

REC-01

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA.

Adamir da Rocha Nina Junior⁽¹⁾; Silvana C. Pando⁽²⁾; José Francisco de C. Gonçalves⁽²⁾;

⁽¹⁾ Bolsista PIBIC/CNPq; ⁽²⁾ Pesquisador INPA/CPST

As sementes de leguminosas apresentam alta concentração de proteínas, incluindo os inibidores de proteinases, que são proteínas que atuam especificamente sobre as enzimas proteolíticas. (Macedo *et al.*, 2003). Embora estes compostos estejam envolvidos em vários processos metabólicos nas plantas, o destaque é para a sua atuação como mecanismo de defesa contra o ataque de insetos e patógenos, devido à sua capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas (Bazock *et al.*, 2005). Considerando a importância destas moléculas para as plantas, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença de inibidores de proteinases em sementes de duas espécies de leguminosas da flora amazônica, *Caesalpinia ferrea* Martius var. *cearensis* e *Ormosia costulata* (Miq.) Klein. var. *trifoliolata* (Huber) Amsh. Para a extração das proteínas, as sementes foram trituradas e homogeneizadas em solução salina. A suspensão obtida foi centrifugada e, após diálise, o sobrenadante foi utilizado para caracterizar a atividade dos inibidores nos extratos totais. As concentrações relativas de proteínas foram estimadas pela medida da absorbância a 280 nm e pelo método descrito por Bradford (1976). O perfil protéico das sementes foi monitorado por eletroforese em SDS-PAGE. A enzima tripsina bovina foi previamente titulada e utilizada para detecção e análise da atividade inibitória nos extratos. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C e, após adição do substrato BAPNA, a reação ocorreu durante 30 minutos a 37°C. A hidrólise do substrato foi monitorada fotometricamente a 410 nm. Após a quantificação de proteínas, pôde-se verificar maior concentração protéica no extrato das sementes de *O. costulata* var. *trifoliolata* do que em *C. ferrea* var. *cearensis* (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação das frações protéicas nos extratos totais de sementes de *C. ferrea* var. *cearensis* e *O. costulata* var. *trifoliolata*.

Espécie	A (280 nm)	Bradford (1976) (µg/mL)
<i>C. ferrea</i>	1,714	64,13
<i>O. costulata</i>	2,523	246,79

Os dados obtidos pela curva de inibição da tripsina bovina, com diferentes concentrações de extrato de *C. ferrea* var. *cearensis*, indicaram que a atividade residual da enzima (ARE) decresceu com o

aumento das concentrações do extrato, indicando a presença de inibidores, que podem pertencer à família Kunitz, uma vez que estas proteínas são abundantes nesta subfamília. Na presença de 1,28 µg e 2,56 µg de inibidor, a atividade da enzima foi reduzida em 78,5% e 97,15%; respectivamente. O extrato total de *O. costulata* var. *trifoliolata*, não apresentou especificidade pela tripsina bovina. Estes resultados evidenciam que as subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae podem diferir quanto à presença de inibidores. O perfil eletroforético revelou que a migração das bandas protéicas foi similar nos extratos de ambas as espécies tanto na presença quanto na ausência do agente redutor (Figura 1). O extrato de *O. costulata* var. *trifoliolata* apresentou intensa coloração de proteínas com massa molecular aparente variando entre 20-25 kDa e também entre 40-50 kDa. No entanto, no extrato de *C. ferrea* var. *cearensis*, foi possível observar bandas protéicas mais nítidas com massa molecular aparente menor que 10 kDa.

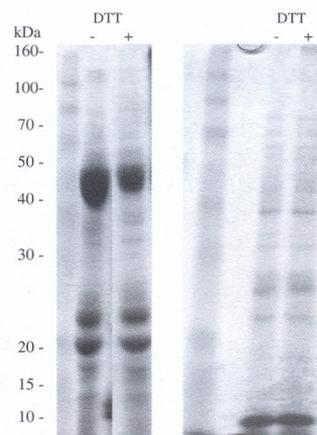


Figura 1: Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% de amostras em condições redutoras (DTT +) e não-redutoras (DTT -). A: 30µg de extrato protéico de *O. costulata* var. *trifoliolata* B: 30µg de extrato protéico de *C. ferrea* var. *cearensis*.

Os resultados permitiram concluir que somente o extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* apresentou inibidor específico para a tripsina bovina, podendo ser caracterizado como inibidor de serinoproteinase.

Macedo, M. L. R.; Freire, M. das G. M.; Cabrini, E. C.; Toyama, M. H.; Novello, J. C. Marangoni, S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621:170-182.

Bažock, R.; Barčić, I. J.; Edwards, C. R. 2005. Effects of proteinase inhibitors on western corn rootworm life parameters. *Journal of Economic Entomology*, 4:185-190

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254