

CARACTERÍSTICAS DE PROTEÍNAS E DE OUTROS COMPOSTOS NITROGENADOS EM SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA

Anna Carolina de Souza HANNA¹, José Francisco de Carvalho GONÇALVES²,
Larissa Ramos CHEVREUIL³

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ²Co-orientador CPST/INPA; ³Orientadora/Bolsista PCI/ CNPq

1. Introdução

Sementes de leguminosas, em geral, possuem altos teores de proteínas de reserva (20 a 30% da massa seca), cuja função é armazenar, principalmente, nitrogênio e enxofre (Buckeridge *et al.*, 2004). Essas proteínas estão distribuídas em diferentes classes, podendo ser fracionadas em: globulinas, albuminas, prolaminas, glutelinas ácidas ou básicas quanto a sua solubilidade (Osborne, 1924; Buckeridge *et al.*, 2004). Dentre os diferentes grupos funcionais de proteínas presentes nas sementes de leguminosas, as lectinas e os inibidores de proteinases constituem duas classes importantes na defesa das plantas contra o ataque de insetos e patógenos (Chrispeels e Raikhel, 1991; Mosolov e Valueva, 2005). Além da presença de proteínas como fonte de nitrogênio para os processos metabólicos, estas sementes possuem outros compostos nitrogenados, como por exemplo, os ureídeos (alantoína e ácido alantóico), que são moléculas orgânicas ricas em nitrogênio, resultantes da associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Gomes, 1982; Quiles *et al.*, 2009). Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o conteúdo de proteínas de sementes de leguminosas da Amazônia, investigando a composição protéica quanto as classes de solubilidade (globulinas, albuminas, prolaminas e glutelinas), além de confirmar ou não a presença de inibidores de serinoproteinases, lectinas e ureídeos.

2. Material e Métodos

Sementes de dez espécies de leguminosas arbóreas da flora Amazônica: *Campsiandra comosoa* Benth, *Centrosema triquetum* (Benth) Benth, *Copaifera venezuelana* Harms & Pittier, *Crudia oblonga* Benth, *Dalbergia spruceana* (Benth) Benth, *Dinizia excelsa* Ducke, *Macrolobium multijugum* (DC.) Benth, *Macrosamanea spruceana* (Benth), *Ormosia smithii* Rudd e *Swartzia laevicarpa* Amshoff, provenientes do banco de leguminosas em estudo no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal, foram trituradas em moinho analítico (10 g) e posteriormente homogeneizadas em solução salina (NaCl 0,5 M), ácida (HCL 0,1 M) e básica (NaOH 0,1 M) na proporção de 1:10 (m/v) sob agitação constante durante 4 horas, para o fracionamento de albuminas e globulinas, glutelinas ácidas e glutelinas básicas, respectivamente. A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica como padrão. Os compostos nitrogenados foram extraídos de acordo com a metodologia de Bielski (1966), e quantificados pela análise colorimétrica de derivados de glioxilato como descrito por Vogels e Van der Drift (1970). As leituras foram realizadas a $\lambda = 535$ nm, utilizando alantoína como padrão. Para a detecção da atividade inibitória da tripsina bovina, 30 μ L de solução de tripsina 1% (em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5) foram adicionados às amostras (200 μ L), com o tampão de diluição citado completando o volume final de 500 μ L e, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 200 μ L de BApNA 1,25 mM foram adicionados e incubados a 37°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 150 μ L de ácido acético a 30%. A leitura espectrofotométrica foi realizada a $\lambda = 405$ nm. No ensaio de detecção de atividade inibitória de quimotripsina bovina, 50 μ L de solução de quimotripsina 2% (em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) foram adicionados à amostra (200 μ L), com o tampão de diluição citado completando o volume final de 500 μ L e, incubados a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 200 μ L de Azocaseína 1% (diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) foram adicionados e incubados a 37°C durante 1 hora. A reação foi interrompida com a adição de 300 μ L de TCA 20% (ácido tricloroacético). As amostras foram centrifugadas a 3250 g, durante 20 minutos e, 400 μ L do sobrenadante obtido foram alcalinizados com 400 μ L de NaOH 2 N. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a $\lambda = 420$ nm. A atividade hemaglutinante (AHE) nos extratos protéicos foi testada por meio de ensaios de aglutinação, utilizando eritrócitos de diferentes animais (camundongo, coelho, hamster e rato branco), previamente preparados

(suspensão de eritrócitos 2%). Para este ensaio, utilizou-se placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, preenchidos com 25 µL de solução salina (NaCl 0,15 M), 25 µL da suspensão de eritrócitos (2%) e 25 µL do extrato protéico. As placas foram incubadas durante 30 min a 37°C e, os resultados analisados visualmente, após 30 min e 12 horas do período de incubação.

3. Resultados e discussão

Os teores de proteínas variaram entre as classes protéicas e entre as espécies de acordo com o fracionamento utilizando diferentes extratores, sendo, de modo geral, as glutelinas ácidas a classe protéica majoritária para todas as subfamílias (Tabela 1).

Ao avaliar cada subfamília, observou-se que *D. spruceana*, *S. laevicarpa* e *M. spruceana* foram as espécies com os maiores percentuais protéicos nas subfamílias Papilionoideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae, respectivamente.

Estes resultados divergem dos encontrados em sementes de *Sesbania pachycarpa*, *Milletia thonningii*, *Mucuna utilis* e *M. cochichi-nensis*, todas pertencentes à subfamília Papilionoideae, onde a classe majoritária de proteínas foram as globulinas (Ezeagu e Gowda, 2005).

Tabela 1 – Teor de proteínas em diferentes classes protéicas e de ureídeos em sementes de leguminosas arbóreas.

Sufamílias/ Espécies	Proteínas (%)				Ureídeos (%)
	Albuminas	Globulinas	Glutelinas		
			Ácidas	Básicas	
Papilionoideae					
<i>D. spruceana</i>	4,0	2,4	7,0	1,5	2,62 ± 0,1
<i>O. smithii</i>	1,8	1,7	1,2	1,2	1,38 ± 0,2
<i>C. triquetrum</i>	2,5	1,8	4,3	0,5	2,87 ± 0,1
Caesalpinoideae					
<i>C. venezuelana</i>	0	0,6	1,6	0,1	1,67 ± 0,2
<i>S. laevicarpa</i>	6,0	1,0	4,6	1,2	2,81 ± 0,1
<i>C. oblonga</i>	2,1	0	4,8	5,7	1,76 ± 0,2
<i>M. multijugum</i>	2,9	0,3	4,5	1,1	3,63 ± 0,1
<i>C. comosa</i>	4,2	3,5	1,0	1,7	2,40 ± 0,3
Mimosoideae					
<i>M. spruceana</i>	2,3	2,2	6,3	3,1	2,38 ± 0,3
<i>D. excelsa</i>	1,1	0,9	4,0	1,6	2,62 ± 0,1

Na subfamília Caesalpinoideae, os percentuais protéicos divergem dos encontrados em *Bauhinia variegata*, onde as maiores percentagens de proteínas estão compreendidas na classe das globulinas e glutelinas básicas (Pinto *et al.*, 2005). Ao passo que, *Prosopis africana* e *Anadenanthera pavonina* (Mimosoideae) apresentaram altos percentuais protéicos na glutelinas (Ezeagu e Gowda, 2005).

No que diz respeito aos ureídeos, estes desempenham papel essencial como transportadores das principais formas de nitrogênio em leguminosas noduladas tropicais (Raso *et al.*, 2007). De acordo com a quantificação desses compostos, observou-se que as dez espécies apresentaram altos níveis de ureídeos, quando comparados com *Phaseolus vulgaris*, com 0,1% de ureídeos de massa seca do cotilédone (Quiles *et al.*, 2009).

As espécies e as classes protéicas também divergiram quanto à inibição da atividade das enzimas tripsina e quimotripsina, sendo os percentuais inibitórios da tripsina, em geral, maiores que os da quimotripsina (Tabela 2).

Tabela 2 - Inibição da atividade da tripsina e quimotripsina bovina sobre o substrato BAPNA e Azocaseína, respectivamente, pelas diferentes subfamílias de leguminosas, após diferentes etapas de extração protéica.

Subfamília/ Espécies	Inibição da tripsina (%)				Inibição da quimotripsina (%)			
	Albumina	Globulina	Glutelina		Albumina	Globulina	Glutelina	
			Ácida	Básica			Ácida	Básica
Caesalpinoideae								
<i>C. venezuelana</i>	99	97	100	94	99	97	100	94
<i>S. laevicarpa</i>	80	92	100	84	48	16	53	11
<i>C. oblonga</i>	100	0	100	69	50	53	96	31
<i>M. multijugum</i>	44	100	100	74	92	67	98	3
<i>C. comosa</i>	76	93	83	65	63	60	70	26
Mimosoideae								
<i>M. spruceana</i>	100	95	100	100	97	47	100	45
<i>D. excelsa</i>	66	96	97	98	71	24	84	27
Papilionoideae								
<i>D. spruceana</i>	93	100	100	0	94	85	87	41
<i>O. smithii</i>	93	6	42	50	0	0	0	0
<i>C. triquetrum</i>	96	100	92	97	38	0	71	5

Dentre as subfamílias, a Mimosoideae destaca-se pelos maiores percentuais inibitórios tanto da tripsina quanto da quimotripsina. Em Caesalpinoideae, observa-se alta inibição da tripsina para todas as classes protéicas, com exceção das globulinas de *C. oblonga* (0%) e albuminas de *M. multijugum* (44%). Ao passo que, nas Papilionoideae as espécies exibiram altos percentuais principalmente na classe das albuminas e glutelinas ácidas.

Essa variação de inibição da atividade das duas enzimas testadas pode ser explicada pela diferença de especificidade de inibição enzimática, que é dependente da formação do complexo estável entre os aminoácidos presentes no sítio reativo do inibidor com os aminoácidos do sítio ativo da enzima. Isto sugere que há maior especificidade da tripsina com os inibidores do tipo Kuntiz, e tanto a tripsina quanto a quimotripsina com os inibidores do tipo Bowman-Birk (Haq *et al.*, 2004; Mosolov e Valueva, 2008).

Estudos realizados com outras leguminosas pertencentes à flora Amazônica também relatam essa diferença de especificidade de inibição entre tripsina e quimotripsina de inibidores presentes em extratos protéicos de sementes de leguminosas, onde *Cassia brasselari*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae* inibiram a atividade da tripsina e quimotripsina, enquanto *Cassia grandis* e *Inga fagifolia* inibiram especificamente a tripsina (Calderon *et al.*, 2001).

Os diferentes extratos protéicos das 10 espécies estudadas, quando ensaiados com diferentes eritrócitos (camundongo, hamster, rato branco e coelho) não apresentaram AHE, exceto na classe das glutelinas básicas de *D. excelsa*, quando ensaiadas com eritrócitos de coelho.

Para as classes das glutelinas básicas de *D. spruceana* e *C. oblonga*; albuminas, globulinas e glutelinas ácidas de *M. spruceana* e todas as classes protéicas de *S. laevicarpa* não foi possível analisar a AHE em virtude da hemólise (ruptura celular) dos eritrócitos testados, não permitindo que houvesse interação entre possíveis lectinas presentes nos extratos e os carboidratos da superfície celular.

Estudos realizados com *Bauhinia forficata* demonstram AHE em todas as classes protéicas testadas (globulinas, albuminas, glutelinas ácidas e básicas), sendo a glutelina ácida a classe com maior AHE (Faria *et al.*, 2004). Esses resultados divergem dos encontrados para as espécies estudadas, demonstrando a necessidade do tratamento dos extratos protéicos ou dos eritrócitos, com a finalidade de eliminar interferentes responsáveis por promoverem a hemólise dos eritrócitos (por exemplo, hemolisas ou saponinas).

4. Conclusão

De modo geral, nas dez espécies de leguminosas arbóreas estudadas, observou-se maior concentração de proteínas na classe das glutelinas ácidas, seguidas das albuminas e glutelinas básicas, além de demonstrarem potencial para o transporte de nitrogênio através dos ureídeos.

No que tange aos inibidores proteolíticos verificou-se potencial para aprofundar investigações sobre a inibição de serinoproteinases, em diferentes classes protéicas, em especial nas glutelinas ácidas e básicas. Adicionalmente, estas espécies também podem ser fontes da

classe protéica das lectinas, necessitando, para este caso, o aperfeiçoamento do tratamento das amostras, visando eliminar a hemólise das hemácias, para a confirmação da presença de tais moléculas.

5. Referências

- Bielski L.R., Turner N.A. 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17: 278 - 293.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-254.
- Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S. 2004. Acúmulo de reservas. In: Ferreira, A.G.; Borghetti (Eds). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre, p. 31- 50.
- Calderon, L.A., Teles, R. C. L., Leite, J. R. S. A., Bloch C. Jr., Astolfi-Filho, S.; Freitas, S. M. 2001. Serine protease inhibitors from amazom leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein and Peptide Letters*, 8(6): 485-493.
- Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V. 1991. Lectins, lectins genes and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3:1-9.
- Ezeagu, L. E.; Gowda, L. R. 2005. Protein extractability, fractionations and amino acid composition of some leguminous seeds found in Nigeria. *Jornal of Food Biochemistry*, 30: 1-11.
- Faria, R.A.P.G.; Andrade-Neto, M.; Pinto, L.S.; Castellón, R.R.; Cavada, B.S. 2004. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(3): 349-353.
- Gomes, M.A.F. 1982. *Metabolismo de ureídeos e asparagina durante a ontogenia do fruto de plantas de soja noduladas e não noduladas*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 138pp.
- Haq S.K., Atif S.M., Khan R.H, 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection.
- Mosolov, V.V.; Valueva, T. A. 2005. Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41 (3): 227-246.
- Mosolov, V.V.; Valueva, T.A. 2008. Proteinase inhibitor in plant biotechnonology: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(3): 261-269.
- Osborne, T.B. 1924. *The protein vegetable*. London, 154p.
- Pinto, L.S.; Andrade Neto, M.; Bacarin, M.A.; Castellón, R.R.; Gadelha, T.S.; Gadelha, C.A.; Cavada, B.S. 2005. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 9(3): 385-390.
- Quiles, F.A.; Raso, M.J.; Pineda, M.; Piedras, P. 2009. Ureide metabolism during seedling development in french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum*, 135: 19-28.
- Raso MJ, Pineda M, Piedras P. 2007. Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant*, 131: 355-366
- Vogels, G.D.; Van Der Drift, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivates. *Analytical Biochemistry*, 33:143-157.