

### Determinação de atividade de proteases em *Panicum maximum* cv. Tanzânia

Patricia Menezes Santos<sup>1</sup>  
Milena Provazi<sup>2</sup>  
Gilberto Batista de Souza<sup>1</sup>

Foto capa: Patricia Menezes Santos



## 1. Introdução

As proteases são enzimas que catalisam reações em que proteínas são o substrato. A síntese e a degradação de proteínas são processos interdependentes e essenciais ao metabolismo celular. Esses processos estão envolvidos na reciclagem e em todas as mudanças quantitativas e qualitativas das proteínas nas células (Dalling, 1986). A determinação da atividade proteolítica de enzimas pode contribuir, por exemplo, para o entendimento das relações entre fontes e drenos em estudos sobre reservas orgânicas e dos mecanismos de resposta das plantas às condições de estresse

biótico e abiótico (Thornton & Bausenwein, 2000; Hieng et al., 2004).

A quantidade de proteases na solução ou no extrato de um tecido pode ser quantificada por meio de ensaios em que se determina sua atividade catalítica. A atividade das proteases é dependente da concentração das enzimas e do substrato, do pH, da temperatura e do tempo de reação (Dalling, 1986; Lehninger et al., 1995), e, em tecidos vegetais, pode ser determinada utilizando-se a azocaseína como substrato (Dalling, 1986). O método para determinação da atividade proteolítica de enzimas que utiliza a azocaseína foi inicialmente desenvolvido por Charney &

<sup>1</sup> Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luiz, km 234, Caixa Postal 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP. Endereço eletrônico: patricia@cnpse.embrapa.br; gilberto@cnpse.embrapa

<sup>2</sup> Aluna Mestrado - UNESP/Botucatu, SP - Bolsista FAPESP.

Tomarelli (1947). A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis em ácido tricloroacético. A intensidade da cor desenvolvida no sobrenadante, resultante da centrifugação do substrato digerido após a adição do ácido tricloroacético, é função da atividade proteolítica da enzima na solução.

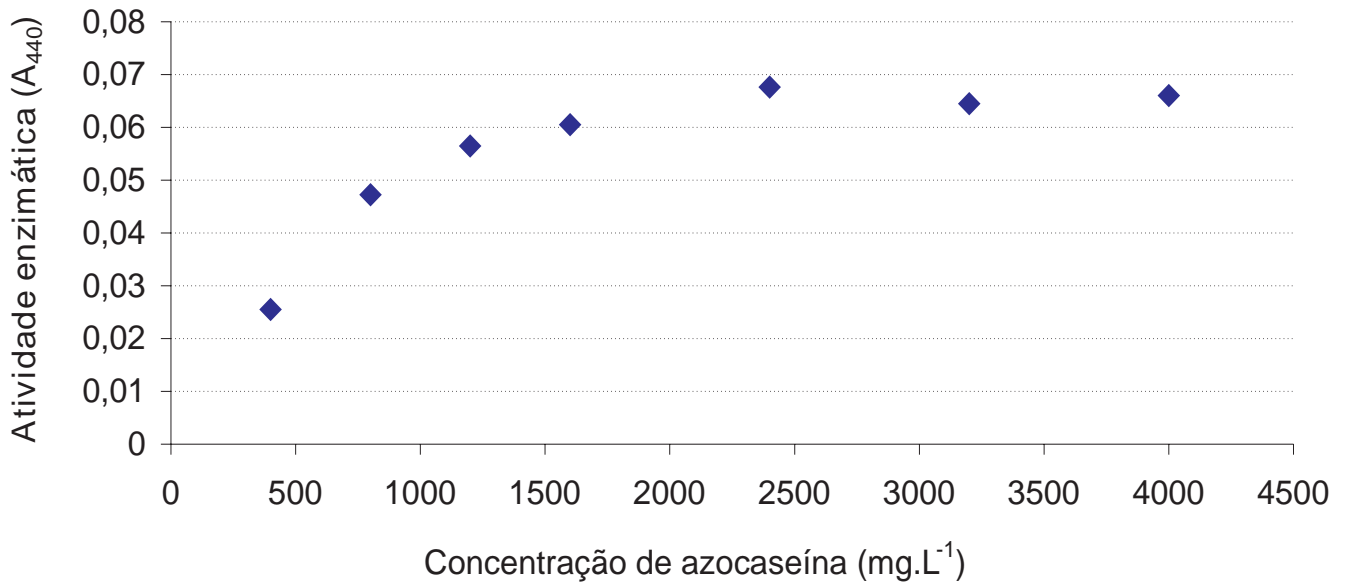
O objetivo deste trabalho foi adaptar a metodologia descrita por Weckenmann & Martin (1984) e identificar as condições ótimas de pH e de concentração do substrato de azocaseína para determinar a atividade das proteases em extratos de folhas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia.

## 2. Condições do ensaio: concentração de azocaseína e pH

Os ensaios de atividade das proteases devem ser conduzidos em condições ideais de pH e com concentração inicial do substrato acima do nível de saturação, de forma que a velocidade inicial da reação seja de ordem zero para o substrato - nessas condições, a velocidade inicial da reação é proporcional somente à concentração da enzima (Lehninger et al., 1995).

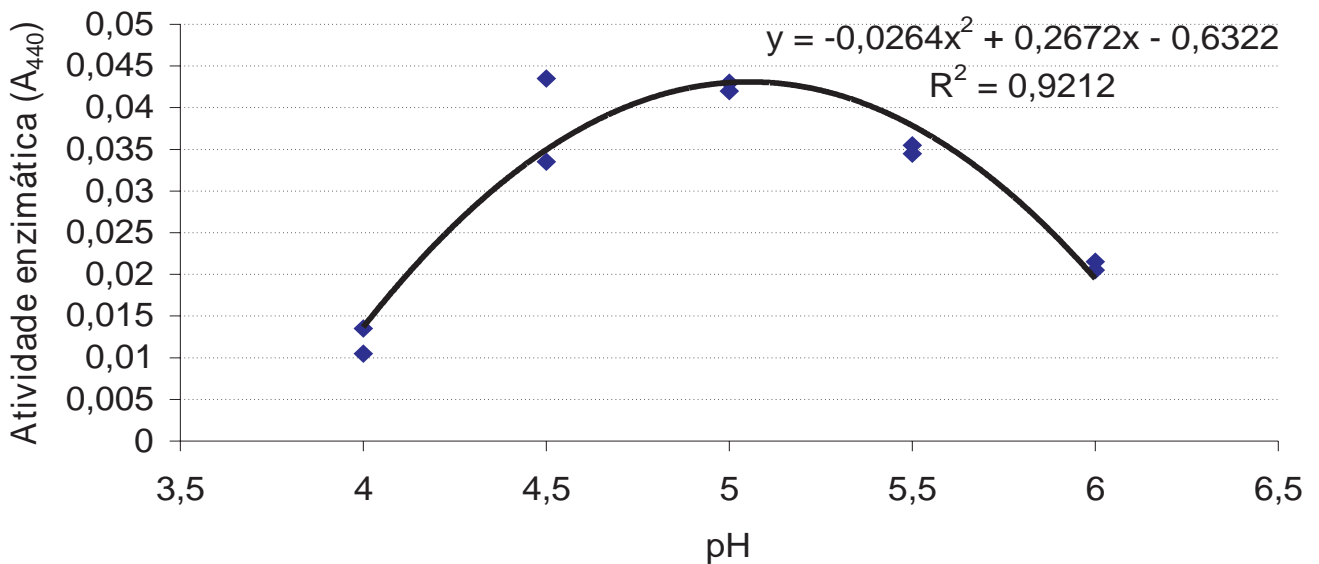
A Figura 1 mostra a tendência do efeito da concentração de azocaseína sobre a velocidade da reação catalisada pelas proteases presentes em extratos de folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia. O ensaio foi conduzido conforme descrito no item 3 (Protocolo para determinação da atividade de proteases em folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia), variando-se apenas a concentração do substrato [de 0 a 4000 mg.L<sup>-1</sup> de azocaseína]. De acordo com os resultados obtidos, a atividade das proteases tende a se estabilizar a partir da concentração de 2000 mg.L<sup>-1</sup> de azocaseína (Figura 1). Assim, para a realização de ensaios de atividade da enzima protease em amostras de *P. maximum* cv. Tanzânia, a concentração ideal do substrato azocaseína selecionada foi de 4000 mg.L<sup>-1</sup>.

Na Figura 2, observa-se o efeito do pH sobre a atividade de proteases em extratos de folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia. O ensaio foi conduzido conforme descrito no item 3 (Protocolo para determinação da atividade de proteases em folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia), variando-se apenas o pH da solução tampão de incubação (citrato-fosfato), de 4,0 a 6,0. A partir da equação apresentada na Figura 2, é possível determinar que a atividade das proteases é máxima em pH 5,0.



**Figura 1.** Efeito da concentração de azocaseína sobre a atividade de proteases inespecíficas em extratos de folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia.

Fonte: Camargo et al. (2005).



**Figura 2.** O efeito do pH sobre a atividade de proteases inespecíficas em extratos de folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia. Fonte: Santos et al. (dados não publicados).

### 3. Protocolo para determinação da atividade de proteases em folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia (adaptado de Weckenmann & Martin, 1984)

#### Reagentes

- Ácido 2-[(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)aminoetanossulfônico] ( $C_6H_{15}NO_6S$  - TES)
- Sulfanilamida-azocaseína (**azocaseína**)
- Ditioneitol ( $C_4H_{10}O_2S_2$  - DTT)
- Polivinil polipirrolidona insolúvel (PVPP)
- Ácido cítrico anidro ( $C_6H_8O_7$ )
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )
- Hidróxido de potássio (KOH)

#### Preparo dos reagentes

##### 1- Solução tampão TES-KOH, pH 6,8:

Dissolver, em 25 mL de água ultrapura (Milli-Q®), 0,14320 g de TES e 0,01542 g de DTT. Corrigir o pH da solução para 6,8 com KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

##### 2- Solução de hidróxido de potássio, 0,1 mol L<sup>-1</sup>:

Dissolver, em 250 mL de água ultrapura, 5,6110 g de KOH; após resfriamento, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água ultrapura.

##### 3- Solução de ácido cítrico, 0,2 mol L<sup>-1</sup>:

Dissolver, em 250 mL de água ultrapura, 38,42 g de ácido cítrico, transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água ultrapura.

##### 4- Solução de fosfato de sódio dibásico, 0,2 mol L<sup>-1</sup>:

Dissolver, em 250 mL de água ultrapura, 107,3 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (ou 143,9 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ); transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água ultrapura.

##### 5- Solução tampão de citrato-fosfato, pH 5,0:

Em 24,3 mL da solução de ácido cítrico, 0,2 mol L<sup>-1</sup>, adicionar 25,7 mL da solução de fosfato de sódio dibásico, 0,2 mol L<sup>-1</sup>.

Ajustar para pH 5,0 adicionando mais ácido cítrico ou fosfato de sódio dibásico.

##### 6- Solução de azocaseína:

Dissolver 24,0 mg de azocaseína em 3,0 mL de água ultrapura; após, adicionar 3,0 mL de solução tampão de citrato-fosfato, pH 5,0, e homogeneizar, agitando suavemente a solução.

##### 7- Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (m/v):

Dissolver 20 g de TCA em água ultrapura, em balão volumétrico de 100 mL.

#### Ensaio de atividade de proteases

- 01 – Pesar 2,0 g de folhas de *P. maximum* cv. Tanzânia e congelá-las em nitrogênio líquido.
- 02 – Transferir as folhas para almofariz de porcelana, adicionar nitrogênio líquido e macerar.
- 03 – Adicionar 300 mg de PVPP às folhas maceradas e homogeneizar.
- 04 – Deixar o material atingir a temperatura ambiente.

- 05 – Após atingir a temperatura ambiente, adicionar 6,0 ml da solução tampão TES-KOH à amostra e homogeneizar em banho de gelo.
- 06 – Transferir o extrato para tubo de centrífuga de polipropileno e centrifugar a 15000 g por 15 min, mantendo à temperatura de 5°C.
- 07 – Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e mantê-lo em banho de gelo.
- 08 – Preparar os tubos de reação adicionando 0,2 mL do sobrenadante e 0,5 mL de solução tampão de citrato-fosfato com azocaseína, em tubo do tipo “ependorf” de 1,5 mL.
- 09 – Incubar por 2 h a 37,0°C.
- 10 – Adicionar 0,7 mL de solução de TCA a 20% (m/v) nos tubos do tipo “ependorf”, para cessar a reação.
- 11 – Resfriar os tubos com a solução por 20 min a 5°C em banho de gelo.
- 12 – Centrifugar a 12000g por 15 min.
- 13 – Transferir 1,0 ml do sobrenadante para tubos de ensaio.
- 14 – Adicionar 0,2 ml de NaOH 3 mol L<sup>-1</sup> aos tubos de ensaio.
- 15 – Ler o valor de absorbância a 440 nm.

OBS: Para preparar o branco, deve-se incubar o substrato (solução tampão de citrato-fosfato + azocaseína) e, depois de retirar os tubos do banho-maria, colocar o TCA e em seguida o homogenato.

## Referências bibliográficas

CHARNEY, M.S.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v.171, p.501-505, 1947.

DALLING, J.M. **Plant proteolytic enzymes**. Boca Raton: CRC Press. 1986. 157p.

HIENG, B.; UGRINOVIC, K.; SUSTAR-VOZLIC, J.; KIDRIC, M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.519-530, 2004.

CAMARGO, L.H.G. de; PROVAZI, M.; SOUZA, G.B. de. Cinética de proteases não-específicas em *Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzânia: concentração do substrato (compact disc). In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 13., Piracicaba, 2005. **Anais...** Piracicaba: USP, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Trad.: Arnaldo Antonio Simões. 2ª Edição, São Paulo – SP: Sarvier, 1995.

THORNTON, B.; BAUSENWEIN, U. Seasonal protease activity in storage tissue of the deciduous grass *Molinia caerulea*. **New Phytologist**, v.146, p.75-81, 2000.

WECKENMANN, D.; MARTIN, P. Endopeptidase activity and nitrogen mobilization in senescing leaves of *Nicotiana rustica* in light and dark. **Physiologia Plantarum**, v. 60, p. 333 – 340, 1984.

### Comunicado Técnico, 62

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Pecuária Sudeste**  
 Endereço: Rod. Washington Luiz, km 234  
 Fone: (16) 3361-5611  
 Fax: (16) 3361-5754  
 Endereço eletrônico: sac@cppse.embrapa.br

1ª edição  
 1ª impressão (2005): 250 exemplares

Ministério da Agricultura,  
 Pecuária e Abastecimento



### Comitê de publicações

**Presidente:** Alfredo Ribeiro de Freitas.  
**Secretário-Executivo:** Edison Beno Pott  
**Membros:** André Luiz Monteiro Novo, Odo Primavesi, Maria Cristina Campanelli Brito, Sônia Borges de Alencar.

### Expediente

**Revisão de texto:** Edison Beno Pott  
**Editoração eletrônica:** Maria Cristina Campanelli Brito.