugation was washed twice with 500µL of 100% acetone and centrifuged at 13.400 g for 5 min at 4 °C. The pellet was washed with 500 µL of petroleum ether and centrifuged at 13.400 g for 5 min at 4 °C. After the delipidation, for Method II, the pellet was submitted to precipitation and protein extraction (PIROVANI et al., 2008), with the incubation of the samples for 14 hours at -20 °C in the wash step with trichloroacetic acid (TCA) in water. For Method III the extraction of the proteins was performed using phenol / SDS-dense, that is, only the second stage of the Pirovani et al. (2008) protocol (Fig. 1).

For *C. brasiliensis*, two replicates of 0.1 g (Pool of immature fruit seeds) and 0.2 g (Pool of mature fruit seeds) were ground to a fine powder using liquid nitrogen and 7% polyvinylpolypyrrolidone. The immature fruits seeds were lyophilized, for the mature fruits the seeds were used fresh, then Method II was applied.

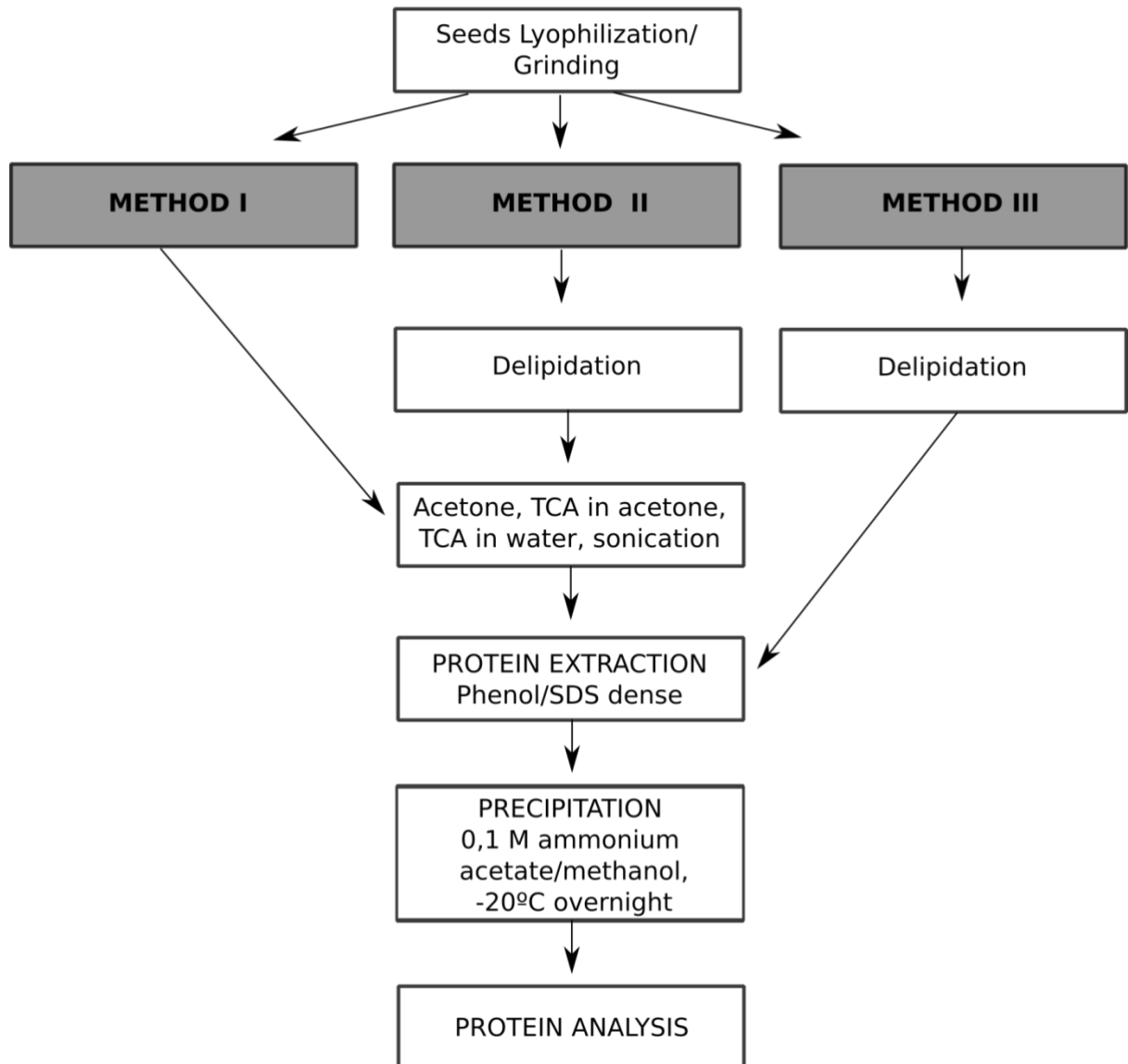


Figure 1. Scheme showing the methods I, II and III of seed protein extraction.

2.3 Protein profile in 2D-SDS-PAGE

For producing 2D-SDS-PAGE, protein samples (500µg) were applied to a 13 cm strips with immobilized pH gradient (IPG) between 3-10 NL and then submitted to the Ettan IPGphor II Isoelectric Focal Unit. The second dimension was performed on 12.5% polyacrylamide gel in the HOEFER SE600 Ruby vertical electrophoresis system (Amersham Bioscience). Protein spots were visualized by impregnation with 0.08% Brilliant Coomassie Blue dye (NEUFF et al., 1988). For this, the gels(triplicates) remained for 1 hour in fixative

buffer (40 % ethanol and 10% acetic acid) and 5 days in colloidal Coomassie blue dye gentle under agitation (8 % ammonium sulfate, 0.08% phosphoric acid, Coomassie blue G -250 0.08 % and 20 % methanol). Thereafter the gels were kept in distilled water, under gentle agitation until the dye was removed. Finally, the 2D-SDS-PAGE were scanned using the Lab Scanner software (Amersham Bioscience) and analyzed in ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare) software.

2.4 Statistical analysis

Multivariate analysis (ANOVA $p < 0.05$) was performed with the aid of the R program (R Development Core TEAM, 2017).

3 RESULTS

The pigments present in *B. orellana* seeds were not successfully removed when samples were washed with acetone and TCA (Method I), resulting in a pellet with red color (Fig 2A). The delipidation, carried out prior to the protein extraction method, resulted in the removal of the greater number of interfering compounds present in the seeds, mainly the lipids and the pigment, providing a gradual depigmentation of the pellet. After each washing and centrifugation, the pellet showed a lighter color until a large amount of the pigment present in the fine powder of the sample (*B. orellana*) was removed, as indicated by the loss of the red color of the pellet (Fig. 2B). The solvent collected at the beginning of the delipidation (supernatant) showed the most intense red color, then it is shown a depigmentation gradient after washing steps (Fig. 2C).

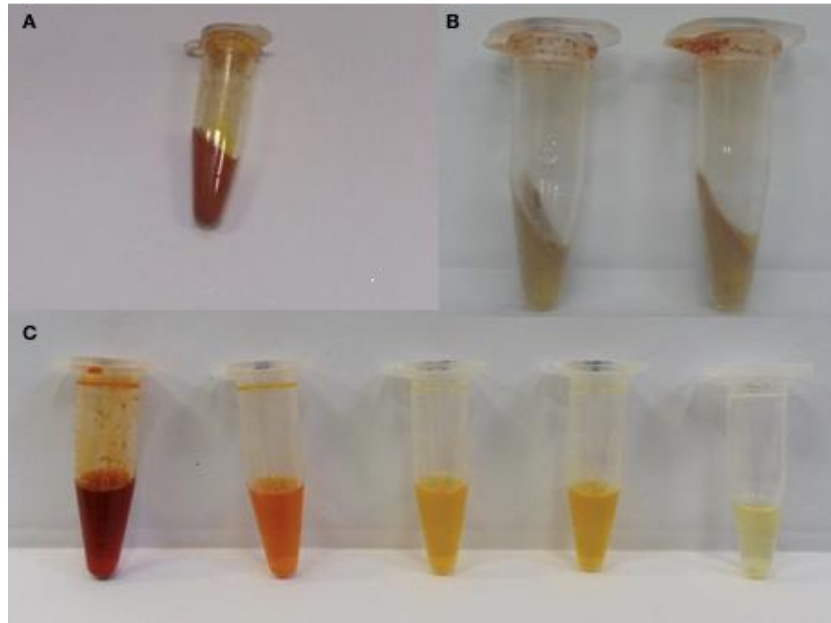


Figure 2. Samples of *B. orellana* seeds submitted to Methods I (A) and II (B). A- Seed fine powder washed with acetone and TCA (Method I). B- Pellet obtained after the delipidation process, by treatment with the solvent 1-butanol: chloroform (1: 9), 100 % acetone and petroleum ether (Method II). C- Depigmentation gradient showing the solvent phase (supernatant) obtained from 1st to 5th treatment of delipidation (Method II and III), after washing steps with organic solvents followed by centrifugation.

Methods II and III showed significantly higher protein yield than Method I with 11.92 mg / g, 13.29 mg / g, and 0.676 mg / g, from 0.2 g of *B. orellana* 's mature seeds, respectively. When applied to *C. brasiliensis*, Method II yielded approximately 2.19 mg of protein per gram of immature fruit seeds and 12.88 mg / g for mature fruits yielded approximately (Table 1).

Table 1. Protein yield of *B. orellana* and *C. brasiliensis* seeds and total number of spots, using extraction methods II and III.

Species	Method	Plant tissue (g)	Protein yield (mg/g)	Spot Number
<i>B. orellana</i>	I	0,2	0.676	-
<i>B. orellana</i>	II	0,2	11.924	313
<i>B. orellana</i>	III	0,2	13.288	186
<i>C. brasiliensis</i> (immature fruit)	II	0,1	2.19	183
<i>C. brasiliensis</i> (mature fruit)	II	0,2*	12.88	109

* Fresh material

The quality and yield of proteins obtained from the *B. orellana* seeds, using the three methods, were monitored by one-dimensional gel (SDS-PAGE) (Fig. 3). It was not possible to visualize protein bands in SDS-PAGE columns where samples submitted to Method I (columns 1 and 2) were applied. Columns 3 and 4 (Method II) showed better staining intensity and better band resolution when compared to columns 5 and 6 (Method III). Also, it was observed a greater streak on columns 5 and 6 (Method III), preventing the visualization of well-defined protein bands. In *C. brasiliensis*, Method II was efficient for extracting seed proteins from fruits at different stages of development (immature and mature), showing in

SDS-PAGE total proteins bands with distinct intensity and broad distribution in comparison to molecular weight standards (Fig. 3B).

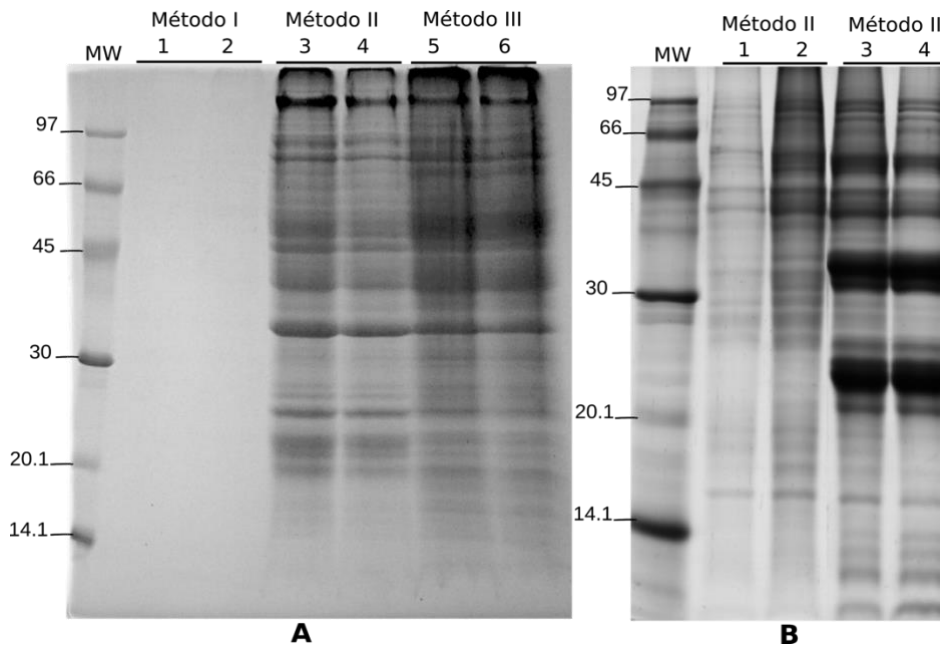


Figure 3. SDS-PAGE of *B. orellana* (A) and *C. brasiliensis* (B) seed total proteins. A: Method I (columns 1 and 2), Method II (columns 3 and 4) and Method III (columns 5 and 6). B: Immature fruits seeds (columns 1 and 2), mature fruits seeds (columns 3 and 4) From each sample it was applied 30 μ L of protein at a 30 μ g concentration. The sizes of protein standards are indicated on the left in kDa.

B. orellana samples submitted to Methods II and III had enough protein yield for application of the two-dimensional gel electrophoresis technique (between 350 and 500 μ g). Protein spots visualized on 2D-SDS-PAGE showed a broad distribution regarding molecular mass and isoelectric point, especially the proteins isolated by Method II in comparison with those of Method III (Fig. 5 - B1 and B2). The 2D-SDS-PAGE of Method II (Fig. 5 - B1) showed a high amount of proteins of higher molecular weight and absence of horizontal streaks as compared to those of Method III (Fig. 5 - B2). In 2D-SDS-PAGE obtained with Method III a high amount of horizontal markings and low spot resolution were observed in regions near pH 10 and in higher molecular weight. Likewise, the protein profiles of *C. brasiliensis* seeds of immature and mature fruits were obtained (Fig. 5 - C1 and C2). In the 2D-SDS-PAGE referring to the seeds of mature fruits (C1), horizontal streaks were observed, as well as fewer spots compared to the protein profile of seeds from immature fruits (C2).

In 2D-SDS-PAGE obtained from the protein extracts of *B. orellana* seeds, 313 and 186 spots were observed using Methods II and III, respectively. In the *C. brasiliensis* species,

with Method II, 183 and 109 spots were observed in seeds from immature and mature fruits, respectively.

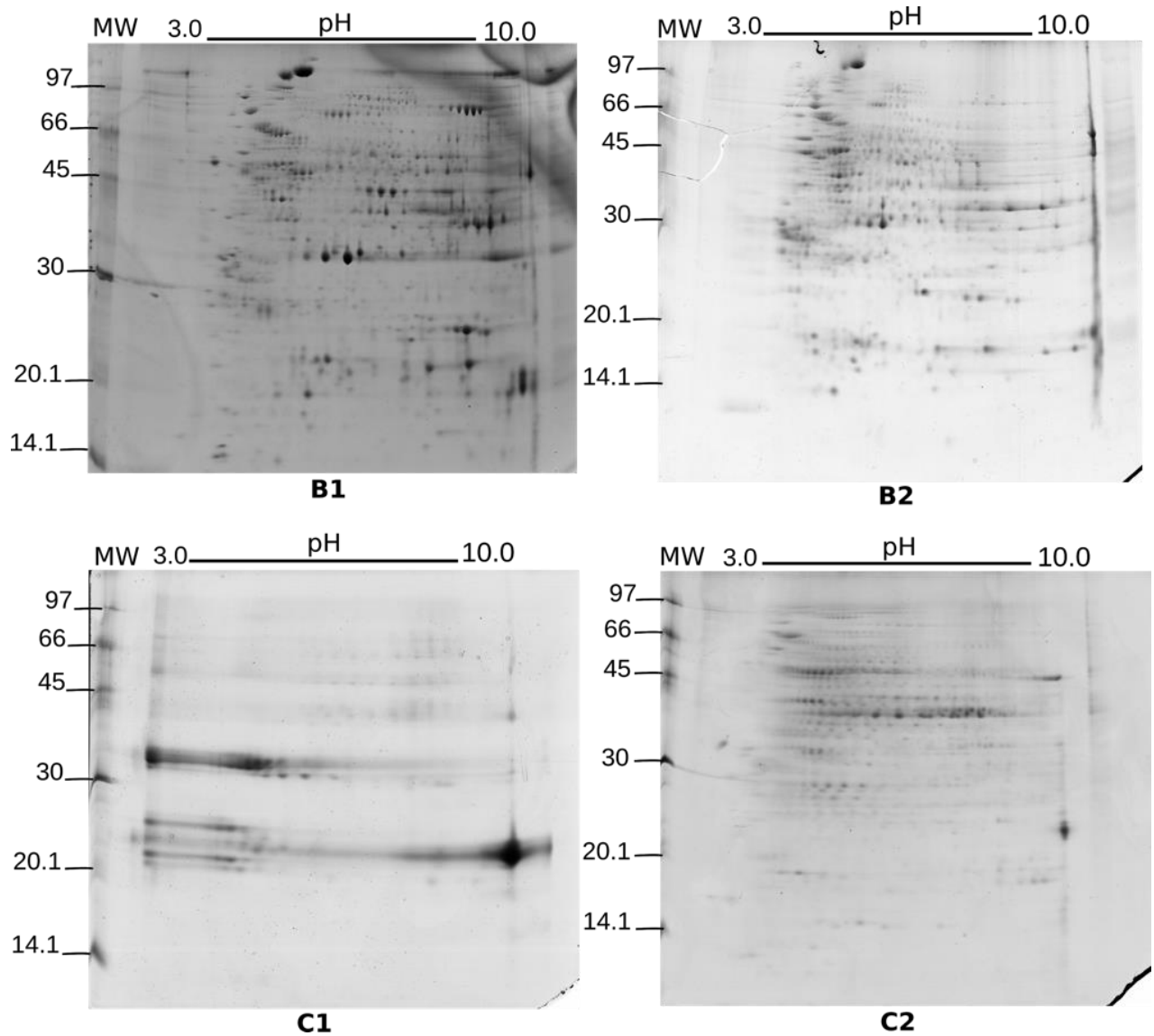


Figure 4. Representative patterns of 2D electrophoresis of *B. orellana* seed total proteins for Methods II (B1) and III- (B2) and *C. brasiliensis* seeds (Method II). C1: Mature fruits of *C. brasiliensis*. C2: Immature fruits of *C. brasiliensis*. Each gel was loaded with 500 μ g of total protein and stained with colloidal Coomassie blue. The sizes of protein standards are indicated on the left in kDa.

4 DISCUSSION

The species *B. orellana* and *C. brasiliensis* have recalcitrant seeds for protein extraction due to the high amount of lipid components, pigments, polyphenols and polysaccharides in their composition (CARVALHO et al., 2016; PINTO et al., 2012). This may be one of the reasons for the lack of data in the literature of proteome 2-DE studies of these species, although there are already transcriptomic studies published for *B. orellana* (CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015; SOARES et al., 2011). To solve this problem, a protocol that eliminates interfering components in seeds was established making it possible to isolate proteins with high quality and yield.

In this study, three methods of protein extraction were tested on *B. orellana* seeds. The protein extraction protocol described by Pirovani et al. (2008) (Method I), that has been used in different plant materials as root (BERTOLDE et al., 2014) and leaf (PIROVANI et al., 2008) of *Theobroma cacao*, and root of Citrus (BERTOLDE et al. 2014), was inefficient when applied to the studied material. This difficulty was justified by the high levels of pigments and other interfering compounds present in the seeds such as bixin in *B. orellana* and chaulmugra oil in *C. brasiliensis*. The treatment using petroleum ether (delipidation) removed these lipid contaminants and allowed the extraction of proteins from *B. orellana* seeds using the two methods (II and III), with no significant difference in protein yield. Similarly, in studies using the same organic solvents, delipidation was attested as an important step in the protein extraction protocol to eliminate the large amount of oil present in palm fruits (*Elaeis guineenses*). This enabled the identification of peptides from the High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) and MS / MS (RODRIGUES-NETO et al. 2015). Studies with protein extracts from castor bean (*Ricinus communis* L.), resolved on SDS-PAGE and 2D-SDS-PAGE, showed change in protein resolution due to the interference of lipid contaminants present in the sample. The use of organic solvents, such as chloroform, in removing these interfering compounds provided better extraction and quality of resolved proteins in 2D-SDS-PAGE (WANG, et al., 2004), corroborating the results obtained in this work.

The results suggested a superior quality of the samples extracted from *B. orellana* using Method II, which showed less streaks between protein bands and higher resolution of proteins in SDS-PAGE in comparison with those of Method III. It is possible that this difference in extraction quality occurred due to additional washes with TCA performed in Method II. The TCA / acetone precipitation to remove non-protein contaminants improved protein extraction and solubilization (WANG et al., 2003; Islam et al., 2004). Although TCA / acetone washes can cause protein degradation due to additional experimental time and sample

manipulation as well as the long exposure to low pH buffer (ALIAS, 2017), in this case, it was evident that the precipitation with TCA / acetone was a crucial step to isolate proteins with satisfactory quality and yield. Also, other studies that used TCA for protein precipitation demonstrated high-resolution proteins on 2D-SDS-PAGE (NANDAKUMAR et al., 2003; CARPENTIER et al., 2005; NATARAJAN et al., 2005; WANG et al., 2006; MALDONADO et al., 2008; ALIAS et al., 2017).

Sonication was another important step in Method II. This process, through the energy of sound waves applied to the samples, allowed the breaking of macromolecules, such as polysaccharides, DNA and RNA as well as decreased the viscosity and / or improved the solubilization of contaminants in the presence of TCA / acetone making it possible to precipitate the proteins (PIROVANI et al., 2008). During extraction, a mixture of phenol and SDS-dense buffer was used (WANG et al., 2003; PIROVANI et al., 2008). It is known that phenol removes interfering compounds prior to electrophoresis (WANG et al., 2003; SARAVANAN & ROSE, 2004) and minimizes the protein degradation that occurs frequently during sample preparation due to the action of proteolytic enzymes found in the sample. In addition, SDS-dense acted as a good solubilizing agent (SCHUSTER & DAVIES, 1983).

When resolved in 2D-SDS-PAGE, the protein profiles of *B. orellana* showed differences in distribution and quality of the spots visualized for the tested methods (II and III). This difference may be related to the presence of non-lipidic interfering compounds that were not eliminated during delipidation, since the samples of Method III were not washed with TCA/acetone and sonicated. These interferents bind to the proteins reducing solubility and affecting their migration during isoelectric focusing, also altering their molecular weight and impairing the distribution of the spots in 2D-SDS-PAGE (VERLENGIA et al., 2012; VILHENA et al., 2015). In addition, the ionic interferents can migrate towards the anode or cathode, depending on their charges and cause water displacement in the focusing gel strip. The lack of water in regions of the gel can impair focusing and result in the generation of horizontal streaks. Thus, we believe that the delipidation and washes with TCA and acetone together with sonication (Method II) were fundamental for obtaining a high-quality protein extract and for these reasons Method II exhibited a greater number of spots from *B. orellana* seeds.

The efficiency of Method II for protein extraction of the recalcitrant seeds was confirmed when applied to *C. brasiliensis* seeds. These seeds, like those of *B. orellana*, are recalcitrant for the extraction of proteins and have a high content of lipids in their composition (Pinto et al., 2012), being suitable to perform the delipidation for the removal of these

interferents. Protein profiles were obtained from seeds of mature and immature fruits and isolated proteins showed high yield and quality. Through the 2D-SDS-PAGE analysis, changes in the protein profiles during *C. brasiliensis* seed development were observed regarding the number of spots in different molecular weight ranges (Fig. C1 and C2). The decrease in the number of spots with low molecular weight and an increase of those spots of higher molecular weight, during seed development, were evident.

In summary, the results showed that Method II provided a better yield, separation and resolution of proteins for two-dimensional gel electrophoresis of *B. orellana* seeds, as well as allowed obtaining the protein profiles of *C. brasiliensis* seeds. In addition, the proposed protocol can be used as a starting point for proteomic studies of other related plant species.

5 CONCLUSIONS

In this study we compared the performance of three different protein extraction methods tested on *B. orellana* seeds, a species rich in interfering compounds. Method II, which includes delipidation and precipitation with TCA / acetone showed better solubilization and resolution of total protein extract resolved in 2D-SDS-PAGE. The effectiveness of the method was confirmed when applied to *C. brasiliensis* seeds, rich in lipidic interferents. Thus, this methodological study will provide an opportunity to analyze the proteomic patterns of the species *B. orellana* and *C. brasiliensis*, allowing to increase the knowledge about the biosynthesis pathways of bixin, chaulmoogra oil and other secondary metabolites as well as from other species.

6 REFERENCES

- ALIAS, N.; MOHD AIZAT, W.; AMIN, N. D. M.; MUHAMMAD, N.; MOHD NOOR, N. (2017). A simple protein extraction method for proteomic analysis of mahogany (*Swietenia macrophylla*) embryos. **Plant Omics**, v.10, p.176.
- AMME, S.; MATROS, A.; SCHLESIER, B.; MOCK, H.P. (2006). Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1537-1546.
- BERTOLDE, F. Z. et al. (2014). Efficient method of protein extraction from *Theobroma cacao* L. roots for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analyses. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.5036–5047.
- BITTENCOURT, F.; ALVES, J.S.; GAIOTTO, F.A. (2015). Microsatellites for *Carpotroche brasiliensis* (Flacourtiaceae), a useful species for agroforestry and ecosystem conservation. **Applications in plant sciences**, v.3, p.01-06.
- CÁRDENAS-CONEJO, Y., CARBALLO-UICAB, V., LIEBERMAN, M., AGUILAR-ESPINOSA, M., COMAI, L., & RIVERA-MADRID, R. (2015). De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis. **BMC genomics**, v.16, p.01-18.
- CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v.5, p.2497-2507.
- CARVALHO, P. et al. Concentração de lipídios, carotenóides totais, geraniolgeraniol e tocotrienol em diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) da coleção do Instituto Agrônômico (IAC). Bragantia, Campinas, 2010. 69, 519–524. Disponível em: <<https://www.ourucum.com.br>>. Acesso em: 28 abr. 2017.
- GARCIA, C. E. et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, 2012. 8, 1510-1517.
- ISLAM, N. et al. (2004). Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. **Proteomics**, v.4, p.1903–1908.
- ISAACSON, T.; DAMASCENO, CM.; SARAVANAN, RS. HE, Y. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Natural Protocols**. v. 1, p.769-774.
- MALDONADO, A.M.; ECHEVARRIA-ZOMENO, S.; JEAN-BAPTISTE, S.; HERNANDEZ, M.; JORRIN-NOVO, J.V. (2008). Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v.71, p.461–472.

- MANTOVANI, N. C. et al. Avaliação de genéticos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. **Ciência Florestal**, 2013. p.355-362.
- NANDAKUMAR, M.P.; SHEN, J.; RAMAN, B.; MARTEN, M.R. (2003) Solubilization of TCA precipitated microbial proteins via NaOH for two dimensional electrophoresis. **J Proteome Res.** v.2, p.89-93.
- NATARAJAN, S. et al. (2009) An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. **Analytical Biochemistry**, v.394, p.259–268.
- OLIVEIRA, A.S.; LIMA, J.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. (2009). Cyclopentenyl acids from sapucainha oil (*Carpotroche brasiliensis* Endl, Flacourtiaceae): the first antileprotic used in Brazil. **Química Nova**, v.32, p.139-145.
- PINTO, L.C.; SOUZA, M.P.C.D.; LOPES, M.V.; FIGUEIREDO, C.A.V. (2012). Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante das sementes da *Carpotroche brasiliensis* (Raddi). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, p.170-176.
- PIROVANI, C. P. et al. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Electrophoresis**, v.29, p.2391–2401.
- RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2002. 20, 101–153.
- RIVIERA-MADRID, R. et al. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, v.109, p.165–172.
- ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; JAMES, J.G.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **Plant J**, v.39, p.715–733.
- RODRIGUES, S.M. et al. (2007). Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**, v.37, p.220–224.
- RODRIGUES, N.J.; RICCI-SILVA, M.; SANTOS, C.; COSTA, P.; RIBEIRO, J.; SIQUEIRA, F.; ABDELNUR, P. (2015). Desenvolvimento de protocolo analítico para identificação de proteínas em frutos de dendê utilizando maldi(+)-tof-ms. In: 55º Congresso Brasileiro de Química. 2015. Goiânia/GO.
- SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p.2522-2532.
- SHEORAN, I.S.; OLSON, D.J.H.; ROSS, A.R.S.; SAWHNEY. V.K. (2005). Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v.5, p.3752–3764.
- SCHUSTER, A.M.; DAVIES, E. (1983). Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls: I. The aging process. **Plant Physiology**, v.3, p.809-816.
- SOARES, V.L.F.; RODRIGUES, S.M.; DE OLIVEIRA, T.M, DE QUEIROZ, T.O.; LIMA, L.S., HORA- JUNIOR, B.T., et al. (2011) Unraveling new genes associated with seed

development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. **Mol Biol Rep.**, v.38, p.1329–1340.

VERLENGIA, R. et al. Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos - Metodologia e Procedimentos Técnicos. São Paulo: Santos, 2013. 261.

VINHA, A. F; RODRIGUES, F. NUNES, A. M; OLIVEIRA, B. P. P. M (2018). Natural pigments and colorants in foods and beverages. **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**, p.363-391.

VILHENA, M. B.; FRANCO, M. R.; SCHMIDT, D.; CARVALHO, G., AZEVEDO, R. A. (2015). Evaluation of protein extraction methods for enhanced proteomic analysis of tomato leaves and roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, p.1853-1863.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. **Journal of Separation Science**, v.31, p.2032–2039.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v.27, p.2782–2786.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; SENSI, E.; TIBERI, P., CRESTI, M. (2004). Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v.329, p.139-141.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E. (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, p.2369–2375.

CAPÍTULO 2

Análise do perfil proteômico global de diferentes órgãos de *Bixa orellana* L. por eletroforese em gel bidimensional

Monique Reis de Santana, Carlos Priminho Pirovani, Virgínia Lúcia Fontes Soares

RESUMO

Estima-se que uma fração do genoma vegetal codifica para proteínas envolvidas em rotas de biossíntese de produtos naturais de baixo peso molecular utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e têxteis. Esses produtos são denominados metabólitos secundários e desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao ambiente. Eles foram caracterizados como antibióticos, antifúngicos e antivirais, e, portanto, viabilizam a defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Além disso, muitas dessas moléculas são pigmentos e desempenham importante função absorvente de UV, evitando danos das folhas. Devido às suas diversas propriedades e aplicações, os metabólitos secundários de plantas são utilizados há séculos. Uma dessas plantas, fonte de um importante composto, é o urucum (*Bixa orellana* L.), que possui importância econômica destacada por ser a única espécie disponível como fonte do metabolito secundário bixina. A bixina é o pigmento que confere a coloração vermelha às sementes de urucum, o qual tem sido extraído e utilizado principalmente como aditivo natural. Diante do grande potencial dos pigmentos produzidos pelo urucum, é que foi proposto investigar a biologia molecular da biossíntese desses compostos. Além disso, pouco é conhecido sobre a biossíntese, catabolismo e sobre as enzimas envolvidas na regulação da deposição de metabólitos secundários no urucum. Portanto, para obter mais informações sobre a dinâmica das proteínas e elucidar os mecanismos relacionados às rotas metabólicas em *B. orellana* L., uma abordagem proteômica de alto rendimento foi empregada para determinar o perfil de expressão em amostras de botão floral e sementes em diferentes estágios de desenvolvimento. Mapas de referência de proteoma de alta resolução de amostras de botão floral e diferentes estágios de

desenvolvimento das sementes, apresentaram diferenças na distribuição dos *spots* quanto ao ponto isoelétrico e peso molecular e número de *spots* detectados, totalizando 1058 *spots*.

Palavras-chave: metabólitos secundários; bixina; proteoma; 2D-SDS-PAGE

1 INTRODUÇÃO

Pigmentos extraídos das sementes de urucum (*Bixa orellana*) são utilizados desde o tempo pré-colonial como corante, tempero na culinária doméstica e para fins terapêuticos (FERREIRA, 2011; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2019). Encontrados em maior quantidade no arilo das sementes, esses pigmentos possuem alto teor de carotenóides, sendo a bixina o principal componente, cerca de 80%, e que contribui para a coloração vermelha das sementes (MERCADANTE TEIXEIRA DA SILVA et al., 2018).

O pigmento de *B. orellana* é usado como corante natural nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Além disso, as propriedades biológicas desse pigmento também são exploradas, tanto como fonte de princípio ativo com potencial para ser usado em novos fármacos, como em condimento ou suplemento alimentar que pode fornecer proteção contra diversas enfermidades (NAMITHA; NEGI, 2010; MANTOVANI et al., 2013; NATIVIDAD AND RAFAEL et al., 2014; CARDENAS-CONEJO et al., 2015; VINHA et al., 2018).

O grande potencial comercial do urucum tem influenciado as pesquisas desenvolvidas sobre a espécie, uma vez que é fonte de pigmento natural e apresenta comprovadas propriedades bioativas. O urucum é uma excelente alternativa aos corantes sintéticos que são comprovadamente nocivos (SINHA et al., 2013; AMCHOVA et al., 2015). Sabe-se que *B. orellana* é a única espécie disponível como fonte do corante natural bixina e por isso apresenta grande valor econômico (RIVERA-MADRID et al., 2006). Portanto, a elucidação da via de biossíntese de bixina e seus mecanismos de regulação são fundamentais para melhorar a produção desse importante carotenóide.

As análises proteômicas são utilizadas para uma ampla gama de aplicações, desde a identificação de biomarcadores até a avaliação da qualidade dos alimentos (PAREDI et al. 2016). Técnicas como o microarranjo de DNA e RNA-seq também apresentam vantagens em estudos de larga escala em todo o genoma, no nível do mRNA. No entanto, níveis de mRNA nem sempre refletem a abundância de proteínas, o que pode limitar o entendimento por exemplo da regulação de vias metabólicas. Portanto, a análise global de proteínas expressas é uma interessante ferramenta para o estudo de proteínas envolvidas em processos celulares (LI et al., 2012; ALIAS et al., 2017).

No presente trabalho, o poder analítico de estudos proteômicos foi explorado para a caracterização inicial do perfil proteico de *B. orellana*. A identificação das proteínas expressas, durante o desenvolvimento das sementes, irá contribuir com a ampliação do conhecimento sobre o sistema complexo que coordena o desenvolvimento das sementes de

urucum associados aos mecanismos de rotas metabólicas. Também fornecerá informações sobre o acúmulo da bixina e identificará rotas metabólicas de compostos com atividades biológicas relevantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das sementes

As amostras de urucum (*Bixa orellana* L., var. Embrapa 37) foram coletadas na fazenda Sempre Viva, localizada na BR-367, Eunápolis – BA. Diferentes estágios de desenvolvimento das sementes foram selecionados com base no diâmetro (mm) e largura (mm) dos frutos, seguindo a seguinte classificação: S1 (1º estágio de desenvolvimento de sementes; 1,5 / 3,1 mm), S2 (2º estágio de desenvolvimento de sementes; 3,1 / 6,8 mm), S3 (3º estágio de desenvolvimento de sementes; 5,2 / 10,9), S4 (4º estágio de desenvolvimento de sementes; 10 / 21,1), S5 (5º estágio de desenvolvimento de sementes; 14,7 / 25,2), S6 (6º estágio de desenvolvimento de sementes; 20,3 / 34,4) e S7 (7º estágio de desenvolvimento de sementes; 25 / 39,1). Também foram coletados os botões florais e flor. As amostras de três réplicas biológicas foram agrupadas formando *pools* e dando origem a três réplicas experimentais. Após coletadas as amostras foram imediatamente submersas em Nitrogênio líquido e encaminhadas ao Laboratório de Proteômica do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), liofilizadas e armazenadas a -20 °C até o uso.

2.2 Obtenção das proteínas

Os *pools* de botão floral, flor e diferentes estágios de desenvolvimento das sementes, foram liofilizados e macerados na presença de nitrogênio líquido e 7% polivinilpolipirrolidona. Em seguida, 0,2g do pó seco das sementes foram submetidos a uma delipidação, seguindo o protocolo otimizado descrito no capítulo 1. As amostras foram ressuspensas em 500µL de 1-butanol: clorofórmio (1:9), a mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 13.400g/ 5 min a 4°C. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida, foi descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de acetona a 100% e centrifugado a 13.400 g por 5 min a 4 °C. Por fim, o precipitado foi lavado com 500 µL de éter de petróleo e centrifugado a 13.400 g por 5 min a 4 °C.

As proteínas foram extraídas seguindo o protocolo descrito por Pirovani et al. (2008). O precipitado final foi ressuspensionado em 800 µL de tampão [Uréia 6M; tiourea 2M; CHAPS 2%; azul de bromofenol 0,002%] e estocado a -20°C até o uso. As proteínas extraídas foram quantificadas utilizando o 2-D Quant Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A qualidade e quantidade de proteínas foram monitoradas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 12,5%, onde 30 µg de cada amostra foram diretamente aplicadas no gel em minicubas HOEFER SE260 MightySmall (LAEMMLI, 1970). Os géis produzidos mediram 8 x 10 cm e foram corados com *Coomassie blue*.

2.3 Eletroforese 2D

Para análise proteômica em 2D-SDS-PAGE, foram utilizadas uma concentração de 350 µg de proteína total diluída em 250 µL de solução de reidratação [Uréia 6M; tiourea 2M; CHAPS 2%; azul de bromofenol 0,002%]. As tiras de gel (contendo imobilina) com 13 cm de comprimento com gradiente de pH não linear imobilizado de 3 a 10 (AmershamBiosciences, ImmobilineTMDry-Strip) foram submetidas na unidade de Focalização Isoelétrica EthanIPGphor III e hidratadas por 12 h na solução de tampão de reidratação / proteína. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5% em um sistema de eletroforese vertical HOEFER SE 600 Ruby (AmershamBioscience). A corrida começou com uma corrente elétrica de 15 mA / gel por 15 min, seguida de 30 µA / gel por 30 min e 50 µA / gel por 3,5 h, totalizando um tempo de 4,25 h. Foram preparados géis em triplicata para cada *pool* de amostra.

2.4 Visualização dos *spots* e análise de imagens

Após eletroforese, os géis de poliacrilamida foram colocados em tampão de fixação (etanol 40% e ácido acético 10%) por 1 h; em seguida, o tampão foi substituído por corante coloidal *Coomassie Blue* (8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08% de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 e 20% de metanol) e foram incubados por 5 dias sob agitação suave. O corante foi substituído por água destilada e os géis foram mantidos sob agitação suave com trocas diárias de água até que o excesso de corante fosse removido.

As imagens dos géis foram digitalizadas com um Labscanner (AmershamBioscience) e analisadas para detecção e quantificação relativa dos *spots*, usando o software ImageMaster

2D Platinum 7.0 (GE HealthCare), considerando a área e a intensidade dos *spots*. Os géis de referenciadas triplicatas foram utilizados para identificar a variação na abundância e distribuição de *spots*, bem como para comparar o acúmulo relativo de proteínas exclusivas para os diferentes órgãos estudados. Para os *matches*, *spots* que apresentaram uma mudança relativa na dobra em abundância igual ou maior que 1,5 foram considerados diferencialmente expressos, e a significância estatística foi determinada se $p < 0,05$ para o teste ANOVA. As triplicatas dos diferentes estágios de desenvolvimento das sementes e botão floral foram comparadas por pares.

2.5 Predição teórica do Peso Molecular e Ponto Isoelétrico das principais enzimas envolvidas na rota de biossíntese de bixina

O peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) foram preditos empregando-se o conjunto de ferramentas disponíveis no COMPUTE pI/Mw(https://web.expasy.org/compute_pi/), utilizando as sequências disponíveis no banco de dados genBank do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3 RESULTADOS

Com o protocolo de extração de proteínas para sementes ricas em compostos interferentes apresentado no capítulo 1, foi possível obter rendimentos proteicos satisfatórios (μg de proteínas/ mg de peso seco) de amostras de botão floral e dos diferentes estágios de desenvolvimento de sementes para a aplicação da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) (Tabela 1). O rendimento foi variável entre os diferentes órgãos e os respectivos estágios de desenvolvimento. No geral, o rendimento médio de proteínas de todas as amostras de semente ($12,34 \mu\text{g}/\text{mg}$) foi maior do que as amostras de botão floral e flor, que renderam $7,43 \mu\text{g}/\text{mg}$ e $4,68 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente. A amostra de flor, apresentou o rendimento proteico 73,42% menor que a amostra com maior rendimento, sementes no estágio 5 (S5). Entre os diferentes estágios de desenvolvimento das sementes, S5 e S2 apresentaram maior rendimento e S7 apresentou o menor, 13,58 % e 40,16 % a menos que os respectivos estágios supracitados. Os estágios 3 (S3), 4 (S4) e 6 (S6) apresentaram rendimentos próximos, havendo uma diferença de 0,77 % entre S4 e S6 e de 6,82 % e 6,9 % destes em relação ao S3, respectivamente.

Tabela 1. Rendimento proteico de botão floral, flor e estágios de desenvolvimento de sementes 2 (S2), 3 (S3), 4 (S4), 5 (S5), 6 (S6) e 7(S7) de *B. orellana* e número total de *spots* detectados em 2D-SDS-PAGE.

Amostra	Concentração de proteína ($\mu\text{L}/\mu\text{L}$)	Rendimento (μg de proteína/ mg de peso seco)
Botão floral	1.859	7,43
Flor	1.17	4,68
Semente (S2)	3.043	12,17
Semente (S3)	2.695	10,78
Semente (S4)	2.893	11,57
Semente (S5)	4.402	17,61
Semente (S6)	2.871	11,48
Semente (S7)	2.629	10,52

*As proteínas foram extraídas a partir de 200mg de amostra liofilizada e ressuspendidas em 800 μL de tampão de reidratação.

O perfil proteômico em SDS-PAGE 12,5% apresentou bandas bem distribuídas na faixa de 14 até superior a 97 kDa (Figura 1). Para todas as amostras, foram observadas bandas bem definidas com boa separação, além de não serem visualizados arrastes entre elas. Em amostras de sementes observou-se uma maior intensidade das bandas de aproximadamente 97 kDa em comparação com as amostras de botão floral e flor. Contudo, esse contraste não reflete em grande diferença na quantidade de *spots* detectados em 2D-SDS-PAGE para as amostras de botão floral e sementes.

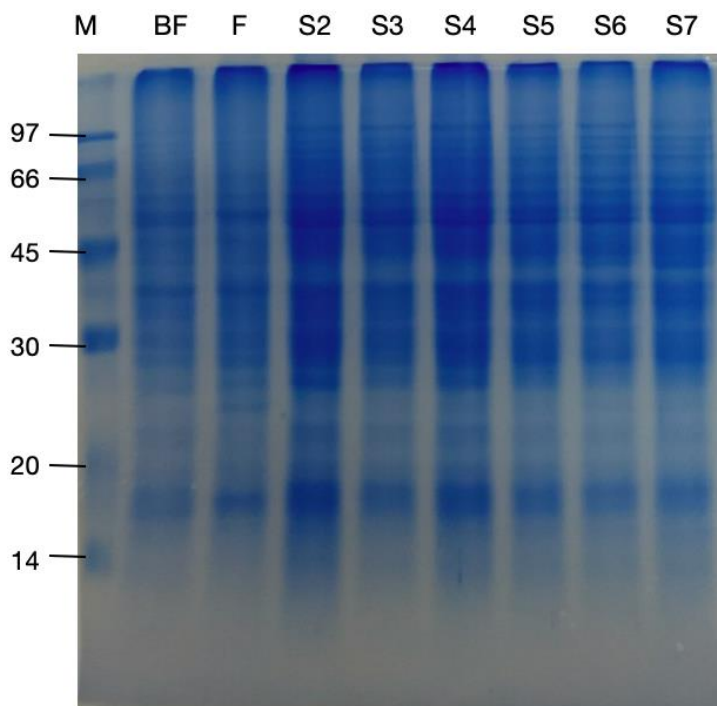


Figura 1. SDS-PAGE de extrato de proteínas totais de diferentes órgãos de *B. orellana*. M: Marcador molecular (14-97 kDa); BF: botão floral; F: flor; S2, S3, S4, S5, S6 e S7: Estágio de desenvolvimento de sementes 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. De cada amostra, foram aplicadas 30 µg de proteína nos géis. Os géis foram corados com corante coloidal *Coomassie Blue* (NEUHOFF et al. 1988).

Com a avaliação dos dados quantitativos (Tabela 1) e qualitativos (Figura1) das proteínas extraídas, as amostras de botão floral e estágios de desenvolvimento das sementes 2 (S2), 5 (S5) e 7 (S7) foram selecionadas para a obtenção dos perfis proteicos em 2D-SDS-PAGE. As amostras foram eleitas de acordo com os melhores rendimentos e melhor qualidade da extração, bem como, por estas sinalizarem estágios mais representativos do desenvolvimento das sementes.

Desta forma, os perfis proteicos do botão floral e dos diferentes estágios de desenvolvimento das sementes (S2, S5 e S7) foram obtidos em 2D-SDS-PAGE (Figura 2). A análise dos *spots* detectados revelou diferenças numéricas para as amostras estudadas. Em géis de botão floral foram detectados 262 *spots*, enquanto nos géis de sementes S2, S5 e S7 foram detectados 279, 272 e 245 *spots*, respectivamente. Assim, comparativamente ao botão floral, o estágio de desenvolvimento S7 (menor número de *spots* detectados) apresentou 6,48% menos proteínas, enquanto o estágio S2 (maior número) 3,67% *spots* a mais. Também foram observadas diferenças entre os perfis proteicos quanto a intensidade de *spots* detectados.

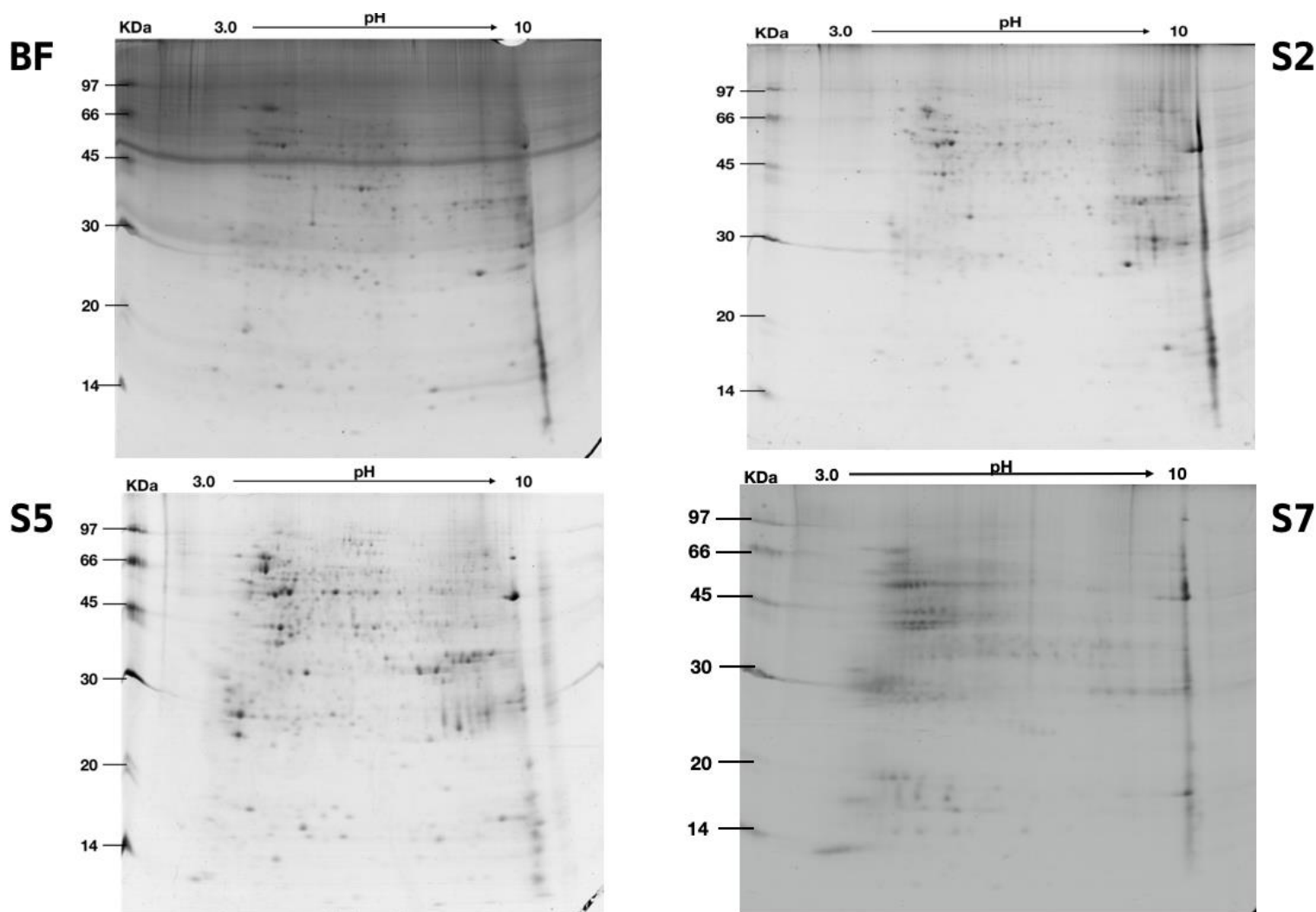


Figura 2. Perfis proteicos de diferentes órgãos de *B. orellana* em 2D-SDS-PAGE. M: marcador molecular (14-97 kDa); BF: botão floral; F: flor; S2, S5 e S7: estágio de desenvolvimento de sementes 2, 5, e 7, respectivamente. Amostras proteicas foram focalizadas em tiras de 13 cm com gradiente de pH 3-10, não linear (NL). Foram utilizadas 350 µg de proteína para cada gel. Os géis foram corados com corante coloidal *Coomassie Blue* (NEUHOFF et al. 1988).

Os géis foram analisados quanto a variação na abundância e distribuição de *spots*, levando em consideração o ponto isoeletrico (pI) e o peso molecular (PM), das proteínas. Os *spots* foram detectados em todas as faixas de pH (3-10). No entanto, a distribuição das proteínas em relação aos seus pIs revelou uma maior concentração do número de *spots* em uma região de pH entre 4 e 7 para todas as amostras. Ainda foi verificado que todas as amostras apresentaram menor quantidade de proteínas mais ácidas (pH entre 3 e 4) (Figura 3).

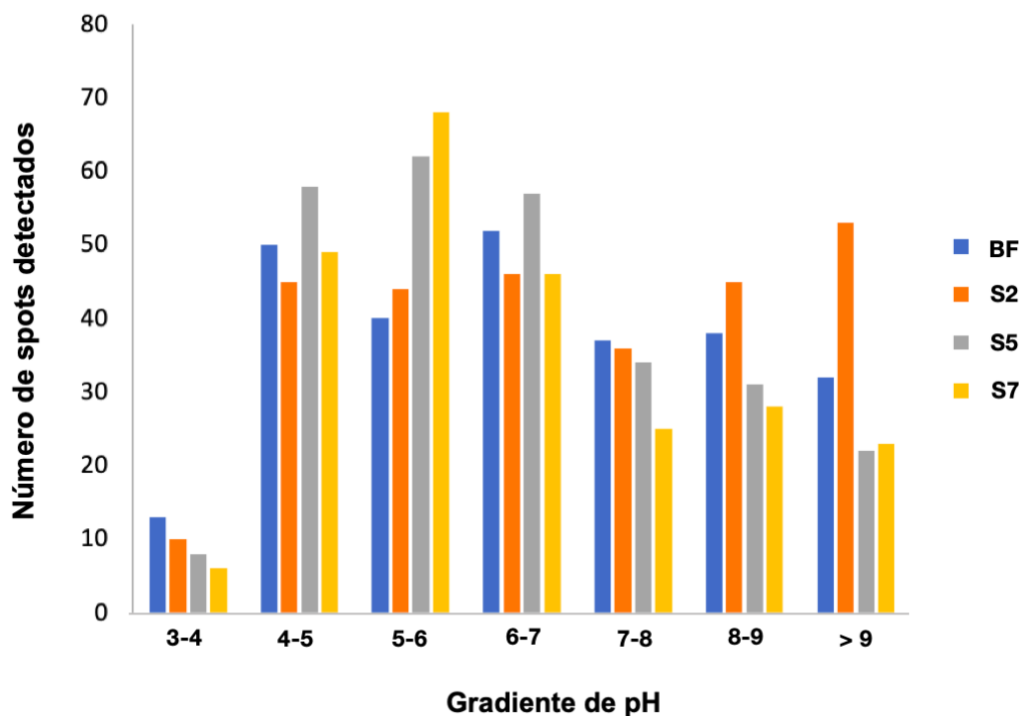


Figura 3. Distribuição dos *spots* detectados em 2D-SDS-PAGE de diferentes órgãos de *B. orellana* quanto ao ponto isoelétrico (pI). BF: botão floral; F: flor; S2, S5 e S7: estágio de desenvolvimento de sementes 2, 5, e 7, respectivamente.

Em botão floral, a maior ocorrência de *spots* foi na faixa de pH entre 6 e 7, com 52 *spots* detectados nessa região, estando próximo do valor detectado para a região de pH entre 4 e 5 para a mesma amostra (50 *spots*). No entanto, houve uma diminuição do número de *spots* nas regiões de pH >7. Para o estágio S2, o maior número de proteínas apresentou o pI em pH > 9. Sementes em estágios de desenvolvimento mais avançados, S5 e S7, a maior frequência de *spots* foi detectada em uma região de pH entre 4 e 6. Contudo, nota-se a diminuição no número de proteínas básicas (pH entre 7 e 9) para os estágios S5 e S7. Na região de pH > 9 os estágios S5 e S7 apresentaram aproximadamente a metade do número de *spots* que o estágio S2.

Em relação ao peso molecular, as imagens mostram predominância na distribuição de *spots* na faixa de 30 a 66 kDa com 53%, 59,4%, 56,6% e 56,3% para botão floral e estágios S2, S5 e S7, respectivamente (Figura 4). Em todas as amostras observou-se menores quantidades de *spots* com peso molecular > 66 kDa. Entre os diferentes órgãos, a amostra de botão floral apresentou o menor número, totalizando 16 *spots*, ao passo que, para os diferentes

estágios de desenvolvimento das sementes houve um decréscimo de aproximadamente 18% do estágio S2 para o estágio S5 e de 63% do estágio S5 para o S7. Por outro lado, as proteínas das amostras de sementes agruparam-se em menor quantidade em uma região <30 kDa, quando comparadas com a amostras de botão floral, que apresentou 25,2%, 14,9% e 9,3% *spots* a mais que os estágios S2, S5 e S7, respectivamente.

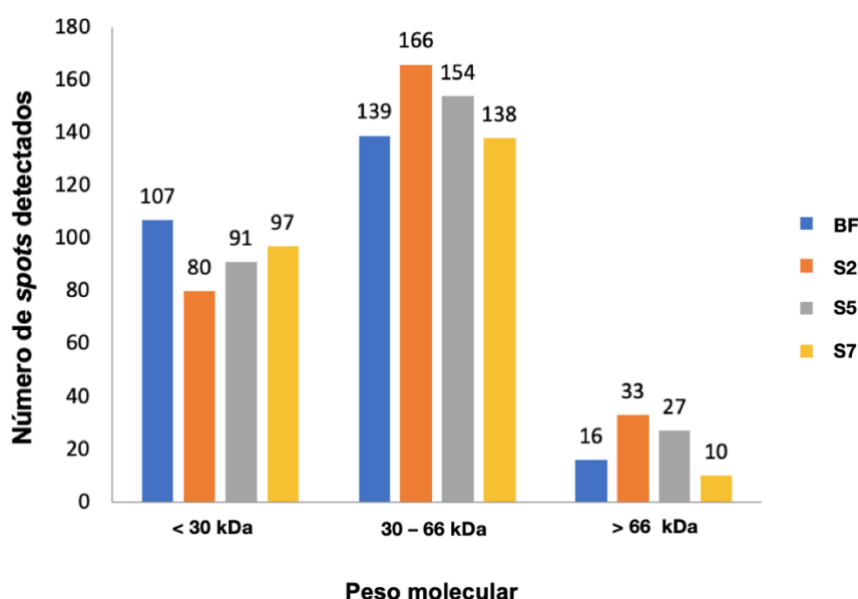


Figura 4. Distribuição dos *spots* detectados em 2D-SDS-PAGE de diferentes órgãos de *B. orellana* de acordo com a massa molecular (kDa). BF: botão floral; F: flor; S2, S5 e S7: Estágio de desenvolvimento de sementes 2, 5, e 7, respectivamente.

Para identificar as proteínas acumuladas diferencialmente para botão floral e diferentes estágios de desenvolvimento das sementes, seus mapas proteômicos foram comparados usando o *software* ImageMaster com validação e quantificação manual. As análises comparativas do número de *spots* exclusivos e comuns, foi realizada por pares, para os diferentes órgãos de *B. orellana*, e organizadas em Diagramas de Venn. A figura 5 mostra as comparações entre botão floral e cada estágio de desenvolvimento das sementes estudados (S2, S5 e S7), bem como entre esses estágios. Um total de 262 *spots* para botão floral foram analisados em contraste com 279, 272 e 245 para os estágios S2, S5 e S7, respectivamente.

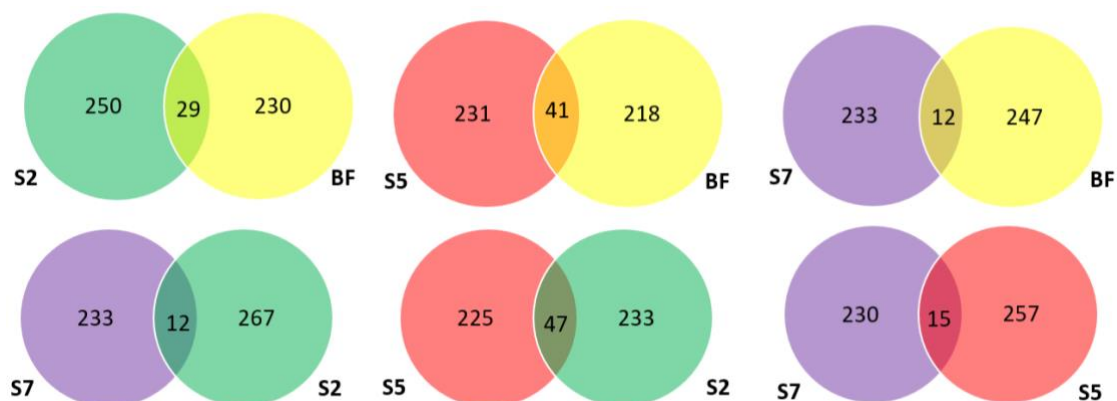


Figura 5. Diagramas de Venn da distribuição de proteínas exclusivas e comuns de diferentes órgãos de *B. orellana*. Todas as proteínas foram detectadas pelo Image Master 2D Platinum (GE Healthcare), foi considerado ANOVA $p > 0.05$ para a distribuição de proteínas diferenciais significativas. BF: botão floral; F: flor; S2, S5 e S7: estágio de desenvolvimento de sementes 2, 5 e 7, respectivamente.

O número de *spots* detectados exclusivamente em cada amostra foi maior que aqueles que ocorrem em ambas amostras para todas comparações em pares. A amostra de botão floral apresentou maior quantidade de *spots* exclusivos (247) em comparação ao estágio S7 e valores menores (230 e 218) na comparação com os estágios S2 e S5. O estágio S2 apresentou 250 *spots* exclusivos na comparação com botão floral e 7, 6% e 6,8% a mais que os estágios S5 e S7. Nas comparações entre os estágios de desenvolvimento, o estágio S2 obteve 12,7 % e 13,8% mais proteínas exclusivas que os estágios S5 e S7, respectivamente. Entre os estágios S5 e S7 o primeiro apresentou 10,5 % mais *spots* exclusivos que o último.

Em relação aos *spots* em comum, a amostra de botão floral, apresentou maior número (41 *spots*) comparativamente ao estágio S5 e 70,7 % e 29,2 % a menos na comparação com os estágios S2 e S7, respectivamente. Entre os estágios de desenvolvimento das sementes, a comparação entre os estágios S2 e S5 apresentou 74,4% mais proteínas detectadas como em comum que a comparação entre os estágios S2 e S7 e 68 % mais que na comparação dos estágios S5 e S7.

As análises *in silico* do peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) teóricos das principais enzimas, sugeridas em estudos anteriores como as envolvidas na rota de biossíntese da bixina, revelaram diferenças no peso molecular e ponto isoelétrico entre as dioxigenase (BoLCD, BoCCD4-1e BoCCD4-3), desidrogenase do aldeído (BoBADH, BoALDH3I1 e

BoALDH31H1) e metiltransferases (BoMT, BoSABATH3 e BoSABATH4) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 2. Predição teórica do Peso Molecular e Ponto Isoelétrico de enzimas envolvidas na rota de biossíntese de bixina.

Enzima	Número de resíduos de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Ponto isoelétrico
BoLCD	369	40.83	5.24
BoCCD4-1	599	68	6.64
BoCCD4-3	589	66.02	8.52
BoBADH	504	54.55	6.28
BoALDH3I1	485	53.78	8.85
BoALDH31H1	567	61.92	9.12
BoMT	375	41.96	9.51
BoSABATH3	360	40.17	5.58
BoSABATH4	363	40.82	5.82

4 DISCUSSÃO

Os mecanismos de regulação do metabolismo dos pigmentos naturais de *B. orellana* têm sido investigados para ampliar os conhecimentos das propriedades biológicas, visando aplicações industriais e médicas.

A maioria dos estudos está voltada para a correlação entre o teor de bixina nas sementes e os níveis de transcrição de genes envolvidos em rotas de carotenoides (SOARES et al., 2011; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015; RIVERA-MADRID et al., 2016; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2018). No entanto, análises do proteoma fornecem ferramentas para uma abordagem mais promissora dos estudos de metabólitos secundários em plantas (JACOBS et al., 2000). Além de revelarem uma análise mais criteriosa da dinâmica proteica durante a deposição desses compostos, a caracterização do perfil proteico possibilita, também, compreender os mecanismos reguladores subjacentes por meio da identificação de enzimas envolvidas na catálise de cascatas de reações, proteínas de transporte e de regulação do

metabolismo secundário (LI et al., 2013). Apesar de sua importância, até o momento, ferramentas proteômicas não haviam sido aplicadas para caracterizar o proteoma de *B. orellana*.

Os eventos metabólicos que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes são importantes na determinação da composição dos produtos armazenados durante a fase de enchimento de grãos (HAJDUCH et al., 2005). Em *B. orellana*, estudos prévios, relataram uma correlação positiva entre a deposição do principal carotenoide encontrado no arilo das sementes, a bixina, e o desenvolvimento destas (JAKO et al., 2002; BOUVIER et al., 2003; RODRÍGUEZ-ÁVILA et al., 2011b; SOARES et al., 2011; LOURO & SANTIAGO, 2015; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015). A enzima dioxigenase da clivagem do carotenoide (CCD) é considerada importante para o acúmulo de carotenóides, estando envolvido na biossíntese da bixina (HENG et al., 2019). Portanto, a avaliação do perfil proteico de diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento das sementes tem como objetivo caracterizar a expressão temporal de enzimas e correlacioná-las com rotas de biossíntese importantes para a produção e deposição de pigmentos.

Em investigações anteriores, a elevada expressão de *BoCCD4* foi observada em estágios finais de desenvolvimento das sementes de *Bixa orellana*, relacionando essa expressão com a rota de biossíntese de bixina (SOARES et al., 2011; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015).

No presente estudo, a análise dos perfis proteicos de diferentes órgãos de *B. orellana*, revelou diferenças quanto ao número de *spots*, bem como, a distribuição de proteínas em relação ao ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM). Ao analisar a distribuição de *spots* em relação ao pI, isto é, o pH específico no qual a carga líquida da proteína é nula (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975), verificou-se que os estágios de desenvolvimento das sementes apresentaram variação quanto a ocorrência de proteínas ácidas e básicas. Todos os produtos de genes, que foram relacionadas com a rota de bixina em trabalhos anteriores, apresentaram nas análises de predição *in silico*, o pI teórico em regiões de pH entre 5 e 9,5 (<https://www.uniprot.org/>). As enzimas importantes para as etapas iniciais da via apresentam uma média do pI de 7,44 e as relacionadas com a etapa final da rota possuem pI de aproximadamente 5,7 (JAKO et al., 2002; BOUVIER et al., 2003; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015). O número de *spots* nas regiões de pH >7 é maior para o estágio 2 quando comparados com os estágios S5 e S7 com mais *spots* em um gradiente de pH entre 5 e 6. Nesse cenário, as diferenças qualitativas e quantitativas no acúmulo de enzimas durante os estágios de desenvolvimento da semente, sugeridas pelos resultados, podem estar

correlacionadas com a deposição gradual do pigmento. A distribuição de *spots* quanto ao peso molecular revelou predominância de proteínas com PM entre 30 e 66 kDa. Esse resultado corrobora com a predição do PM de enzimas apontadas como envolvidas na produção de bixina (JAKO et al., 2002; BOUVIER et al., 2003; CÁRDENAS-CONEJO et al., 2015). Também, o menor número de proteínas detectadas no estágio final de desenvolvimento das sementes sugere uma diminuição na expressão das enzimas envolvidas no metabolismo das sementes, momento este em que predomina a fase final de enchimento de grãos (HAJDUCH et al., 2005).

Ademais, o estudo da expressão diferencial por proteômica torna-se uma ferramenta complementar para análise funcional. Os *matches* dos géis, entre os diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento, revelam diferenças no acúmulo de proteínas. No entanto, uma vez que os estágios não apresentam uma diferença significativa no número de *spots* no decorrer do desenvolvimento, as proteínas detectadas em diferentes pontos no gel podem ser uma representação de suas isoformas com diferentes PM e pI. Sabe-se que a eletroforese bidimensional (2-DE) tem a vantagem de separar proteínas ao nível de isoformas. Essas espécies de proteínas são diferentes formas de uma única proteína que foram derivadas de polimorfismos de gene, clivagem proteolítica, *splicing* alternativo e modificações pós transcricionais (LI et al., 2013). Ainda assim, a complexa regulação dessas espécies de proteínas pode desempenhar papel importante na biossíntese de pigmentos relativamente ao desenvolvimento das sementes.

5 CONCLUSÃO

Esta é a primeira investigação do proteoma de *Bixa orellana*. A predição teórica do ponto isoelétrico e peso molecular de enzimas envolvidas na rota de biossíntese da bixina sugerem uma relação entre o número de spots detectados no primeiro estágio de desenvolvimento das sementes estudados e enzimas envolvidas em etapas iniciais da rota de biossíntese de bixina, bem como entre enzimas da etapa final dessa rota e as amostras em estágios mais avançados de desenvolvimento. Nesse contexto, os resultados obtidos apontam para uma direção de biossíntese desse composto ao longo do desenvolvimento das sementes. Este estudo representa um passo em direção ao esclarecimento dos mecanismos envolvidos na biossíntese dos metabólitos secundários em *B. orellana*, principalmente bixina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Com a identificação do maior número possível de *spots* detectados nas amostras de botão floral e sementes em diferentes estágio de desenvolvimento de *B. orellana*, serão obtidos resultados significativos quanto as bases moleculares da síntese de metabólitos secundários e poderão revelar novos *insights* a respeito da via dos carotenoides, especialmente em relação ao pigmento bixina, bem como destacar outros metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Também, a partir da identificação dos *spots* diferenciais pretende-se reconhecer proteínas exclusivas em cada estágios de desenvolvimento com ênfase particular na detecção de enzimas envolvidas no metabolismo secundário.

7 REFERÊNCIAS

- ABDO, B. M. Isolation, characterization and biological activities of food colorants from *Bixa orellana*. A Thesis Submitted to the Department of Chemistry, Postgraduate Program Directorate, Haramaya university, Haramaya, 2015.
- AKSHATHA, P. GIRIDHAR; RAVISHANKAR, G. A. Morphological diversity in *Bixa orellana* L. and variations in annatto pigment yield, **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 86, n. 4, p. 319-324, 2011.
- ALIAS, N.; MOHD AIZAT, W.; AMIN, N. D. M.; MUHAMMAD, N.; MOHD NOOR, N. A simple protein extraction method for proteomic analysis of mahogany (*Swietenia macrophylla*) embryos. **Plant Omics**, v.10, p.176, 2017.
- AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, 914–922, 2015.
- AMOAKO-ANDOH, F. O.; DANIËLS, B.; KEULEMANS, W.; DAVEY, M. W. A systematic evaluation of protocols for a proteomics analysis of (lyophilized) fruit tissues. **Electrophoresis**, v. 35, n. 10, p. 1395–1405, 2014.
- ANDREW W. DOWSEY, JEFFREY S. MORRIS, HOWARD B. GUTSTEIN, AND G.-Z. Y. A. Informatics and Statistics for Analyzing 2-D Gel Electrophoresis Images. **Humana Press**, v. 60, n. 4, p. 55–71, 2010.
- ANTUNES, L.M.G., et al., Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**v. 585, n 1, p. 113–119, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Consulta Pública nº: 25351.468974/2011-69 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em: dezembro 2019.
- ARMSTRONG, G. & HEARSTT, J. E. Serial review carotenoids 2. **Plant Cell**, v. 10, p. 228–237, 1996.
- BOSE, U.; WIJFFELS, G.; HOWITT, C. A.; COLGRAVE, M. L. Proteomics: Tools of the Trade. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1073, p. 1–22, 2019.
- BOURGAUD, F. GRAVOT, A. MILESI, S. GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**,v. 161, p. 839–851,2001.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, n. (5628), p. 2089–2091, 2003.
- BRITTON, G. Biosynthesis of carotenoids. In: Young A.J., Britton G. (eds) Carotenoids in Photosynthesis. **Springer, Dordrecht**, 1993.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Serial Review**, p. 1551–1558, 1995.

CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B. E.; JAUREGUI, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 85–88, 1995.

CÁRDENAS-CONEJO, Y.; CARBALLO-UICAB, V.; LIEBERMAN, M.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; COMAI, L.; RIVERA-MADRID, R. De novo transcriptome sequencing in *Bixa orellana* to identify genes involved in methylerythritol phosphate, carotenoid and bixin biosynthesis. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.

CARVALHO, P. R. N.; HEIN, M. Urucum: Uma fonte de corante natural. **Colet. ITAL**, Campinas, v.19, n. 1, p. 25 – 33, 1989.

CASTELLO, M. C.; PHATAK, A.; CHANDRA, N.; SHARON, M. Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa Orellana* L., **Indian J Exp Biol**, v. 40, n.12, p. 1378-1381, 2002.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A. Effects of Carotenoids on Health: Are All the Same? Results from Clinical Trials. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 17, p. 2422–2427, 2017.

COGO, L. L., MONTEIRO, C. L. B., MIGUEL, M. D. et al. (2010). Anti-Helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders, **Braz J Microbiology** v. 41, n. 2, 304-309.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim Ceppa**, v. 20, n. 2, p. 203–220, 2002.

CONTRERAS, A.; LEROY, B.; MARIAGE, P. A.; WATTIEZ, R. Proteomic analysis reveals novel insights into tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p. 1–13, 2019.

CORREA, M. P. Urucum. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Ministério da Agricultura. v. 6, p. 358 – 359, 1975.

COX, J.; MANN, M. Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 273–299, 2011.

CREMER, F.; VAN DE WALLE, C. Method for extraction of proteins from green plant tissues for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 147, n. 1, p. 22–26, 1985.

CUNNINGHAM, F. X. Regulation of carotenoid accumulation in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 198–202, 2002.

CUNNINGHAM, F. X.; BARRY, P.; ZAIREN S. A.; KELLY, A. M.; DEAN, D. Functional Analysis of the B and E Lycopene Cyclase Enzymes of *Arabidopsis* Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1613–1626, 1996.

CUNNINGHAM, F. X.; GRANTT, E. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 557–583, 1998.

CUTSEM, E.; SIMONART, G.; DEGAND, H.; FABER, A. M.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Gel-based and gel-free proteomic analysis of *Nicotiana tabacum* trichomes identifies proteins involved in secondary metabolism and in the (a)biotic stress response. **Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 440–454, 2011.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, 2018.

FABRI, E. G.; TERAMOTO, J. R. S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 140–140, 2015.

FERREIRA, S. F. Qualidade de coloríficos de urucum comercializados em diferentes regiões do Brasil. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Doutorado em Ciência e tecnologia de alimentos, Instituto de Tecnologia; 2011

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136–138, 2003.

FRANCO, C. F. O. et al. Urucuzeiro. **Agronegócio de Corantes Naturais**. Emepa, João Pessoa. 2002

FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KIANO, J. W.; MISAWA, N.; BRAMLEY, P. M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 1092–1097, 2002.

GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; DE FÁTIMA GASPARI DIAS, J.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 8, 2012.

GIORGI, A.; De MARINIS, P.; GRANELLI, G.; CHIESA, L. M.; PANSERI, S. Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repellent activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. **Journal of Chemistry**, 2013.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513–516, 2003.

GOOLLIER, J. F.; COTTERET, J.; ROSEMBAUM, G. Light-stable screening cosmetic composition containing bixin combined with a lipid-soluble UV filter and its use for protecting the human epidermis against ultra-violet radiation. **France Pat**, v. 5, n. 032, p. 382, 1991.

GORI, T.; NZEL, T. M. Oxidative stress and endothelial dysfunction: **Therapeutic implications**. **Ann Med** v. 43, p. 259–72, 2011

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J. W.; HELEN, J. J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference

maps, expression profiles, and an interactive proteome database. **PlantPhysiology**, v. 137, n. 4, p. 1397–1419, 2005.

HARDER, M. N. C.; SPADA, F. P.; SAVINO, V. J. M.; COELHO, A. A. D.; CORRER, E.; MARTINS, E. Coloração de cortes cozidos de frangos alimentados com urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 507–509, 2010.

HE, D., HAN, C., YAO, J., SHEN, S., & YANG, P. Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. **Proteomics**, v. 11, n. 13, p. 2693–2713, 2011.

HENG, Z.; SHENG, O.; HUANG, W.; ZHANG, S.; FERNIE, A. R.; MOTORYKIN, I.; KONG, Q.; YI, G.; & YAN, S. Integrated proteomic and metabolomic analysis suggests high rates of glycolysis are likely required to support high carotenoid accumulation in banana pulp. **Food Chemistry**, v. 297, 2019.

HESKETH, A. R.; CHANDRA, G.; SHAW, A. D.; ROWLAND, J. J.; KELL, D. B.; BIBB, M. J.; & CHATER, K. F. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 917–932, 2002.

HIROSE, S.; YAGINUMA, N.; INADA, Y. Energized state of mitochondria as revealed by the spectral change of bound bixin. **Arch BiochemBiophys**, v. 152, n. 1, p. 36-43, 1972.

HIRSCHBERGH, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 210–218, 2001.

IBGE, Produção Agrícola Municipal 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, CM.; SARAVANAN, RS. HE, Y. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Natural Protocols**. v. 1, p.76-774, 2006.

ISLAM, S. M. B.; HOSSAIN, M. K.; GOMES, I.; GOMES, D. J.; RAHMAN, S. R.; RAHMAN, M. S.; RASHID, M. A. Antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Bixa orellana* Linn. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 6, p. 1126–1134, 2011

JACOBS, D. I.; VAN DER HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Proteomics in plant biotechnology and secondary metabolism research. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 277–287, 2000.

JACQ, A., BURLAT, V.; JAMET, E. Plant Cell Wall Proteomics as a Strategy to Reveal Candidate Proteins Involved in Extracellular Lipid Metabolism. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 2, p. 190–199, 2017.

JAKO, C.; COUTU, C.; ROEWER, I.; REED, D. W.; PELCHER, L. E.; COVELLO, P. S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (*Bixaceae*) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163. N. 1, p. 141–145, 2002.

JONDIKO, I. J. O. & PATTENDEN A, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *B. orellana*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3159-3162, 1989.

JORRIN-NOVO, J. V.; KOMATSU, S.; SANCHEZ-LUCAS, R.; RODRÍGUEZ DE FRANCISCO, L. E. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! **Journal of Proteomics**, v. 198, p. 1–10, 2019.

KAPOOR, V. P.; KATIYAR, K.; PUSHPANGADAN, P.; SINGH, N. (2008). Development of natural dye based sindoor. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 7, n. 1, p. 22–29, 2008.

KAZUYUKI, K.; KAWAGOE, S.; KENSAKU, S.; SHOJIRO, S. Agent for changing color of skin, **JP Pat**, 1999.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues - A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Human Genetics**, v. 26, n. 3, p. 231–243, 1975.

KNIGHT, J. A. Diseases related to oxygen-derived free radicals. **Ann Clin Lab Sci** v. 25, p. 111-21, 1995.

KOLLER, A.; WASHBURN, M. P.; LANGE, B. M.; ANDON, N. L.; DECIU, C.; HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, 2002.

KOVARY, K. et al. Biochemical behavior of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 431, 2001.

LARANCE, M., & LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 269–280, 2015.

LI, Y. J.; WANG, F. X.; WANG, Y. Q.; LIU, Y. C.; ZHANG, X. Y.; SUN, Y. Q.; SUN, J. Identification of the proteins in green cotton fiber using a proteomics-based approach. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1519–1523, 2013.

LI, Y. J.; ZHANG, X. Y.; WANG, F. X.; YANG, C. L.; LIU, F.; XIA, G. X.; SUN, J. A comparative proteomic analysis provides insights into pigment biosynthesis in brown color fiber. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 374–388, 2013.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LOURO, R. P.; SANTIAGO, L. J. Development of carotenoid storage cells in *Bixa orellana* L. seed arils. **Protoplasma**, v. 253, n. 1, p. 77-86, 2016.

MANGANELLI, L. et al. Estudio etnobotánico del uso de *Bixa orellana* L. (achiote) por los agricultores del extremo sul de Bahía. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 23, n. 3, p. 1–11, 2018.

MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Avaliação de genótipos de urucum (*Bixa orellana* L.) por meio da caracterização morfológica de frutos, produtividade de sementes e teor de bixina. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 355–363, 2013.

MARTORELL, L. F. El Achiote o Bixa. El café de Nicaragua. v.1, p.17-18, 1975.

MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from annatto. **ACS Symposium Series**, v. 775, p. 92–101, 2001.

MERCADANTE, A. Z., & PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 193-196, 2001.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1050-1054, 1997.

MUHINDI FELIX, M. Challenges in technology transfer to small scale operators: the case of bixa farmers of Lamu County. Paper Presented to National Council for Science and Technology at the 2nd National Science, **Technology and Innovation Week**, 2013.

NAKANO, L. C. G. Considerações sobre o plantio e extração do urucum (*Bixa orellana* L.) e sua utilização como corante. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v. 2, n. 1, p. 33-39, 1998.

NAMITHA, K. K.; NEGI, P. S. (2010). Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50, 728–760.

NATARAJAN, S. et al. An efficient extraction method to enhance analysis of low abundant proteins from soybean seed. **Analytical Biochemistry**, v. 394, p. 259–268, 2009.

NATHAN, V. K.; RANI, M. E.; RATHINASAMY, G.; NARAYANAN DHIRAVIAM, K. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Natural Colouring Pigment Derived from *Bixa orellana* L. Seed Aril. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 137–143, 2017.

NATIVIDAD, L. R. & RAFAEL, R. R. Carotenoid Analyses and Antibacterial Assay of Annatto (*Bixa orellana* L.), Carrot (*Daucus carota* L.), Corn (*Zea mays* L.) and Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Extracts. **Research Journal of Recent Science**, v. 3, n. 3, p. 40-45, 2014.

NISAR, N., LI, L., LU, S., KHIN, N. C., & POGSON, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68–82.

O'FARRELL, P. H. High Resolution of Proteins Electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007–4021, 1975.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS, A. (2009). Agro forestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>). Acesso em: 23 de setembro de 2019

PAREDI, G.; RABONI, S.; MARCHESANI, F.; ORDOUDI, S. A., TSIMIDOU, M. Z., MOZZARELLI, A., & MCPHEE, D. J. Insight of saffron proteome by gel-electrophoresis. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1–12, 2016.

PARIMALAN, R., MAHENDRANATH, G., GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Abiotic Elicitor Mediated Augmentation of Annatto Pigment Production in Standing Crop of *Bixa orellana* L. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, n. 4, p. 229-236, 2011.

PAUMGARTTEN, F. et al. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p.1595-1601, 2002.

PFANDER, H. Carotenoids: An overview. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 15, n. 6, p. 32–33, 1992.

PILLAI, S.; SONI, S.; DHULAP, S.; HIRWANI, R. R. Pharmacological and cosmeceutical applications of *Bixa Orellana* L.: A review of the scientific and patent literature. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 9, n. 4, p. 281–289, 2018.

PINO, J. A., & CORREA M. T. Chemical Composition of the Essential Oil from Annatto (*Bixa orellana* L.) Seeds, **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 66-67, 2003.

PIROVANI, C. P.; CARVALHO, H. A. S.; MACHADO, R. C. R.; GOMES, D. S.; ALVIM, F. C.; POMELLA, A. W. V.; MICHELI, F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2391–2401, 2008.

PRETSON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and Chemistry of annatto. **Food Chemistry**. v. 5, p. 47-56, 1980.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

REITH, J. F., & GIELEN, J. W. Properties of Bixin and Norbixin and the Composition of Annatto Extracts. **Journal of Food Science**, v. 36, n. 6, p. 861–864, 1971.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R. M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 2, p. 165–172, 2006.

RIVIERA-MADRID, R.; AGUIAR-ESPINOSA, M.; CÁRDENAS-CONEJO, Y.; Garza-Caligaris, L. E. Carotenoid derivates in achiote (*Bixa orellana*) seeds: Synthesis and health promoting properties. **Frontiers in Plant Science**, p. 71–77, 2016.

RODRIGUES, S. M. et al. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**, v. 37, p. 220–224, 2007.

RODRÍGUEZ-ÁVILA, N. L.; NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; AGUILAR-ESPINOSA, M.; RIVERA-MADRID, R. Regulation of Pigment-Related Genes During Flower and Fruit Development of *Bixa orellana*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n. 1, p. 43–50, 2011.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; JAMES, J.G.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **Plant J**, v.39, p.715–733, 2004.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 4–12, 2001.

SANDMANN, G.; ROMER, S.; FRASER, P. D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 4, p. 291–302, 2006.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 519(1–2), 103–119, 2002.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA, R. P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 131–141, 2003.

SCOTTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food Coloring Formulations. 1. Determination of Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1031–1038, 1998.

SHILPI, J. A.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; UDDIN, S. J.; ALAM, M. S.; SADHU, S. K.; SEIDEL, V. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 264–271, 2006.

SIEGENTHALER, I. N.-H. and P.-A. Two-dimensional separation of chloroplast membrane proteins by isoelectric focusing and electrophoresis in sodium dodecyl sulphate, v. 468, p. 461–471, 1977.

SINHA, K., et al. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). Ind. **Crops Prod**, v. 41, p. 165–171, 2013.

SIVA, R.; FEBIN, P.D.; KUNDU, K.; SATYANARAYANA, V.S.V.; VIJAYA, K. Molecular characterization of bixin- an important industrial product. **Industrial Crops Production**, v. 32, p. 48–53, 2010.

SMITH, Annatto extracts chemical and technical assessment. **Chemical and Technical Assessment Manual**, p. 1–21, 2006.

SOARES, V. L. F.; RODRIGUES, S. M.; DE OLIVEIRA, T. M.; DE QUEIROZ, T. O.; LIMA, L. S.;HORA-JÚNIOR, B. T.; COSTA, M. G. C. Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 2, p. 1329–1340, 2011.

SOUMYA, V.; VENKATESH P.; HARI, P. K.; SHRISHAILAPPA, B. Microwave facilitated extraction of bixin from *Bixa orellana* and its in-vitro antioxidant activity. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, p. 479-485, 2010.

STOHS, S. J. Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 7, p. 956-960, 2014.

SUMATHI, P. & PARVATHI, A. Antibacterial potential of the aqueous and organic extracts of *Bixa Orellana* L. **Int J Pharma BioScience**, v. 2, n. 2, p. 193-202, 2011.

TAMIL, S.A.; DINESH, M.G.; SATYAN, R.S.; CHANDRASEKARAN, B.; ROSE, C. Leaf and seed extracts of *Bixa Orellana* L. Exert antimicrobial activity against bacterial pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 9, p. 116 120, 2011.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733-749, 2008.

TAY-AGBOZO, S.; STREET, S.; KISPERS, L. The carotenoid Bixin found to exhibit the highest measured carotenoid oxidation potential to date consistent with its practical protective use in cosmetics, drugs and food. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.186, p. 1-8, 2018.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J.; RIVERA-MADRID, R. The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote). **Planta**, v. 248, n. 2, p. 267-277, 2018.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; ZENG, S.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; RIVERA-MADRID, R.; DOBRÁNSZKI, J. *Bixa orellana* L. (achiote) tissue culture: a review. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, p. 231-241, 2019.

TELRANDHE, U.; SWATI L. N.; SUSHIL S.; BURLE, S. D.; SATISH B. K. (2016). Pharmacognostic and Phytochemical Investigation on Seed of *Bixa orellana* Linn, 2016.

VERLENGIA, R. et al. Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos. **Metodologia e Procedimentos Técnicos**. São Paulo: Santos, 261, 2013.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2369-2375, 2003.

WILDGRUBER, R.; HARDER, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W.; FEY, S. J.; GÖRG, A. Towards higher resolution: Two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 13, p. 2610-2616, 2000.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996.

WU, X.; GONG, F.; WANG, W. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. **Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 645–658, 2014.

YANG, D.; DU, X.; YANG, Z.; LIANG, Z.; GUO, Z.; LIU, Y. Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 456–466, 2014.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, 2005.

ZERRES, S.; STAHL, W. Carotenoids in human skin. **BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2019.