



DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES CISTEÍNICAS, PEROXIDASES E INIBIDORES DE PAPAÍNA EM SEMENTES DE *Crotalaria spectabilis*

Victor Paulo Mesquita Aragão(1) - Valdanya Mara Pereira Aguiar (2) - Antonio Silvio do Egito (3) - Murilo Sérgio da Silva Julião (4) - Lúcia Betânia da Silva Andrade(5) -

1. Bolsista CNPq/IC/UVA - 2. Bolsista CNPq/IC/UVA - 3. Pesquisador/Embrapa Caprinos - 4. Prof. Adjunto/Química/UVA - 5. Profa. Dra. Orientadora/Biologia/UVA -

PALAVRAS-CHAVE

leguminosa, cistatinas, inibidores de proteases

APOIO

UVA/CNPq/FINEP

INTRODUÇÃO

Vegetais são uma rica fonte de proteínas bioativas de amplo interesse e variadas aplicações. Proteases, peroxidases e inibidores de proteases são foco de diversas pesquisas no intuito de investigar a funcionalidade e uso dessas biomoléculas em diversas áreas. Proteases cisteínicas são importantes para o desenvolvimento das plantas, participando em processos como a mobilização de proteínas de reserva, senescência e morte celular programada (HAQ, 2004). Peroxidases ocorrem amplamente em vegetais e estão envolvidas em vários processos do metabolismo, podendo ser empregadas na construção de biosensores e em muitos processos industriais (FATIBELO e VIEIRA, 2002). Proteínas inibidoras de proteases são moléculas que inibem a atividade de enzimas proteolíticas participando nos processos de regulação endógena e na defesa das plantas (HAQ, 2004). *Crotalaria spectabilis* é uma leguminosa de ampla ocorrência no Ceará, sendo conhecida por sua resistência a nematóides fitopatogênicos (WANG, 2002).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos detectar e quantificar enzimas proteolíticas, peroxidases e inibidores de proteases cisteínicas em sementes de *Crotalaria spectabilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *C. spectabilis* foram coletadas na cidade de Sobral. Para a obtenção de uma fina farinha, as sementes foram trituradas em moinho elétrico, maceradas e peneiradas. Para a determinação das melhores condições de extração das proteínas de interesse, foram utilizadas quatro soluções: tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6 e pH 7 e soluções de NaCl 0,15 M e 0,5 M. Proteínas solúveis foram extraídas da farinha, nas diferentes soluções, na proporção de 1:10 (m/v), sob agitação constante por 1 hora. Os extratos foram filtrados e centrifugados a 4000 x g, por 30 minutos, e o homogenato foi utilizado para quantificação de proteínas totais solúveis (BRADFORD, 1976), atividade peroxidásica (FATIBELO e VIEIRA, 2002), proteases cisteínicas e seus inibidores (ABE, 1987). Para a detecção da atividade de inibidores de proteases cisteínicas os extratos foram aquecidos a 100°C, por 5 minutos, com o objetivo de eliminar a possível presença de atividade proteolítica endógena.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a quantidade de proteínas extraídas usando tampão fosfato 0,2M, pH 7 (5,20 mg/mL) e solução de NaCl 0,15M (5,28 mg/mL) foi maior do que as extraídas usando tampão fosfato 0,2 M pH 6 (3,69 mg/mL) e solução de NaCl 0,5 M (2,5 mg/mL). Os resultados da detecção de peroxidases mostraram que em todos os extratos houve presença de atividade peroxidásica, sendo apresentada maior atividade específica (U/mg) nos de pH 6 (33 U/mg) e na solução de NaCl 0,5 M (33,4 U/mg). Os extratos obtidos em tampão fosfato pH 7 e solução de NaCl 0,15 M apresentaram 21 U/mg e 14,9 U/mg, respectivamente. Foi possível também detectar a presença de proteases cisteínicas e altos níveis de inibidores de papaína em extratos protéicos totais, havendo uma inibição de 100% da atividade da papaína. Embora *C. spectabilis* seja uma planta de larga ocorrência no Nordeste, poucos são os estudos relacionados à bioatividade de proteínas dessa espécie vegetal.

CONCLUSÕES

As sementes de *C. spectabilis* contém quantidades abundantes de proteínas, dentre estas, peroxidases, proteases cisteínicas e inibidores de proteases cisteínicas sendo as sementes de *C. spectabilis* uma rica fonte dessas biomoléculas com potencial aplicação nas mais diversas áreas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABE, M., et al. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 51, n. 1, p. 2763-2768, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 2, 1976.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos vegetais e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, p. 455-464, 2002.
- HAQ, S. K. et al. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 431, p. 145-159, 2004.
- WANG, K. H. et al. *Crotalaria* is a cover crop for management: a review. *Nematropica*, v. 32, n. 1, 2002. WANG, K. H., et al. *Nematropica*, v. 32, n. 1, 2002.