

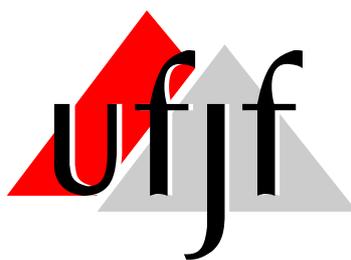
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Arthur Girardi Carpanez

**Análise das macromoléculas e origem do pigmento azul dos arilos de
Ravenala madagascariensis (Strelitziaceae).**

Juiz de Fora

2014



**Análise das macromoléculas e origem do pigmento azul dos arilos de
Ravenala madagascariensis (Strelitziaceae).**

Mestrando: Arthur Girardi Carpanez

Orientador: Prof. Dr. Richard Michael Grazul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Juiz de Fora
2014

Carpaneze, Arthur Girardi.

Análise das macromoléculas e origem do pigmento azul dos arilos de *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae). / Arthur Girardi Carpaneze. -- 2014.

81 p.

Orientador: Richard Michael Grazul

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. *Ravenala madagascariensis*. 2. Arilo. 3. Ficobilinas. 4. Proteínas. I. Grazul, Richard Michael, orient. II. Título.

Arthur Girardi CarpaneZ

**Análise das macromoléculas e origem do pigmento azul dos arilos de
Ravenala madagascariensis (Strelitziaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em 25 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Richard Michael Grazul - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Priscila Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. João Paulo Vieira Leite
Universidade Federal de Viçosa

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvana e Luiz Carlos, que sempre apoiam completamente minhas decisões desde que comecei a toma-las.

As minhas irmãs, Thársia e Thaís, pelo carinho e apoio durante estes anos de convivência e aprendizado.

A minha namorada, Isadora, que me incentivou e ajudou durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos e colegas de trabalho do NUPEQ e Laboratório de Estrutura e Função de proteínas que ajudaram de forma direta e indireta ao desenvolvimento deste projeto.

Ao professor, Richard, pela confiança em me aceitar como aluno de mestrado e dividir suas experiências profissionais e pessoais e por fim gostaria de agradecer aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e CAPES e a Universidade Federal de Juiz de Fora.

“pero se dejó llevar por su convicción de que los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga otra vez y muchas veces a parirse a sí mismos.”

Gabriel García Márquez, El amor en los tiempos del cólera.

RESUMO

A Strelitziaceae é uma família de monocotiledôneas pertencente a ordem Zingiberales que possui três gêneros: *Strelitzia* com cinco espécies na África meridional, *Ravenala* com uma única espécie em Madagascar e *Phenakospermum* com uma única espécie no norte da América do sul. A *Ravenala madagascariensis* produz um arilo fibroso de textura graxa e cor azul, que ao contrário da maioria dos tecidos vegetais não perdem a cor após morte celular. O que desperta o interesse do estudo dessa espécie do ponto de vista químico é (I) a raridade de pigmentos azuis nas plantas e (II) a maior estabilidade do pigmento comparado com as classes mais conhecidas como: os carotenóides, flavonóides, betalainas e clorofilas, o que torna este pigmento um atrativo candidato para o uso em cosméticos e na indústria alimentícia.

Neste trabalho descreve-se as tentativas de isolamento, purificação, análise e caracterização das macromoléculas naturais presentes na fração apolar e polar dos arilos da *R. madagascariensis*. Na fração apolar, identificou-se a presença de triglicerídeos, que corresponde a aproximadamente 70% dos arilos, através da análise por RMN de ^1H e espectroscopia no infravermelho. A identidade e proporção relativa dos ácidos graxos presentes foi determinado por GC-MS, cálculo do índice de Kováts e da comparação dos tempos de retenção com padrões sintetizados. Os quatro componentes principais, presente nesta fração, são os ácidos: palmítico (C16:0, 41%), esteárico (C18:0, 14%), oleico (C18:1 ω 9_{cis}, 34%) e linoleico (C18:2 ω 6, 7%). A análise da fração polar dos arilos sugere a presença de um cromóforo da classe das ficobilinas, tetrapirróis lineares, devido às absorções em 680 e 620nm no UV-Vis dos extratos de HOAc e SDS, respectivamente, e do resultado positivo para o ensaio de Ehrlich. A avaliação dos espectros de infravermelho e Raman indicam a presença de uma proteína, devido as absorções características de amida I, II e III e a ausência de absorções na região de 500 a 200 cm^{-1} no espectro Raman indica inexistência de um metal coordenado ao cromóforo. O perfil proteico obtido por eletroforese revela a presença de proteínas, com uma banda mais marcante na região de 48KDa, provavelmente envolvida no processo de formação da cor azul presente nos arilos da *R. madagascariensis*. As análises por RP-HPLC, nos diferentes comprimentos de onda, do extrato de SDS sugerem que o cromóforo é mantido por interações intermoleculares e não por ligações covalentes.

Palavras chave: *Ravenala madagascariensis*, arilo, ficobilinas, proteínas.

ABSTRACT

The *Strelitziaceae* is a family of monocotyledons belonging to the order Zingiberales which contains three genera: *Strelitzia* with five species in meridional África, *Ravenala* with a single specie in Madagascar and *Phenakospermum* with a single specie in the Northern regions of South America. *Ravenala madagascariensis* produces a fibrous aril with a waxy texture and blue coloration, which, contrary to the majority of plant tissues, does not lose its color after cell death. What is interesting from a chemical point of view is: I) the rarity of blue pigments in the plant kingdom and II) its stability is greater than other common classes of naturally occurring plant pigments such as carotenoids, betalains and chlorophyls which make it an attractive candidate as a pigment for use in food and cosmetics.

The current work describes attempts to isolate, purify, analyze and characterize naturally occurring macromolecules present in the non-polar and polar fractions of the seed arils of *R. madagascariensis*. In the non-polar fraction, which comprises approximately 70% of the arils, the prescence of triacylglycerides was confirmed by ¹H NMR and infrared spectroscopies. The identities and relative proportions of the fatty acids present were determined by GC-MS, calculation of their Kováts indices and by comparison to authenic reference standards after conversion to their methyl esters by transesterification. The four principal compounds encountered were: palmitic (C16:0, 41%), stearic (C18:0, 14%), oleic (C18:1 ω₉cis, 34%) and linoleic (C18:2 ω₆, 7%) acids. Analysis of the polar fraction of the arils suggests the presence of a chromophore related to the phycobilins, a class of tetrapyrrole pigments, due to absorptions at 680 and 620nm in the UV-Vis of the HOAc and SDS extracts respectively, and a positive result to the Ehrlich test. Examination of the infrared and Raman spectra indicate the presence of a protein, due to absorptions characteristic of amide I, II and III bands in the infrared, while the absence of absorptions in the region between 500 and 200cm⁻¹ in the Raman spectra would indicate the absence of a metal coordinated to the chromophore.. The protein profile obtained by gel electrophoresis strongly suggests the presence of a protein with a mass of aproximately 48KDa, which possesses a chromophore responsible for the blue color observed in the arils of *R. madagascariensis*. Analysis by RP-HPLC at various wavelengths of the SDS extracts suggest that the chromophore is held in place by intermolecular interactions as opposed to covalent bonding.

Keywords: *Ravenala madagascariensis*, aril, phycobilins, proteins.

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SMBOLOS

HOAc – cido acético glacial

SDS – Dodecil sulfato de sdio

RP-HPLC – Reversed phase high performance liquid chromatography

HPLC – High performance liquid chromatography

RMN – Ressonncia magntica nuclear

TLC – Thin layer chromatography

Trp – Triptofano

Phe – Fenilalanina

GC-MS - Gas chromatography mass spectrometry

BSA – Bovine serum albumin

APG II - Angiosperm Phylogeny Group

UV-Vis – Ultravioleta visível

NIST08 - National Institute of Standards and Technology, 2008

EXPASY - Expert Protein Analysis System

MALDI – Ionizao e Dessoro a Laser assistida por matriz

THF – Tetrahidrofurano

EtOH – Etanol

MeOH – Metanol

ACN – Acetonitrila

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

TCA – cido tricloroacético

Brij[®]35 - Polioxietilenoglicol dodecil ter

H₂O_{dd} – gua deionizada

DMAC - Dimetilacetamida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da família Strelitziaceae no mundo. Adaptado de http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/zingiberalesweb.htm	1
Figura 2 - Morfologia vegetativa da <i>Ravenala madagascariensis</i> . Sementes envoltas pelos arilos azul. Adaptado de “Pollination of <i>Ravenala madagascariensis</i> (Strelitziaceae) by Lemurs in Madagascar: Evidence for an Archaic Coevolutionary System.”	2
Figura 3 - Regiões do espectro eletromagnético e decomposição da luz branca gerando o espectro de cores. A cor vermelha apresenta o mais longo dos comprimentos de onda 700nm, e a cor violeta o mais curto 400nm.....	4
Figura 4 - Exemplo de nano-agregados, cada nanoestrutura é geralmente chamada de “irideosomo”	6
Figura 5 - Fluxograma para obtenção dos triglicerídeos presentes nos arilos.....	11
Figura 6 - Esquema de obtenção dos ésteres metílicos a partir dos triglicerídeos presentes nos arilos.....	11
Figura 7 - Esquema de síntese dos ésteres metílicos a partir dos ácidos graxos puros. .	12
Figura 8 - Fluxograma de obtenção das amostras para análise por HPLC e eletroforese.	15
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H , na faixa de 0 a 8ppm, da fração hexânica dos arilos.	18
Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H na faixa de 3,8 a 5,8 ppm. Sinais referentes aos prótons A e B do triglicerídeo.	19
Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas do extrato hexânico dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Modo de injeção split, com uma taxa de split 1:10, volume de injeção de 1 μL , fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C.	19
Figura 12 - Espectro de massas do palmitato de metila. Em destaque as principais perdas de massa.....	20
Figura 13 - Mecanismo para o rearranjo de MacLafferty.	20
Figura 14 - Espectro de massas do oleato de metila. Em destaque as principais perdas de massas.....	21
Figura 15 - Mecanismos para a perda de metanol.	21
Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas do padrão de ésteres metílicos. Modo de injeção split, com uma taxa de split 1:10, volume de injeção de 1 μL , fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C.....	22
Figura 17 - Processo de conversão do isômero cis para o isômero trans, que ocorre no meio reacional.....	23

Figura 18 - Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos C6-C26, C28 e C30. Modo de injeção split, com uma taxa de split 1:10, volume de injeção de 1µL, fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C.	24
Figura 19 - Espectro no ultravioleta, na faixa de 200 a 800nm, da suspensão dos arilos em acetonitrila.	26
Figura 20- Espectro no ultravioleta do extrato de HOAc com tempo de extração 10 e 60min.	28
Figura 21 - Imagem de microscopia confocal da epiderme dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Os pontos azuis dentro das células indicam a marcação do núcleo.	29
Figura 22 - Espectro no ultravioleta do extrato de HOAc novo e velho.	30
Figura 23 - Espectro no infravermelho do arilo bruto da <i>R. madagascariensis</i>	32
Figura 24 - Espectro no infravermelho do arilo sem cera da <i>R. madagascariensis</i>	33
Figura 25 - Espectro no infravermelho dos arilos da <i>S. nicolai</i> e da <i>R. madagascariensis</i> . Estrutura da bilirrubina.	34
Figura 26 - Espectro Raman do arilo da <i>R. madagascariensis</i> com cera e sem cera.	35
Figura 27 - Reação entre o reagente de Ehrlich e um pirrol genérico formando o composto de cor vermelha que indica um resultado positivo para o teste.	36
Figura 28 - Espectro no ultravioleta do ensaio de Ehrlich com o extrato de HOAc do arilo da <i>R. madagascariensis</i>	37
Figura 29- Formação do composto de Ruhemann que possui coloração púrpura.	38
Figura 30- TLC do hidrolisado de proteínas das amostras de <i>R. madagascariensis</i> , albumina de soro bovino e <i>S. nicolai</i>	39
Figura 31 - Ruptura de membrana lipídica e extração de uma proteína de membrana através do uso de um surfactante aniônico, no caso SDS.	40
Figura 32- Espectro no ultravioleta do extrato dos arilos em SDS 2%.	40
Figura 33 - Curva analítica para doseamento de proteínas usando o método de Lowry.	42
Figura 34 - Espectro no ultravioleta na faixa de 200 a 800nm. Extratos de ácido acético bruto e o sobrenadante após a precipitação das proteínas.	43
Figura 35 - Espectro no ultravioleta na faixa de 200 a 800nm. Extratos de dodecilsulfonato de sódio bruto e sobrenadante após a precipitação das proteínas.	43
Figura 36 - Estrutura química da bilirrubina e da ficocianobilina.	44
Figura 37 - Interação de uma proteína/peptídeo com a fase reversa da coluna de RP-HPLC.	45
Figura 38- Representação dos grupos cromóforos responsáveis pela absorção em 190 e 280nm.	46
Figura 39- Cromatograma do extrato de SDS bruto e sobrenadante dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases móveis água 0,1%	

ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm.	46
Figura 40- Cromatograma do extrato de SDS bruto e precipitado de proteínas dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm.	47
Figura 41- Cromatograma do extrato de SDS bruto dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm e 600nm.	48
Figura 42- Cromatograma do extrato de SDS precipitado dos arilos da <i>R. madagascariensis</i> . Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm e 600nm.	49
Figura 43 - Esquema de uma eletroforese em gel de poliacrilamida.....	50
Figura 44 -Separação por tamanho de macromoléculas em um gel de poliacrilamida. O complexo de proteínas-SDS que é carregado negativamente migra em direção ao ânodo (carregado positivamente) e os poros do gel faz com que ocorra uma separação das moléculas.	51
Figura 45 - Espécie neutra ligando-se à proteína tanto por interações hidrofóbicas (Phe, Trp) como por atrações eletrostáticas (grupo sulfônico interagindo com os nitrogênios carregados).....	52
Figura 46 - A espécie aniônica liga-se às proteínas principalmente através das interações eletrostáticas (grupo sulfônico interagindo com os nitrogênios carregados).	53
Figura 47 - A espécie catiônica não forma um complexo com a proteína pois sua absorbância não muda (470nm).....	53
Figura 48 - Perfil eletroforético dos extratos de dodecilsulfonato de sódio em um gel de poliacrilamida 10%. Voltagem aplicada de 100V durante o período de 1h25min. Comparação das bandas obtidas com um padrão de peso molecular (PM).....	55
Figura 49 - Curva analítica utilizada no cálculo da massa molecular dos compostos separados por eletroforese em gel.....	56
Figura 50 - Perfil eletroforético dos extratos de dodecilsulfonato de sódio em um gel de poliacrilamida 15%. Voltagem aplicada de 100V durante o período de 3h. Comparação das bandas obtidas com um padrão de peso molecular (PM) e um padrão de albumina de soro bovino BSA (63KDa).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absorbância e cores complementares.	5
Tabela 2 - Programação do forno do GC-MS.....	9
Tabela 3 - Solventes testados para extração da cor azul presente no arilo.	12
Tabela 4 - Soluções testadas para a extração da cor azul presente no arilo.....	13
Tabela 5 - Enzimas testadas para a extração da cor azul presente no arilo.	14
Tabela 6 - Amostras analisadas com o reagente de Ehrlich.	14
Tabela 7 - Curva analítica para doseamento de proteínas totais.....	16
Tabela 8 - Preparo das amostras para doseamento.	16
Tabela 9 - Surfactantes usados na tentativa de extração.....	17
Tabela 10 – Principais componentes da fração hexânica dos arilos da <i>R. madagascariensis</i>	24
Tabela 11 - Identificação dos principais ácidos graxos saturados, moinsaturados e polinsaturados obtidos pela fração hexânica dos arilos da <i>R. madagascariensis</i>	24
Tabela 12 - Influência do pH sobre os arilos e sementes.	25
Tabela 13 - Solventes testados para extração da cor azul presente no arilo.	26
Tabela 14 - Soluções testadas para a extração da cor azul presente no arilo.....	27
Tabela 15 - Enzimas testadas para extração do pigmento azul	31
Tabela 16 - Resultado do teste de Ehrlich.	37
Tabela 17 - Amostras analisadas para obtenção do perfil proteico dos arilos.....	42
Tabela 18 - Amostras para eletroforese	54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	<i>RAVENALA MADAGASCARIENSIS</i> (STRELITZIACEAE).....	1
1.2.	INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA.....	3
1.2.1.	Interação da luz com a matéria, um fenômeno químico.....	4
1.2.2.	Interação da luz com a matéria, um fenômeno físico.....	5
2.	JUSTIFICATIVA.....	7
3.	OBJETIVOS.....	8
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	9
4.1.	EQUIPAMENTOS.....	9
4.2.	MATERIAL VEGETAL.....	10
4.3.	OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO.....	10
4.4.	DERIVATIZAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO.....	11
4.5.	SÍNTESE DOS PADRÕES DOS ÉSTERES METÁLICOS.....	12
4.6.	TENTATIVAS DE EXTRAÇÃO DO PIGMENTO AZUL DOS ARILOS.....	12
4.7.	TRATAMENTO DOS ARILOS COM ENZIMAS.....	13
4.8.	TESTE DE EHRLICH.....	14
4.9.	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE E HPLC.....	14
4.10.	SOLUÇÕES EMPREGADAS NO MÉTODO DE LOWRY.....	15
4.11.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, MÉTODO DE LOWRY....	16
4.12.	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA TLC.....	16
4.13.	EXTRAÇÃO DO PIGMENTO COM SURFACTANTES.....	17
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1.	ANÁLISE DOS TRIGLICERÍDEOS PRESENTES NOS ARILOS.....	18
5.2.	INFLUÊNCIA DO PH NA EXTRAÇÃO DO PIGMENTO AZUL CONTIDO NOS ARILOS.....	25
5.3.	TENTATIVAS DE EXTRAÇÃO DA COR AZUL PRESENTE NOS ARILOS. 25	
5.4.	TRATAMENTO DOS ARILOS COM ENZIMAS.....	30
5.5.	ESTUDO DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS ARILOS.....	31
5.5.1.	Infravermelho.....	32
5.5.2.	Raman.....	34

5.6.	TESTE DE EHRLICH	36
5.7.	ANÁLISE DOS ARILOS POR TLC.	37
5.8.	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS COM AGENTES SURFACTANTES.....	39
5.9.	ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DOS ARILOS.....	41
5.9.1.	Preparo das amostras e doseamento das proteínas totais.....	41
5.9.2.	Perfil proteico das amostras por RP-HPLC.	45
5.9.3.	Perfil proteico das amostras por eletroforese.....	49
6.	CONCLUSÕES	58
	APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E ARTIGOS PUBLICADOS.....	60
	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. *RAVENALA MADAGASCARIENSIS* (STRELITZIACEAE).

A Strelitziaceae é uma família de monocotiledôneas pertencente a ordem Zingiberales (Kress, 1990). Suas plantas são muito semelhantes em aparência e habitat de crescimento com outros membros de famílias relacionadas, como a Musaceae (família da banana). Estas famílias compartilham características como folhas largas, dispostas verticalmente, com nervação transversal e inflorescências coloridas (Cron *et al.*, 2012). Devido a estas semelhanças a família Strelitziaceae foi incluída na Musaceae por algum tempo (Weberling, 1989), contudo em classificações recentes, como APG II, a Strelitziaceae foi reconhecida como uma família separada (The Angiosperm Phylogeny, 2009). Hoje a *Ravenala madagascariensis* é considerada como única espécie do seu gênero, entretanto estudos apontam a presença de pelo menos quatro variações que podem ser distinguidas de acordo com suas características macro morfológicas, habitat de crescimento e pela preferencias de habitat, que futuramente podem receber o título de espécie (P. Blanc, 2003).

A família Strelitziaceae inclui três gêneros e todos ocorrem em regiões tropicais ou subtropicais: *Strelitzia* com cinco espécies na África meridional, *Ravenala* com uma única espécie em Madagascar e *Phenakospermum* com uma única espécie América do sul (Cron *et al.*, 2012). Tal família é caracterizada por um caule lenhoso; brácteas, folhas modificadas que estão associadas com estruturas reprodutivas; coriáceas, em forma de barco envolvendo as flores; e uma capsula lenhosa loculicida contendo sementes envoltas por arilos coloridos (Scott-Elliot, 1890).

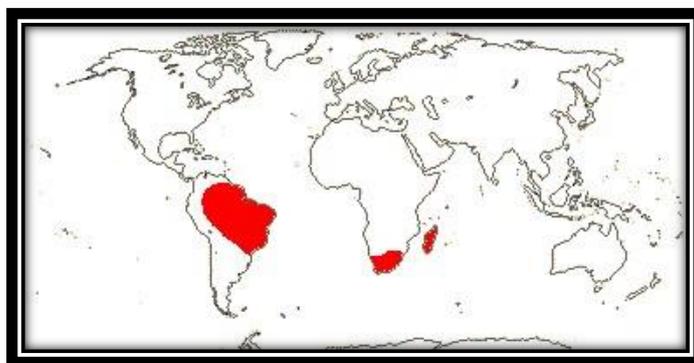


Figura 1 - Distribuição geográfica da família Strelitziaceae no mundo. Adaptado de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/zingiberalesweb.htm>.

A *R. madagascariensis* é uma planta nativa de Madagascar amplamente cultivada nos trópicos como uma planta ornamental. No Brasil após ser importada como uma espécie ornamental, difundiu-se como espécie espontânea e encontra-se atualmente bem inserida e adaptada na região sudeste. Ela também é conhecida como árvore do viajante, devido ao fato de ser um reservatório natural de água, uma vez que suas hastes crescem próximas, gerando assim uma cápsula onde a água armazenada era utilizada pelos viajantes (Feeley-Harnik, 2001). No século XVIII, Pierre Sonnerat completou a identificação da *R. madagascariensis*. Esta planta possui um conjunto de características morfológicas marcantes, como o tronco parecido com o de uma palmeira e as folhas parecidas com as de uma bananeira, mas dispostas verticalmente. Já suas sementes, apresentam um arilo fibroso de textura graxa e cor azul (Feeley-Harnik, 2001).

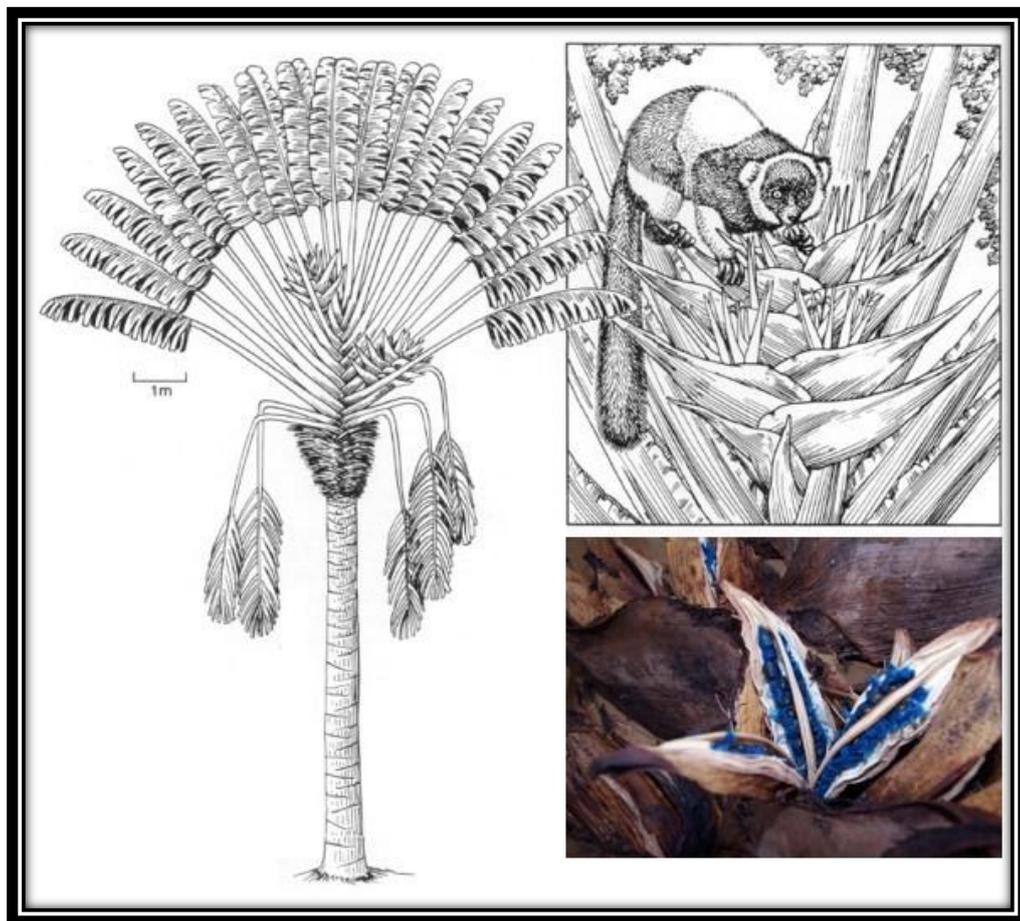


Figura 2 - Morfologia vegetativa da *Ravenala madagascariensis*. Sementes envoltas pelos arilos azul. Adaptado de “Pollination of *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae) by Lemurs in Madagascar: Evidence for an Archaic Coevolutionary System.”

O termo arilo refere-se a estruturas que estão cobrindo ou ligadas à semente e se desenvolvem a partir, ou próximo do funículo do óvulo e muitas vezes esta estrutura é

colorida e carnuda (Endress, 1973). Sua função é de atração dos animais polinizadores que ao comerem os arilos acabam dispersando a semente (C. Marshall, 2008). No caso da *R. madagascariensis*, os mamíferos não voadores responsáveis pela polinização são os lêmures (W. John Kress, 1994).

Em 1661, Flacourt descreveu muitos usos das várias partes da *R. madagascariensis*, tendo como foco o uso da semente, em especial o arilo azul, para a produção de óleo. O interesse pelos arilos permanece até os dias atuais uma vez que 6 patentes recentes abordam a produção de cosméticos a partir dos mesmos (Andre e Garcia, 2009; 2011b; a; Renimel e Andre, 2011; Florence *et al.*, 2012). A função descrita para os arilos nestas composições, como: cremes, bases, etc., é de promover a coloração azul.

O que torna os arilos de *R. madagascariensis* interessantes, no ponto de vista químico, é que, ao contrário da maioria dos tecidos vegetais que perdem a cor após morte celular, estes conseguem manter-se azuis por mais de 40 anos (Pirone, 2010), o que torna as propriedades química destes compostos incomuns, não correspondendo àquelas comumente encontradas nas classes mais conhecidas de pigmentos, como os carotenóides, flavonóides, betalainas e clorofilas (Williams *et al.*, 1981; Mantoura e Llewellyn, 1983; Stintzing e Carle, 2004).

1.2. INTERAÇÃO DA LUZ COM A MATÉRIA.

A luz desloca-se no espaço por meio de ondas eletromagnéticas e o espectro eletromagnético cobre uma enorme faixa de energias e, portanto, de comprimentos de onda. A parte do espectro referente ao visível, que nossos olhos respondem, é apenas uma fração do mesmo e compreende a faixa de 380 – 780nm (Skoog, 2006). Quando um feixe de luz solar passa por um prisma ele pode ser decomposto em diferentes frequências gerando assim o espectro de cores: violeta, índigo (ciano), azul, verde, amarelo, laranja, vermelho, sendo que cada banda colorida apresenta um comprimento de onda específico na região do visível.

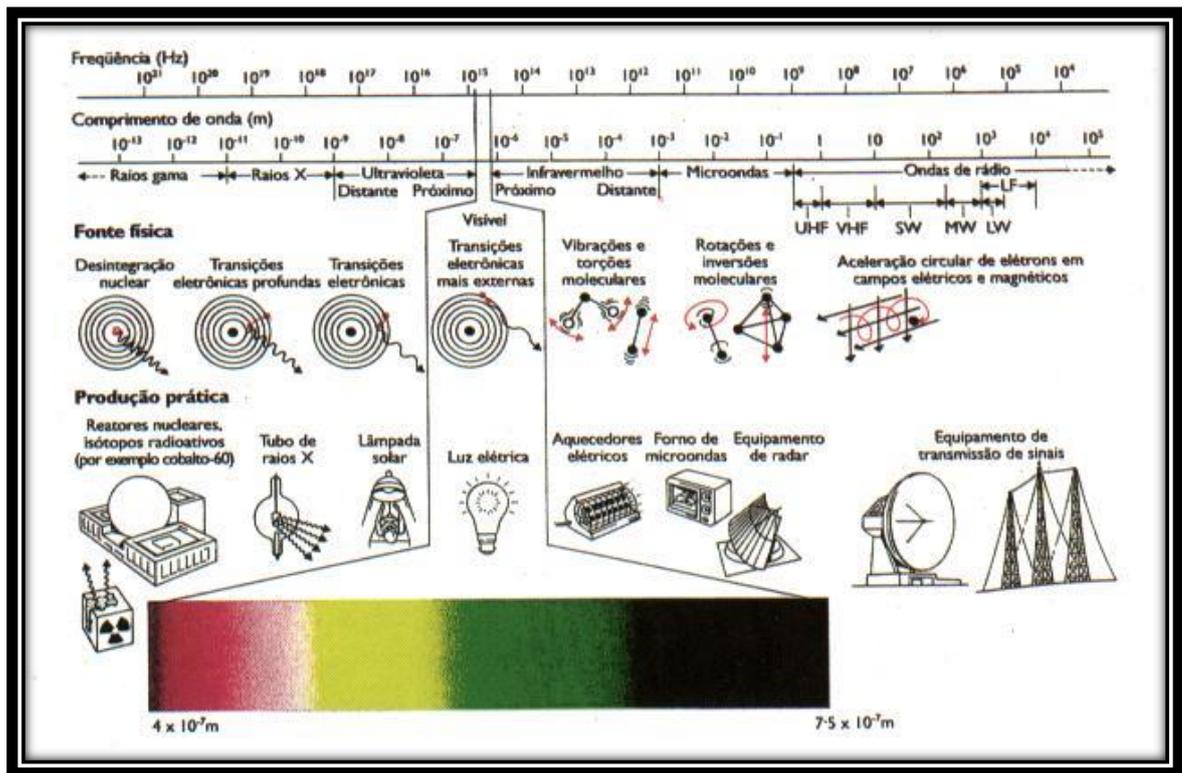


Figura 3 - Regiões do espectro eletromagnético e decomposição da luz branca gerando o espectro de cores. A cor vermelha apresenta o mais longo dos comprimentos de onda 700m, e a cor violeta o mais curto 400nm.

A produção de cores em objetos pode ser compreendida por dois processos distintos. O primeiro e mais comum é o processo de absorção da luz (fenômeno químico) e o segundo processo é o de interferência ondulatória (fenômeno físico) (Andre e Garcia, 2011a).

1.2.1. Interação da luz com a matéria, um fenômeno químico.

A absorção ou emissão da luz visível está relacionado com as transições entre os níveis de energia dos elétrons de valência, em orbitais atômicos ou moleculares. A energia e consequentemente o comprimento de onda da luz estão associados à diferença de energia entre as transições. Dessa forma, na geração das cores através de um processo químico, a absorção de componentes da luz visível pelo objeto dependerá da estrutura do cromóforo presente no mesmo. A cor observada no objeto será a complementar ao comprimento de onda absorvido pelo cromóforo (Skoog, 2006). Como ilustrado na tabela número 01.

Tabela 1 - Absorbância e cores complementares.

Comprimento de onda (nm)	Cor Absorvida	Cor Observada
650 – 780	Vermelho	Verde azulado
595 – 650	Laranja	Azul esverdeado
560 – 595	Amarelo – Verde	Violeta
500 – 560	Verde	Violeta – Vermelho
490 – 500	Verde azulado	Vermelho
480 – 490	Azul esverdeado	Laranja
435 – 480	Azul	Amarelo
380 – 435	Violeta	Amarelo – Verde

Pode-se perceber que quanto menor for o comprimento de onda absorvido por um cromóforo a cor observada tenderá para o azul e quanto maior for o comprimento de onda absorvido por um cromóforo a cor observada tenderá para o vermelho.

1.2.2. Interação da luz com a matéria, um fenômeno físico.

Na geração da cor por um processo físico não se observa uma relação com o processo de absorção da luz por um cromóforo, mas sim um fenômeno de interferência ondulatória (Mason, 1922). As cores geradas por este método são denominadas “cores estruturais” (Parker e Martini, 2006). Este fenômeno foi observado pela primeira vez pelos cientistas Robert Hooke e Isaac Newton e o princípio da interferência ondulatória foi explicado um século depois pelo cientista Thomas Young.

Iridescência é o nome dado a cor formada por este fenômeno óptico, caracterizado pela mudança de tonalidade de superfícies em função do ângulo de visão e de incidência da luz (Kinoshita e Yoshioka, 2005). A cor iridescente é produzida por múltiplas reflexões da luz em uma superfície constituída por várias camadas semitransparentes, nanoestruturas muito regulares (Sato *et al.*, 2008). Estas camadas, também chamadas de irideosomos, amplificam ou atenuam mais umas frequências do que outras e, conseqüentemente, o comprimento de onda dos componentes da luz visível (Andre e Garcia, 2011a; Vignolini *et al.*, 2012).

Através do mesmo fenômeno óptico, também são formadas as cores não iridescentes, que apesar de serem geradas por interferências ondulatórias, não se observa a mudança de tonalidade na cor, pois as camadas nano estruturadas se encontram dispostas aleatoriamente (Shawkey e Hill, 2006).

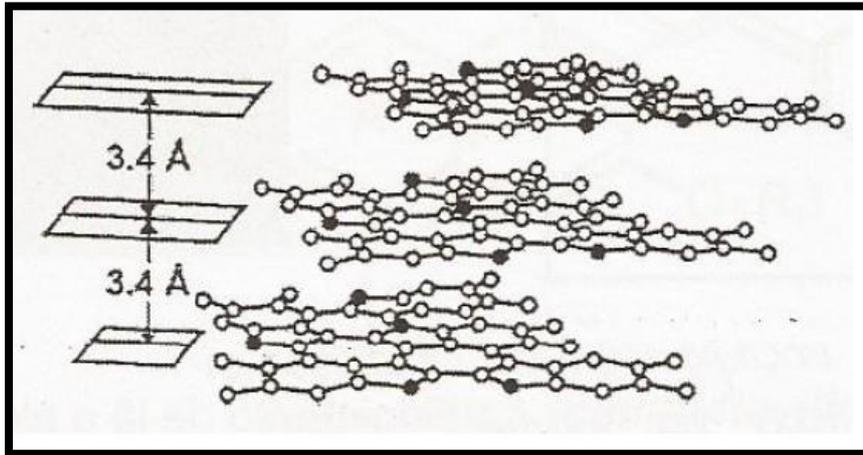


Figura 4 - Exemplo de nano-agregados, cada nanoestrutura é geralmente chamada de “irideosomo”.

2. JUSTIFICATIVA

A busca por corantes naturais tem aumentado fortemente nas últimas décadas, e o mercado de corantes apresenta um crescimento de mais de um bilhão de dólares por ano (Newsome *et al.*, 2013). Dos corantes naturais aprovados para uso, temos as cores vermelha, roxo (por ex. as betalainas e antocianinas), laranja e amarelo (por ex. os carotenos, bixinas e curcumina), entretanto falta-se cores como azul (Francis, 1989). Os pigmentos azuis são em sua maioria produzidos por plantas e microrganismos. Esta cor é de ocorrência relativamente rara na natureza (Mao, D.-J. Z., Ya-Ling, 2011). A *R. madagascariensis* por apresentar um arilo de coloração azul, que ao contrário da maioria dos tecidos vegetais, não perde a cor após a morte celular, e possuir propriedades químicas incomuns as classes de compostos comumente encontradas no reino vegetal como carotenoides, betalainas, flavonoides e clorofilas, a *R. madagascariensis* torna-se uma candidata atrativa para o uso como corante nas indústrias de alimentos ou cosméticos.

Desta forma, este projeto apresenta como motivação a busca por uma nova fonte natural de um corante azul que seja estável e de possível utilização no mercado de alimentos e cosméticos, visto que esta classe de compostos naturais é extremamente rara e custosa (Mao, D. Z., Yaling, 2011).

3. OBJETIVOS

Este projeto apresenta como objetivos o isolamento, purificação e análise das macromoléculas presentes no arilo da *R. madagascariensis*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. EQUIPAMENTOS

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Alpha, na região compreendida entre 4000-400 cm^{-1} . Utilizou-se como matriz pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos com uma média de 64 varreduras e uma resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Os espectros na região do UV-Visível foram obtidos no aparelho Spectrophotometer-UV-1800-Shimadzu na faixa de 200 a 800nm.

As análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas foram realizadas em um GCMS-QP2010Plus-Shimadzu acoplado com um auto injetor AOC-5000, com uma coluna Rtx[®]-5ms (Crossband[®] 5% difenil 95% polisiloxano). Usou-se hélio como gás de arraste. As condições empregadas para análise foram: modo split, com uma taxa de split 1:10, volume de injeção de 1 μL , fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C. A programação do forno foi realizada da seguinte forma:

Tabela 2 - Programação do forno do GC-MS.

Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)	Espera (min)
	80	3
5	150	6
5	230	5
15	300	5

O detector de massas foi programado para analisar massas na faixa de 40 a 700 unidades de massa atômica e a fonte de ionização foi o impacto de elétrons a 70eV.

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro FT-Raman da Bruker com radiação excitante em 1064nm modelo RFS-100 equipado com detector de germânio e resfriado com nitrogênio líquido.

As análises por eletroforese em gel foram realizadas em um Mini Protean III, BioRad e as amostras aplicadas em um gel de poliacrilamida a 10% ou 15% com 0,1% de dodecil sulfonato de sódio, SDS.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram desenvolvidas em um HPLC Agilent 1100 Series, equipado com o software Agilent Chemstation LC Systems, empregando uma coluna de fase reversa C18Inertsil ODS 3 (4,6 mm x 150,0 mm, 5µm), coluna de guarda Inertsil ODS 3 (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm), injetor manual com alça de amostragem de 20µL e detector fotométrico na região do UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas (MWD). Monitorou-se os canais 214, 260, 280, 600nm.

As análises de microscopia confocal foram realizadas em um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (TCS SP5, Leica, Alemanha) com excitação por um Laser de Diodo na faixa de 405 nm. A autofluorescência da parede celular foi detectada na faixa de emissão entre 440 e 480 nm. As imagens foram processadas por meio do software Leica Application Suite (LAS 260).

Todas as análises foram realizadas nas dependências da Universidade Federal de Juiz de Fora, no Instituto de Ciências Exatas (ICE) ou no Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

4.2. MATERIAL VEGETAL

A coleta das sementes da *R. madagascariensis* foi realizada no bairro Aeroporto na cidade Juiz de Fora, MG em setembro de 2012. Uma exsicata da planta foi enviada para o herbário, número do depósito CESJ 63816 e identificada pela Profa. Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora. As sementes da *S. nicolai* foram coletadas no mesmo endereço, em setembro de 2012.

4.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO

O método de extração escolhido para obtenção da cera presente nos arilos foi a extração com um solvente apolar, mais especificamente *n*-hexano destilado. Desta forma, 1,378g dos arilos brutos foram transferidos para um béquer e adicionou-se 30mL de *n*-hexano destilado. Após 24h, os 30mL foram transferidos para um balão de fundo redondo e adicionou-se mais 30mL de *n*-hexano destilado aos arilos. Este procedimento foi

repetido três vezes. O *n*-hexano destilado contendo a cera foi evaporado em um evaporador rotatório com pressão reduzida a uma temperatura de 40°C.

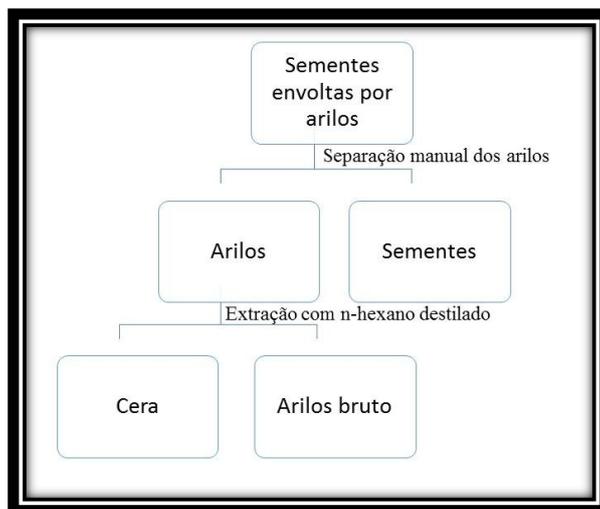


Figura 5 - Fluxograma para obtenção dos triglicerídeos presentes nos arilos. A porcentagem massa/massa de cera nos arilos é de 70%

4.4. DERIVATIZAÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO.

Em um tubo de ensaio contendo aproximadamente 50mg da fração hexânica obtida previamente, foi adicionado uma solução de KOH 0,5 mol L⁻¹, em metanol. Agitou-se vigorosamente o tubo e aqueceu-o em água fervente por 10min. Após resfriamento adicionou-se 5mL da solução de esterificação (2g NH₄Cl, 60mL de MeOH, 3mL de H₂SO₄), agitou-se novamente o tubo e aqueceu-o em seguida. Por fim, adicionou-se 4mL de uma solução salina e fez-se uma extração com *n*-hexano destilado (Garcia, 2006).

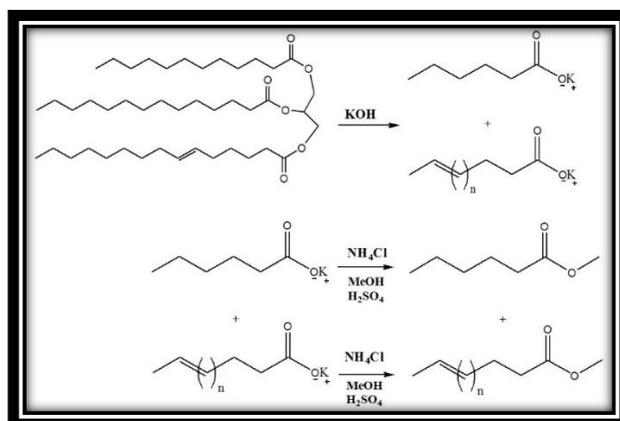


Figura 6 - Esquema de obtenção dos ésteres metílicos a partir dos triglicerídeos presentes nos arilos.

4.5. SÍNTESE DOS PADRÕES DOS ÉSTERES METÍLICOS.

Os ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) foram derivatizados na forma dos seus ésteres metílicos. Em um balão de fundo redondo contendo 10mL de metanol foi adicionado 0,200g de cada um dos ácidos graxos e quantidade catalítica de ácido sulfúrico. A solução permaneceu sob agitação e refluxo por 4h e em seguida foi submetida a uma extração líquido-líquido utilizando-se os solventes éter de petróleo e água. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida obtendo-se assim os ésteres metílicos de cada ácido graxo.

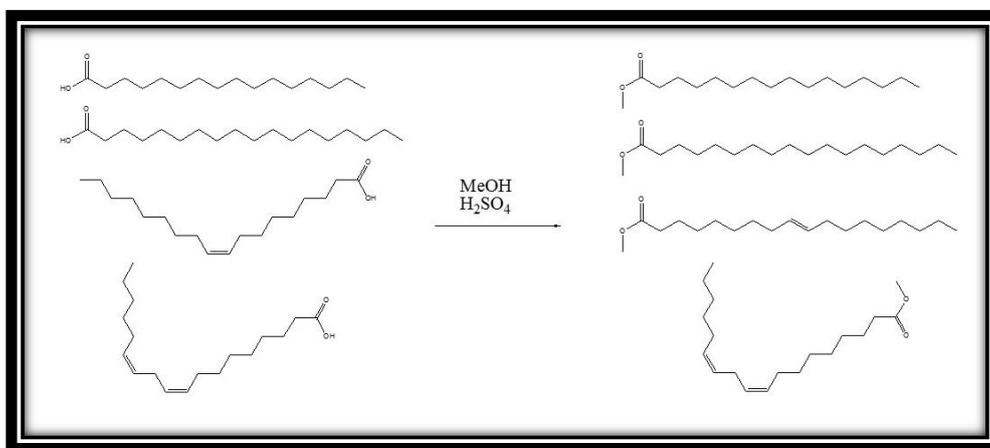


Figura 7 - Esquema de síntese dos ésteres metílicos a partir dos ácidos graxos puros.

4.6. TENTATIVAS DE EXTRAÇÃO DO PIGMENTO AZUL DOS ARILOS.

Para a extração do pigmento azul, 10mg dos arilos sem cera foram adicionados a 1mL de uma solução e de um solvente de escolha, especificados na tabela abaixo. Em alguns casos as tentativas de extração foram feitas através de um banho ultrassônico de potência 100W e frequência 40KHz, em outros aqueceu-se em banho maria a 80°C.

Tabela 3 - Solventes testados para extração da cor azul presente no arilo.

Solvente	Ultrassom	Aquecimento
Éter	Sim	Sim
Acetona	Sim	Sim
THF	Sim	Sim
CHCl ₃	Sim	Sim

Acetato de Etila	Sim	Sim
EtOH	Sim	Sim
CH ₃ NO ₂	Sim	Sim
ACN	Sim	Sim
MeOH	Sim	Sim
DMF	Sim	Sim
DMSO	Sim	Sim
H ₂ O	Sim	Sim
Glicerina	Sim	Sim
DMAC	Sim	Sim
TCA 10%	Sim	Sim
HOAc quente	Sim	Sim
Ácido Fórmico	Sim	Sim

Tabela 4 - Soluções testadas para a extração da cor azul presente no arilo.

Solução	Ultrassom	Aquecimento
Ácido Cítrico 10%	Sim	Sim
Ácido. Ascórbico 10%	Sim	Sim
FeSO ₄ 10%	Sim	Sim
Bissulfito de sódio 10%	Sim	Sim

4.7. TRATAMENTO DOS ARILOS COM ENZIMAS.

Na tentativa de liberar o pigmento azul do arilo, usou-se uma série de enzimas de diferentes classes. Em um tubo de ensaio com 2mL do tampão apropriado, colocou-se 0,5mL de cada enzima e estas foram mantidas a uma temperatura de no máximo 40°C em um banho maria durante aproximadamente 48 horas.

Tabela 5 - Enzimas testadas para a extração da cor azul presente no arilo.

Enzima	Classe	Tampão
Termamyl 120-L [®]	α -amilase	H ₂ O
Citrozym Ultra L [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻
Ultrazym AFPL [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻
Serva R-10 [®]	Pectinase	Citrato
Novozym 33095 [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻
Cellubrix L [®]	Celulase	HOAc/OAc ⁻
Pectinex Ultra SP_L [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻

4.8. TESTE DE EHRLICH.

Em tubos de ensaio colocou-se os extratos de ácido acético da *R. madagascariensis* e de clorofórmio da *S. nicolai*. Adicionou-se de 3 a 5 gotas do reativo de Ehrlich (200mg de *p*-dimetilaminobenzaldeído em 5,00mL de etanol 95% e 5,00mL de ácido clorídrico concentrado) e aqueceu-se os tubos em banho maria a 60°C.

Tabela 6 - Amostras analisadas com o reagente de Ehrlich.

Planta	Parte	Extrato de	Cor do extrato
<i>R. madagascariensis</i>	Arilos	HOAc	Azul
<i>S. nicolai</i>	Arilos	CHCl ₃	Laranja

4.9. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ELETROFORESE E HPLC.

Os extratos de SDS 2% (33,2mg em 1,5mL) e HOAc (32,5mg em 1,5mL), obtidos através da exposição a um banho ultrassônico e a um banho maria respectivamente, foram filtrados para a separação das fibras e aliqüotados (2x500 μ L). A uma destas aliqüotas adicionou-se acetona (5°C) para forçar a precipitação das proteínas. O fluxograma das extrações está ilustrado abaixo:

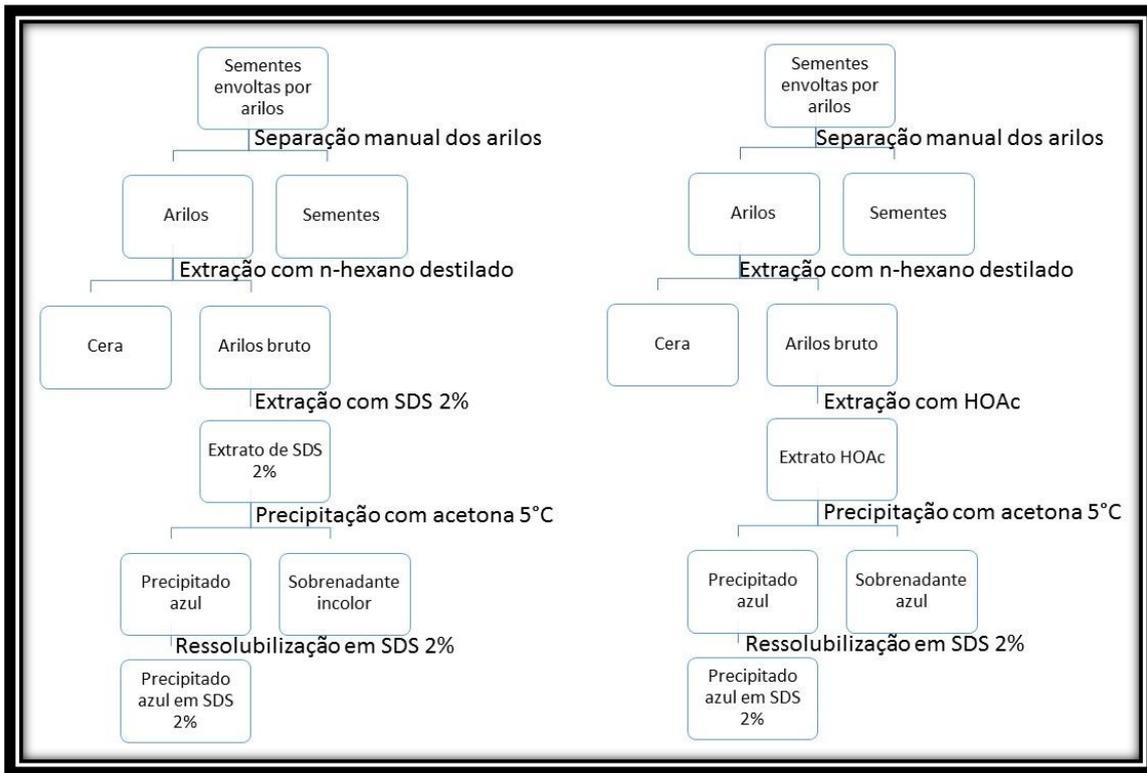


Figura 8 - Fluxograma de obtenção das amostras para análise por HPLC e eletroforese.

$SDS_{\text{nov}} =$ Extrato de SDS 2% dos arilos azuis após remoção das fibras.

$SDS_{\text{ppt}} =$ Resselubilizado das proteínas precipitadas com acetona do extrato de SDS_{nov} em SDS 2%.

$SDS_{\text{sobre}} =$ Sobrenadante da precipitação com acetona do extrato de SDS_{nov} .

$SDS_{\text{velho}} =$ Extrato de SDS 2% mantido em condições ambiente após 3 meses.

4.10. SOLUÇÕES EMPREGADAS NO MÉTODO DE LOWRY.

Solução alcalina: 4g de NaOH, 20g de Na_2CO_3 em 1000mL de H_2O_{dd}

Solução de tartarato de sódio e potássio: 2g de $KNaC_4H_4O_4 \cdot 4H_2O$ em 1000mL de H_2O_{dd}

Solução de sulfato de cobre: 1g de $CuSO_4$ em 1000mL de H_2O_{dd}

Mistura reativa: 35mL de solução alcalina + 35mL de solução de tartarato de sódio e potássio + 350 μ L de solução de sulfato de cobre.

Solução padrão de albumina: 1mg/mL.

4.11. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, MÉTODO DE LOWRY.

O doseamento das proteínas totais nas amostras de SDS novo, velho, ppt e sobre foi medido através do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979). Os volumes dos reagentes empregados estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 7 - Curva analítica para doseamento de proteínas totais.

Tubo	H ₂ O _{dd}	Albumina	Mistura reativa	Follin-Ciocalteu
Branco	400 µL	---	2mL	200µL
Tubo 01	390 µL	10 µL	2mL	200 µL
Tubo 02	380 µL	20 µL	2mL	200 µL
Tubo 03	370 µL	30 µL	2mL	200 µL
Tubo 04	360 µL	40 µL	2mL	200 µL

As amostras analisadas foram tratadas com os mesmos reagentes, os volumes empregados estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 8- Preparo das amostras para doseamento.

Tubo	H ₂ O _{dd}	V _{amostra}	Mistura reativa	Follin-Ciocalteu
SDS novo	390 µL	10µL	2mL	200µL
SDS ppt	390 µL	10µL	2mL	200 µL
SDS sobre	390 µL	10µL	2mL	200µL
SDS velho	390 µL	10µL	2mL	200 µL

4.12. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA TLC.

O protocolo utilizado para hidrólise de proteínas foi a incubação com ácido clorídrico 6N a 110°C, por um período de aproximadamente 4h. Para melhor resolução, utilizou-se uma placa de celulose e uma fase móvel de *n*-butanol, ácido acético e água na proporção de 3:1:1. Todas as placas foram reveladas com ninidrina (Heathcote, 1968; Bidlingmeyer *et al.*, 1984; Friedman, 2004).

Um padrão de albumina e uma amostra de *S. nicolai* foram hidrolisadas como controle positivo e controle negativo respectivamente.

4.13. EXTRAÇÃO DO PIGMENTO COM SURFACTANTES.

Na tentativa de extração do pigmento azul com os surfactantes, 10mg dos arilos foram adicionados a 1mL da solução de SDS ou Brij[®]35 2% e mantidos em banho ultrassônico por 20min.

Tabela 9 - Surfactantes usados na tentativa de extração.

Surfactante	Tipo	Concentração
SDS	Aniônico	2%
Brij [®] 35	Não-iônico	2%

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DOS TRIGLICERÍDEOS PRESENTES NOS ARILOS.

A extração com *n*-hexano destilado rendeu 1,003g de um resíduo semissólido de coloração branca e odor acastanhado. Esta massa corresponde a 72% em massa dos arilos brutos. O espectro de RMN de ^1H mostrado na figura abaixo é referente ao resíduo obtido do extrato hexânico.

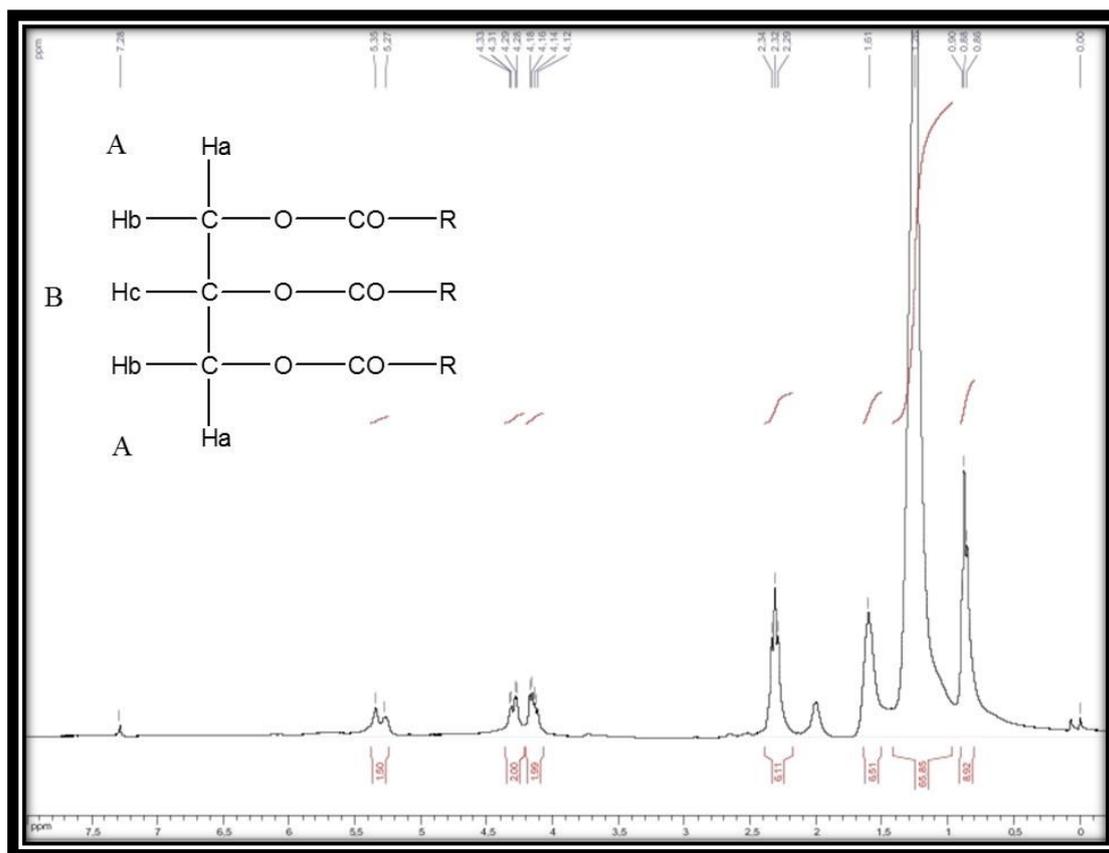


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H , na faixa de 0 a 8ppm, da fração hexânica dos arilos.

O duplete largo, em δ 5,36, referente ao próton B e os dois duplos dupletos, na faixa de δ 4,33 a 4,12, referente aos prótons A são sinais característicos de triglicerídeos, confirmando assim a composição da fração hexânica da *R. madagascariensis*. A constante de acoplamento para o duplo duplete, δ 4,33 a δ 4,12, é de $^2\text{J}=12\text{Hz}$ para o acoplamento geminal e $^3\text{J}=6\text{Hz}$ para o acoplamento a distância.

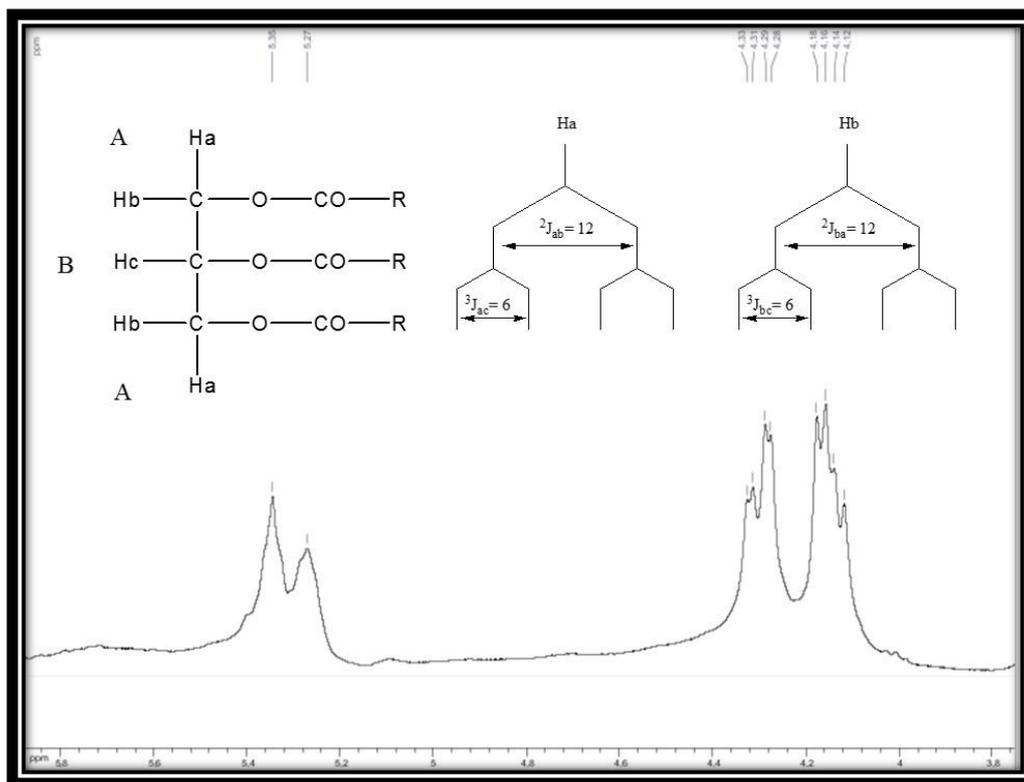


Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H na faixa de 3,8 a 5,8 ppm. Sinais referentes aos prótons A e B do triglicerídeo.

Confirmada a presença dos triglicerídeos no extrato hexânico, fez-se uma transesterificação desta amostra, obtendo os ésteres metílicos, que podem então ser analisados por GC-MS. A identificação dos ácidos graxos que compõem o triglicerídeo presente nos arilos pode ser realizada através do perfil de fragmentação dos compostos gerado no espectrômetro de massa. O perfil cromatográfico obtido por GC-MS do extrato hexânico dos arilos da *R. madagascariensis* está ilustrado na figura 11:

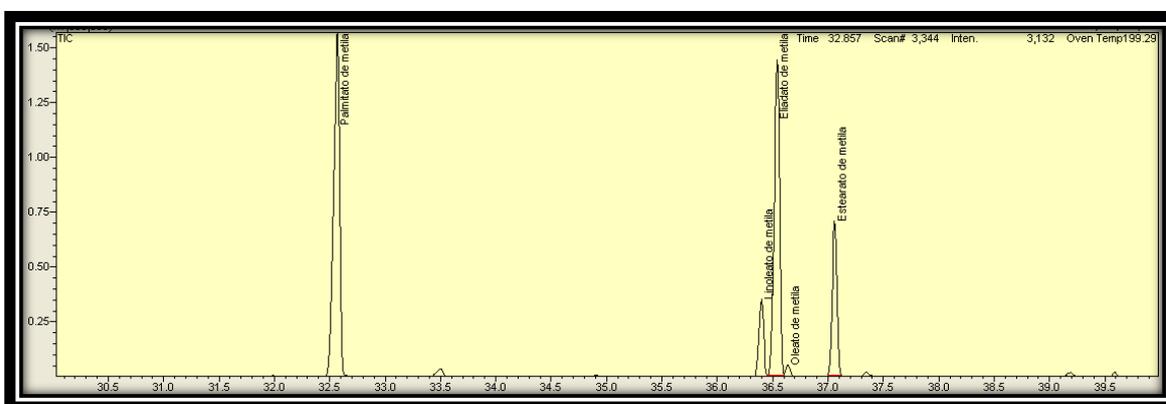


Figura 11 - Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas do extrato hexânico dos arilos da *R. madagascariensis*. Modo de injeção split, com uma razão de 1:10, volume de injeção de $1\mu\text{L}$, fluxo total de $19,1\text{mL}/\text{min}$, temperatura da injetora de 245°C .

Os ésteres metílicos de cadeia longa saturados apresentam um espectro de massas característicos onde pode-se observar a presença do íon molecular (M^+) e outros íons significantes, que em geral equivalem a $m/z = [M - 31]^+$ (perda do grupamento metóxi), $m/z = [M - 43]^+$ (perda de C2, C3, C4 devido a rearranjos complexos) e íons de fórmula $[CH_3COO(CH_2)_n]^+$. O íon base desta classe de compostos, em $m/z = 74$, corresponde ao rearranjo de Maclafferty, que apresenta o mecanismo exposto na figura 13.

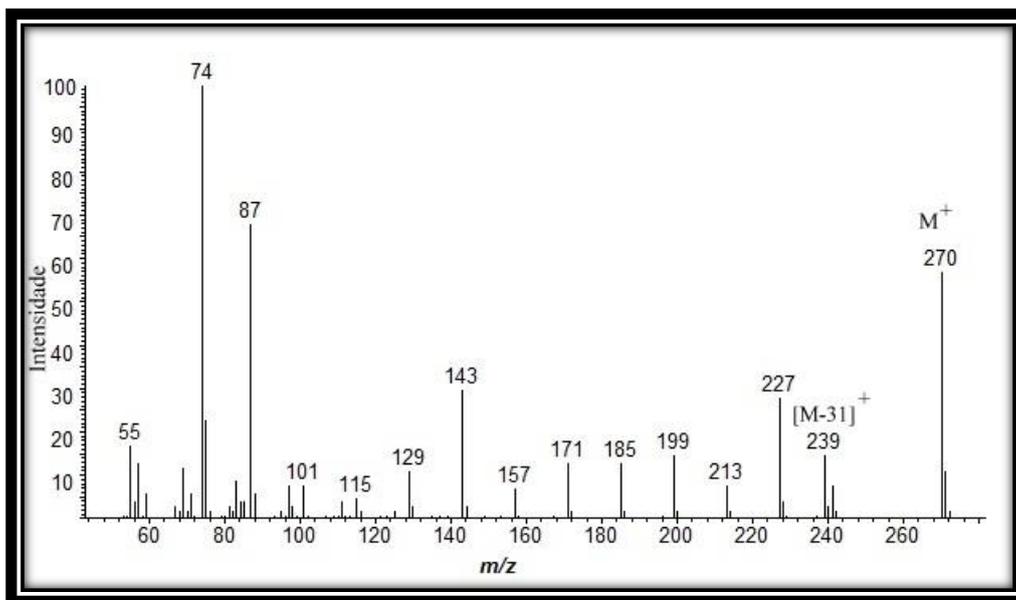


Figura 12 - Espectro de massas do palmitato de metila. Em destaque as principais perdas de massa.

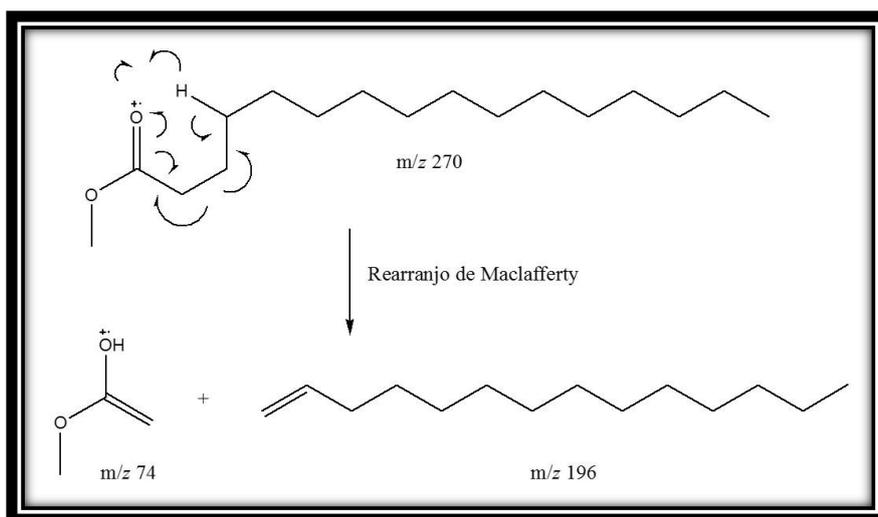


Figura 13 - Mecanismo para o rearranjo de MacLafferty.

Os ésteres metílicos de cadeia longa insaturados apresentam um perfil de fragmentação na espectrometria de massas bem diferente dos seus análogos saturados.

Nesta classe de compostos pode-se destacar a presença do íon molecular (M^+), a perda de metanol, $m/z = [M - 32]^+$, e o pico em $m/z = 74$ que também corresponde ao rearranjo de Maclafferty.

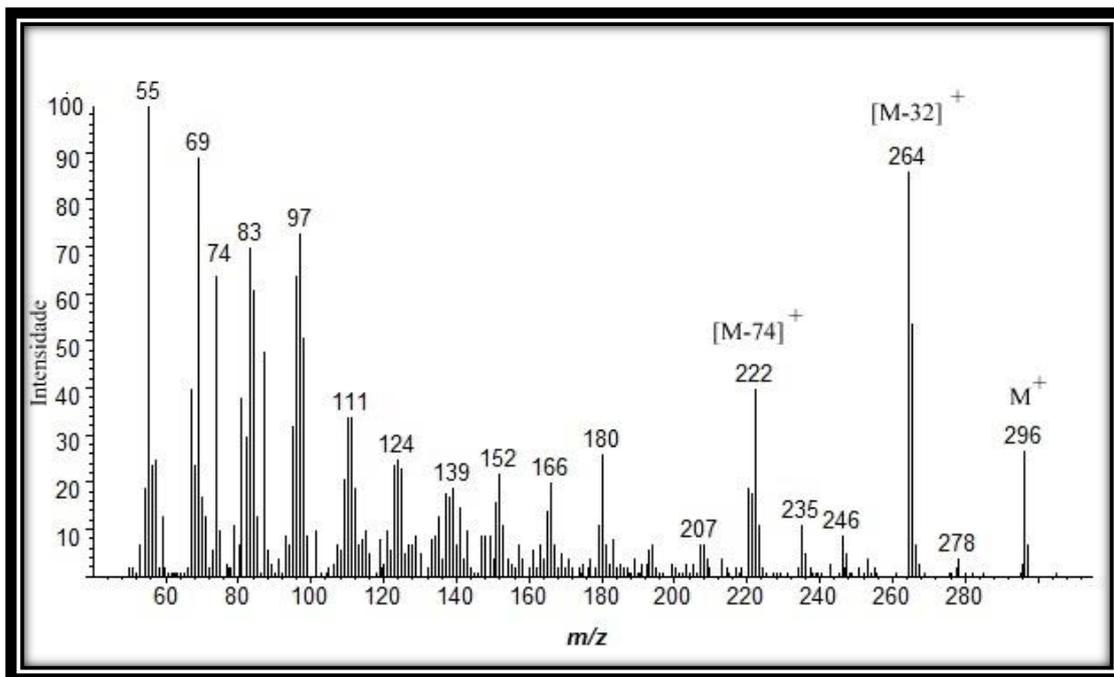


Figura 14 - Espectro de massas do oleato de metila. Em destaque as principais perdas de massas.

O mecanismo para a perda de metanol, $[M-32]^+$, encontra-se ilustrado abaixo:

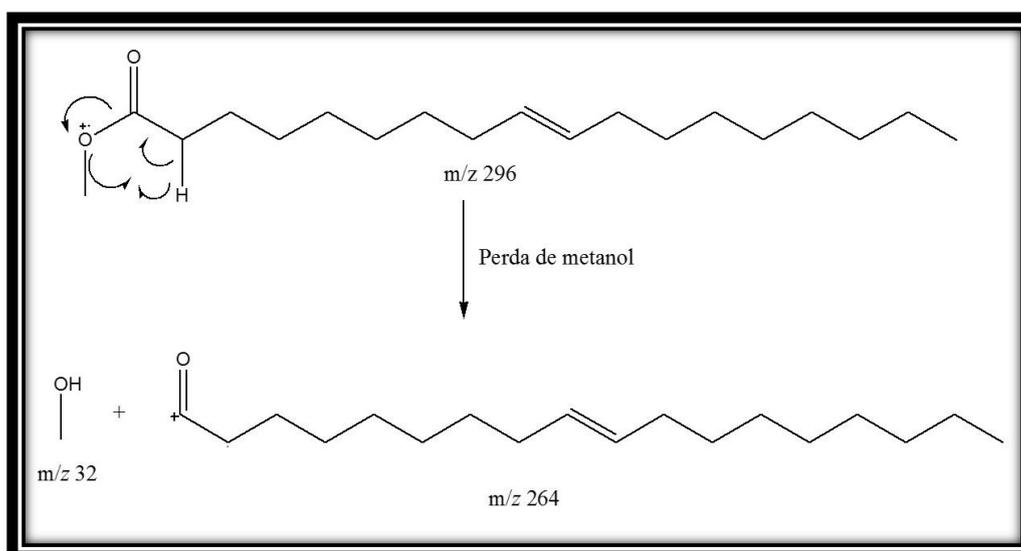


Figura 15 - Mecanismo para a perda de metanol.

Contudo, para a identificação não ambígua dos compostos encontrados no cromatograma, além dos espectros de massas obtidos e da comparação destes com os da biblioteca NIST08 é preciso calcular o Índice de Kováts e comparar o tempo de retenção dos compostos com padrões de ésteres metílicos sintetizados. O perfil cromatográfico encontrado para os padrões de ésteres metílicos encontra-se ilustrado na figura 16:

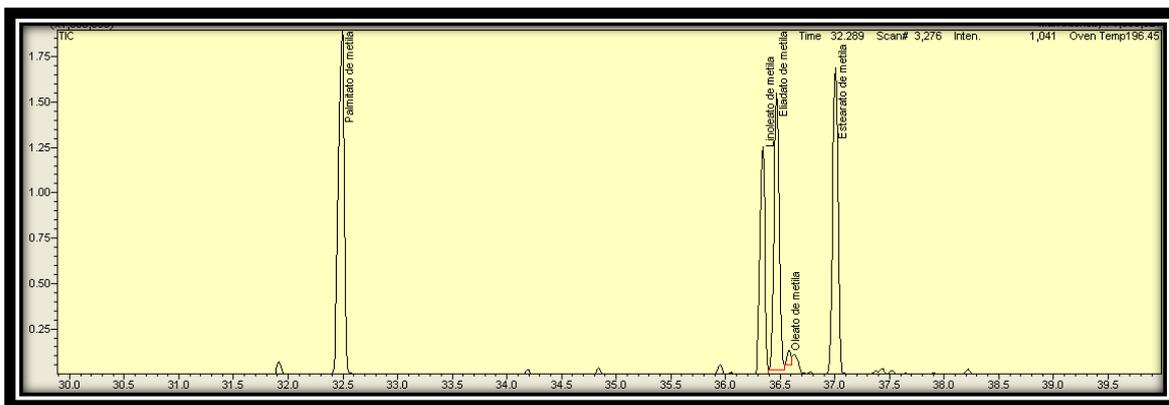


Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas do padrão de ésteres metílicos. Modo de injeção split, com razão 1:10, volume de injeção de 1 μ L, fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C.

Percebe-se que, apesar do preparo do padrão de éster metílico ser feito a partir do ácido graxo C18:1_{cis} obteve-se no meio reacional o éster metílico com a dupla na posição *trans*. Isso ocorre pois, durante o processo de síntese usa-se um meio ácido, logo a dupla ligação presente na cadeia alifática é hidratada e, em seguida, desidratada, formando novamente o alceno. Entretanto, forma-se o alceno mais estável, que é o *trans*, figura 17. Nas plantas, o processo de biossíntese é mediado por enzimas e, por isso, predomina-se os isômeros *cis*.

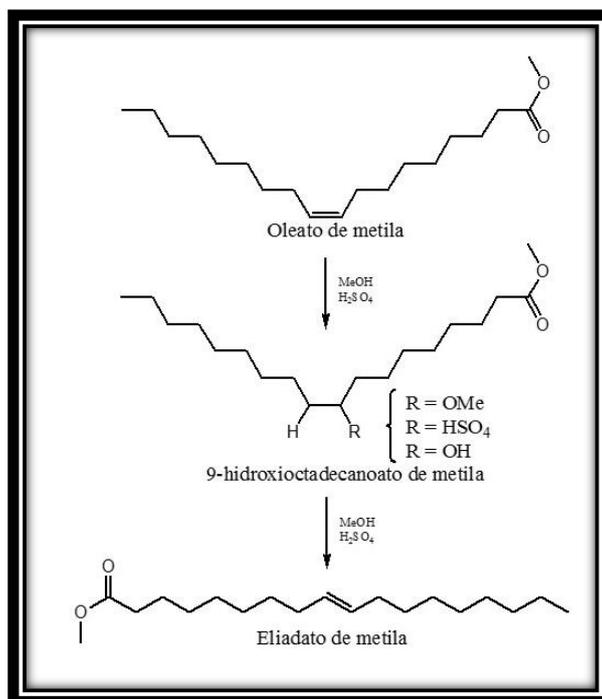


Figura 17 – Processo proposto para a conversão do isômero cis para o isômero trans, que ocorre no meio reacional.

O Índice de Kováts é um índice utilizado em cromatografia gasosa para a conversão dos tempos de retenção dos compostos obtidos em um determinado método em um índice independente do sistema utilizado. Para isso, um padrão de *n*-alcanos é utilizado com a finalidade de normalizar os tempos de retenção obtidos para os compostos presentes na amostra, através da fórmula:

$$IK = 100 \left[n + \frac{(Tr_x - Tr_n)}{(Tr_{n+1} - Tr_n)} \right]$$

Tr_x – Tempo de retenção do composto de interesse.

Tr_n – Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção inferior a Tr_x

Tr_{n+1} – Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção superior a Tr_x

n – número de carbonos do hidrocarboneto de menor tempo de retenção

O cromatograma do padrão de hidrocarbonetos, C₆-C₂₆, C₂₈ e C₃₀, utilizado para o cálculo do Índice de Kováts encontra-se ilustrado abaixo:

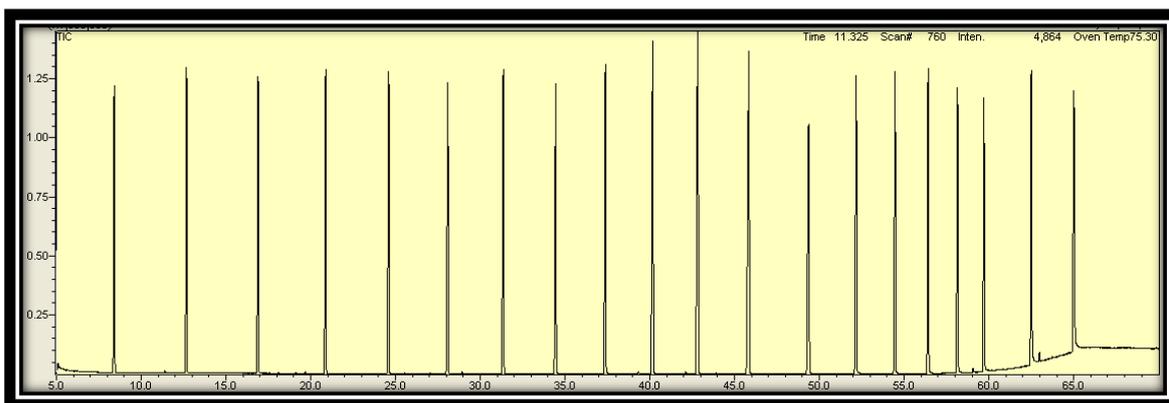


Figura 18 - Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos C6-C26, C28 e C30. Modo de injeção split, com razão de 1:10, volume de injeção de 1 μ L, fluxo total de 19,1mL/min, temperatura da injetora de 245°C.

Os principais componentes da amostra analisada encontram-se resumidos nas tabelas abaixo, onde pode-se visualizar o tempo de retenção e o Índice de Kováts para cada composto e o erro obtido quando compara-se os dados encontrados neste trabalho com os disponíveis na literatura.

Tabela 10 – Principais componentes da fração hexânica dos arilos da *R. madagascariensis*.

Composto	Representação	Área %	T _r	Índice de Kováts
Palmitato de metila	C16:0	41.32	32.571	1902
Linoleato de metila	C18:2 ω 6	6.81	36.398	2096
Elaidato de metila	C18:1 ω 9 _{trans}	33.98	36.544	2103
Oleato de metila	C18:1 ω 9 _{cis}	0.85	36.639	2112
Estearato de metila	C18:0	14.32	37.061	2131

Tabela 11 - Identificação dos principais ácidos graxos saturados, moinsaturados e polinsaturados obtidos pela fração hexânica dos arilos da *R. madagascariensis*.

Representação	Simi.	IK _{amostra}	IK _{padrão}	IK _{literatura}	Erro _{padrão}	Erro _{literatura}
C16:0	96%	1902	1925	1921	1,1%	1,0%
C18:2 ω 6	95%	2096	2093	2095	0,1%	0,05%
C18:1 ω 9 _{trans}	94%	2103	2099	2082	0,2%	1,0%
C18:1 ω 9 _{cis}	84%	2112	2105	2086	0,3%	1,0%
C18:0	96%	2131	2126	2124	0,2%	0,3%

Simi – Abreviação para similaridade.

Existem poucos dados a respeito da composição das ceras presentes nos arilos de *R. madagascariensis* na literatura, e os dados aqui encontrados estão de acordo com os relatados por RABARISOA e colaboradores. (Rabarisoa *et al.*, 1981).

5.2. INFLUÊNCIA DO PH NA EXTRAÇÃO DO PIGMENTO AZUL CONTIDO NOS ARILOS.

Com o intuito de se obter informações a respeito do efeito do pH sobre os arilos da *R. madagascariensis*, executou-se ensaios com ácidos e bases forte. Os resultados observados, ao tentar extrair a cor azul em meios ácidos e básicos, encontram-se em desacordo com os descritos por GIRAL (Giral, 1946). A coloração marrom-avermelhada, obtida pelos autores quando os arilos estão em um meio básico, não foi observada, todavia ao tratar as sementes com uma solução alcalina foi possível reproduzir tal resultado. Os arilos, quando em meio básico, apresentam uma coloração esverdeada.

Tabela 12 - Influência do pH sobre os arilos e sementes.

Parte usada	Solvente	Cor Solução	Cor Arilo
Semente	NaOH 10%	Vermelho	***
Arilo	NaOH 10%	Incolor	Esverdeado
Arilo	HCl (conc)	Incolor	Azul

5.3. TENTATIVAS DE EXTRAÇÃO DA COR AZUL PRESENTE NOS ARILOS.

Após a extração dos triglicerídeos presentes no arilo com *n*-hexano destilado percebeu-se que o próprio solvente se tornou azulado. Presumiu-se que o composto responsável pela coloração azul apresentava uma pequena solubilidade em solventes apolares. Com a intenção de aumentar a eficiência da extração, fez-se uma segunda tentativa, utilizando como solvente acetonitrila. No espectro de ultravioleta da solução, pode-se observar uma absorção em 653nm referente à estrutura estudada.

A elevação da linha base do espectro é um fenômeno que, em geral, ocorre quando na solução analisada se encontra material particulado. Para a retirada de tal material da solução, utilizou-se um filtro de membrana 0,45µm. Ao filtrar-se a solução, notou-se que

o filtrado tornou-se incolor, enquanto pequenas partes da fibra azul ficaram retidas no filtro. Tais fibras são oriundas do processo utilizado para a extração, pois a sonicação, é capaz de romper partes da fibra e gerar uma suspensão dos arilos na solução de acetonitrila.

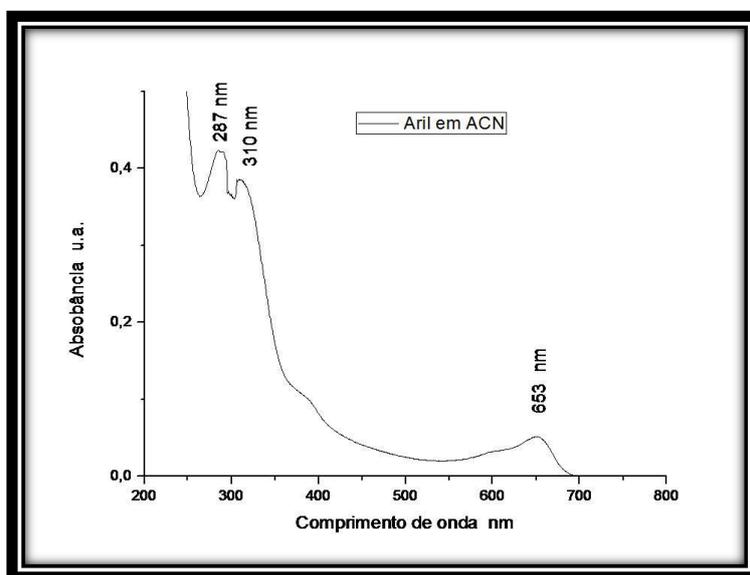


Figura 19 - Espectro no ultravioleta, na faixa de 200 a 800nm, da suspensão dos arilos em acetonitrila.

Como a extração com acetonitrila não foi eficiente, uma série de solventes com diferentes propriedades, como acidez, polaridade, capacidade redutora/oxidativa e basicidade foram testados.

Tabela 13 - Solventes testados para extração da cor azul presente no arilo.

Solvente	Cor Solução	Arilo	Filtro 0,45µm PTFE
Éter	Incolor	Azul	Incolor
Acetona	Incolor	Azul	Incolor
THF	Azul-verde	Azul	Incolor
CHCl₃	Incolor	Azul	Incolor
Acetato de Etila	Incolor	Azul	***
EtOH	Incolor	Azul	Incolor
CH₃NO₂	Amarelo claro	Branco	***
ACN	Azul claro	Azul	Incolor
MeOH	Azul verde	Azul	Incolor
DMF	Marrom claro	Branco	***

DMSO	Marrom escuro	Branco	***
H₂O	Azul claro	Branco	Incolor
Glicerina	Transparente	Azul	***
DMAC	Amarelo claro	Branco	***
TCA 10%	Amarelo-marrom	Azul	***
HOAc quente	Azul	Branco	Azul
Ácido Fórmico	Marrom	Branco	***

*** Nestes casos, a solução não foi filtrada por membrana 0,45µm.

Tabela 14 - Soluções testadas para a extração da cor azul presente no arilo.

Solução	Cor Solução	Arilo	Filtro 0,45µm PTFE
Ácido Cítrico 10%	Esverdeada	Esverdeado	***
Ácido Ascórbico 10%	Incolor	Branco	***
FeSO₄ 10%	Azul-escuro	Branco	***
Bissulfito de sódio 10%	Incolor	Branco	***

*** Nestes casos, a solução não foi filtrada por membrana 0,45µm.

Dos solventes e soluções testados, para a extração do pigmento azul presente nos arilos, apenas o ácido acético a quente foi eficaz. Apesar de ser eficaz, este método de extração deve ser bastante controlado, uma vez que é necessário a aplicação de elevadas temperaturas, de 70°C a 80°C, por um curto período de tempo, em geral de 15 a 20min. Caso estas condições sejam excedidas, o extrato obtido perde o tom azul e torna-se esverdeado, como ilustrado no destaque da figura 20.

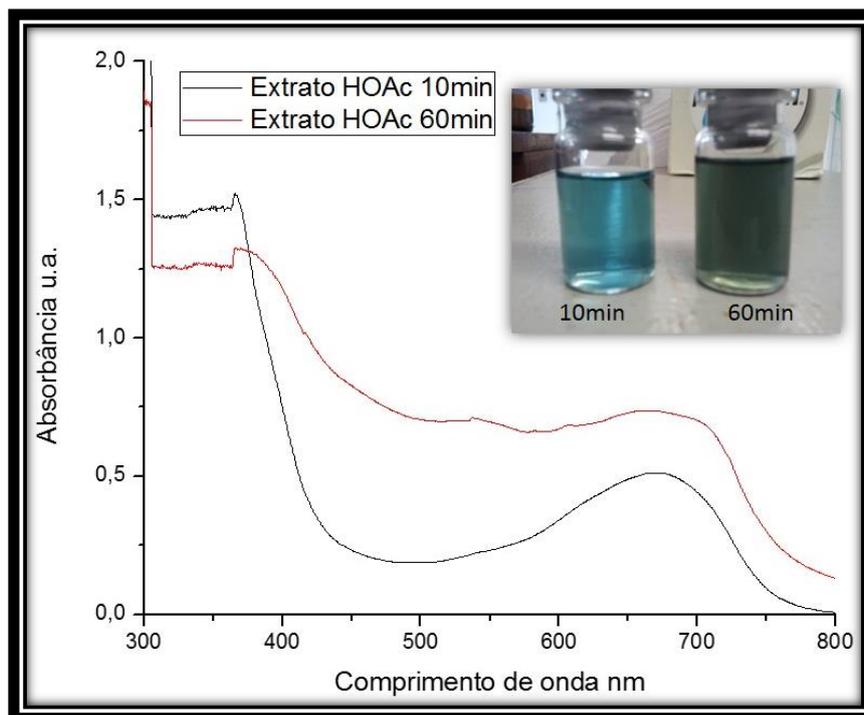


Figura 20- Espectro no ultravioleta do extrato de HOAc com tempo de extração 10 e 60min.

O espectro de ultravioleta do extrato de ácido acético mostra uma absorção em 680nm referente a um cromóforo presente na solução. Logo, pode-se afirmar que o processo de formação da cor é devido a um fenômeno químico de absorção da luz. O trabalho de ANDRE, P., *et al*, descreve que a cor azul presente nos arilos da *R. madagascariensis* é gerada através de um processo de interferência ondulatória construtiva, causado pelas células da epiderme da planta que são formadas por uma complexa estrutura a base de celulose dispostas em multicamadas. Este tipo de processo seria considerado como um fenômeno físico de geração de cores, o que não está de acordo com os dados obtidos neste trabalho, uma vez que observa-se a presença de um cromóforo em solução (Andre e Garcia, 2011b; a). A imagem abaixo ilustra a disposição da parede celular das células presentes nos arilos, que poderiam proporcionar fenômeno físico de geração das cores.

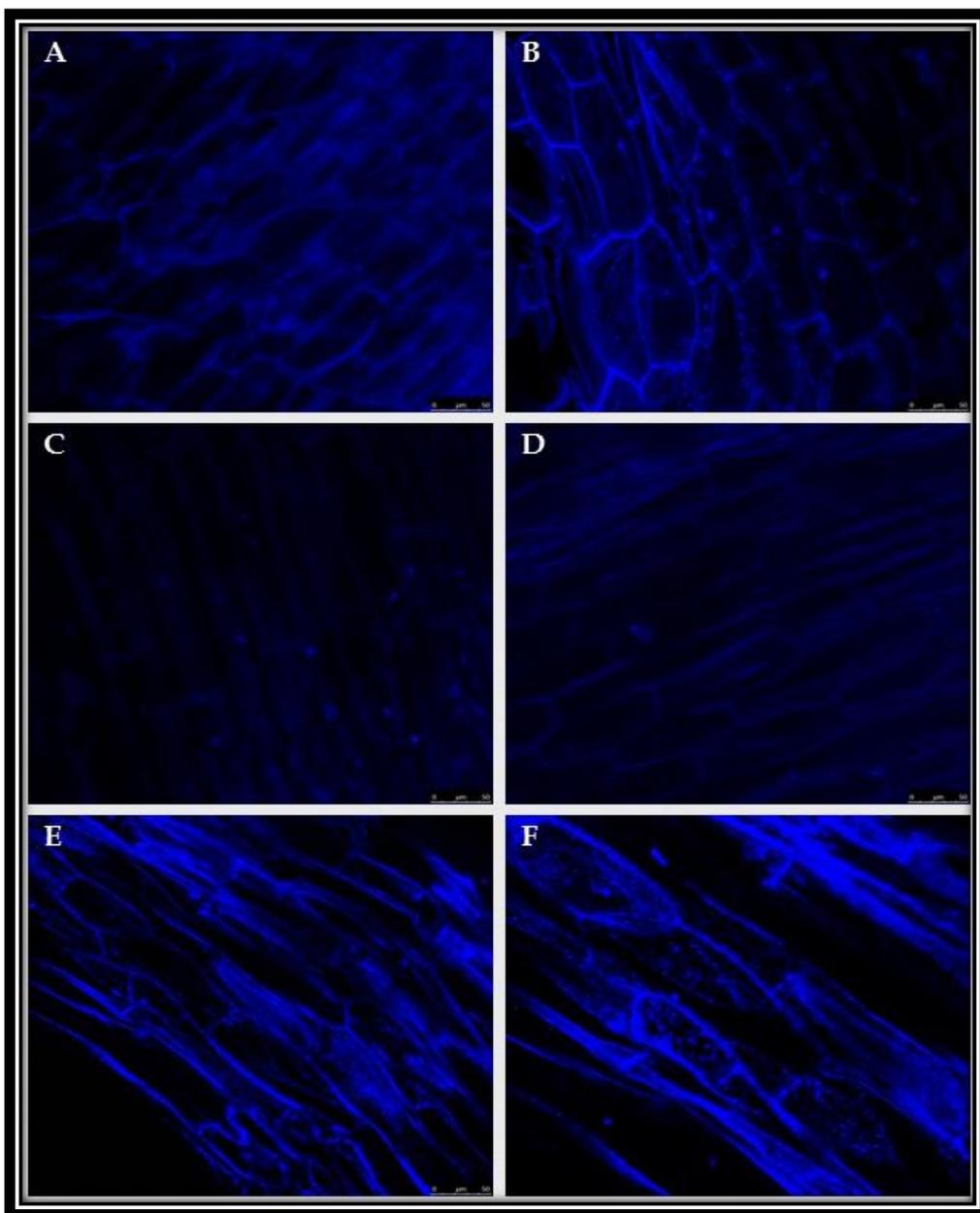


Figura 21 - Imagem obtida por microscopia de fluorescência dos arilos de *R. madagascariensis*. A disposição dos feixes de celulose que formam a parede celular foram evidenciados, para a visualização dos núcleos, o cromóforo DAPS foi aplicado ao tecido após a perfuração das células por triton X-100.

Apesar do ácido acético ser capaz de extrair o composto responsável pela cor azul no arilo, este solvente não é capaz de estabilizar o mesmo por um longo período. De modo que após duas semanas, o extrato armazenado à temperatura ambiente começa oxidar-se e a solução torna-se marrom.

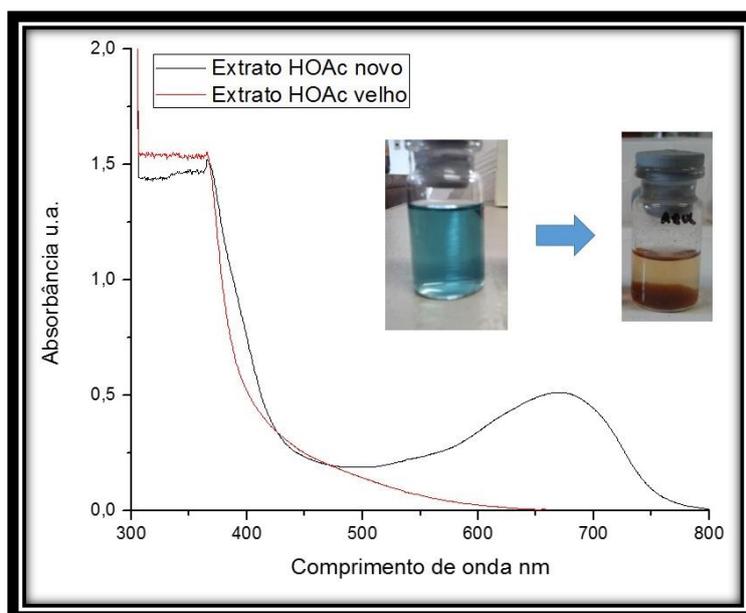


Figura 22 - Espectro no ultravioleta do extrato de HOAc novo e velho.

5.4. TRATAMENTO DOS ARILOS COM ENZIMAS.

Visto que as tentativas de extração do pigmento azul, com os solventes e soluções acima descritos, mostraram-se ineficientes a longo prazo, cogitou-se que a razão para tais falhas seria devido a tratar-se de uma proteína. Ao tentar extrair-la com solventes, tal como o ácido acético, extraía-se apenas o cromóforo da mesma e, por isso, com o passar do tempo o mesmo degradava-se em solução, pois este não se encontrava estabilizado pela proteína. E para eliminar a possibilidade da geração da cor azul nos arilos por um fenômeno de interferência ondulatória, submeteu-se os arilos a enzimas, com a pretensão de extrair a proteína, mantendo o cromóforo estável por mais tempo. Ao tratar os arilos com celulase, as camadas de celulose foram degradadas e caso a cor azul fosse mantida provar-se-ia que a cor observada é resultado da presença de um cromóforo. Com o objetivo de verificar o funcionamento das enzimas, utilizou-se o teste de Fehling, que geralmente detecta a presença de açúcares redutores, como monossacarídeos, dissacarídeos e aldeídos, na solução que continha a enzima celulase. Na alíquota testada, notou-se a formação de óxido de cobre I, composto de cor vermelha, indicando um resultado positivo. Apesar da enzima ter funcionado, ela não foi capaz de extrair o pigmento e as fibras dos arilos permaneceram azuis.

A ação da celulase promoveu a digestão do complexo de celulose presente nos arilos e pode-se notar que a cor azul é mantida. Caso a cor azul fosse oriunda de um

processo de interferência ondulatória, como descrito por ANDRE, P., a remoção destas camadas tornaria a ocorrência deste fenômeno improvável e a cor deixaria de existir nos pontos em que as camadas fossem danificadas. Esse fato, além da absorção em 680nm do extrato de ácido acético, corrobora para a hipótese do fenômeno químico de geração da cor.

Tabela 15- Enzimas testadas para extração do pigmento azul

ENZIMA	CLASSE	TAMPÃO	SOLUÇÃO
Termamyl 120-L [®]	α -amilase	H ₂ O	Permaneceu incolor
Citrozym Ultra L [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻	Permaneceu incolor
Ultrazym AFPL [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻	Permaneceu incolor
Serva R-10 [®]	Pectinase	Citrato	Permaneceu incolor
Novozym 33095 [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻	Permaneceu incolor
Cellubrix L [®]	Celulase	HOAc/OAc ⁻	Permaneceu incolor
Pectinex Ultra SP_L [®]	Pectinase	HOAc/OAc ⁻	Permaneceu incolor

5.5. ESTUDO DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS ARILOS.

O estudo dos grupos funcionais presentes nos compostos químicos pode ser feito através da espectroscopia vibracional, que engloba as técnicas de infravermelho e Raman. Apesar destas técnicas serem fundamentadas em processos de interação entre a radiação e matéria, cada uma delas é baseada em um fenômeno físico diferente e por isso são complementares (Keresztury, 2006). A espectroscopia de infravermelho tem seus fundamentos baseados em efeitos de absorção da radiação, desta forma, para que uma molécula seja ativa no infravermelho, é necessário que haja uma variação do momento de dipolo com o tempo. Ligações simétricas como H₂, Cl₂ não são ativas no infravermelho, pois não apresentam um momento de dipolo que varie com o tempo (Donald L. Pavia, 2010; Rodrigues e Galzerani, 2012). A espectroscopia Raman, por sua vez, é governada por processos de espalhamento da luz pela matéria. Quando a luz monocromática incide na matéria ela pode ser absorvida, transmitida ou espalhada. A intensidade da luz espalhada é proporcional ao quadrado da polarização. Assim a técnica de espectroscopia Raman é dependente da simetria das oscilações atômicas que modificam a polarização do meio, por exemplo, ligações simétricas como H₂ e Cl₂ são

ativas no Raman. Desta forma, com a intenção de se obter mais informações sobre a estrutura do pigmento azul dos arilos, fez-se um estudo dos grupos funcionais presentes no mesmo através das técnicas de espectroscopia vibracional.

5.5.1. Infravermelho.

Na análise dos arilos brutos, finamente triturados e homogeneizados em KBr, pode-se destacar a presença de absorções na região de 3450cm^{-1} , referentes a possíveis grupos OH e NH presentes nas fibras dos arilos; absorções na região de 2925 e 2853cm^{-1} referentes aos estiramentos e dobramentos dos grupamentos metílicos presentes na camada graxa; absorção em 1744cm^{-1} referente ao estiramento C=O da carbonila de éster alifático; absorção em 1165cm^{-1} referente ao estiramento C-O de éster; e uma absorção em 720cm^{-1} referente ao estiramento de cadeia longa de hidrocarbonetos que está de acordo com a presença de triglicerídeos nos arilos (Donald L. Pavia, 2010).

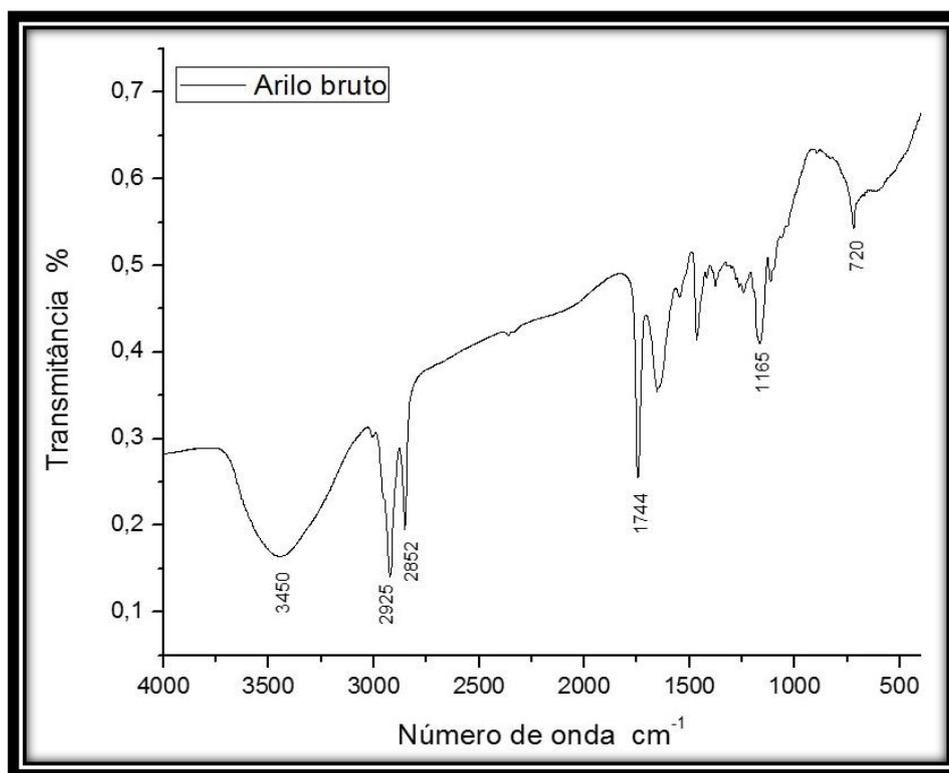


Figura 23 - Espectro no infravermelho do arilo bruto da *R. madagascariensis*.

Após o tratamento dos arilos com *n*-hexano ocorre a retirada das triglicerídeos e outros compostos apolares, desta forma, ao comparar os espectros de infravermelho do arilo com e sem cera, nota-se a mudança de intensidade nas absorções na região de 1750

a 1550cm^{-1} . Visto que cerca de 70% da composição dos arilos corresponde a triglicerídeos, a retirada dos mesmos possibilita uma melhor visualização de bandas antes menos intensas.

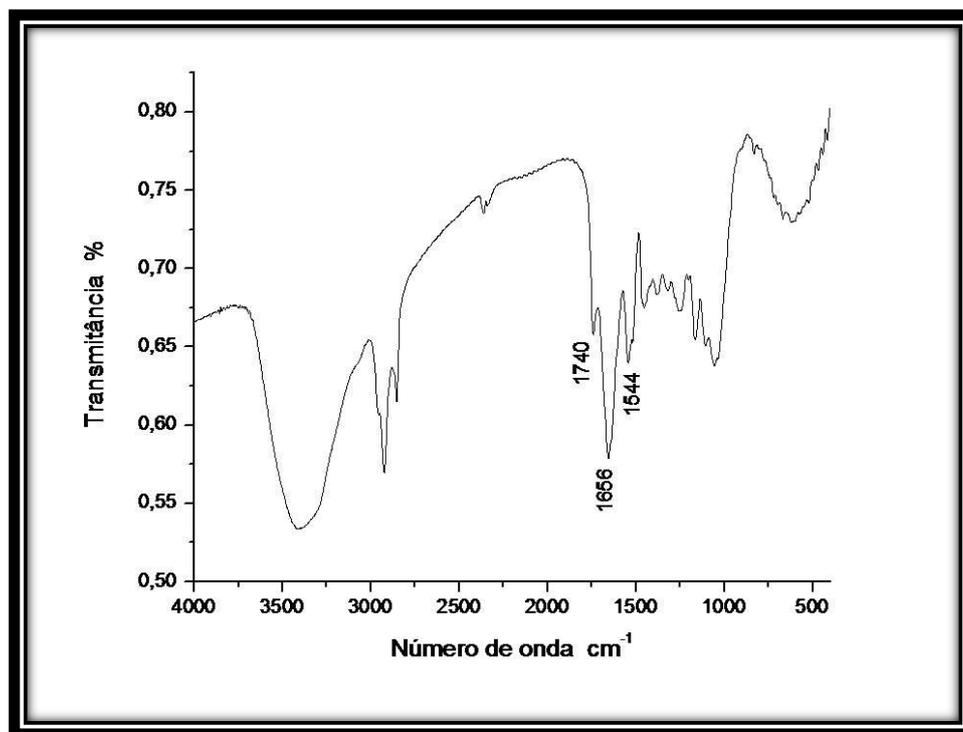


Figura 24 - Espectro no infravermelho do arilo sem cera da *R. madagascariensis*.

A absorção em 1656cm^{-1} sugere a presença de uma proteína, uma vez que tal absorção pode ser associada com a banda de amida I (α -helix) presente em proteínas (Haris e Severcan, 1999) e está relacionada principalmente com o estiramento C=O e C-N. A segunda absorção intensa em 1544cm^{-1} está associada a banda de amida II presente em proteínas que é relacionada principalmente com a vibração de dobramento do grupo N-H e pelo estiramento C-N. Bandas de amida III também estão presentes no caso a absorção em 1320cm^{-1} , este tipo de absorção está relacionado com a conformação de vários peptídeos presentes na proteína (Surewicz *et al.*, 1993; Haris e Severcan, 1999; Barth e Zscherp, 2002; Kong e Yu, 2007; Ordonez *et al.*, 2011; Rodrigues e Galzerani, 2012; Shai, 2013).

Recentemente, PIRONE *et al.*, relataram pela primeira vez a presença de bilirrubina, um tetrapirrol cíclico, como sendo o principal pigmento dos arilos presentes na *S. nicolai* que pertence à família Strelitziaceae. Como a *R. madagascariensis* pertence à mesma família, é de interesse a comparação entre os dois arilos, uma vez que a cor azul

pode ser referente a algum composto com estrutura semelhante. Visto que algumas das vias biosintética podem ser comuns para ambas as espécies.

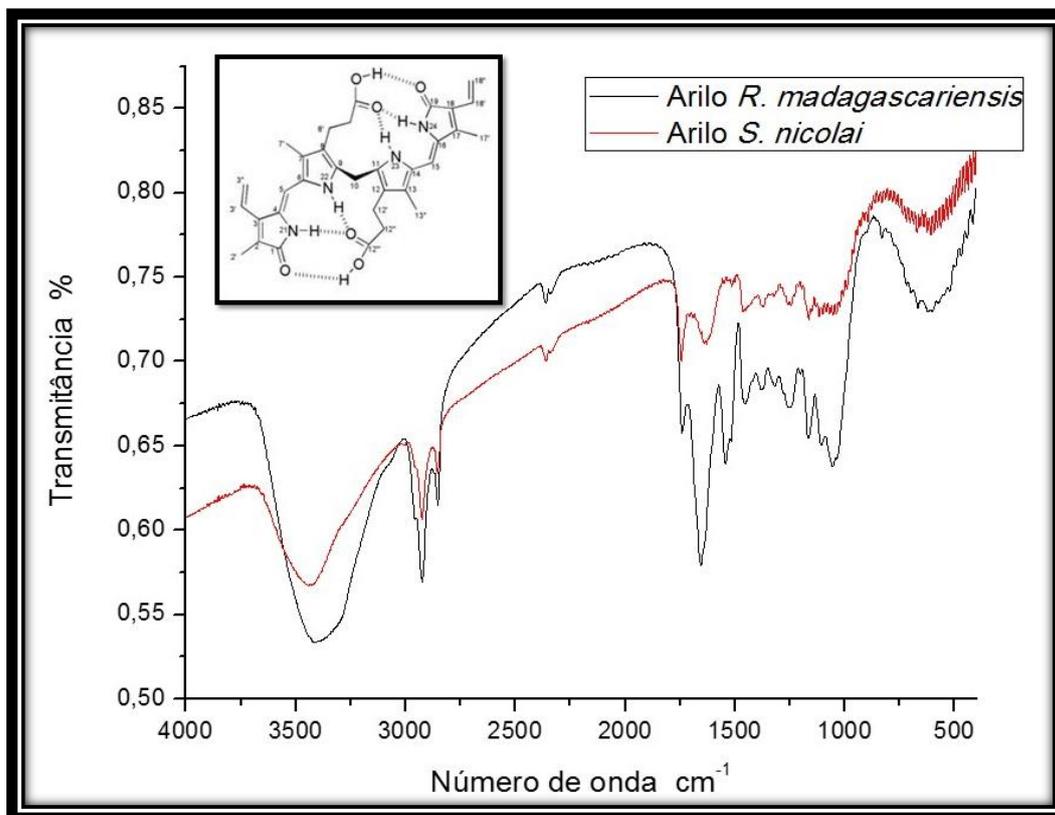


Figura 25 - Espectro no infravermelho dos arilos da *S. nicolai* e da *R. madagascariensis*. Estrutura da bilirrubina.

Pode-se perceber que as principais absorções presentes nos arilos da *R. madagascariensis* estão ausentes na *S. nicolai*. Este fato suporta a hipótese de que o pigmento presente no arilo da *R. madagascariensis* é uma proteína que possui cor ou uma proteína na qual um grupo cromóforo esteja ligado covalentemente, ou sendo estabilizado pela mesma por meio de interações intermoleculares.

5.5.2. Raman.

As metaloproteínas que possuem grupos prostéticos contendo núcleos de zinco ou cobre apresentam coloração azul e são bem descritas, como por exemplo as proteínas azuis de cobre (Norris *et al.*, 1986; Messerschmidt, 1998; Pierloot *et al.*, 1998). Com o intuito de confirmar a presença ou ausência destes metais nos arilos, fez-se um espectro Raman varrendo a região de 4000 a 200 cm^{-1} . A vantagem de se trabalhar com esta técnica

é que estruturas com baixa polarizabilidade como celulose, ligninas e outras fibras presentes nos arilos brutos não apresentarão atividade no espectro Raman, pois para uma molécula ser ativa no Raman a mesma deve ser polarizável (Rodrigues e Galzerani, 2012). A polarizabilidade depende da facilidade com que ocorre a redistribuição eletrônica da molécula, quando a mesma encontra-se sob a presença de um campo elétrico. Desta modo, comparando os espectros vibracionais de infravermelho e Raman, tem-se que no espectro Raman não se observa a absorção na região de 3400cm^{-1} vista no infravermelho.

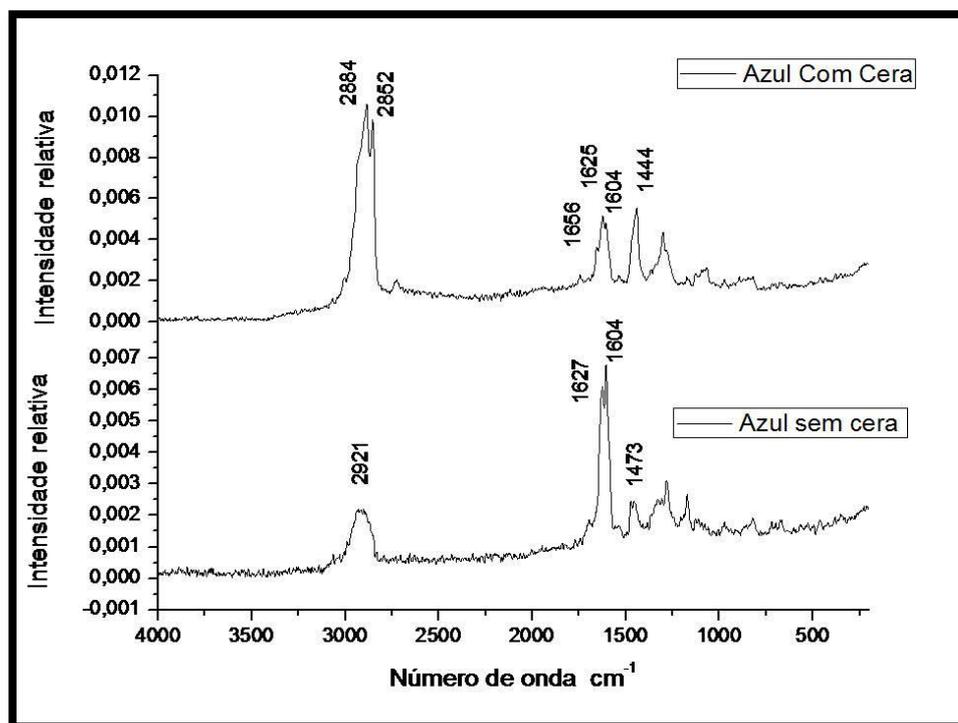


Figura 26 - Espectro Raman do arilo da *R. madagascariensis* com cera e sem cera.

Comparando os espectros Raman obtidos dos arilos da *R. madagascariensis*, tem-se que a perda da intensidade e da definição das bandas na região de 2950 a 2850cm^{-1} no espectro sem cera é referente a ausência dos triglicerídeos que compõem aproximadamente 70% em massa do arilo. A ausência da banda em 1656cm^{-1} referente a um grupamento carbonílico também pode ser justificada pela ausência dos triglicerídeos, uma vez que os mesmos apresentam carbonilas de ésteres em sua estrutura. As absorções nas regiões de 1625 e 1475cm^{-1} normalmente são atribuídas a bandas de amida I e amida II, respectivamente. Tais bandas são comuns em amostras proteicas que apresentam como estrutura secundária a forma de folhas beta (“ β -sheet”). Picos de absorção em 1604cm^{-1} podem ser atribuídos a resíduos do aminoácido fenilalanina

presentes em amostras proteicas (Maiti *et al.*, 2004; Tuma, 2005). A hipótese do pigmento azul apresentar um grupo prostético com núcleo de cobre ou zinco poderia ser confirmada a partir do espectro Raman, no qual esperava-se encontrar uma absorção referente ao estiramento Cu-N, ou Zn-N, entretanto nenhuma destas bandas pode ser visualizada nos espectros, o que sugere que a proteína em questão não é uma metaloproteína com núcleos de Cu ou Zn.

5.6. TESTE DE EHRLICH

O teste de Ehrlich é um teste colorimétrico simples para a identificação de grupamentos indólicos e pirrólicos através da reação destes grupamentos com o *p*-dimetilaminobenzaldeído formando um composto de coloração vermelha, o que indica um resultado positivo para o teste (Alexander e Butler, 1976; Miller e Wright, 1982; O'neal *et al.*, 2000; Brady e Robins, 2003).

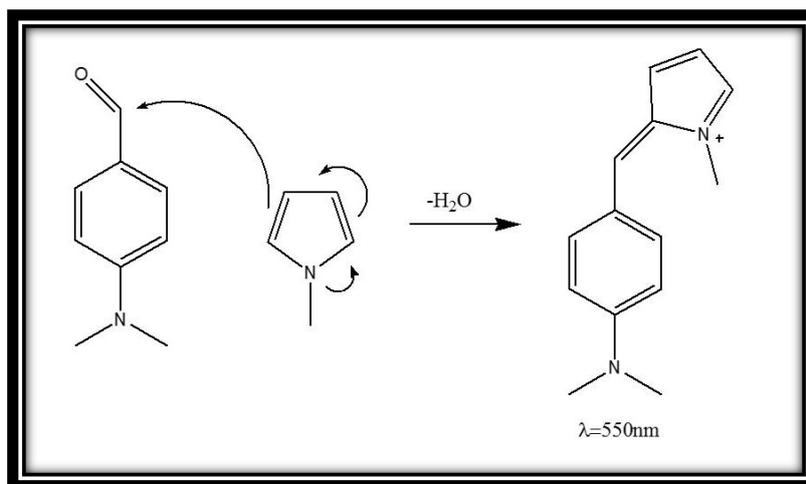


Figura 27 - Reação entre o reagente de Ehrlich e um pirrol genérico formando o composto de cor vermelha que indica um resultado positivo para o teste.

Os extratos em clorofórmio e ácido acético dos arilos da espécie *S. nicolai* e da espécie *R. madagascariensis*, respectivamente, foram submetidos ao teste de Ehrlich e ambos apresentaram um resultado positivo. Dessa maneira pode-se suspeitar da presença de grupamentos pirrólicos no cromóforo dos arilos da *R. madagascariensis*.

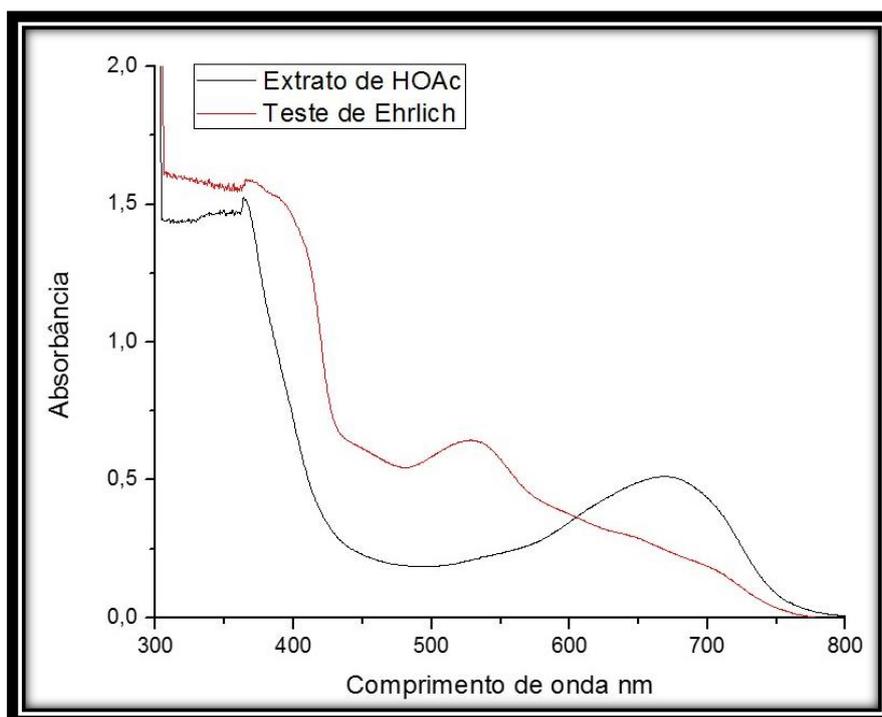


Figura 28 - Espectro no ultravioleta do ensaio de Ehrlich com o extrato de HOAc do arilo da *R. madagascariensis*.

Tabela 16- Resultado do teste de Ehrlich.

Amostra	Solvente	Teste de Ehrlich
<i>R. madagascariensis</i> arilos	HOAc	Positivo
<i>S. nicolai</i> arilos	CHCl ₃	Positivo

5.7. ANÁLISE DOS ARILOS POR TLC.

As proteínas são macromoléculas compostas por peptídeos e estes por sua vez possuem os aminoácidos como blocos construtores. Existem 20 aminoácidos essenciais que são utilizados na biosíntese de proteínas pelos organismos vivos, estes embora sejam compostos incolores podem ser identificados por TLC através da reação com o revelador ninidrina gerando um composto de cor púrpura, como descrito na figura (Heathcote, 1968; Friedman, 2004).

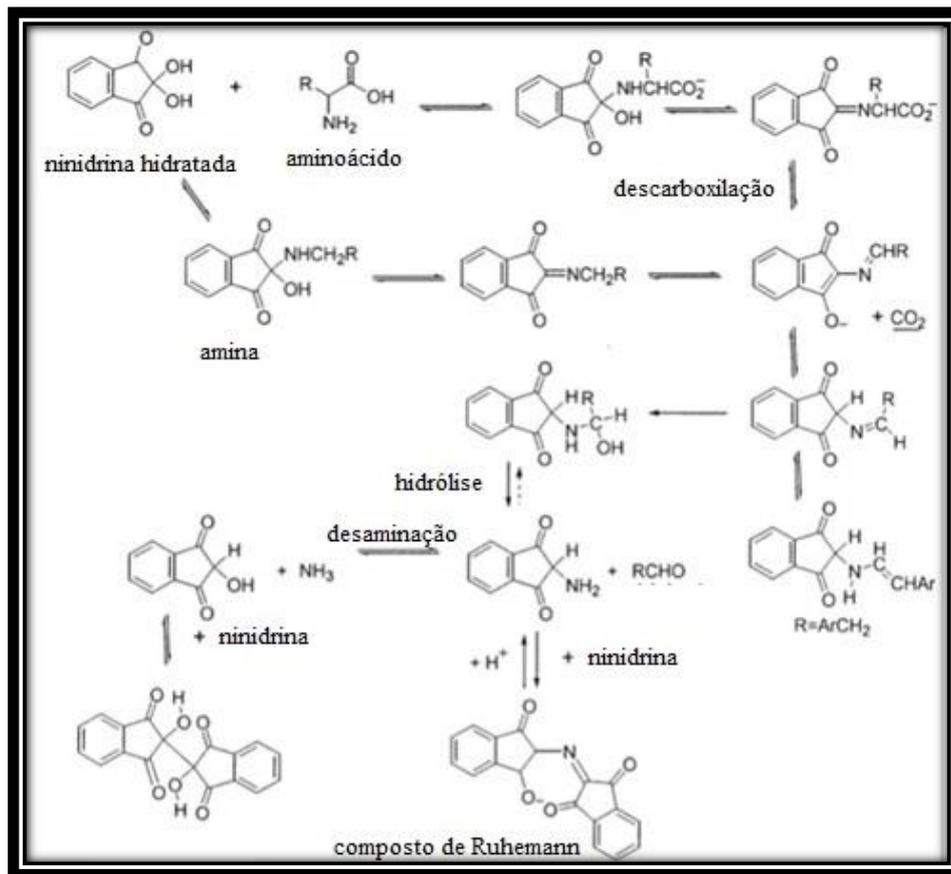


Figura 29- Formação do composto de Ruhemann que possui coloração púrpura

A digestão dos arilos sem cera foi realizada através da incubação dos mesmos em ácido clorídrico 6mol.L^{-1} seguido de aquecimento a 80°C por 15min, gerando os aminoácidos livres. Como a estrutura vegetal inteira foi utilizada na digestão, para evitar um falso positivo, usou-se como controle negativo os arilos da *S. nicolai*, que apresentam como cromóforo a bilirrubina. E como controle positivo, a proteína albumina de soro bovino, BSA, foi utilizada. Na placa abaixo, percebe-se a presença de manchas roxas nas amostras de *R. madagascariensis* e BSA, o que indica um resultado positivo para proteínas. Já na amostra de *S. nicolai*, estas manchas não são observadas, o que está de acordo com o fato da cor laranja ser oriunda da presença de bilirrubina, um tetrapirrol linear.

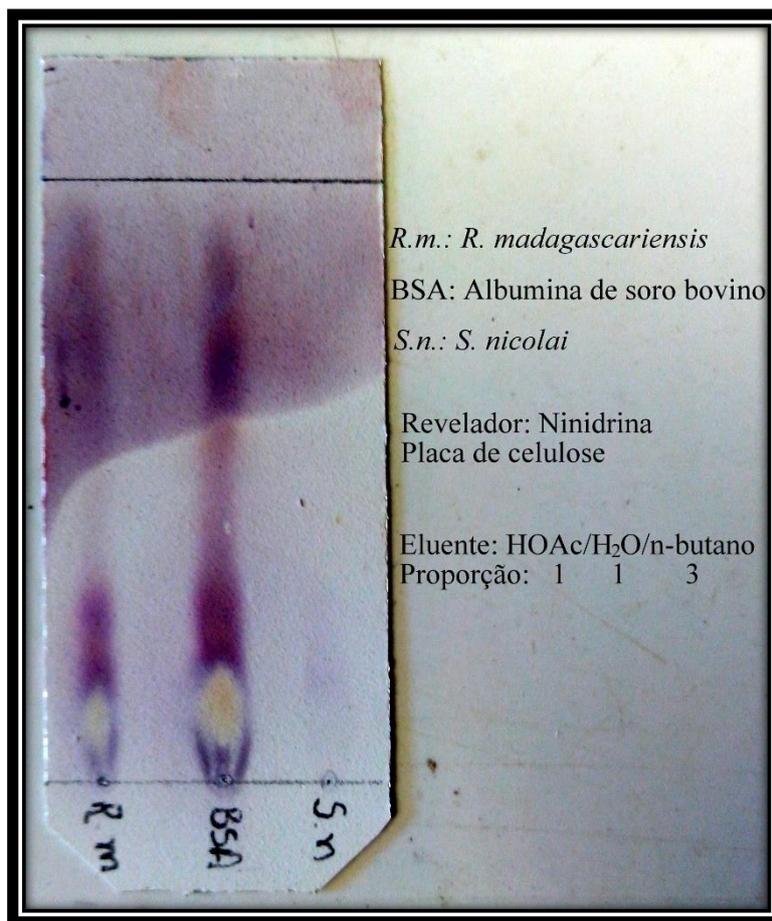


Figura 30- TLC do hidrolisado de proteínas das amostras de *R. madagascariensis*, albumina de soro bovino e *S. nicolai*.

5.8. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS COM AGENTES SURFACTANTES.

Os surfactantes são moléculas com propriedades únicas, capazes de gerar interações hidrofóbicas e hidrofílicas com as amostras. Esta característica se deve ao fato dos surfactantes possuírem propriedades anfífilas, ou seja, apresentam uma porção polar e outra apolar. As características do grupamento polar nos surfactantes são a base para a classificação dos mesmos, que podem ser: não iônico (não apresentam carga), iônico (carregados positiva ou negativamente) ou zwitteriônico (apresentada tanto cargas negativas como positivas mas a somatória das cargas e zero). Os surfactantes podem ser usados para realizar a lise celular (liberando assim as proteínas), para solubilizar proteínas de membrana e lipídios, entre outras funções. Quando utilizados para a extração das proteínas, os surfactantes podem ser classificados como não desnaturantes ou desnaturantes. Como exemplo de surfactantes desnaturantes, tem-se o dodecil sulfato de sódio, que é um surfactante aniônico. O modo de ação deste surfactante ocorre via quebra

da membrana e desnaturação das proteínas através da ruptura das interações proteína-proteína. Já como exemplo de surfactantes não desnaturantes, tem-se os iônicos ou zwitterionicos. O modo de ação dos surfactantes não-iônicos se dá através do comprometimento da integridade das membranas das células, facilitando portanto a extração das proteínas solúveis, muitas vezes na sua forma nativa.

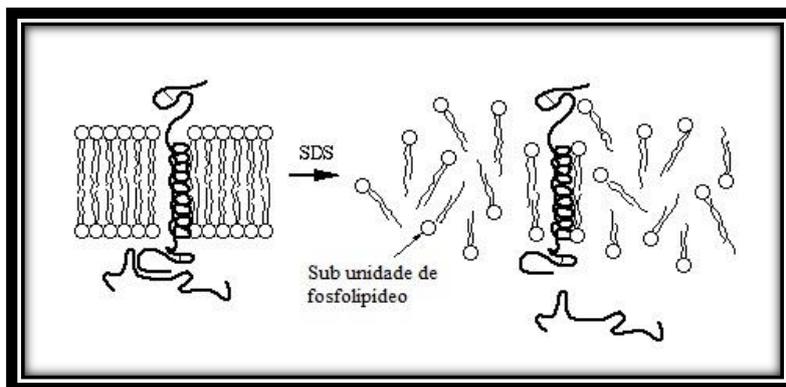


Figura 31 - Ruptura de membrana lipídica e extração de uma proteína de membrana através do uso de um surfactante aniônico, no caso SDS.

Deste modo, escolheu-se para tentar extrair as proteínas presentes na *R. madagascariensis* dois tipos de surfactantes, um desnaturante, o SDS, e outro não-desnaturante, o BRIJ[®]35. Observou-se que a solução de SDS, após a extração, tornou-se azul. Um espectro de ultravioleta desta solução foi obtido para avaliar as absorções na faixa do ultravioleta e visível.

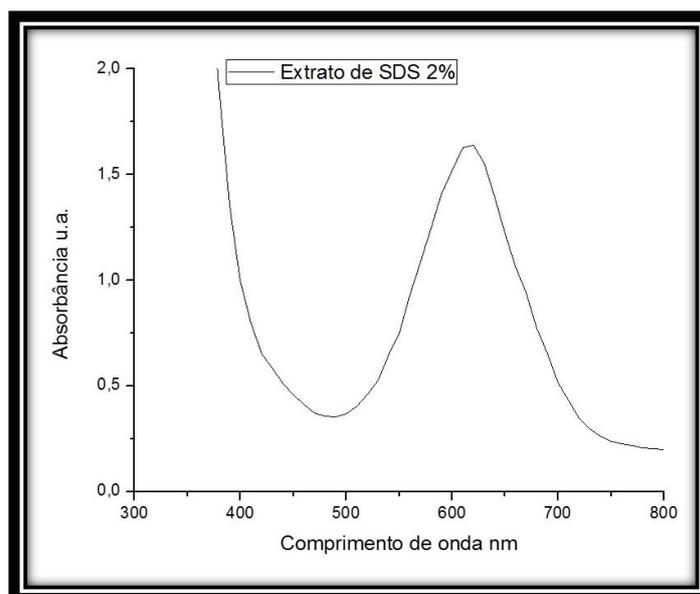


Figura 32- Espectro no ultravioleta do extrato dos arilos em SDS 2%.

O extrato de SDS quando armazenado a -20°C é estável, o que facilita a análise e a manipulação das amostras.

5.9. ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DOS ARILOS.

Após a confirmação da presença de proteínas, envolvidas no processo de geração da cor azul dos arilos da *R. madagascariensis*, com os dados acima expostos, partiu-se para a análise da(s) proteína(s) responsável(eis) pela coloração. Usou-se métodos clássicos de análise como a eletroforese em gel e a cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa.

5.9.1. Preparo das amostras e doseamento das proteínas totais.

A solubilidade das proteínas nos solventes aquosos dependerá dos resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos presentes na superfície da mesma. A adição de um solvente orgânico miscível, como a acetona, à solução pode causar a precipitação das proteínas, devido à diminuição da constante dielétrica do meio, o que causa a agregação e precipitação das proteínas presentes no meio (Barritault *et al.*, 1976). Uma amostra proteica mantida em condições ambientes, na ausência de inibidores de proteases e estabilizantes, faz com que este extrato perca seu conteúdo proteico por causa das reações de oxidação e/ou hidrólise que ocorrem em solução. Das amostras preparadas tem-se 4 extratos de surfactantes e 3 extratos ácidos, totalizando 7 amostras.

A dosagem das proteínas totais nas amostras foi feita através do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979). Tal método consiste na quantificação das proteínas através da mudança de coloração da solução, devido a reação dos sais de cobre (II) com as ligações peptídicas em condições alcalinas. O produto desta reação é um composto de coloração azul, por isso a leitura foi feita no comprimento de onda de 660nm. A mudança da cor da solução é proporcional a concentração de proteínas na amostra, o que possibilita a estimativa do teor de proteínas através do uso da curva analítica exibida abaixo:

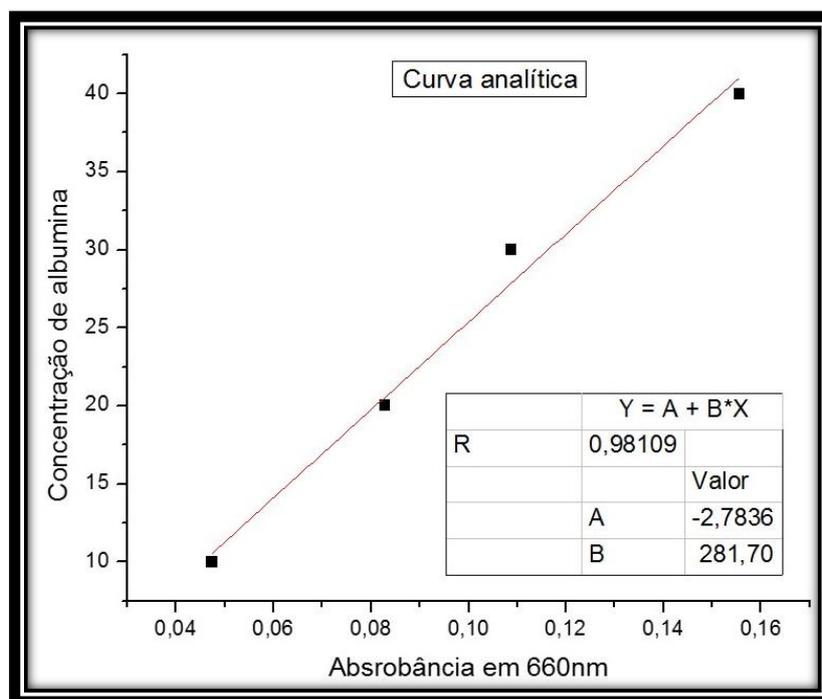


Figura 33 - Curva analítica para doseamento de proteínas usando o método de Lowry.

A equação da reta para esta curva é da forma $Y = -2,78 + 281,70 \cdot X$.

Tabela 17 – Teor de proteínas nas amostras de SDS e HOAc.

Extrato	Cor	HPLC	Eletroforese	[Proteínas]
SDS bruto	Azul	Sim	Sim	4,01µg/µL
SDS ppt	Azul	Sim	Sim	2,51µg/µL
SDS sobrenadante	Incolor	Sim	Sim	1,34µg/µL
SDS velho	Marrom	Sim	Sim	5,78µg/µL
HOAc bruto	Azul	Não	Sim	***
HOAc ppt	Azul	Não	Sim	0,73µg/µL
HOAc sobrenadante	Azul	Não	Sim	1,20µg/µL

*** Neste caso, não calculou-se o teor de proteínas.

O fato do extrato em ácido acético, após a precipitação das proteínas, permanecer azul sugere que o cromóforo responsável pela coloração não se encontra ligado covalentemente à proteína, mas sim mantido por interações intermoleculares, ou que durante o processo de extração, por utilizar-se elevadas temperaturas e um meio ácido, a ligação entre o cromóforo e a proteína seja rompida.

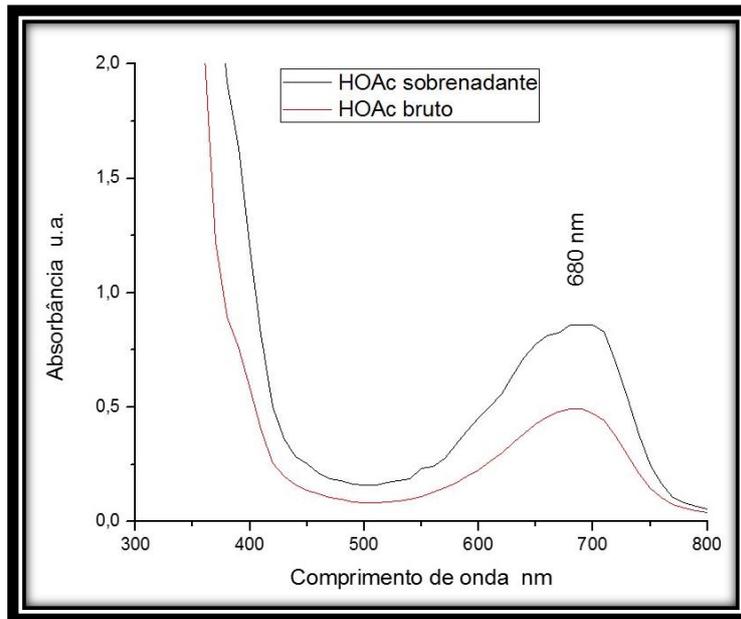


Figura 34 - Espectro no ultravioleta na faixa de 200 a 800nm. Extratos de ácido acético bruto e o sobrenadante após a precipitação das proteínas.

A extração com a solução de dodecil sulfato de sódio, por ser mais branda, permite que as interações intermoleculares ou ligações covalentes, entre a proteína e o cromóforo se mantenham. Desse modo, obtém-se um extrato incolor após a precipitação das mesmas.

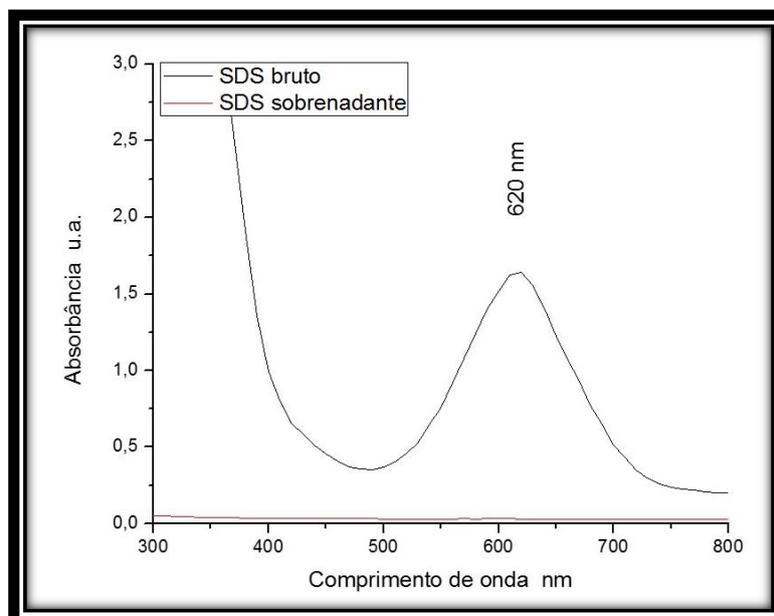


Figura 35 - Espectro no ultravioleta na faixa de 200 a 800nm. Extratos de dodecilsulfonato de sódio bruto e sobrenadante após a precipitação das proteínas.

A presença de proteínas nos sobrenadantes, tanto do extrato em SDS, quanto do extrato de HOAc, indica que a precipitação com acetona não foi total e apenas uma parte das proteínas presentes foram precipitadas. Embora a mesma técnica de espectroscopia eletrônica, análise por ultravioleta, ser utilizada para as amostras de SDS ($\lambda_{\max} = 600\text{nm}$) e HOAc ($\lambda_{\max} = 680\text{nm}$) não se pode realizar comparações entre os resultados, posto que o solvente utilizado nesta técnica interfere com a posição do λ_{\max} dos compostos analisados. No entanto, estas absorções em 600 e 680nm estão compreendidas na faixa de absorção das ficobilinas, tetrapirróis lineares usualmente encontrados nos cloroplastos das algas vermelhas ou em cianobactérias, e ligadas covalentemente a proteínas, conhecidas como ficobiliproteínas (Heocha, 1963; Crespi *et al.*, 1968; Beuhler *et al.*, 1976; Beale, 1993; Glazer, 1994). As ficobilinas, do ponto de vista químico, são estruturalmente muito semelhantes à bilirrubina, recentemente descrita por Pirone *et al.*, na *S. nicolai*. Por serem tetrapirróis, assim como a bilirrubina, geram um resultado positivo para o teste de Ehrlich, o que encontra-se de acordo com os dados obtidos neste trabalho (O'carra e Colleran, 1970; O'carra *et al.*, 1980; Grossman *et al.*, 1993; Nogales e Lightner, 1995; Fevery, 2008; Pirone *et al.*, 2009; Pirone, 2010; Cron *et al.*, 2012).

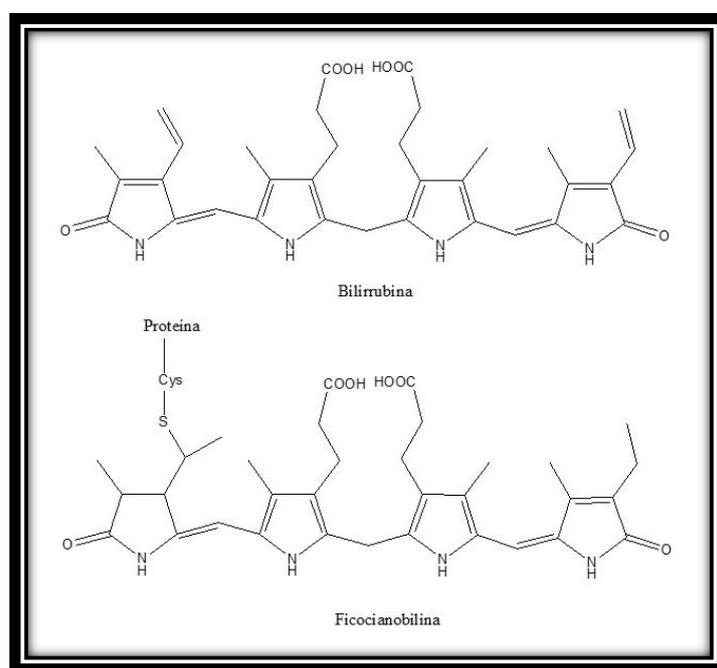


Figura 36 - Estrutura química da bilirrubina e da ficocianobilina.

5.9.2. Perfil proteico das amostras por RP-HPLC.

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) se tornou uma ferramenta bem estabelecida e amplamente utilizada para a análise de biomoléculas. O termo RP-HPLC se aplica devido à presença de um grupo apolar (hidrofóbico) ligado quimicamente à fase estacionária da coluna de HPLC. A separação na RP-HPLC ocorre então com base na hidrofobicidade dos compostos. A razão da RP-HPLC apresentar tanto sucesso é a sua resolução. Esta técnica é capaz de distinguir entre compostos que são extremamente similares, como por exemplo, a separação de proteínas com estruturas primárias que se diferenciam apenas por um resíduo de aminoácido. A retenção de proteínas e peptídeos na RP-HPLC ocorre geralmente através da combinação de mecanismos do tipo adsorção/dessorção e um mecanismo do tipo de partição, diferentemente das moléculas menores que, normalmente, separam-se estritamente pelo mecanismo de partição. A impressão digital hidrofóbica da proteína adsorve ao revestimento da coluna (no caso uma fase de C18) e a medida que as condições da fase móvel são alteradas, normalmente com o aumento da porção orgânica, a proteína é dessorvida e eluída da coluna. A figura abaixo representa um esquema simplificado desta descrição.

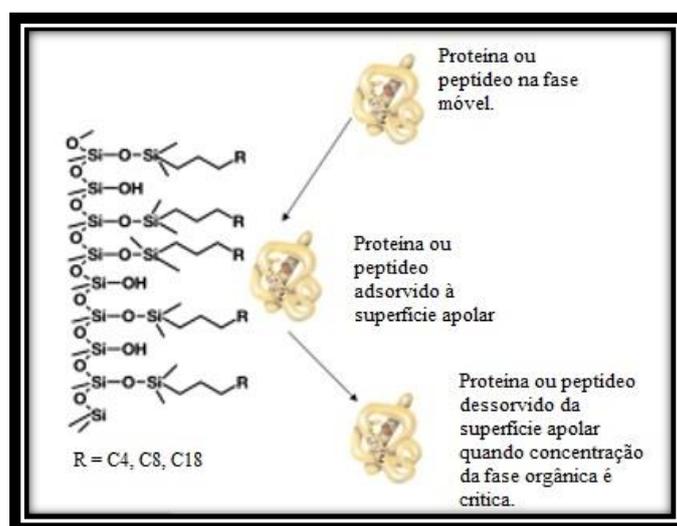


Figura 37 - Interação de uma proteína/peptídeo com a fase reversa da coluna de RP-HPLC.

A detecção das proteínas analisadas pode ser realizada usando o ultravioleta distante ou o ultravioleta próximo nos comprimentos de onda 214 e 280nm respectivamente. A ligação peptídica absorve fortemente no ultravioleta distante com um

máximo em 190nm. Este comprimento de onda já foi utilizado para detecção das proteínas, entretanto devido à absorção das moléculas de oxigênio nesta faixa do espectro, as medidas passaram a ser realizadas em 205 e 214nm, contudo estes comprimentos de onda também apresentam uma desvantagem que é a necessidade da calibração do espectrofotômetro para o ultravioleta distante. Uma terceira opção de trabalho é a detecção indireta das proteínas no ultravioleta próximo, no comprimento de onda de 280nm, que depende do conteúdo dos aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e uma pequena colaboração de resíduos de fenilalanina e ligações dissulfeto. A desvantagem deste método é a interferência de ácidos nucleicos que absorvem fortemente em 280nm.

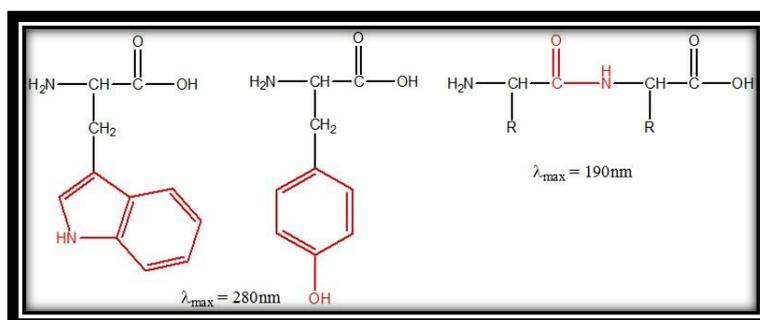


Figura 38- Representação dos grupos cromóforos responsáveis pela absorção em 190 e 280nm.

Tendo em mente estas vantagens, a análise dos extratos de SDS_{bruto} e SDS_{sobrenadante} foram realizadas e o perfil proteico obtido encontra-se ilustrado abaixo:

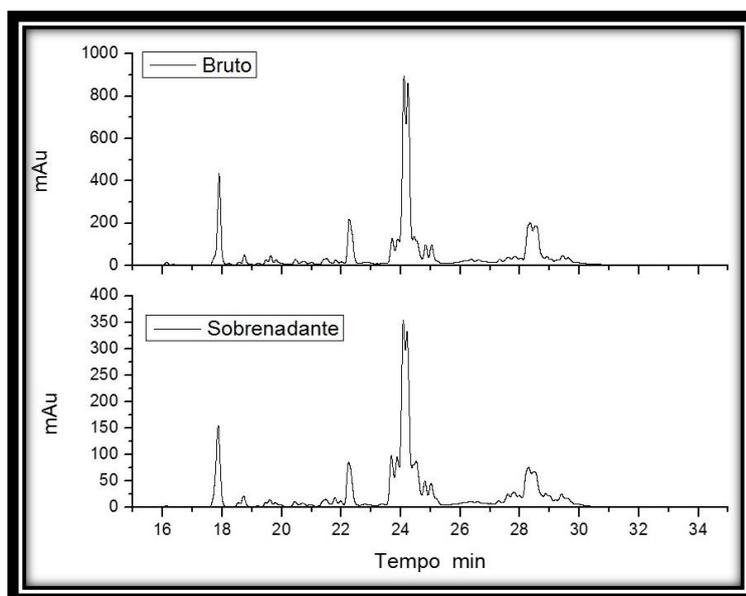


Figura 39- Cromatograma do extrato de SDS bruto e sobrenadante dos arilos da *R. madagascariensis*. Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm.

A diminuição da intensidade relativa no extrato de SDS sobrenadante é esperada, visto que no processo de precipitação das proteínas adiciona-se 500 μ L de acetona na amostra, o que causa a diluição dos constituintes da mesma. O mesmo perfil proteico em ambas as amostras sugere que a proteína associada ao processo de geração da cor não é nenhuma das aqui encontradas, uma vez que o extrato do sobrenadante é incolor.

A precipitação com acetona a frio “mostrou-se seletiva” a uma proteína em específico que apresenta um tempo de retenção, no método utilizado, de 26,74min. Esta proteína está diretamente ligada ao fenômeno químico de produção de cor nos arilos da *R. madagascariensis*, posto que o seu extrato apresenta uma coloração azul. No extrato bruto, ao expandir a faixa de 26 a 28min, nota-se a presença de dois picos que estão em uma concentração relativa muito baixa na amostra.

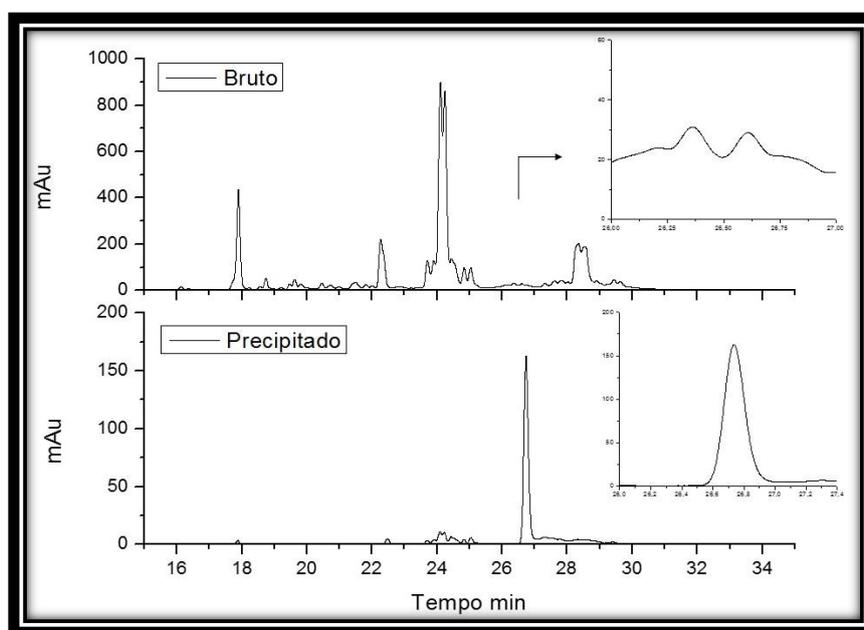


Figura 40- Cromatograma do extrato de SDS bruto e precipitado de proteínas dos arilos da *R. madagascariensis*. Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm.

Uma vez que os extratos de SDS_{bruto} e SDS_{precipitado} apresentam, em solução, uma coloração azul, é possível a comparação entre as absorções detectadas no canal de 280nm com as do canal de 600nm.

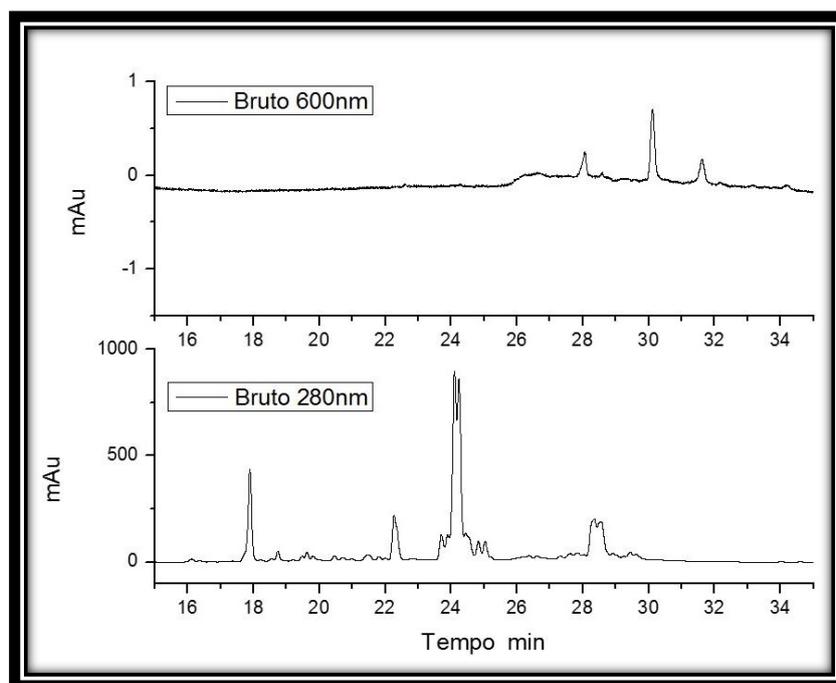


Figura 41- Cromatograma do extrato de SDS bruto dos arilos da *R. madagascariensis*. Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases móveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm e 600nm.

A presença de absorções no comprimento de onda de 600nm reforça a hipótese da geração da cor através de um fenômeno químico. O fato destas absorções não apresentarem nenhuma correlação com as observadas em 280nm sugere fortemente que a proteína responsável pela cor azul possui um grupo cromóforo associado de forma não covalente, ou seja, através de interações intermoleculares, com a proteína. Deste modo, o cromóforo e a proteína não necessitam obrigatoriamente de apresentarem o mesmo tempo de retenção, pois a medida que a força do solvente é variada, ocorre a separação da proteína e do cromóforo, que é baseada nas propriedades físicas dos compostos. As absorções em 600nm possuem um tempo de retenção maior que o composto detectado em 280nm, o que indica que o cromóforo apresenta um maior caráter apolar que a proteína.

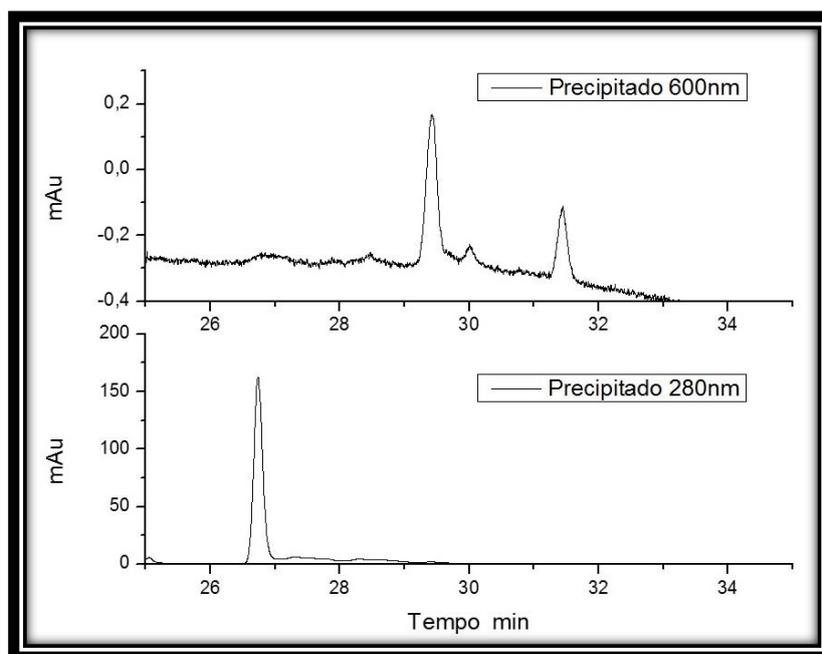


Figura 42- Cromatograma do extrato de SDS precipitado dos arilos da *R. madagascariensis*. Utilizou-se um gradiente exploratório com as fases moveis água 0,1% ácido fórmico e acetonitrila, variou-se de 0 a 100% de acetonitrila. Detecção a 280nm e 600nm.

Os extratos em ácido acético não puderam ser analisados por RP-HPLC, pois a coluna C-18 utilizada apresenta uma faixa de pH de trabalho que varia de 3-8 unidades. Uma vez que o pH destas amostras encontra-se abaixo desta faixa de trabalho não foi possível analisa-las.

5.9.3. Perfil proteico das amostras por eletroforese.

A eletroforese é o processo em que moléculas carregadas se movem em uma solução através da aplicação de um campo elétrico, durante o processo eletroforético a mobilidade dos compostos dependerá da sua forma, carga e tamanho (Derua e Bossuyt, 2002). Esta mobilidade é também influenciada pela concentração, tipo e pH do tampão utilizado, pela temperatura e força do campo aplicado (Garfin, 1990). A técnica de eletroforese é comumente utilizada para separação de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e também para separação de moléculas mais simples como: açúcares carregados, peptídeos e aminoácidos (Judd, 1994). Na eletroforese a amostra é adicionada em um poço de gel stacking. Este gel apresenta uma porosidade maior, permitindo que as moléculas a serem separadas se agreguem no limite deste quando é iniciada a aplicação da voltagem (Goldenberg e Creighton, 1984). Desta forma,

todos os compostos penetrarão no gel de corrida, onde serão separados por sua carga, tamanho e forma, juntos.

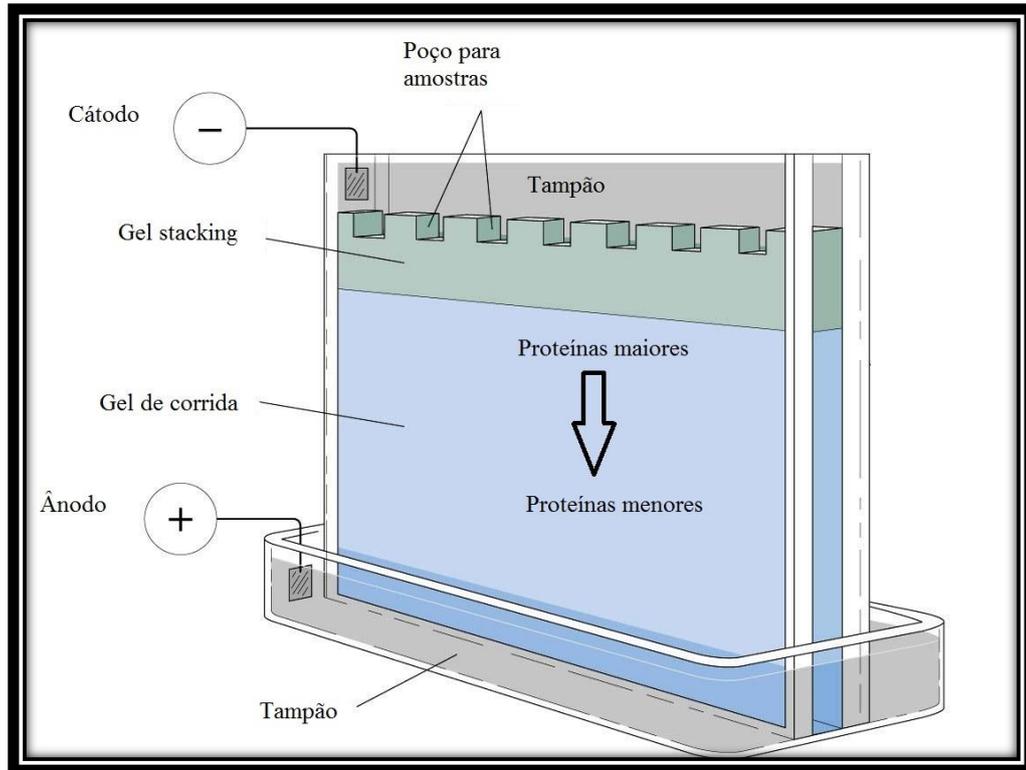


Figura 43 - Esquema de uma eletroforese em gel de poliacrilamida.

As matrizes de corrida são necessárias para que haja a separação, e elas podem ser compostas de diferentes materiais como: papel, acetato de celulose e géis de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida são as matrizes mais comuns, e o tamanho dos poros no gel é determinado pela quantidade de agente reticulante e de poliacrilamida total (Alfenas, 2006).

Neste trabalho, utilizou-se a técnica denominada SDS-PAGE, realizada em géis de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio, que consiste na separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. O SDS, em solução, pode existir nas formas de monômeros ou micelas, e a concentração de cada forma dependerá da concentração de SDS, temperatura e força iônica da solução (Silva e Souza, 2009).

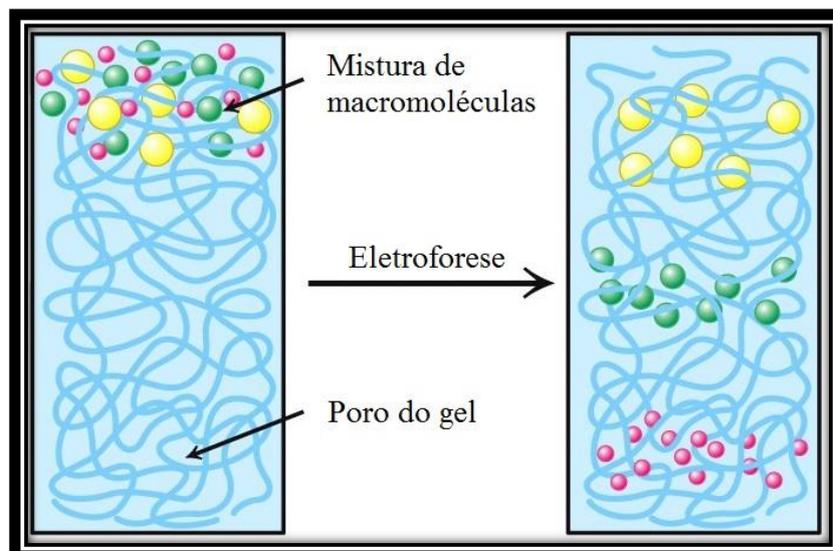


Figura 44 -Separação por tamanho de macromoléculas em um gel de poliacrilamida. O complexo de proteínas-SDS que é carregado negativamente migra em direção ao ânodo (carregado positivamente) e os poros do gel faz com que ocorra uma separação das moléculas.

Quando na presença de proteínas, o SDS forma um complexo, SDS-Proteína, de interações não covalentes (Weber e Kuter, 1971). Apesar deste complexo apresentar uma semelhança a um sistema micelar, o mesmo resulta da interação entre monômeros de SDS com a proteína e não da incorporação da macromolécula numa micela ou da adição de micelas a superfície externa da proteína (Reynolds e Tanford, 1970). A introdução do dodecil sulfato de sódio no sistema de eletroforese permite que limitações de sistema do tipo PAGE, géis de poliacrilamida nativo, sejam superadas (Pereira *et al.*, 1983), pois o SDS presente no tampão desnatura e isola as proteínas uma das outras, o que gera uma série de benefícios, como:

- I. Uma carga negativa global nas proteínas, pois o SDS é uma molécula carregada negativamente mascarando assim a carga intrínseca da proteína, uma vez que ele se liga de forma não covalente a mesma.
- II. Uma razão similar de carga/massa para todas proteínas na mistura, posto que o SDS se liga a uma razão constante de aproximadamente 1,4g de SDS para 1g de proteína, que corresponde a uma estequiometria de aproximadamente uma molécula de SDS para cada dois aminoácidos (Pitt-Rivers e Impiombato, 1968; Nelson, 1971).
- III. Uma conformação linear nas proteínas, em vez de uma complexa estrutura terciária.

Como resultado temos que a velocidade com que um complexo de SDS-proteína migra no gel de poliacrilamida, contendo SDS, depende principalmente do seu tamanho, o que possibilita a determinação do peso molecular de compostos presentes na amostra (Fernandez *et al.*, 1998).

A detecção das proteínas no gel é realizada através da reação com o azul brilhante de Comassie, que se liga a todas as proteínas presentes na amostra de forma inespecífica e quase estequiometricamente, permitindo a inferência sobre a quantidade relativa de proteína na amostra (Wirth e Romano, 1995). Este corante pode se encontrar em três formas distintas, a neutra, a catiônica e a aniônica. Destas formas, apenas duas são capazes de ligar-se à proteína, pois as interações eletrostáticas e interações de Van de Waals, que promovem esta interação, não estão presentes na forma catiônica (De Moreno *et al.*, 1986).

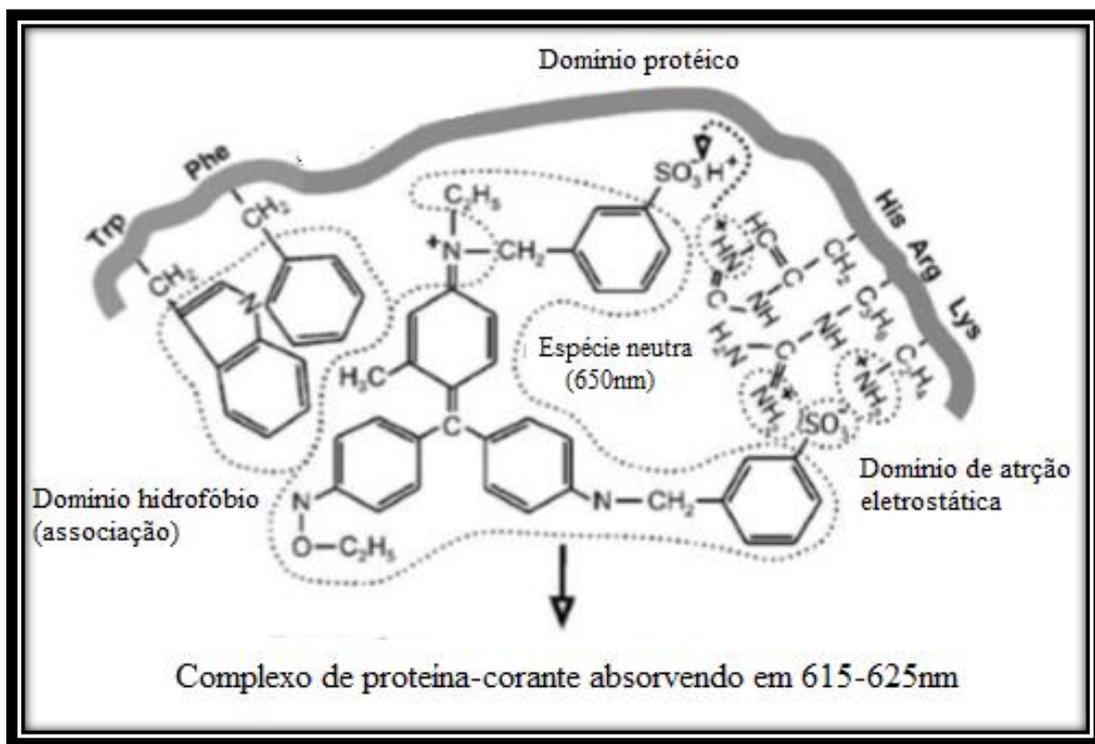


Figura 45 - Espécie neutra ligando-se à proteína tanto por interações hidrofóbicas (Phe, Trp) como por atrações eletrostáticas (grupo sulfônico interagindo com os nitrogênios carregados).

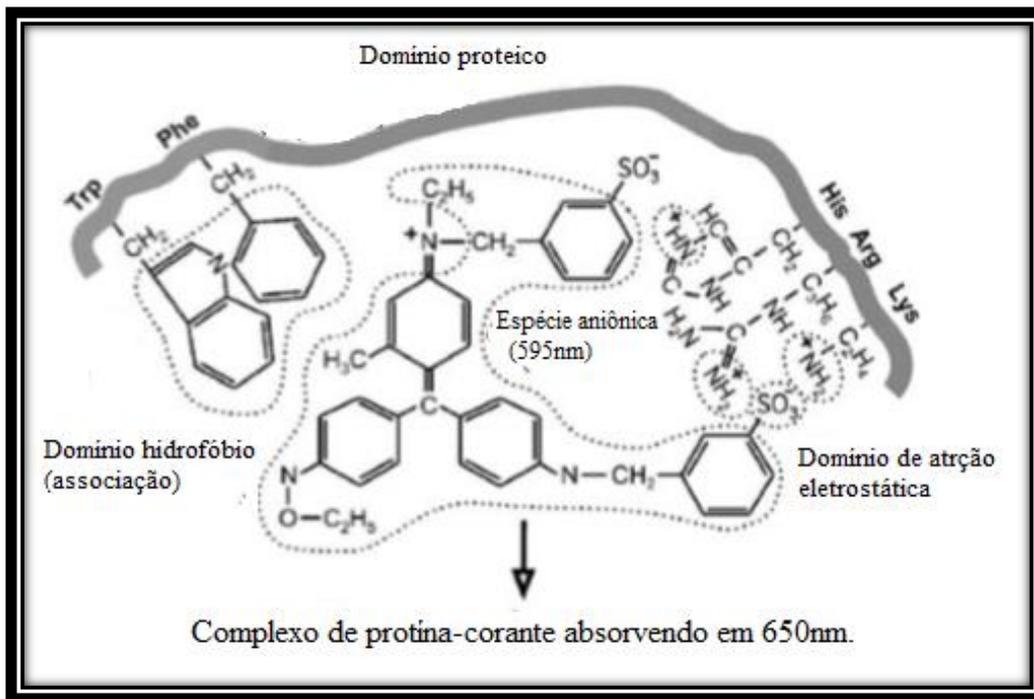


Figura 46 - A espécie aniônica liga-se às proteínas principalmente através das interações eletrostáticas (grupo sulfônico interagindo com os nitrogênios carregados).

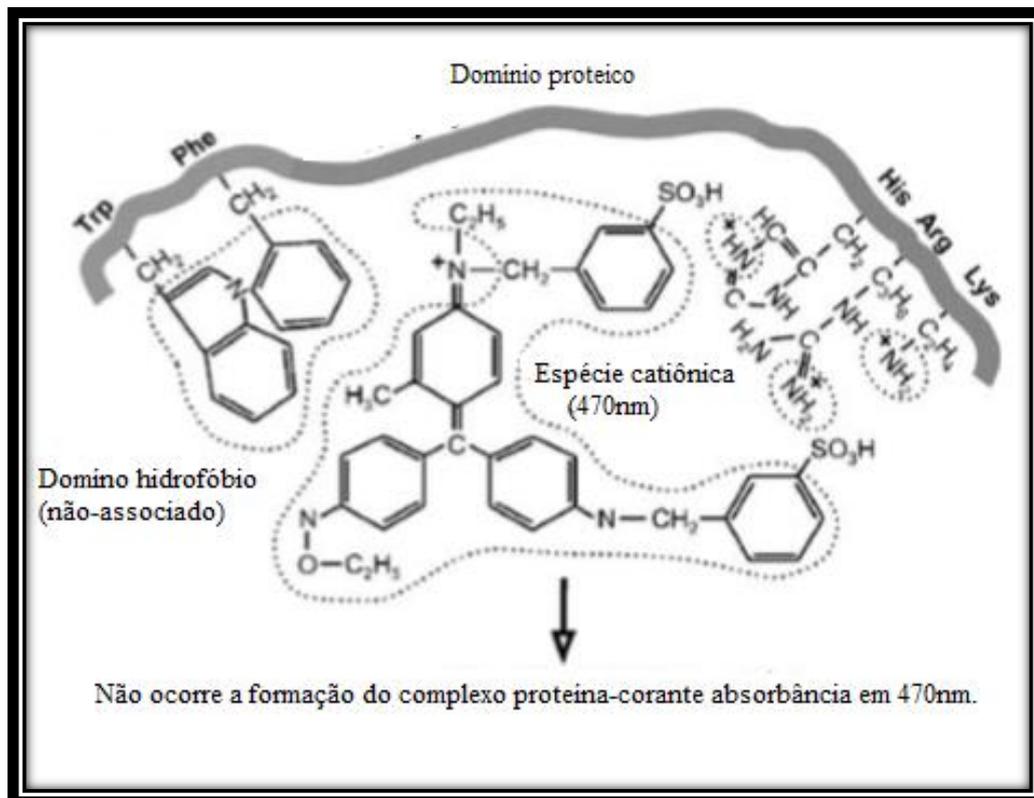


Figura 47 - A espécie catiônica não forma um complexo com a proteína pois sua absorbância não muda (470nm).

Tendo em vista as vantagens e informações possíveis de se obter com essa técnica, as amostras de SDS e HOAc foram analisadas. Para uma melhor comparação e avaliação da presença ou ausência de determinadas proteínas nas amostras, todas foram preparadas de modo a obter uma quantidade final de proteína total em cada poço de 50 µg. Os géis foram revelados com azul brilhante de Comassie e os volumes utilizados no preparo das amostras estão descritos abaixo:

Tabela 18 - Amostras para eletroforese

Amostra	[Proteínas]	V _{amostra}	V _{tampão de amostra}	V _{água}	V _{final}
SDS novo	4,01µg/µL	12,47µL	7,5µL	40,00µL	60µL
SDS ppt	2,51µg/µL	19,92µL	7,5µL	32,60µL	60µL
SDS sobre	1,34µg/µL	37,31µL	7,5µL	15,20µL	60µL
SDS velho	5,78µg/µL	10,38µL	7,5µL	42,11µL	60µL
HOAc bruto	***	52,00 µL	7,5µL	0 µL	60µL
HOAc sobre	1,20 µg/µL	41,67µL	7,5µL	11,00µL	60µL
HOAc ppt	0,73 µg/µL	52,00 µL	7,5µL	0 µL	60µL

*** Neste caso, não foi calculado.

O perfil eletroforético das amostras analisadas encontra-se ilustrado na figura 48. Nas amostras em ácido acético não foi possível observar nenhuma proteína no gel. O motivo para tal fato é que as proteínas na solução de HOAc encontram-se com uma carga total positiva, o que faz com que migrem para o polo negativo no sistema de eletroforese. Contudo, no experimento realizado não se tem um gel para observar esta faixa, o que causa o acúmulo da amostra no próprio gel stacking. Visto isso, nada se pode afirmar sobre a presença ou ausência de proteínas neste extrato. Dos extratos de SDS, tem-se quatro tipos de amostras:

SDS_{bruto} = Corresponde a extração do corante com uma solução de SDS 2% sem nenhum tratamento posterior.

SDS_{sobrenadante} = Corresponde ao sobrenadante do extrato bruto após a precipitação das proteínas com acetona.

SDS_{precipitado} = Corresponde ao precipitado de proteínas ressolubilizado em uma solução de SDS 2%.

SDS_{velho} = Corresponde ao extrato de SDS bruto mantido em condições ambientes na ausência de estabilizantes ou inibidores de proteases, o que facilita a oxidação ou hidrólise do conteúdo proteico da amostra.

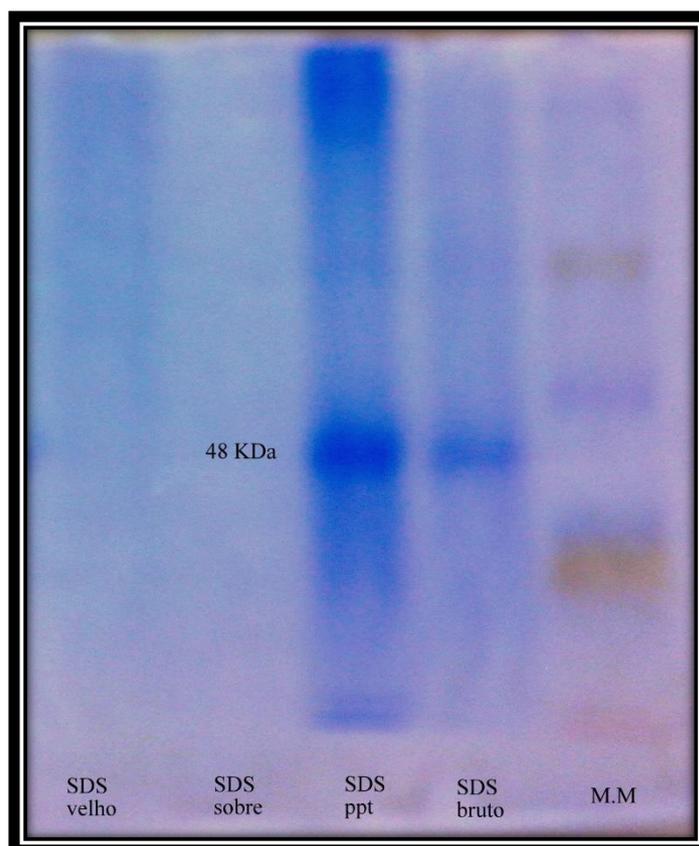


Figura 48 - Perfil eletroforético dos extratos de dodecilsulfonato de sódio em um gel de poliacrilamida 10%. Voltagem aplicada de 100V durante o período de 1h25min. Comparação das bandas obtidas com um padrão de peso molecular (MM).

O perfil proteico do extrato de $\text{SDS}_{\text{bruto}}$ e $\text{SDS}_{\text{precipitado}}$ são muito semelhantes. Nota-se que na extração com SDS 2% ocorre, preferencialmente, a retirada de um grupo de proteínas com peso molecular na faixa de 31 a 52KDa. No extrato de $\text{SDS}_{\text{precipitado}}$ pode-se visualizar, além destas proteínas, outros dois grupos distintos, as proteínas de maior peso molecular que se encontram retidas na base do gel de corrida e as proteínas mais leves que estão no limite do mesmo. Com a finalidade de obter uma melhor estimativa do peso molecular da proteína detectada na faixa de 31 a 52KDa, construiu-se a curva analítica abaixo, que leva em consideração o peso molecular dos compostos presentes padrão de peso molecular e o seu deslocamento no gel de corrida.

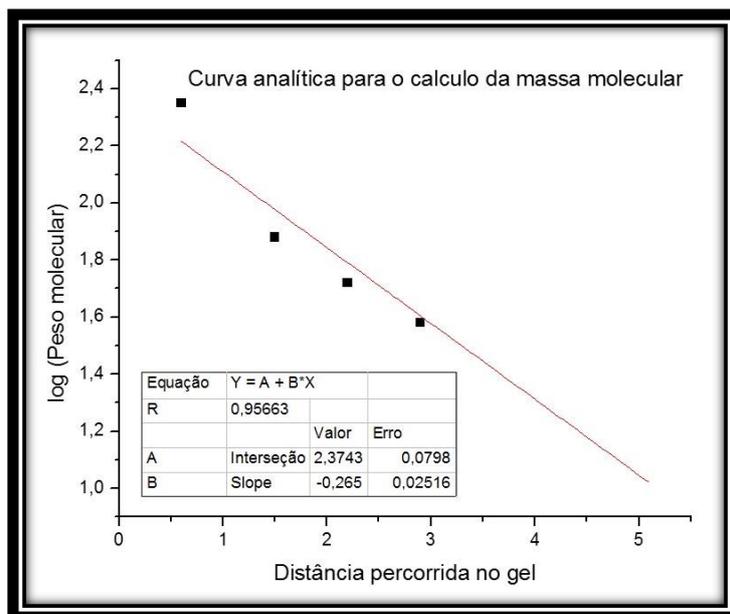


Figura 49 - Curva analítica utilizada no cálculo da massa molecular dos compostos separados por eletrofose em gel.

O deslocamento da proteína visualizada nas amostras de $\text{SDS}_{\text{bruto}}$ e $\text{SDS}_{\text{precipitado}}$ no gel é de 2,6cm o que corresponde a um valor de aproximadamente 48KDa. A intensificação desta mancha na amostra de $\text{SDS}_{\text{precipitado}}$ (extrato de cor azul) e a ausência nas amostras de $\text{SDS}_{\text{sobrenadante}}$ e $\text{SDS}_{\text{velho}}$ (extratos incolor e marrom, respectivamente) sugerem fortemente a presença de uma proteína envolvida no processo de formação da cor e que esta proteína apresenta uma massa de aproximadamente 48KDa. Na tentativa de se obter uma melhor separação desta mancha, uma segunda corrida eletroforética foi realizada, utilizando um gel de corrida com uma quantidade maior de acrilamida, o que reduz o diâmetro dos poros no gel. Dessa forma, as proteínas em geral apresentarão uma menor mobilidade, fazendo com que a corrida fique mais longa e a separação mais efetiva. O perfil eletroforético do gel a 15% encontra-se ilustrado na figura 50.

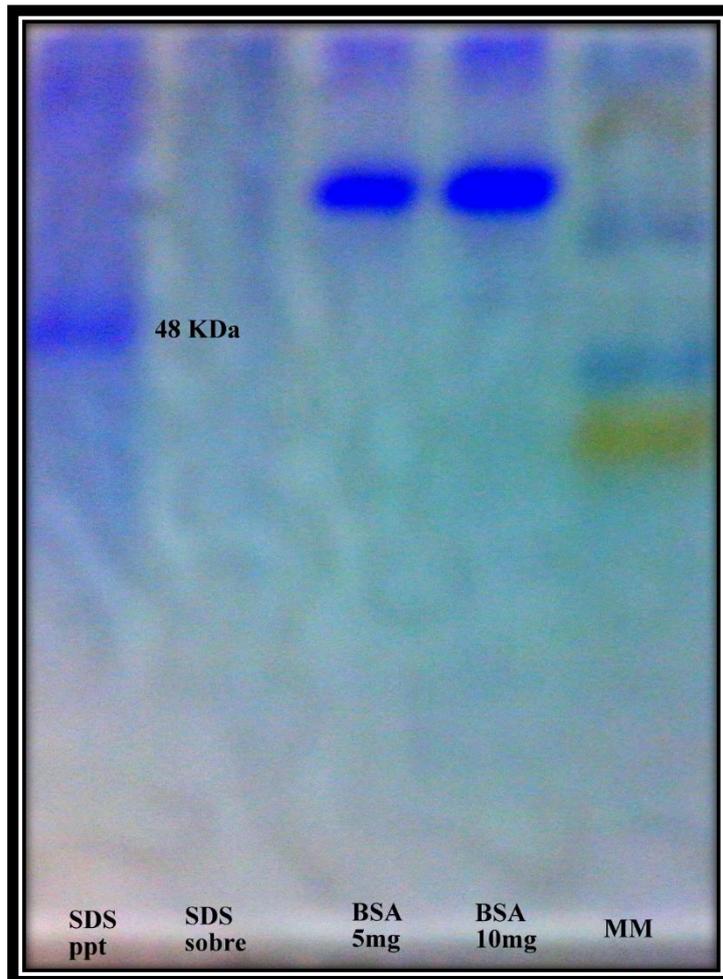


Figura 50 - Perfil eletroforético dos extratos de dodecilsulfonato de sódio em um gel de poliacrilamida 15%. Voltagem aplicada de 100V durante o período de 3h. Comparação das bandas obtidas com um padrão de peso molecular (PM) e um padrão de albumina de soro bovino BSA (63KDa).

O resultado esperado não foi alcançado, pois não se observou a separação da banda de 48KDa, apenas sua retenção no gel devido ao menor diâmetro dos poros.

A busca no banco de dados de proteínas, EXPASY, exhibe um total de 91 proteínas descritas por inferência pertencentes a *R. madagascariensis*, no entanto nenhuma destas apresenta uma massa com o valor próximo da proteína aqui descrita.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho descreve a análise das macromoléculas apolares e polares contida nos arilos da *R. madagascariensis*. Na fração apolar dos arilos, identificou-se a presença de triglicerídeos através da análise de RMN de ^1H desta fração. Os ácidos graxos que compõem a mesma foram obtidos através de uma reação de transesterificação e analisados por GC-MS, e sua identificação realizada por meio do cálculo do índice de Kováts e da comparação dos tempos de retenção com padrões sintetizados. Os quatro componentes principais, presente nesta fração são os ácidos: palmítico (C16:0, 41%), esteárico (C18:0, 14%), oleico (C18:1 ω ₉_{cis}, 34%, que corresponde ao somatório dos ácidos elaídico e oleico) e linoleico (C18:2 ω ₆, 7%).

A análise da fração polar dos arilos, que consiste na extração, isolamento e identificação do pigmento azul presente nos mesmos, mostrou-se extremamente complexa. De todos os solvente e soluções testados, apenas o ácido acético e a solução de dodecil sulfato de sódio na concentração de 2% foram capazes de extrair o pigmento. Destes extratos apenas o de SDS mostrou-se estável, quando armazenado a -20°C , por períodos maiores que dois meses.

Os extratos de HOAc e SDS apresentam absorções no ultravioleta nos comprimentos de 680 e 620nm, respectivamente. Estes dados, junto com os ensaios enzimáticos, confirmam que a geração da cor nos arilos se dá por um processo químico e não devido a um fenômeno de interferência ondulatória como descrito na literatura. A faixa de 590 a 700nm no ultravioleta, onde estão inclusos os extratos de HOAc e SDS, é característica das ficobilinas, tetrapirróis lineares, o que sugere a presença desta classe de compostos na amostra. Outro dado experimental que corrobora para esta hipótese é o resultado positivo no ensaio de Ehrlich, que é específico para grupamentos pirrólicos ou indólicos.

O estudo dos grupos funcionais presentes no arilo, através das técnicas de infravermelho e Raman, indicam a presença de uma proteína, que é comprovado devido as bandas de amida I, II e III características de proteínas presentes na amostra. Além de indicar a presença da proteína, a análise por Raman também sugere a ausência de metais como Cu e Zn na estrutura proteica, visto que não se encontra absorções na faixa de 500 a 200cm^{-1} , faixa característica de absorções entre metais e nitrogênio ou oxigênio.

O perfil proteico do extrato de SDS foi obtido tanto por HPLC, quanto por eletroforese. No experimento de HPLC, notou-se a presença de um pico com tempo de retenção 26,74min, na amostra de SDS_{precipitado}, que está diretamente relacionado com a geração da cor, uma vez que este extrato apresenta uma coloração azul. A comparação dos canais de 280 e 600nm sugere que o cromóforo esteja ligado de forma não covalente à proteína, pois o tempo de retenção dos compostos detectados no canal de 600nm não coincidem com os obtidos em 280nm. Também pode-se notar que esta proteína encontra-se em uma concentração relativa muito baixa na amostra bruta. Através da eletroforese em gel, pode-se estimar o peso molecular desta proteína que é da ordem de 48KDa.

Neste cenário, descreve-se pela primeira vez a presença de uma proteína, com peso molecular de aproximadamente 48KDa, associada de forma não covalente a um grupamento cromóforo, possivelmente da classe das ficobilinas, responsável pela coloração azul nos arilos da *Ravenala madagascariensis*. Para a completa elucidação estrutural da proteína, recomenda-se como trabalhos futuros, a obtenção de uma maior quantidade de amostra para realizar estudos com as técnicas de MALDI e degradação de Edman.

APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E ARTIGOS PUBLICADOS.

VICCINI, LYDERSON FACIO ; SILVEIRA, ROMENA SANGLARD ; DO VALE, ALINE AMÁLIA ; DE CAMPOS, JOSÉ MARCELLO SALABERT ; REIS, ARYANE CAMPOS ; DE OLIVEIRA SANTOS, MARCELO ; CAMPOS, VICTORIA RABELO ; CARPANEZ, ARTHUR GIRARDI ; GRAZUL, RICHARD MICHAEL . Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products* (Impresso) **JCR**, v. 59, p. 14-19, 2014.

TAVARES, T.T. ; PASCHOAL, D. ; MOTTA, E.V.S. ; CARPANEZ, A.G. ; LOPES, M.T.P. ; FONTES, E.S. ; DOS SANTOS, H.F. ; SILVA, H. ; GRAZUL, R.M. ; Fontes, A.P.S. . Platinum(II) and palladium(II) aryl-thiosemicarbazone complexes: Synthesis, characterization, molecular modeling, cytotoxic and antimicrobial activity. *Journal of Coordination Chemistry* (Impresso) **JCR**, v. 67, p. 1-21, 2014.

MACHADO, RACHEL R. P. ; JARDIM, DEBORAH F. ; SOUZA, ANDREZZA R. ; SCIO, ELITA ; FABRI, RODRIGO L. ; CARPANEZ, ARTHUR G. ; GRAZUL, RICHARD M. ; MENDONÇA, JOSÉ PAULO R. F. DE ; LESCHE, BERNHARD ; AARESTRUP, FERNANDO M. . The effect of essential oil of *Syzygium cumini* on the development of granulomatous inflammation in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* (Impresso) **JCR**, v. 23, p. 488-496, 2013.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, R. S.; BUTLER, A. R. Electrophilic substitution in pyrroles. Part I. Reaction with 4-dimethylaminobenzaldehyde (Ehrlich's reagent) in acid solution. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 6, p. 696-701, 1976.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e Marcadores Bioquímicos em Plantas e Microrganismos**. 2ª Edição. Editora UFV, 2006.

ANDRE, P.; GARCIA, M. **Dyestuffs of plant origin and use thereof for colouring compositions, in particular cosmetic compositions** 2009.

ANDRE, P.; GARCIA, M. **Dyestuffs of plant origin and use thereof for colouring compositions, in particular cosmetic compositions** 2011a.

ANDRE, P.; GARCIA, M. **Matieres colorantes d'origine vegetale et leur utilisation pour colorer des compositions, en particulier cosmetiques** 2011b.

BARRITAU, D. et al. The Use of Acetone Precipitation in the Isolation of Ribosomal Proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 131-135, 1976.

BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. **Q Rev Biophys**, v. 35, n. 4, p. 369-430, 2002.

BEALE, S. I. Biosynthesis of phycobilins. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 2, p. 785-802, 1993.

BEUHLER, R. J. et al. Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. **J Biol Chem**, v. 251, n. 8, p. 2405-11, 1976.

BIDLINGMEYER, B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.

BRADY, J. D.; ROBINS, S. P. **Method of assaying pyrrole-containing biological compounds**. 2003.

C. MARSHALL, J. G. **Fruit and Seed Production: Aspects of Development, Environmental Physiology and Ecology**. 1. Cambridge University Press: 2008.

CRESPI, H. L.; SMITH, U.; KATZ, J. J. Phycocyanobilin. Structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. **Biochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2232-42, 1968.

CRON, G. V. et al. Phylogenetic Relationships and Evolution in the Strelitziaceae (Zingiberales). **Systematic Botany**, v. 37, n. 3, p. 606-619, 2012.

DE MORENO, M. R.; SMITH, J. F.; SMITH, R. V. Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 9, p. 907-911, 1986.

DERUA, R.; BOSSUYT, X. Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Application of DNA and Protein Separations. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 803-804, 2002.

DONALD L. PAVIA, G. M. L., GEORGE S. KRIZ. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª Edição Norte-americana. CENGAGE, 2010.

ENDRESS, P. K. Arils and aril-like structures in woody ranales. **New Phytologist**, v. 72, n. 5, p. 1159-1171, 1973.

FEELEY-HARNIK, G. Ravenala Madagascariensis Sonnerat: The Historical Ecology of a “Flagship Species” in Madagascar. **Ethnohistory**, v. 48, n. 1-2, p. 31-86, 2001.

FERNANDEZ, J.; GHARAH DAGHI, F.; MISCHÉ, S. M. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Electrophoresis**, v. 19, n. 6, p. 1036-1045, 1998.

FEVERY, J. Bilirubin in clinical practice: a review. **Liver Int**, v. 28, n. 5, p. 592-605, 2008.

FLORENCE, T.; GAN, D.; HINES, M. **Topical skin care formulations comprising plant extracts** 2012.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

FRIEDMAN, M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 385-406, 2004.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. (Mestrado). INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

GARFIN, D. E. **One-dimensional gel electrophoresis**. 1990. 425-41.

GIRAL, F. Nota preliminar sobre el arilo de la semilla de la palma del viajero. **Ciencia**, v. 7, p. 308-309, 1946.

GLAZER, A. Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105-112, 1994.

GOLDENBERG, D. P.; CREIGHTON, T. E. Gel electrophoresis in studies of protein conformation and folding. **Analytical Biochemistry**, v. 138, n. 1, p. 1-18, 1984.

GROSSMAN, A. R. et al. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. **Microbiol Rev**, v. 57, n. 3, p. 725-49, 1993.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 1-4, p. 207-221, 1999.

HEATHCOTE, J. G. The analysis by TLC of the amino acids of protein hydrolysates and of biological fluids. **Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles**, v. 16, n. 1-4, p. 85-91, 1968.

HEOCHA, C. Ó. Spectral Properties of the Phycobilins. I. Phycocyanobilin*. **Biochemistry**, v. 2, n. 2, p. 375-382, 1963.

JUDD, R. Electrophoresis of Peptides. In: WALKER, J. (Ed.). **Basic Protein and Peptide Protocols**: Humana Press, v.32, 1994. cap. 8, p.49-57.

KERESZTURY, G. Raman Spectroscopy: Theory. In: (Ed.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

KINOSHITA, S.; YOSHIOKA, S. Structural Colors in Nature: The Role of Regularity and Irregularity in the Structure. **Chem Phys Chem**, v. 6, n. 8, p. 1442-1459, 2005.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 39, n. 8, p. 549-59, 2007.

KRESS, W. J. The Phylogeny and Classification of the Zingiberales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, n. 4, p. 698-721, 1990.

LOWRY, O. H. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAITI, N. C. et al. Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: alpha-synuclein. **J Am Chem Soc**, v. 126, n. 8, p. 2399-408, 2004.

MANTOURA, R. F. C.; LLEWELLYN, C. A. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 151, n. 0, p. 297-314, 1983.

MAO, D.-J. Z., YA-LING. Review of research situations of natural blue edible pigments in China. **Zhongguo Shipin Tianji**, n. Issue4, p. Pages149-155, 2011

MAO, D. Z., YALING. Research situations of natural blue pigments in China. **Zhongguo Tiaoweipin**, v. Volume36, n. Issue10, p. Pages109-114, 2011

MASON, C. W. Structural Colors in Feathers. I. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 201-251, 1922.

MESSERSCHMIDT, A. Metal sites in small blue copper proteins, blue copper oxidases and vanadium-containing enzymes. In: HILL, H. A. O.; SADLER, P. J., et al (Ed.). **Metal Sites in Proteins and Models Redox Centres**: Springer Berlin Heidelberg, v.90, 1998. cap. 2, p.37-68.

MILLER, J. M.; WRIGHT, J. W. Spot indole test: evaluation of four reagents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 589-592, 1982.

NELSON, C. A. The Binding of Detergents to Proteins: I. The maximum amount of dodecyl sulfate bound to proteins and the resistance to binding of several proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 12, p. 3895-3901, 1971.

NEWSOME, A. G.; MURPHY, B. T.; BREEMEN, R. B. V. Isolation and Characterization of Natural Blue Pigments from Underexplored Sources. In: (Ed.). **Physical Methods in Food Analysis**: American Chemical Society, v.1138, 2013. cap. 8, p.105-125. (ACS Symposium Series).

NOGALES, D.; LIGHTNER, D. A. On The Structure of Bilirubin in Solution: C{1H} heteronuclear overhauser effect nmr analyses in aqueous buffer and organic solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 1, p. 73-77, 1995.

NORRIS, G. E.; ANDERSON, B. F.; BAKER, E. N. Blue copper proteins. The copper site in azurin from *Alcaligenes denitrificans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 10, p. 2784-2785, 1986.

O'CARRA, P.; COLLERAN, E. Separation and identification of biliverdin isomers and isomer analysis of phycobilins and bilirubin. **Journal of Chromatography A**, v. 50, n. 0, p. 458-468, 1970.

O'CARRA, P.; MURPHY, R. F.; KILLILEA, S. D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. **Biochem J**, v. 187, n. 2, p. 303-9, 1980.

O'NEAL, C. L.; CROUCH, D. J.; FATAH, A. A. Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drugs of abuse. **Forensic Sci Int**, v. 109, n. 3, p. 189-201, 2000.

ORDONEZ, M. V. et al. Secondary structure determination by FTIR of an archaeal ubiquitin-like polypeptide from *Natrialba magadii*. **Eur Biophys J**, v. 40, n. 9, p. 1101-7, 2011.

P. BLANC, A. H., N. RABENANDRIANINA, J.S. ROBERT* AND C.M. HLADIK. The variants of *Ravenala* in natural and anthropogenic habitats. In: (Ed.). **The Natural History of Madagascar**. The University of Chicago Press, Chicago & London: Goodman, S.M. & Benstead, J., 2003. p.472-476.

PARKER, A. R.; MARTINI, N. Structural colour in animals—simple to complex optics. **Optics & Laser Technology**, v. 38, n. 4–6, p. 315-322, 2006.

PEREIRA, H. G. et al. Comparasion of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 483-490, 1983.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 201-220, 1979.

PIERLOOT, K. et al. Relation between the Structure and Spectroscopic Properties of Blue Copper Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 50, p. 13156-13166, 1998.

PIRONE, C. et al. Animal Pigment Bilirubin Discovered in Plants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 8, p. 2830-2830, 2009.

PIRONE, C. L. **Bilirubin: an Animal Pigment in the Zingiberales and Diverse Angiosperm Orders**. 2010. (Doctor). Florida International University

PITT-RIVERS, R.; IMPIOMBATO, F. S. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. **Biochem. J.**, v. 109, n. 5, p. 825-830, 1968.

RABARISOA, I.; GAYDOU, E. M.; BIANCHINI, J.-P. COMPOSITION DES HUILES EXTRAITES DU FRUIT DE *Ravenala madagascariensis*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 61, n. 3, p. 691-695, 1981.

RENIMEL, I.; ANDRE, P. **Extract of the plant ravenala madagascariensis and use as cosmetic hydrating agent 2011.**

REYNOLDS, J. A.; TANFORD, C. Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, n. 3, p. 1002-1007, 1970.

RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, p. 1-9, 2012.

SATO, O.; KUBO, S.; GU, Z.-Z. Structural Color Films with Lotus Effects, Superhydrophilicity, and Tunable Stop-Bands. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2008.

SCOTT-ELLIOT, G. F. Note on the Fertilisation of *Musa*, *Strelitzia reginae*, and *Ravenala madagascariensis*. **Annals of Botany**, v. os-4, n. 2, p. 259-264, 1890.

SHAI, Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 10, p. 2306-2313, 2013.

SHAWKEY, M. D.; HILL, G. E. Significance of a basal melanin layer to production of non-iridescent structural plumage color: evidence from an amelanotic Steller's jay (*Cyanocitta stelleri*). **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt 7, p. 1245-50, 2006.

SILVA, R. D. S.; SOUZA, C. R. B. D. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 255-260, 2009.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. tradução da 8ª edição. 2006.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 1, p. 19-38, 2004.

SUREWICZ, W. K.; MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. **Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 389-394, 1993.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.

TUMA, R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 4, p. 307-319, 2005.

VIGNOLINI, S. et al. Pointillist structural color in Pollia fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. 15712-15715, 2012.

W. JOHN KRESS, G. E. S., MICHEL ANDRIANIFAHANANA, HILARY SIMONS MORLAND. Pollination of *Ravenala madagascariensis* (Sterlitziaceae) by lemurs in Madagascar: evidence for an archaic coevolutionary system? **American Journal of Botany**, v. 81, n. 5, p. 542-551, 1994.

WEBER, K.; KUTER, D. J. Reversible Denaturation of Enzymes by Sodium Dodecyl Sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 14, p. 4504-4509, 1971.

WEBERLING, F. **Morphology of Flowers and Inflorescences**. Cambridge University Press, 1989.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; MAYO, S. J. Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family araceae. **Phytochemistry**, v. 20, n. 2, p. 217-234, 1981.

WIRTH, P. J.; ROMANO, A. Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 698, n. 1-2, p. 123-143, 1995.