



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

CARACTERIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE α -AMILASE ISOLADO DE SEMENTES DE *Ricinus communis* L.

Nascimento, V. V. e Machado, O. L. T. laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos – Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (LQFPP/CBB/UENF) Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil; vveigadonascimento@yahoo.com.br, Olga@uenf.br

RESUMO

Proteínas e peptídeos que inibem α -amilase vêm sendo isolados de plantas e microrganismos. Estes inibidores podem ter um importante papel no controle da atividade α -amilásica endógena ou na defesa contra o ataque de pragas e patógenos. Alguns destes inibidores são relatados por seus fatores antinutricionais. Sete famílias de inibidores protéicos de α -amilase são encontrados na natureza, definidos por sua similaridade de seqüência e estrutura tridimensional. Neste trabalho alguns peptídeos de sementes de *Ricinus communis* foram extraídos com etanol 50%. Um destes peptídeos, designado Rc-knottin, com massa molecular de 3400 Da, foi purificado em coluna de filtração em gel (Sephadex G-50), seguida de cromatografia de fase reversa (coluna C18) em sistema HPLC. O peptídeo purificado inibe a atividade α -amilásica de larvas dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* e a α -amilase salivar humana, mas não inibe a α -amilase das larvas do inseto *Tenebrio molitor*.

INTRODUÇÃO

Desde tempos mais remotos o ataque de pragas e patógenos tem causado inúmeros prejuízos à agricultura. Esta batalha persistirá, pois homem, pragas e patógenos têm em comum um princípio básico de busca: o alimento, sem o qual não sobrevivem. As plantas sofrem constantes agressões, pelo ataque de pragas e patógenos e pelas mudanças ocorridas no meio onde vivem, entre elas, variações de temperatura, umidade, teor aquoso, salino, pH do solo, radiações, lesões mecânicas, poluentes como metais pesados, o que acarreta reações fisiológicas em suas células (Bowles, 1990). Adaptação e resistência traduzem-se por profundas alterações no metabolismo da célula vegetal. Entre elas ocorre a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos, os quais são ativados através de mecanismos complexos. Diversas proteínas e peptídeos são sintetizados, dentro do programa de desenvolvimento da planta, fazendo parte da chamada defesa constitutiva. Tais proteínas e peptídeos exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, agindo de forma direta, combatendo o agente agressor, ou indireta, mantendo a estrutura e as funções celulares (Shewry & Lucas, 1997). Entre os compostos de defesa produzidos pelas plantas estão os inibidores de α -amilase. Os inibidores de α -amilase vêm sendo isolados de plantas, animais e microrganismos, podendo ser de natureza protéica ou não. Os inibidores de α -amilase protéicos estão divididos em 7



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

famílias, de acordo com sua similaridade de seqüência primária e estrutura tridimensional (Payan, 2004). Estes inibidores são encontrados em cereais (Feng et al., 1996; Franco et al., 2000), leguminosas (Ishimoto et al., 1996), tubérculos e em outros organismos, podendo apresentar massa molecular de 4 kDa, 5 kDa, 13 kDa, 26 kDa e 50 kDa. Estes inibidores apresentam especificidade pela enzima alvo, desta forma, alguns inibidores apresentam alta afinidade por α -amilase de insetos e mamíferos (Franco et al., 2002), enquanto outros inibidores agem especificamente sobre a enzima de alguns insetos (Chagolla-Lopez, et al., 1994). Neste trabalho isolamos de sementes de *Ricinus communis* um peptídeo inibidor de α -amilase, denominado RC-knottin.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de polipeptídeos das sementes de *Ricinus communis* - Os polipeptídeos foram extraídos baseando-se na solubilidade dos mesmos em etanol 50%, empregando uma metodologia descrita por Claeson et al., 1998 com algumas modificações. As sementes (30 g), após a retirada do tegumento, foram maceradas e os lipídeos extraídos com 150 mL de hexano. Após agitação por duas horas o material foi centrifugado por 15 minutos a 2500 g. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de extração repetido até que não observamos mais a presença de lipídeos (2 ou 3 vezes). Ao precipitado isento de gorduras foram adicionados 80 mL de etanol 50%, e mantidos sob agitação por 30 min. Centrifugamos, reservamos o sobrenadante, e repetimos o processo com o precipitado. **Separação dos polipeptídeos por filtração em gel** - O extrato protéico das sementes de *R. communis* foi submetido a filtração em gel. A resina utilizada foi sephadex G-50, e o eluente ácido trifluoracético (TFA) 0,1 %. **Isolamento do peptídeo Rc-knottin por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC** - A fração de baixo peso molecular, rica em polipeptídeos, obtida por filtração em gel, foi submetida à cromatografia líquida de fase reversa empregando a coluna C18, com fluxo de 0,7 mL/min, sendo o solvente A composto por ácido trifluoracético (TFA) 0,1 % e o solvente B por acetonitrila 80 % contendo TFA 0,1 %. **Desnaturação, redução e alquilação** - O peptídeo Rc-knottin, inibidor de α -amilase, foi desnaturado com uréia 6 M em tampão Tris /HCl 0,1 M pH 8,3 contendo EDTA 1 mM, a 50 °C por 2 horas em banho-maria, foi reduzido com DTT 30 %, a 50 °C por 2 horas, e alquilado com vinil-piridina a 50 °C por 1 hora (Waxdal et al., 1968). **Hidrólise enzimática** - O peptídeo Rc-knottin desnaturado, reduzido e alquilado foi incubado com as enzimas tripsina, quimotripsina e endoglutamase separadamente, em tampão tampão Tris-HCl 100mM pH 7,0, por 18 horas a 37 °C. **Hidrólise química** - O peptídeo Rc-knottin desnaturado, reduzido e alquilado foi submetido a hidrólise química nos resíduos de triptofano. **Seqüenciamento** - Os peptídeos resultantes das hidrólises enzimáticas e



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

química foram submetidos ao seqüenciamento automático utilizando a metodologia de Edman (Edman, 1950) e ao seqüenciamento por espectrometria de massas.

Determinação da inibição da atividade de α -amilase salivar e dos insetos *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* e *Tenebrio molitor* - Quantidades crescentes do peptídeo isolado (1 a 50 pmoles) foram dissolvidas em água ultrapura e incubados com 25 μ L de α -amilase salivar e 10 μ L de α -amilase dos insetos *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e *T. molitor* (quais as concentrações das enzimas usadas no ensaio de inibição?) em banho-maria a 30 °C por 30 min. Após este período, adicionamos 25 μ L de solução de amido 1 %, e o meio foi incubado a 30 °C por 15 min, para a α -amilase salivar, e por 30 min para as enzimas dos insetos. Após o resfriamento do meio reacional, 400 μ L de DNS foram adicionados e o material foi fervido por 5 min. Adicionamos então, 400 μ L de água em cada amostra, e a hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorvância a 540nm (Bernfeld, 1955). **Avaliação da estabilidade térmica do peptídeo Rc-knottin** - Quantidades crescentes do peptídeo isolado (1,0; 2,0; 3,0; 5,0 pmols) previamente fervido por 40min foram incubados com 25 μ L de α -amilase salivar e posteriormente submetidos a ensaios de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento dos polipeptídeos das sementes de *R. communis* por filtração em gel - O extrato protéico das sementes de *R. communis* foi submetido à filtração em gel em resina Sephadex G-50 e o perfil cromatográfico do fracionamento é apresentado na figura 1, onde pode-se observar três frações: Fração I, ricina; Fração II, "pool de albuminas 2S"; Fração III, fração de baixo peso molecular. Este trabalho concentrou-se na fração de baixo peso molecular. **Isolamento do peptídeo Rc-knottin por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (HPLC-C18)** - A fração de baixo peso molecular foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C18 e o perfil cromatográfico do fracionamento é apresentado na figura 2. A fração destacada com uma seta foi utilizada como material de estudo neste trabalho. Esta fração foi desnaturada, reduzida e alquilada (fig. 2). Os espectros de absorção das frações nativas e desnaturadas são apresentados na fig. 2 ("inset"). **Seqüenciamento** – O peptídeo Rc-knottin desnaturado, reduzido e alquilado, mostrou-se resistente à hidrólise pelas enzimas tripsina, quimotripsina e endoglutamase. A hidrólise química nos resíduos de triptofano gerou 5 peptídeos. Dois destes foram seqüenciados por espectrometria de massas e as seqüências obtidas foram: KLFD, WRVA.



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

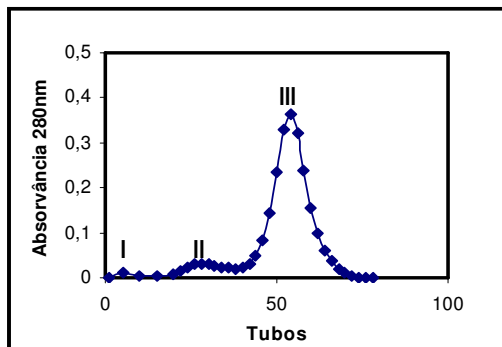


Figura 1- Perfil cromatográfico do extrato protéico das sementes de *R. communis* após cromatografia de gel filtração utilizando resina Sephadex G-50

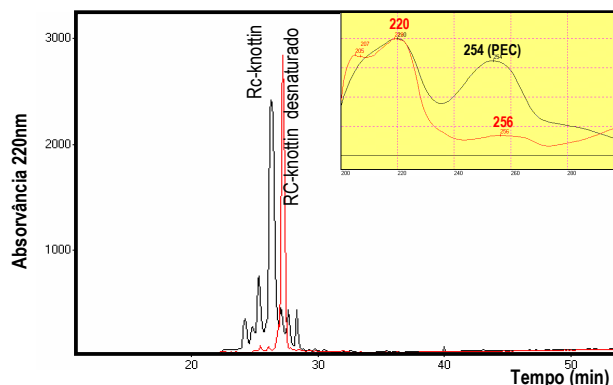


Figura 2- Cromatografia de fase reversa em coluna C18. Perfil da repurificação do peptídeo Rc-knottin obtido por cromatografia em coluna C18 e o perfil cromatográfico da desnaturação, redução e alquilação .

Inset - Espectro de absorção de Rc-knottin e do Rc-knottin desnaturado, reduzido e alquilado (254 nm).

Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos *Z. subfasciatus* *C. maculatus*

e *T. molitor* - O peptídeo isolado mostrou-se um potente inibidor da atividade da α -amilase salivar humana e da α -amilase dos insetos *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, mas não inibiu a atividade da α -amilase do inseto *T. molitor*, como mostra a tabela 1. Esta especificidade de inibição é comum entre os inibidores de α -amilase (Chagolla-Lopez, et al., 1994; Berre-anton et al., 2000). O peptídeo isolado após desnaturação térmica (aquecimento a 100°C por 40 minutos) deixa de inibir a α -amilase salivar humana. Como o aquecimento mimetiza uma situação de cozimento, normalmente empregado nas sementes antes do consumo, acreditamos no possível emprego deste peptídeo na construção de plantas geneticamente modificadas com este peptídeo, tornando estas resistentes ao ataque de alguns insetos predadores de sementes ricas em amido.

Tabela 1 – Inibição da atividade α -amilásica pelo peptídeo RC-knottin.

α -amilase	pmols do peptídeo	% de inibição
Salivar humana	4	100
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	25	100
<i>Callosobruchus maculatus</i>	25	100
<i>Tenebrio molitor</i>	50	2
Salivar humana fervida	5	0

CONCLUSÕES

As sementes de *R. communis* apresentam um peptídeo inibidor de alfa-amilase, solúvel em etanol 50 % resistente à clivagem por diversas enzimas e com características de peptídeos com domínio "knottin". O peptídeo Rc-knottin inibe a atividade enzimática da α -amilase salivar humana e da



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

α -amilase dos insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*, mas é inativo contra a α -amilase do inseto *Tenebrio Molitor*. Em função das características apresentadas o peptídeo RC-knottin é um candidato em potencial para transformação de sementes suscetíveis ao ataque de predadores que utilizam amido como nutriente.

REFERÊNCIAS

- BERNFELD, P. **Methods enzymol.** v.1,p. 149-158, 1955.
- BERRE-ANTON, L.V., NAHOUM, V.; PAYAN, F.; ROUGÉ, P. **Plant Physiol. Biochemistry**, v.38: 657-665. 2000.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochemistry**, v.59, p. 873-907. 1990.
- CHAGOLLA-LÓPEZ, A., BLANCO-LABRA, A., PATTHY, A., SÁNCHEZ, R. , PONGOR, S.. **J. Biol. Chem.** v.269, p. 23675-23680, 1994
- CLAESON, P.; GÖRANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T. & BOHLIN, L. **J. Nat. Prod.** v. 61, p.77-81, 1998.
- EDMAN, P. Method for determination of amino acid sequence in peptides. **Acta Chem. Scan.** v.28, p. 283-293, 1950.
- FENG, G. H., RICHARDSON, M., CHEN, M. S., KRAMER, K. J., MORGAN, T. D. , REECK, G. R. . **Ins. Biochem. Mol. Biol.** v.26, p. 419-426, 1996.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; BLOCH JR, C.; SILVA, C.P. , GROSSI DE SÁ, M. F. **Eur. J. Biochem.** v.267, p.1466-1473, 2000.
- FRANCO, O.L.; RIGDEN D.J; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 397-412, 2002.
- ISHIMOTO, M., SATO, T., CHRISPEELS, M. J., KITAMURA, K. **Entomol. Exp. Appl.** v. 79, p. 309–315. 1996.
- PAYAN, F. **Bioch. Biophys. Acta** ,v.1696, p. 171-180, 2004.
- SHEWRY, P. R. , LUCAS, J. A. **Plant Pathol.** v. 26, p. 135-191, 1997.
- WAXDAL, M. J., KONIGSBERG, H., HENLEY, W. L. , EDELMAN, G. M. (1968). The covalent structure of a human gamma-G immunoglobulin II. Isolation and characterization of the cyanogens bromide fragments. **Biochem.** v.7, p.1959-1966, 1989.