

## PROSPECÇÃO DE PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES EM SEMENTES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA

Ariadne Elisa Belo da SILVA<sup>1</sup>

Larissa Ramos CHEVREUIL<sup>2</sup>

José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Coorientador CDAM/INPA; <sup>3</sup>Orientador CDAM/INPA

### INTRODUÇÃO

A família botânica Fabaceae é um dos grupos de plantas mais importantes em termos de quantidade de espécies, correspondendo a terceira maior família entre as angiospermas, na qual estão inseridos cerca de 730 gêneros e 19.400 espécies, divididas dentro de três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Rahman e Parvin 2014). O alto índice de espécies de Fabaceae em florestas tropicais é um significativo fator que influencia as taxas de acúmulo de carbono e nitrogênio no ecossistema (Knops *et al.* 2002; Sprent *et al.* 2013). Plantas com capacidade de fixação de nitrogênio na família Fabaceae são consideradas estocadoras de compostos nitrogenados, como as proteínas, as quais são altamente acumuladas durante o período de desenvolvimento das sementes (Cusack e McCleery 2014). Essas moléculas apresentam amplo potencial para prospecção, considerando a diversidade de funções que exercem nas plantas, podendo atuar no processo de mobilização das reservas, como fonte de enxofre e nitrogênio, bem como na defesa vegetal (Yahara *et al.* 2013). Dentre as principais classes de proteínas presentes em sementes de Fabaceae, destacam-se as proteases e os inibidores de proteases (Patel *et al.* 2014). As proteases, ou peptidases, são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas (Kidric *et al.* 2014). Os inibidores de proteases, por sua vez, são proteínas capazes de reduzir a velocidade da reação catalisada por proteases, resultando na inibição reversível e/ou irreversível da atividade enzimática. Desta maneira, a bioprospecção de proteases e inibidores de proteases em sementes de espécies Fabaceae pertencentes à flora Amazônica, quando investigada por meio de estudos químicos e bioquímicos, pode identificar, de forma mais precisa, aspectos relacionados aos processos funcionais e metabólicos, assim como diagnosticar o potencial deste material biológico para a utilização industrial, visto que a presença de moléculas com aplicabilidade pode gerar novos produtos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de protease e inibidores de proteases em extratos de sementes de 50 espécies de Fabaceae da Amazônia.

### MATERIAL E MÉTODOS

Sementes maduras de 50 espécies de Fabaceae da Amazônia (*Campsiandra comosa*; *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*; *Cassia leiandra*; *Copaifera venezuelana*; *Cynometra bauhinifolia*; *Dialium guianense*; *Dicorynia paraensis*; *Dimorphandra caudata*; *Dimorphandra parviflora*; *Hymenaea courbaril*; *Macrolobium multijugum*; *Peltogyne venosa*; *Senna tapajozensis*; *Anadenanthera peregrina*; *Dinizia excelsa*; *Enterolobium schomburgkii*; *Inga pezizifera*; *Leucaena leucocephala*; *Parkia decussata*; *Parkia discolor*; *Parkia gigantocarpa*; *Parkia nitida*; *Parkia panurensis*; *Parkia pendula*; *Parkia platycephala*; *Stryphnodendron guianense*; *Zygia inaequalis*; *Zygia trunciflora*; *Acosmium nitens*; *Canavalia brasiliensis*; *Centrosema triquetrum*; *Dalbergia spruceana*; *Deguelia scandens*; *Dioclea bicolor*; *Dioclea guianensis*; *Erythrina fusca*; *Mucuna urens*; *Ormosia costulata*; *Ormosia discolor*; *Ormosia lignivalvis*; *Ormosia macrocalyx*; *Ormosia paraensis*; *Ormosia smithii*; *Sesbania exasperata*; *Swartzia ingifolia*; *Swartzia laevicarpa*; *Swartzia longistipitata*; *Swartzia polyphylla*; *Swartzia recurva* e *Swartzia sericea*) foram coletadas ao longo de 2010 em vários sítios florestais da Amazônia, localizados no Amazonas-Brasil:

O material pulverizado obtido das sementes de cada espécie foi utilizado para a extração de proteínas em NaCl 0,15 M durante 2 h à temperatura ambiente, seguida de centrifugação, diálise e liofilização. A quantificação de proteínas foi realizada a partir da metodologia de Bradford (1976).

As atividades proteolíticas das serino e cisteínoproteases foram estimadas a partir da incubação da amostra com os substratos BAPNA (benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida, Sigma) e BANA (N- alfa Benzoi-DL-Arginina B naftilamida, Sigma), respectivamente. Após a paralisação das reações, foram realizadas leituras espectrofotométricas específicas para cada

ensaio, sendo 405 nm para a serino e 540 nm para as cisteínoproteases. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 0,01.

Para a determinação das atividades inibitórias, inicialmente, as amostras foram ressuspensas em tampão de reação e aquecidas em água em ebulição durante 5 minutos. A inibição da tripsina foi detectada a partir da incubação da amostra, tripsina (Sigma) e o substrato BAPNA a 37° C. A reação foi paralisada pela adição de ácido acético 30% e realizadas leituras espectrofotométricas a 405 nm. A inibição da quimotripsina foi determinada a partir da incubação da amostra, quimotripsina (Sigma) e o substrato azocaseína a 37°C. Após a paralisação da reação pela adição de TCA 20%, as amostras foram centrifugadas e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µL de NaOH 2 M, sendo realizadas leituras espectrofotométricas dos produtos da reação em espectrofotômetro à 420 nm. A inibição da papaína foi estimada a partir da incubação papaína (Sigma), DTT, EDTA, amostra e o substrato BANA a 37° C. A reação foi interrompida pela adição de HCl 2% em etanol e, para conferir cor à reação foi adicionado DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído) 0,06%. Após 40 minutos em repouso, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 540 nm. A inibição da bromelaína foi detectada por meio da incubação de bromelaína (Sigma), amostra e o substrato azocaseína à 37° C. Após a paralisação da reação pela adição de TCA 20%, as amostras foram centrifugadas e 400 µL do sobrenadante foi alcalinizado com 400 µL de NaOH 2 M. Posteriormente, foram realizadas leituras espectrofotométricas à 540 nm. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a inibição de uma unidade de atividade de protease.

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS, glicerol e β-mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, glicina e SDS, a 200 volts, 15 mA/gel, durante 2 horas. Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega. Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético, etanol e água destilada durante 2 horas e descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades proteolíticas tanto de serino como de cisteínoproteases variaram da ordem de 0,1 a 40 UA/ mg de proteína nas 50 espécies de Fabaceae estudadas, com destaque para a subfamília Mimosoideae, que apresentou as maiores atividades proteolíticas para as duas classes de proteases.

Quanto às atividades inibitórias, a inibição da tripsina variou de 2,0 a 65,0 UI/mg de proteína, ao passo que a inibição da quimotripsina variou de 1,2 a 448,0 UI/mg de proteína. Para a papaína, a atividade inibitória variou entre 1,8 e 54,0 UI/mg de proteína, enquanto que a inibição da bromelaína, variou entre 0,1 e 253,0 UI/mg de proteína. Comparando essas atividades entre as subfamílias, a Caesalpinioideae destaca-se pelas maiores atividades inibitórias contra a tripsina, papaína e bromelaína, ao passo que o maior número de inibição da quimotripsina foi encontrado pelos extratos proteicos das espécies pertencentes à subfamília Faboideae.

Os grupos mais conhecidos de inibidores de proteases provenientes de sementes são os de serinoproteases, que incluem inibidores de tripsina e quimotripsina. Contudo, outras classes também podem estar presentes como os inibidores de cisteíno, aspártico e metaloproteases. Dentre os inibidores de serinoproteases, os do tipo Kunitz e Bowman-Birk são abundantes em sementes de leguminosas. A diferença entre esses dois inibidores decorre, principalmente, sobre sua massa molecular, número de pontes dissulfeto e número de sítios ativos (Oliva e Sampaio 2009; Joshi *et al.* 2013). Esses dois inibidores, especificamente, apresentam variação quanto à inibição de diferentes proteases, destacando-se os inibidores do tipo Kuntiz como potentes inibidores da tripsina e poucos para a quimotripsina, ao passo que os do tipo Bowman-Birk podem inibir tanto a tripsina quanto a quimotripsina (Jamal *et al.* 2012).

Essa diferença de inibição frente às diferentes proteases também foi encontrada em estudos envolvendo a distribuição de inibidores de proteases em sementes de leguminosas, onde as espécies *Cassia tora*, *Delonix regia*, *Parkia speciosa* e *Crotalaria cratalia* inibiram apenas a tripsina. Por outro lado, *Caesalpinia pulcherrima*, *Leucaena Leucocephala*, *Mimosa invisa* e *Sesbania cannabina* foram capazes de inibir a tripsina e a quimotripsina (Norioka *et al.* 1988). No que diz respeito à estudos envolvendo espécies de Fabaceae pertencentes à flora Amazônica, já se tem relato de inibidores de tripsina e quimotripsina em extratos de sementes de *Cassia brasselari*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guinanses*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae*, enquanto que em *Inga fagifolia* e *Cassia grandis* a inibição foi específica contra a atividade da tripsina (Calderon *et al.* 2001).

A partir das análises eletroforéticas, observou-se a predominância de bandas proteicas com massas moleculares variando de 8 a 35 kDa nas espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoidea e, de 8 a 75 kDa em Faboideae. É importante ressaltar que, mesmo utilizando altas concentrações de proteínas, nos extratos de *Cynometra bahiniifolia*, *Dialium guianensis*, *Dicorynia paraenses*, *Zygia inaequalis* e *Mucuna urens* não foi possível observar bandas proteicas, apesar da detecção de altas atividades inibitórias.

A partir da massa molecular aparente das bandas proteicas, além de confirmar a presença de certas classes de proteínas, pode-se inferir a classe a qual pertence. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que proteínas com massas moleculares na faixa de 40 e 60 kDa pertençam às cisteíno e serinonoproteases, visto que a literatura científica relata essa faixa de massa molecular para proteínas purificadas pertencentes à essas classes (Tajima *et al.* 2011; Praxedes-Garcia *et al.* 2013). Quanto aos inibidores, muitos tem sido descritos com massa molecular de 8 a 10 kDa para os inibidores do tipo Bowman-Birk e de 20 kDa para os Kuntiz, enquanto as fitocistatinas (inibidores de cisteínoproteases presentes em vegetais) correspondem à moléculas de tamanhos variando 12 a 16 kDa (Martínez *et al.* 2012).

## CONCLUSÃO

Proteases e inibidores de proteases estão amplamente distribuídos em sementes de espécies de Fabaceae da Amazônia, evidenciando a importância dessa família botânica em estudos envolvendo a obtenção de moléculas com possível aplicação biotecnológica.

## REFERÊNCIAS

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- 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 Amazon Leguminosae seeds: Purification and preliminar characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein Peptide Letters*, 8: 485-493.
- Cusack, D.F.; McCleery, T.L. 2014. Patterns in understory diversity and soil nitrogen across native-and non-native-urban tropical forests. *Forest Ecology and Management*, 318: 34-43.
- Jamal, F.; Pandey, P.K.; Singh, D.; Khan, M.Y. 2012. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry*, 12: 1-34.
- Joshi, R.S.; Mishra, M.; Suresh, C.G.; Gupsta, V.S.; Giri, A.P. 2013. Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 5087- 5094.
- Kidric, M.; Kos, J.; Ssbotic, J. 2014. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica*, 38: 139-158.
- Knops, J.M.H.; Bradley, K.L.; Wedin, D.A. 2002. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. *Ecology Letters*, 5: 454-466.
- Laemmli, 1970. U.K. Laemmli. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685.
- Martínez, M.; Cambra, I.; Gonzalez-Melendi, P.; Satamaría, M.E.; Díaz, I. 2012. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum*, 145: 85-94.
- Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. 1988. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52: 1245-1252.
- Oliva, M.L.V.; Sampaio, M. U. 2009. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 81: 615-621.
- Patel, P.J.; Dabhade, A.R.; Patil, U.K. 2014. Rapid Detection of Proteinaceous Protease Inhibitor from Several Plants of North Maharashtra Region. *Journal of Natural Remedies*, 14: 2320-3358.
- Praxedes-Garcia, P.; Cruz-Silva, I.; Gozzo, A.J.; Nunes, V.A.; Torquato, R.J.; Tanaka, A.S.; Figueiredo-Ribero, R.C.; Gonzalez, Y.G.; Araujo, M.S. 2012. Biochemical Aspects of a Serine Protease from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) Seeds: A Potential Tool to Access the Mobilization of Seed Storage Proteins. *The Scientific World Journal*, 12: 1-8.
- Rahman, A.H.M.M.; Parvin, M.I.A. 2014. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 2: 6-8.
- Sprent, J.I.; Ardley, J.K.; James, E.K. 2013. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation process. *South African Journal of Botany*, 15: 31-41.

Tajima, T.; Yamaguchia, A.; Matsushima, S.; Satoha, M.; Hayasaka, S.; Yoshimatsua, K.; Shoia, Y.B. 2011. Biochemical and molecular characterization of senescence-related cysteine protease–cystatin complex from spinach leaf. *Physiologia Plantarum*, 141: 97–116.

Yahara T.; Javadi, F.; Onoda, Y.; Queiroz, L.P.D; Faith, D.P.; Prado, D.E.; Akasaka, M.; Kadoya, T.; Ishihama, F.; Davies, S.; Slik, J.W.F.; Bin, C.; Darnaedi, D.; Pennington, R.T.; Tuda, M.; Shimada, M.; Ito, M.; Egan, A.N.; Buerki, S.; Raes, N.; Kajita, T.; Mimura, M.; Tachida, H.; Iwasa, Y.; Smith, G.F.; Victor, J.E. 2013. Global legume diversity. Assessment: concepts, key indicators, and strategies. *Taxon*, 62: 249–266.