

Isolamento e caracterização estrutural e funcional de cistatinas de sementes de *Clitoria fairchildiana*

Izabela de Queiroz Pontes, Dayanni dos Santos Pádua, Gustavo Lemos Rocha, Kátia Valevski Sales Fernandes

As cistatinas são inibidores protéicos de proteases cisteínicas que desempenham várias funções em plantas, indo desde reguladores endógenos de proteólise, a proteínas de defesa contra predadores e até agentes em processos de transdução de sinais celulares e de interação tecidual. O objetivo geral deste trabalho é o isolamento de cistatinas de *Clitoria fairchildiana* e a investigação de sua ação sobre a germinação de sementes de *Glycine max*. A proposta é passo essencial ao entendimento das funções fisiológicas destes inibidores e base para futuros usos biotecnológicos destas proteínas. As sementes de *C. fairchildiana* foram maceradas e sua farinha foi submetida a processos de despigmentação e extração protéica. O extrato bruto (EB) foi fervido, dialisado e liofilizado. Para a purificação de cistatinas, o EB foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. As frações coletadas foram avaliadas em espectrofotômetro a 280nm. O teor protéico de todas as amostras foi mensurado pelo método de BCA. Para germinação de sementes quiescentes de *G. max*, foram utilizadas 20 sementes, mantidas sobre papel de filtro umedecido em água, em câmara de germinação a 28° C, sob fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro. As sementes foram coletadas após 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h de embebição. Estas foram medidas, pesadas e selecionadas. As sementes foram dissecadas em seus tecidos constituintes: cotilédones, epicótilos e radículas. Os tecidos foram triturados sob nitrogênio líquido e a farinha resultante foi pesada e tratada com metanol 80%, antes de sujeitas à extração protéica. A atividade de proteases cisteínicas dos extratos protéicos foi visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, contendo gelatina. Foi determinado um teor protéico de 475 µg/mg no EB de *C. fairchildiana*. A cromatografia de exclusão molecular separou três picos que serão submetidos aos ensaios de atividade de inibição da papaína, para então seguir com os próximos passos de purificação. As concentrações de proteínas em µg/µl das sementes de *G. max* foram suficientes para se fazer o ensaio de atividade enzimática em gel e atividade proteolítica foi detectada em eixos embrionários. O processo de purificação de fitocistatinas de *C. fairchildiana* continua em andamento.

Palavras-chave: *Clitoria fairchildiana*, *Glycine max*, cistatinas, proteases cisteínicas.

Instituições de fomento: UENF, FAPERJ, CNPq.