

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

“Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*”

LARISSA RAMOS CHEVREUIL

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

LARISSA RAMOS CHEVREUIL

“Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*”

Orientador: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Coorientador: Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Botânica.

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

Comissão examinadora da aula de qualificação da tese:

1. **Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon – UNIR**
2. **Profa. Dra. Iza Marineves Almeida da Rocha – UFAM**
3. **Dr. Douglas A. Steinmacher – Instituto Biosomática/ SP**
4. **Dra. Isolde Dorothea Kossman Ferraz – INPA**
5. **Dra. Paula Cristina da Silva Ângelo – EMBRAPA**

Comissão examinadora da Defesa Pública:

1. **Profa. Dra. Célia Regina R. da Silva Carlini – UFRGS**
2. **Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza – INPA**
3. **Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto – UFJF**
4. **Dra. Martha Maria Passador – INPA**
5. **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos – UFC**

- C529 Chevreuil, Larissa Ramos
Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga* / Larissa Ramos Chevreuil. --- Manaus : [s.n.], 2014.
xv, 119 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2013.
Orientador : José Francisco de Carvalho Gonçalves.
Coorientadora : Leonardo de Azevedo Calderon.
Área de concentração : Biodiversidade Vegetal da Amazônia, Reprodução e Crescimentos de Vegetais.
1. Enzimas proteolíticas. 2. Sementes. 3. *Parkia multijuga*.
I. Título.
- CDD 583.322

Sinopse:

A ocorrência de proteases e inibidores de proteases foi estudada durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*, bem como isolou-se inibidores de tripsina e caracterizou-se sua atividade quanto à variação de temperatura e pH e sequência amino-terminal.

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas, Inibidores proteolíticos, mobilização de proteínas, sementes florestais.

Aos meus pais, Welington e Mafalda

Ao meu esposo, Ricardo

Ao meu irmão e minha cunhada, Wellington e Eliza

Ao meu orientador, Dr. José Francisco

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento por meio dos projetos Bionorte n° 554307/2010-3 e Universal n° 480233/2011-0;

Aos meus pais, meu esposo, meu irmão e cunhada por todo incentivo e apoio na realização desta tese;

Ao meu orientador, por todas as oportunidades concedidas, ensinamentos, pela confiança, paciência, respeito, amizade e pelas críticas construtivas que contribuíram para o meu crescimento pessoal, espiritual e, acima de tudo, profissional. Sou muito grata a tudo que me foi proporcionado ao longo desses 10 anos!

Ao meu co-orientador por toda ajuda e ensinamentos ao longo da realização desta tese;

À toda a equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA-LFBV), pelo apoio, amizade e convivência;

À estudante de iniciação científica, Rafaela Oliveira da Silva, por toda ajuda nas atividades de bancada;

À Flávia Schimpl pela ajuda nos experimentos de germinação;

À toda equipe do Centro de Estudos Biomoleculares Aplicado à Saúde (FioCruz/Universidade Federal de Rondônia), em especial ao Rodrigo, Leandro e sr. Makoto, por toda ajuda nos experimentos de purificação;

Aos colegas de turma da PPG-BOT/ 2012, pela convivência, carinho e pelos momentos de confraternização;

Às secretárias da PPG-BOT, Neide e Léia, pela dedicação e ajuda nas questões administrativas/ burocráticas;

À banca examinadora, professores Márcio Viana (UFC), Célia Carlini (UFRS), Paulo Henrique (UFJF), Martha Passador (INPA) e Luiz Augusto (INPA) pelas correções e contribuições teóricas;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigada!

"— É pecado sonhar?

— Não, Capitu. Nunca foi.

— Então por que essa divindade nos dá golpes tão fortes de realidade e parte nossos sonhos?

— Divindade não destrói sonhos, Capitu. Somos nós que ficamos esperando, ao invés de fazer acontecer."

Autor: Machado de Assis

Livro: Dom Casmurro

RESUMO

Durante a germinação das sementes, proteínas de reserva são acumuladas e degradadas para dar suporte aos principais eventos metabólicos envolvidos na construção de novas células e tecidos. A mobilização proteica ocorre a partir da atividade de proteases e, pode ser controlada por inibidores de proteases, evitando a hidrólise prematura das proteínas de reserva. O objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em períodos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*, bem como purificar inibidores de tripsina. Para tanto, as sementes, após quebra da dormência, foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita e acondicionadas em câmaras de germinação à 25°C. Os estádios de coleta foram: sementes quiescentes (SQ), após 24 h de embebição (EM), emissão da radícula (RA), expansão do nó cotiledonar (NO) e emissão da parte aérea (PA). As proteínas foram extraídas em NaCl 0,15 M. As atividades de serinoproteases e de inibidores de tripsina e quimotripsina foram avaliadas utilizando-se como substratos o BAPNA e a azocaseína e, a atividade das cisteínoproteases e de inibidores de papaína e bromelaína, utilizando-se o BANA e azocaseína, respectivamente. Os inibidores de tripsina foram purificados a partir de cromatografias em tripsina-Sepharose 4B e HiTrap DEAE FF. O monitoramento da purificação e da mobilização das proteínas foi realizado por meio eletroforeses em SDS-PAGE e géis 2D. Durante a germinação das sementes de *P. multijuga* observou-se decréscimo expressivo no conteúdo de proteínas após RA, permanecendo até PA, sendo confirmado por géis 2D, demonstrando a degradação de proteínas na faixa de 35 a 75 kDa durante PA, ao passo que, proteínas de 9 kDa foram sintetizadas durante EM. Quanto às atividades inibitórias, verificou-se estabilidade na inibição das serinoproteases em todos os estádios estudados, sendo a atividade anti-tríptica vinte vezes maior quando comparada à da quimotripsina. A inibição de cisteínoproteases foi mais variável, verificando-se máxima inibição da papaína e da bromelaína em EM e NO, respectivamente. As atividades de serino e cisteínoproteases apresentaram-se constantes até NO, com acréscimo em PA. A purificação dos inibidores de tripsina envolveu duas etapas cromatográficas, onde os perfis obtidos foram similares em todos os estádios estudados, indicando a purificação das mesmas moléculas ou de iso-inibidores nos diferentes estádios estudados. A partir da purificação dos inibidores de tripsina (PmTI1 e PmTI2) de SQ, essas proteínas foram caracterizadas por apresentarem especificidade inibitória contra a tripsina, alta estabilidade quanto à variação de temperatura e pH e, homologia à sequência de aminoácidos de inibidores do tipo Bowman-Birk de outras espécies de Fabaceae. Neste sentido, inibidores de serino e cisteínoproteases devem participar da regulação da atividade de proteases durante a germinação e nos eventos pré e pós-germinativos de sementes de *P. multijuga*, estando os inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk presentes durante todo o processo de formação da plântula.

ABSTRACT

During seed germination, storage proteins are accumulated and degraded to support the major metabolic events involved in development new cells and tissues. The mobilization of proteins occurs through the activity of proteases, which can be regulated through the presence of proteases inhibitors that prevent premature hydrolysis of the storage proteins. The objective of this research was to investigate the activity of proteases and protease inhibitors during germination and pre-and post-germination of seeds of *Parkia multijuga* and purify trypsin inhibitors. Thereby, the seeds after breaking dormancy, they were germinated in plastic pots containing vermiculite and packed in germination chambers at 25°C. The collection stages were quiescent seeds (SQ), after 24 h of imbibition (EM), radicle protrusion (RA), expansion of cotyledon node (NO) and issue shoot (PA). Proteins were extracted into 0.15 M NaCl. The activities of serine proteinases and trypsin and chymotrypsin inhibitors were performed using BAPNA and azocasein as substrates. The activity of cysteine proteases and papain and bromelain inhibitors using BANA and azocasein, respectively. Trypsin inhibitors were purified by affinity chromatography usin trypsin-Sepharose 4B and ion exchange on HiTrap DEAE FF. The purification and the mobilization of proteins was performed by electrophoresis on SDS-PAGE and 2D gels. During seed germination of *P. multijuga* observed a significant decrease in the protein content after RA remaining until PA was confirmed by 2D gels, wich show proteins degradation in the range of 35 to 75 kDa in PA, while 9 kDa proteins were synthesized during EM. Regarding the inhibitory activity, serine protease inhibition showed high stability during all stages studied, of which trypsin inhibition was 20 times higher than chymotrypsin. Inhibition of cysteine proteases is more variable, observing for maximum inhibition of papain and bromelain in EM and NO, respectively. The activities of serine and cysteine proteases presented themselves to constant NO, with an increase in PA. The purification of trypsin inhibitors involved two chromatographic steps, which were similar to the profiles obtained in all stages studied, indicating the purification of the same molecule or isoinhibitors in different stages studied. From the purification of trypsin inhibitors (PmTI1 and PmTI2) SQ, these proteins are characterized by presenting against trypsin inhibitory specificity, high stability against variation of temperature and pH and amino acid sequence homology to the Bowman-type inhibitors Birk from other Fabaceae species. Thus, serine and cysteine proteases inhibitors could participate in the regulation of protease activity during germination and events pre and post-germination of seeds of *P. multijuga*, with the trypsin inhibitors Bowman-Birk type present throughout the process of formation of the seedling.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
ABREVIÇÃO PARA AMINOÁCIDOS.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.2. Deposição de proteínas	19
2.3. Germinação	21
2.4. Mobilização de proteínas	24
2.5. Enzimas proteolíticas	25
2.6. Degradação das proteínas de reserva.....	27
2.7. Regulação da mobilização de proteínas de reserva	29
2.8. Inibidores de proteases.....	30
2.8.1. Classificação dos inibidores de proteases.....	32
2.9. Diversidade e características das espécies da família Fabaceae.....	35
2.9.1. Aspectos gerais de <i>Parkia multijuga</i> Benth.	36
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 1	49
1. Introdução.....	50
2. Objetivos.....	52
2.1. Objetivo Geral.....	52
2.2. Objetivos específicos.....	52
3. Material e métodos	53
3.1. Material vegetal	53
3.2. Extração de proteínas.....	54
3.3. Quantificação de proteínas.....	54
3.4. Atividade de serinoproteases	55
3.5. Atividade de cisteínoproteases.....	56
3.6. Inibição da tripsina.....	56

3.7. Inibição da quimotripsina	57
3.8. Inibição da papaína	58
3.9. Inibição da bromelaína	58
3.10. Purificação dos inibidores de tripsina	59
3.11. SDS-PAGE	59
3.12. Eletroforese em gel 2D	60
4. Resultados	62
5. Discussão	69
6. Conclusão	75
7. Referências Bibliográficas.....	76
 CAPÍTULO 2	 80
1. Introdução.....	81
2. Objetivos	85
2.1. Objetivo Geral.....	85
2.2. Objetivos específicos	85
3. Material e Métodos	86
3.1. Purificação dos inibidores de tripsina	86
3.2. Atividade inibitória da tripsina	87
3.3. Atividade inibitória da quimotripsina	88
3.4. Eletroforese em sistema SDS-PAGE.....	89
3.5. Eletroforese em Gel 2D	89
3.6. Estabilidade térmica	90
3.7. Estabilidade quanto à variação de pH	90
3.9. Análise da sequência amino-terminal	91
4. Resultados	92
5. Discussão	100
6. Conclusão	106
7. Referências Bibliográficas.....	107
 5. CONCLUSÃO GERAL	 115
 ANEXOS	 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da semente.....	19
Figura 2. Diagrama conceitual de síntese de proteínas.....	20
Figura 3. Principais eventos metabólicos durante a embebição de sementes.....	22
Figura 4. Comparação dos padrões de mobilização proteica no eixo radicular e cotilédones durante a germinação e pós-germinação de sementes de eudicotiledôneas.....	25
Figura 5. Representação esquemática da hidrólise de proteínas por proteases e proteinases.....	26
Figura 6. Representação das vias de degradação de proteínas de reserva.....	28
Figura 7. Formação de complexo estável entre enzima (cisteínoprotease) e inibidor.....	31
Figura 8. Deposição e mobilização de proteínas de reserva associado à presença de proteases e inibidores de proteases nas sementes.....	32
Figura 9. Modelo estrutural de um inibidor do tipo Kunitz.....	33
Figura 10. Modelo estrutural de um inibidor do tipo Bowman-Birk.....	34
Figura 11. Aspectos do fruto e sementes da espécie <i>P. multijuga</i>	36
Figura 12. Estádios de germinação e eventos pré e pós-germinativos de sementes de <i>P. multijuga</i>	54
Figura 13. Fluxograma das principais etapas metodológicas.....	55
Figura 14. Mudanças na concentração de proteínas solúveis nos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de <i>P. multijuga</i>	63
Figura 15. Eletroforese em géis 2D dos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de <i>P. multijuga</i>	64
Figura 16. Atividade de inibidores de proteases nos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios de germinação e pré e pós-germinação de	

sementes de <i>P. multijuga</i>	65
Figura 17. Atividade de proteases nos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de <i>P. multijuga</i>	65
Figura 18. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose dos extratos proteicos dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de <i>P. multijuga</i>	66
Figura 19. SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia em tripsina-Sepharose dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de <i>P. multijuga</i>	67
Figura 20. Cromatografia de troca iônica em HiTrap DEAE FF das frações parcialmente purificadas nos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de <i>P. multijuga</i>	68
Figura 21. Fluxograma das principais etapas metodológicas.....	87
Figura 22. Perfil de eluição em cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose do extrato proteico de sementes de <i>P. multijuga</i> e SDS-PAGE.....	92
Figura 23. Perfil de eluição em cromatografia de fase reversa em coluna C18.....	93
Figura 24. Eletroforese em gel 2D das frações provenientes da cromatografia de fase reversa em C18.....	93
Figura 25. Perfil de eluição em cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap DEAE FF	94
Figura 26. Eletroforese em gel 2D das frações provenientes da cromatografia em HiTrap DEAE FF.....	95
Figura 27. Especificidade da atividade inibitória de PmTI1 e PmTI2 contra serinoproteases.....	96
Figura 28. Curvas de inibição da tripsina bovina pelos inibidores PmTI1 e PmTI2.....	97
Figura 29. Estabilidade da atividade de PmTI1 e PmTI2.....	97
Figura 30. Sequência amino-terminal de PmTI1 e alinhamento com inibidores Bowman-Birk isolados de leguminosas.....	98
Figura 31. Sequência amino-terminal de PmTI2 e alinhamento com inibidores Bowman-Birk isolados de leguminosas.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN: acetonitrila
- BANA: benzoil – DL – arginina – β - nafilamida;
- BAPNA: benzoil Arginina p-Nitroanilida;
- BBIs: Inibidores Bowman-Birk
- BIS: N, N' - metileno bis acrilamida;
- DEAE: dietil-aminoetil;
- DMACA: 4-(dimetilamino)-cinamaldeído;
- DMSO: Dimetilsulfóxido;
- DTT: ditioneitol;
- EDTA: ácido etilenodiamino tetracético;
- HCl: ácido clorídrico;
- kDa: kiloDalton;
- M: molar;
- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio;
- nm: nanômetro;
- p/v: peso/volume;
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida;
- PSA: persulfato de amônio;
- SDS: dodecil sulfato de sódio;
- TCA: Ácido tricloroacético;
- TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina;
- TFA: ácido trifluoroacético
- Tris: (hidroximetil) aminometano;
- UA: unidade de atividade
- UI: unidade de inibição;
- UV: ultra violeta;
- v/v: volume/volume;

ABREVIÇÃO PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC; Voet *et al.*, 2000.

1. Introdução

A alta diversidade vegetal presente na flora amazônica associada a diferentes eventos metabólicos, quando investigada por métodos bioquímicos e/ou biotecnológicos, pode diagnosticar, de forma mais precisa, o potencial desse material biológico para a utilização bioindustrial, tendo em vista a presença de moléculas com aplicabilidade para a obtenção de novos produtos (Bariane *et al.*, 2012).

Dentre os órgãos e/ou tecidos vegetais com potencial para prospecção de biomoléculas, destacam-se as sementes, por constituírem uma das principais fontes de reserva de estocagem (proteínas, lipídeos e carboidratos), além de fornecerem informações bioquímicas importantes para o entendimento de processos fisiológicos e possibilitam informações agroindustriais e ecológicas, podendo, ainda, favorecer a conservação da biodiversidade por meio da seleção do material genético das espécies (Gonçalves *et al.*, 2002; Bewley *et al.*, 2013).

Informações científicas acerca da composição química de sementes tropicais são úteis para a compreensão dos seus processos funcionais e para a obtenção de novos produtos a partir das reservas estocadas, especialmente as proteínas, que correspondem, em média, 20 a 30% da massa seca das sementes em espécies de Fabaceae (Silva, 2010).

Conceitualmente, as sementes são propágulos sexuais estruturalmente compostos por tecidos diferenciados (tegumento, endosperma e cotilédones), destinados ao acúmulo de material de estocagem, importantes para o processo de germinação e, por conseguinte, perpetuação das espécies via propagação sexuada (Perez, 2004; Rajjou *et al.*, 2012).

A germinação é um processo complexo dividido em fases, que se inicia com a embebição da semente, ocasionando o aumento da respiração celular e a reativação do metabolismo, proporcionando eventos celulares essenciais que irão permitir o crescimento do embrião, a emissão da radícula e o subsequente desenvolvimento da plântula (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013).

Dentre os principais eventos celulares que ocorrem durante a reativação do metabolismo, inclui-se a mobilização das reservas estocadas (proteínas, lipídeos, carboidratos e metabólitos secundários), as quais fornecem energia e matéria-prima para a construção de novas células e tecidos (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013). A mobilização das proteínas, em particular, ocorre por meio da atividade de enzimas proteolíticas (proteínases ou proteases), responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, fornecendo nitrogênio e enxofre para diferentes vias de biossíntese, inclusive para a síntese de novas proteínas (Pesquet, 2012). Devido à importância metabólica dessas enzimas durante a germinação, sua atividade deve ser eficientemente regulada, de modo a evitar a hidrólise prematura de proteínas. Dentre os mecanismos desenvolvidos para o controle dessa atividade, destaca-se a interação com inibidores proteolíticos (Magni *et al.*, 2012).

Os inibidores de proteases são proteínas capazes de bloquear reversível ou irreversivelmente a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, por meio da formação de um complexo estável entre enzima-inibidor, a partir de interações entre os aminoácidos presentes no sítio reativo do inibidor, com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas alvo (Macedo *et al.*, 2011). Além da importante função como reguladores enzimáticos durante o processo germinativo de sementes, os inibidores de proteases também têm sido associados ao mecanismo de defesa vegetal contra o ataque de insetos e patógenos, uma vez que são responsáveis por inibir enzimas digestivas ou hidrolíticas necessárias para a “entrada” do organismo na célula vegetal (Kuhar *et al.*, 2012; Magni *et al.*, 2012).

Nesse contexto, estudos envolvendo a degradação de proteínas e a regulação da atividade metabólica das proteases e dos inibidores de proteases, durante a germinação de sementes de Fabaceae pertencentes à flora amazônica, podem contribuir para o entendimento da germinação e das implicações do metabolismo das proteínas neste processo. Adicionalmente, considerando o foco nos sistemas de produção agrícola sustentáveis, a identificação de novos produtos na diversidade da flora tropical apresenta-se como alternativa ao modelo atual, pautado na aplicação química, em particular, no que concerne aos métodos de proteção das plantas.

2. Referencial Teórico

2.1. Desenvolvimento das sementes

O processo de desenvolvimento das sementes ocorre durante a embriogênese, que consiste em um período no qual o zigoto sofre várias alterações morfológicas e celulares, resultando na formação de um embrião maduro, composto de eixo embrionário (radícula e parte aérea) e cotilédones, que muitas vezes contém altos níveis de reservas estocadas como carboidratos, lipídeos e proteínas. Neste sentido, os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário estabelecem a organização estrutural da planta, além de preparar o embrião para a dormência e germinação (Marilyn e Harada, 1993; Angelovici *et al.*, 2010).

Duas fases distintas são observadas durante o desenvolvimento da semente, a primeira (morfogênese) consiste em um período de formação do embrião, devido às intensas divisões celulares e consequente formação de tecidos e órgãos embrionários e, nessa fase, há aumento rápido na massa fresca da semente e no conteúdo de água (Figura 1). A segunda fase consiste no período de maturação da semente, caracterizada pelo acúmulo de reservas de estocagem, mudanças no tamanho e massa (fresca e seca) do embrião, redução no conteúdo de água, supressão da germinação precoce, aquisição da tolerância à dessecação, desidratação e quiescência e, em muitas espécies, indução da dormência (Figura 1) (Goldberg *et al.*, 1994; De Castro e Hilhorst, 2000; De Castro *et al.*, 2004).

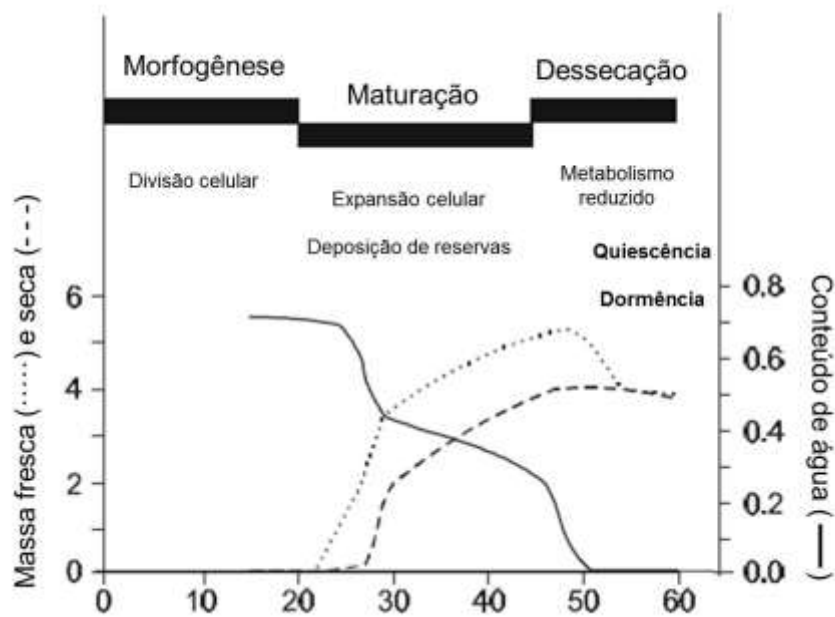


Figura 1. Desenvolvimento da semente. Mudanças na massa fresca e seca e conteúdo de água delimitam o desenvolvimento da semente em fases distintas, assim como características celulares e fisiológicas (De Castro e Hilhorst, 2000; De Castro *et al.*, 2004).

2.2. Deposição de proteínas

As reservas estocadas nas sementes podem ser distinguidas em dois tipos principais, àquelas destinadas à produção principal de energia, utilizadas no início da germinação (reservas de sacarose e oligossacarídeos da série rafínosica) e, àquelas utilizadas pelas plântulas em crescimento, pela transferência de matéria dos tecidos de reserva para as estruturas em desenvolvimento, como por exemplo, as proteínas (Buckeridge *et al.*, 2004a).

As proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, durante as fases intermediária e final do processo de maturação sendo, posteriormente, transportadas e acumuladas em corpos protéicos (vacúolos de estocagem de proteínas) (Figura 2) (Herman e Larkins, 1999; Buckeridge *et al.*, 2004b; Angelovici *et al.*, 2010). Durante o período de deposição, a degradação e o *turnover* das proteínas de reserva são insignificantes, indicando que esses compostos são protegidos contra a hidrólise prematura (Müntz, 2001).

A síntese dessas moléculas ocorre em períodos bem definidos durante o desenvolvimento da semente, quando os mRNAs, que codificam as proteínas, estão presentes exclusivamente nos tecidos de reserva (cotilédones e endospermas). No retículo endoplasmático (local de síntese), as proteínas apresentam peptídeos sinalizadores que as direcionam para o lúmen, os quais são removidos por clivagem proteolítica e, então, as proteínas são dobradas em suas estruturas tridimensionais, e as pontes dissulfeto, quando presentes, são formadas. Durante ou após a síntese, as proteínas, em geral, sofrem várias modificações, incluindo glicosilação, dobramento e montagem, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Herman e Larkins, 1999; Buckeridge *et al.*, 2004b; Bewley *et al.*, 2013).

De modo geral, o transporte das proteínas ocorre via complexo de Golgi. Contudo, em cereais, a formação dos corpos proteicos ocorre de forma direta, a partir do retículo endoplasmático rugoso. Nas monocotiledôneas, os corpos proteicos podem ser constituídos apenas pela agregação de proteínas de reserva, lançadas no citoplasma ou sequestradas nos vacúolos por autofagia (Figura 2). Em eudicotiledôneas, as proteínas de reserva são armazenadas nos corpos proteicos compostos por dupla membrana, proeminentes especialmente nas células do parênquima dos cotilédones, bem como no eixo embrionário (Herman e Larkins, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Buckeridge *et al.*, 2004b; Vitale e Hinz, 2005; Bewley *et al.*, 2013).

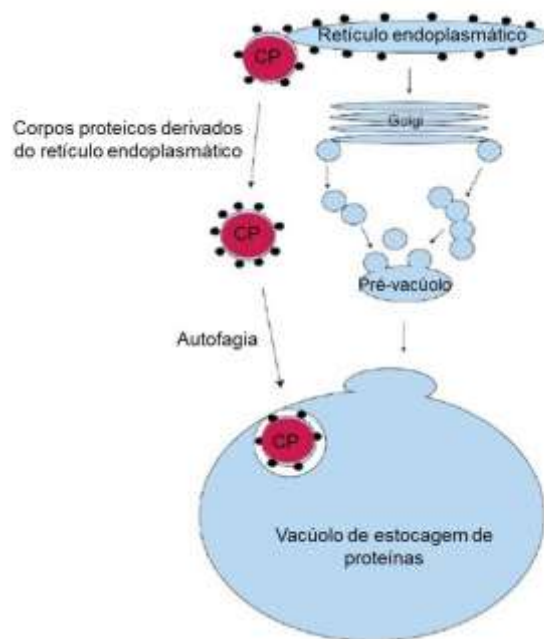


Figura 2. Diagrama conceitual de síntese de proteínas. CP: Corpos proteicos. Adaptado de Herman e Larkins (1999).

Outra forma utilizada pelas plantas para acumular proteínas de reservas são os vacúolos líticos, que contêm enzimas proteolíticas ácidas, responsáveis por hidrolisar proteínas para o crescimento na fase pós-germinativa, suportando o desenvolvimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.*, 2004b).

2.3. Germinação

A germinação tem recebido diferentes conceitos, dependendo do campo de investigação. Do ponto de vista biológico, fisiológico ou botânico, a germinação é descrita como um processo que tem início com a embebição, promovendo a reativação do metabolismo, culminando com a retomada do crescimento do eixo embrionário, com conseqüente rompimento do tegumento pela raiz primária (Labouriau, 1983; Martinez, 2011).

Do ponto de vista tecnológico ou agrônômico, a germinação é reconhecida como sendo a produção de uma planta normal, como resultado da intensificação do metabolismo da semente e desenvolvimento das partes do embrião (Brasil, 1992; Martinez, 2011).

Considerando a germinação sob o ponto de vista fisiológico, os eventos subsequentes ao alongamento do eixo radicular, como a mobilização de reservas estocadas, estão associados ao crescimento e desenvolvimento da plântula (Bewley, 1997; Oliveira, 2010).

O processo germinativo envolve tanto reações catabólicas, como a degradação de substâncias de reserva, quanto reações anabólicas, com a produção de novas células e organelas no embrião. Assim, a germinação consiste, fundamentalmente, em eventos como a reidratação, em que ocorre a embebição de água pelas células do embrião, a formação e liberação de enzimas, como a reativação das organelas celulares e macromoléculas e, o metabolismo de substâncias de reserva, gerando energia metabólica, culminando no crescimento e divisão celular (Popinigis, 1985; Martinez, 2011).

De modo geral, a germinação tem início com a entrada da água na semente, seguindo um padrão trifásico de absorção (Figura 3).

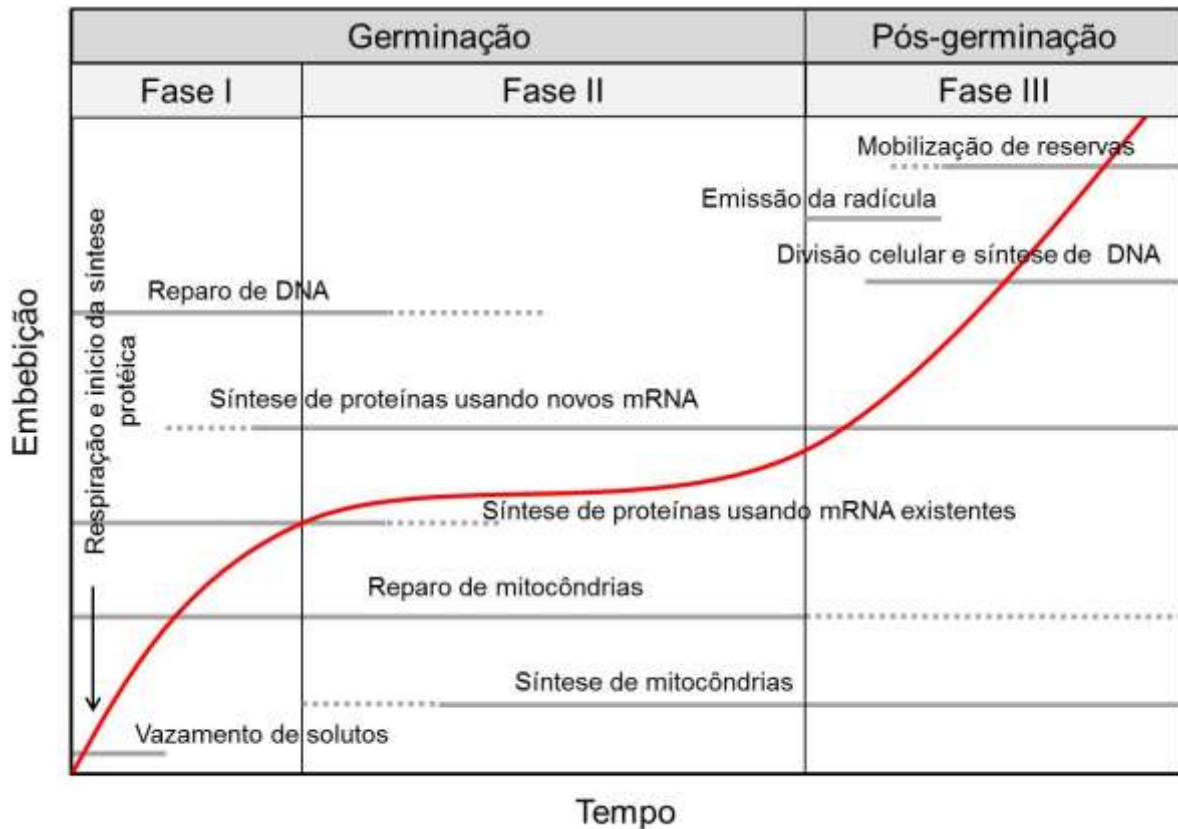


Figura 3. Principais eventos metabólicos durante a embebição de sementes. Adaptado de Bewley (1997).

A fase I é rápida, considerada uma etapa puramente física, que depende apenas do potencial matricial da semente, sendo caracterizada pelo aumento na absorção de água. O influxo de água dentro das células resulta em perturbação estrutural temporal, particularmente nas membranas, levando ao imediato e rápido vazamento de solutos e de compostos de baixa massa molecular. Quando todas as matrizes atingem hidratação plena, o conteúdo de água na semente atinge um nível de platô, o que caracteriza a Fase II, consistindo em intervalo ou período para preparação e ativação do metabolismo (Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

A fase III da embebição, conhecida como “ponto final” da germinação, é caracterizada pelo aumento na absorção de água associado à expansão celular e crescimento da radícula (Bewley, 1997; Nonogaki *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011).

Durante o processo de absorção de água pela semente, as estruturas e enzimas necessárias à retomada da atividade metabólica já estão presentes nas

sementes, onde as células contêm mitocôndrias, enzimas do ciclo de Krebs e oxidases terminais o suficiente para prover a quantidade de ATP necessária para suportar o metabolismo durante várias horas de embebição (Nonogaki *et al.*, 2010).

Ainda na fase I da germinação, ocorre a síntese de proteínas que, inicialmente, depende de ribossomos e mRNAs “pré-existentes”, sintetizados durante o desenvolvimento da semente. Posteriormente, a síntese de novas proteínas depende de novos ribossomos e mRNAs sintetizados durante o processo germinativo (Figura 3). Adicionalmente, essa fase caracteriza-se por acentuado aumento da atividade respiratória, resultando na produção da energia necessária para suportar várias reações bioquímicas, além do início da degradação de algumas substâncias de reserva que deverão nutrir o crescimento do eixo embrionário (Bewley, 1997; Martinez, 2011).

Duas etapas distintas da síntese de DNA nas células da radícula são evidenciadas. A primeira, com início logo após a embebição, está associada ao reparo de danos aos DNAs, que podem ocorrer durante a fase de maturação e de secagem da semente. A segunda etapa corresponde à síntese de DNA associada à divisão celular (Figura 3) (Nonogaki *et al.*, 2010). Outra característica importante é que as substâncias desdobradas na fase I, e transportadas durante a fase II, são organizadas em substâncias complexas que irão dar origem às estruturas que permitirão o crescimento do eixo embrionário, possibilitando ganho de biomassa em função de interações metabólicas pertencentes às três fases (Martinez, 2011).

A emergência da radícula através das estruturas ao redor do embrião caracteriza o término da germinação e marca o início do desenvolvimento da plântula. Embora a germinação termine com a protusão da radícula, o processo germinativo também pode envolver a preparação para o crescimento da plântula até que ela se torne autosuficiente na síntese de compostos orgânicos. Entretanto, até esse momento, o crescimento da plântula é abastecido pelos compostos derivados das reservas das sementes, aspecto que não configura um organismo autotrófico “stricto sensu”.

2.4. Mobilização de proteínas

A degradação de proteínas em plantas é um processo complexo envolvendo múltiplas vias proteolíticas, que podem ser conduzidas em diferentes compartimentos celulares (Palma *et al.*, 2002).

A mobilização de proteínas tem início com o desenvolvimento do embrião, normalmente suportando o crescimento da plântula até que ela se torne autotrófica. Desse modo, as reservas de proteínas são mobilizadas também para a estruturação dos processos que conferem capacidade de absorver nutrientes e realizar fotossíntese (Buckeridge *et al.*, 2004a). É importante ressaltar que a mobilização não é simultânea em todas as células, ocorrendo em tempos e locais distintos, onde diferentes enzimas atuam em diferentes partes da planta nascente, aspecto que pode ser descrito como mobilizações tecido e tempo específicas (Tiedemann *et al.*, 2001). Do ponto de vista metabólico, os precursores enzimáticos são sintetizados, transportados para os corpos protéicos e, após sua ativação, iniciam a hidrólise das proteínas endógenas (Tiedemann *et al.*, 2001).

Em períodos específicos da germinação, as proteínas de reserva são hidrolisadas a aminoácidos livres, que servirão como precursores para a síntese de novas proteínas ou de outros compostos constituídos de nitrogênio (Zakharov *et al.*, 2004). Durante a germinação, os aminoácidos liberados a partir da hidrólise de proteínas de reserva presentes no eixo radicular e cotilédones, por meio da ação de proteases já existentes na semente seca e ativadas pela embebição, são reutilizados para a síntese de novas proteínas na mesma região de origem. Após a germinação, as reservas de proteínas do eixo radicular são esgotadas e a fonte de aminoácidos, para a síntese de novas proteínas, passa a ser suprida exclusivamente pelos cotilédones, onde muitos dos aminoácidos são transportados para as regiões de crescimento, embora alguns sejam retidos para a síntese de proteases e de outras hidrolases, requeridas para a mobilização das reservas de amido e lipídeos (Figura 4) (Müntz, 2001; Bewley *et al.*, 2013).

Com o fim da proteólise, os corpos protéicos vazios são fundidos formando grandes vacúolos, onde uma variedade de hidrolases é secretada, transformando-se em vesículas autofágicas responsáveis pela senescência e degeneração dos cotilédones (Buckeridge *et al.*, 2004a).

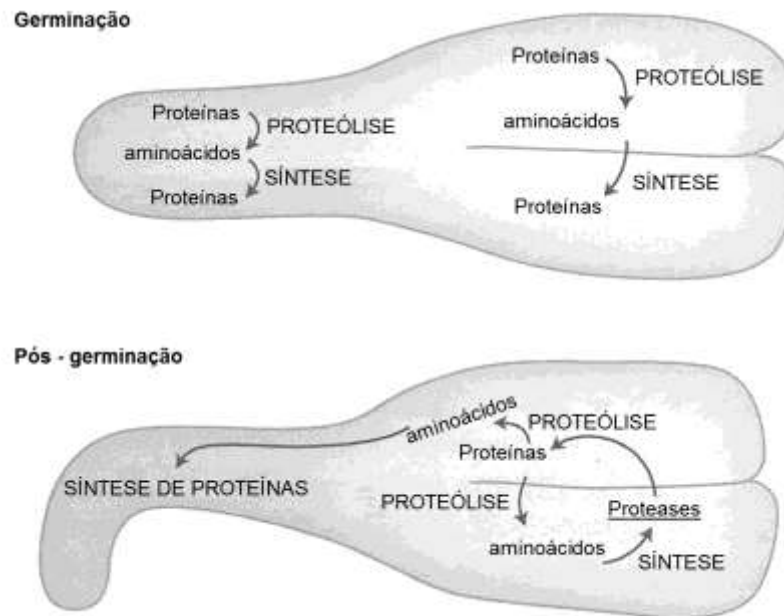


Figura 4. Comparação dos padrões de mobilização proteica no eixo radicular e cotilédones durante a germinação e pós-germinação de sementes de eudicotiledôneas. Adaptado de Müntz (2001) e Bewley *et al.* (2013).

2.5. Enzimas proteolíticas

A hidrólise de proteínas de reserva a seus aminoácidos constitutivos requer uma classe de enzimas chamadas proteases ou peptidases, onde algumas são responsáveis pela hidrólise total da proteína, enquanto outras produzem pequenos polipeptídeos que, posteriormente, são degradados por peptidases (Figura 5). Dessa maneira, as proteases podem ser categorizadas de acordo com o modo pelo qual hidrolisam seus substratos (Zakharov *et al.*, 2004; Bewley *et al.*, 2013).

Algumas dessas peptidases, especialmente serinocarboxipeptidases, estão presentes nos vacúolos de estocagem de proteínas e nos vacúolos líticos, enquanto outras peptidases, como as aminopeptidases, estão localizadas no citosol e atuam sobre oligopeptídeos transportados dos vacúolos líticos para o citosol (Zakharov *et al.*, 2004).

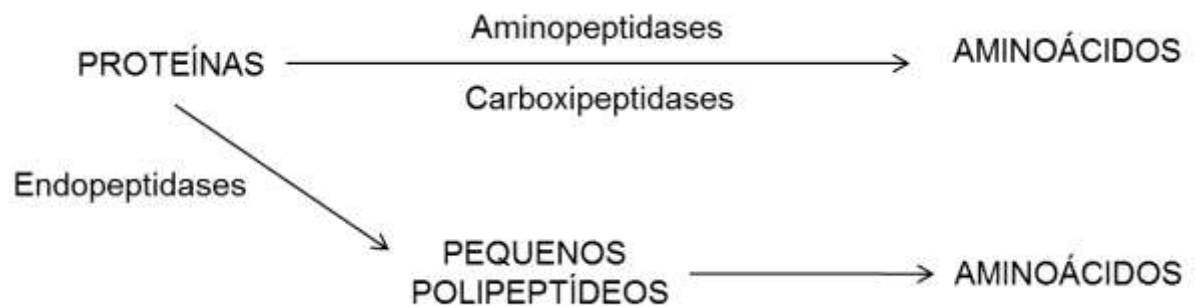


Figura 5. Representação esquemática da hidrólise de proteínas por proteases e proteinases. Adaptado de Bewley *et al.* (2013).

Endopeptidases (proteinases) são responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas internas das proteínas, produzindo pequenos polipeptídeos. Essas proteinases são classificadas em quatro maiores grupos, compreendendo as serino, cisteíno, aspártico e metaloproteinases, diferenciando-se pela presença de aminoácidos ou íons metálicos específicos em determinadas posições dos seus sítios ativos (Tabela 1) (Schaller, 2004; Tsiatsiani *et al.*, 2012; Bewley *et al.*, 2013).

Tabela 1. Diferenças entre as classes de enzimas proteolíticas (endopeptidases). Adaptado de: Neurath (1984) e van der Hoorn (2008).

Classe catalítica	Proteinases representativas	Componentes característicos do sítio reativo
Serinoproteinases	Tripsina, quimotripsina e elastase	Ser – His
Cisteínoproteinases	Papaína e bromelaína	Cys-His
Aspárticoproteinases	Pepsina	Asp
Metaloproteinases	Termolisina	Zn ⁺²

Aminopeptidases (proteases) clivam os aminoácidos da extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica, sendo encontradas em múltiplas formas,

localizadas no citosol. Carboxipeptidases (proteases), em contrapartida, clivam os aminoácidos da extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica, também encontradas em múltiplas formas, porém, são localizadas nos corpos proteicos (Palma *et al.*, 2002; Bewley *et al.*, 2013).

Muitas funções têm sido atribuídas à atividade das proteases nas sementes, como a remoção de proteínas anormais/ deformadas ou modificadas, o suprimento de aminoácidos necessários para a síntese de novas proteínas, a contribuição na maturação de zimogênios pela hidrólise limitada, o controle do metabolismo pela redução na abundância de enzimas e proteínas regulatórias e, a remoção de peptídeos sinais das proteínas, antes de sua integração final nas organelas (Palma *et al.*, 2002).

2.6. Degradação das proteínas de reserva

A mobilização de proteínas de reserva durante a embebição até a germinação consiste em um processo essencial para o estabelecimento da plântula, onde a embebição das sementes marca o maior número de mudanças no metabolismo de proteínas (Tan-Wilson e Wilson, 2012; Bewley *et al.*, 2013).

Assim, proteínas sintetizadas e estocadas em abundância, durante o desenvolvimento da semente, são hidrolisadas a aminoácidos livres para a biossíntese de novas moléculas e formação de novos tecidos (Tan-Wilson e Wilson, 2012).

Durante a mobilização, as proteínas de reserva, inicialmente, sofrem proteólise limitada, a partir da atividade de endopeptidases, em posições expostas na superfície molecular e, assim, sofrem modificações estruturais que as tornam mais susceptíveis às futuras degradações enzimáticas (Figura 6) (Bewley *et al.*, 2013).

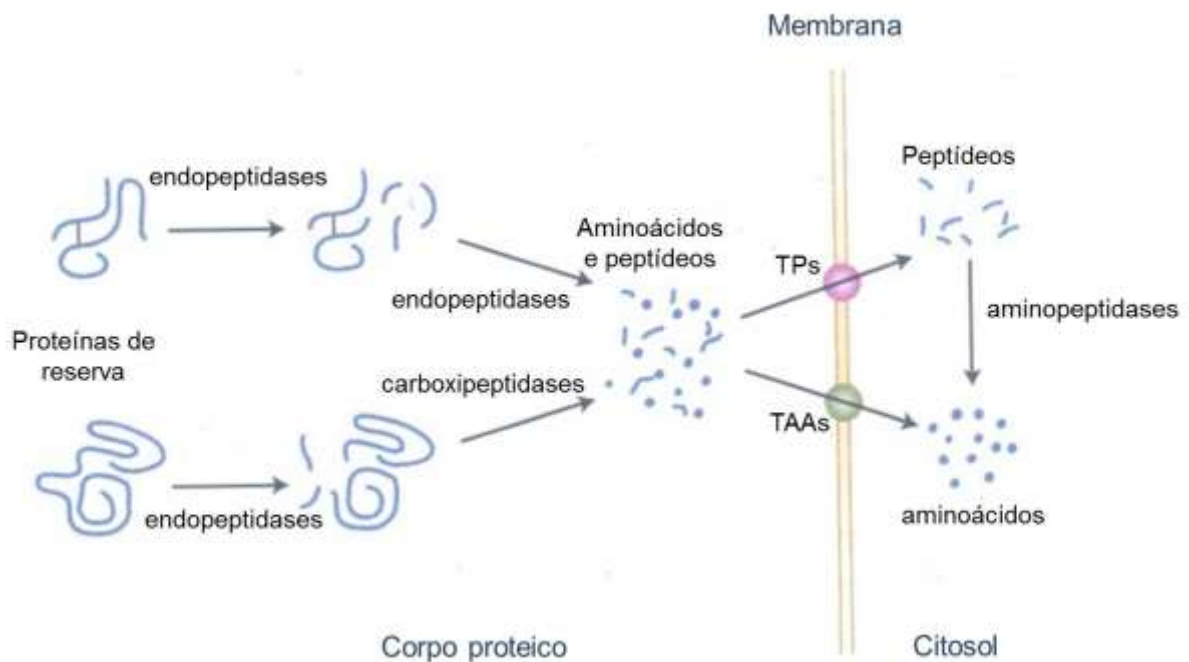


Figura 6. Representação das vias de degradação de proteínas de reserva. TPs: transportadores de peptídeos. TAAs: transportadores de aminoácidos. Adaptado de Bewley *et al.* (2013).

Hidrólises subsequentes por endo e carboxipeptidases resultam na produção de pequenos peptídeos e aminoácidos que, posteriormente, são transportados dos corpos proteicos para o citosol por transportadores ativos, onde os peptídeos são ainda degradados a aminoácidos pela ação de aminopeptidases (Abdala *et al.*, 1999; Bewley *et al.*, 2013).

A degradação proteolítica das proteínas de reserva parece ser um processo relativamente simples, evitada durante o desenvolvimento da semente e iniciada após a embebição e germinação. Contudo, a linha divisória entre a maturação das sementes (quando as proteínas de reserva são sintetizadas) e o crescimento das plântulas (quando as proteínas de reserva são degradadas a aminoácidos livres) ainda não é totalmente esclarecida (Müntz *et al.*, 2001; Tan-Wilson e Wilson, 2012).

Estudos envolvendo a mobilização de proteínas de reserva entre diferentes espécies têm demonstrado características comuns quanto aos locais mais vulneráveis à clivagem e variações quanto à presença de enzimas proteolíticas, essenciais para a realização da hidrólise proteica (Tan-Wilson e Wilson, 2012).

2.7. Regulação da mobilização de proteínas de reserva

À semelhança de outros processos importantes no desenvolvimento das sementes e no crescimento pós-germinação, o controle tanto do acúmulo quanto da hidrólise das proteínas é essencial para o bom funcionamento dos processos fisiológicos que ocorrem durante a germinação, previndo a hidrólise prematura dessas reservas. Vários mecanismos são desenvolvidos para controlar a mobilização de proteínas durante a germinação, como por exemplo, a presença de hormônios vegetais, a solubilidade e compartimentalização, a diferença de pH e a interação com inidores proteolíticos. No que diz respeito ao controle hormonal, fitohormônios são responsáveis por regular o metabolismo de síntese de proteínas durante o desenvolvimento da semente até à proteólise pós-germinação (Tan-Wilson e Wilson, 2012). O modelo mais claro da atuação dos fitohormônios conhecido é em sementes de monocotiledôneas (*Hordeum vulgare*), onde o ácido giberélico secretado pelo embrião inicia a mobilização proteica nas células da camada de aleurona (Davy *et al.*, 1998).

Em sementes de *Oriza sativa*, durante as primeiras 72 horas de embebição, o ácido giberélico induz a expressão de uma cisteínoproteinase associada à degradação da glutelina (proteína de reserva) (Yang *et al.*, 2007).

Em contraste, o controle hormonal sobre a mobilização de proteínas de reserva em sementes de eudicotiledôneas ainda não é totalmente esclarecido. A ação do ácido giberélico e dos brassinoesteróides tem sido descrita durante a germinação e desenvolvimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana*. Contudo, suas funções sobre a degradação proteica ainda não foram totalmente desvendadas nesse sistema, uma vez que as proteases responsáveis pela hidrólise de proteínas ainda não foram identificadas (Holdsworth *et al.*, 2008).

Além da compactação estrutural de algumas proteínas de reserva, proporcionando o acesso limitado por proteases, as proteínas de reserva podem ser protegidas contra a proteólise devido à subcompartimentalização dessas moléculas, onde proteínas de reserva são encontradas na porção cristalóide dos corpos proteicos e as proteases na matriz, em torno do cristalóide. Dessa maneira, após a embebição das sementes, as proteases tornam-se acessíveis às proteínas de reserva, iniciando a sua hidrólise (Weeda *et al.*, 2010; Tan-Wilson e Wilson, 2012).

Outra forma de regulação da atividade de enzimas proteolíticas durante a maturação da semente ocorre por meio da diferença de pH do meio e o pH ótimo para a atividade da enzima, sendo as proteases ativadas em faixas de pH variando de 3,0 a 5,5. Assim, após a embebição, conforme demonstrado em *Triticum aestivum*, a camada de aleurona reduz o pH do endosperma até próximo de 4,2, pela secreção e absorção de ácido málico. Dessa forma, a acidificação do meio produz um ambiente propício à atividade de proteases, além de aumentar a solubilidade das proteínas de reserva (Martinez-Camacho *et al.*, 2004).

Inibidores proteolíticos também têm sido reportados como reguladores do processo de degradação proteica. Em *Fagopyrum esculentum*, a baixa atividade de metaloproteinases tem sido atribuída à existência de um inibidor de protease, responsável por formar complexos com enzimas proteolíticas. Após a dissociação desse complexo enzima-inibidor, a enzima é liberada, tornando-a ativa para a realização da hidrólise das proteínas de reserva (Elpidina *et al.*, 1991).

Em sementes de monocotiledôneas, fitocistatinas (inibidores proteolíticos) interagem fortemente com cisteínoproteases, sugerindo participação na regulação da atividade dessas hidrolases (Oliveira *et al.*, 2003). Em espécies de Fabaceae, as fitocistatinas estão localizadas no citoplasma, sugerindo atuação na proteção para o caso de rompimento dos corpos proteicos contendo proteases, ou ainda, na proteção das sementes contra a ação de proteases secretadas por insetos, fungos ou outros fitopatógenos (Dubey *et al.*, 2007).

2.8. Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases são proteínas regulatórias dos eventos proteolíticos, sendo ubíquas em todos os organismos vivos, incluindo plantas, animais e microorganismos, e estão envolvidos em diversos processos metabólicos (Mello *et al.*, 2006; Hernández-Nistal *et al.*, 2009). Em muitas espécies de plantas, os inibidores estão presentes em altas concentrações nas sementes, representando de 5 a 15% do conteúdo de proteínas totais. Em sua grande maioria, são encontrados nas famílias Fabaceae, Brassicaceae, Poaceae, bem como em tubérculos de Solanaceae (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Shee e Sharma, 2008; Rufino *et al.*, 2013).

Essas moléculas são proteínas capazes de reduzir a velocidade da reação catalisada por uma enzima, resultando na inibição reversível e/ou irreversível da atividade proteolítica, por meio da formação de um complexo estável, através da complementariedade do sítio reativo do inibidor ao sítio ativo da enzima (Figura 7) (Bode e Huber, 2000; Laskowski e Qasim, 2000; Habib e Fazili, 2007; Joshi *et al.*, 2013). A formação desse complexo estável entre enzima e inibidor é dependente da interação entre aminoácidos, presentes no sítio reativo do inibidor com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas proteolíticas alvo (Haq *et al.*, 2004; 2005; Joshi *et al.*, 2013).

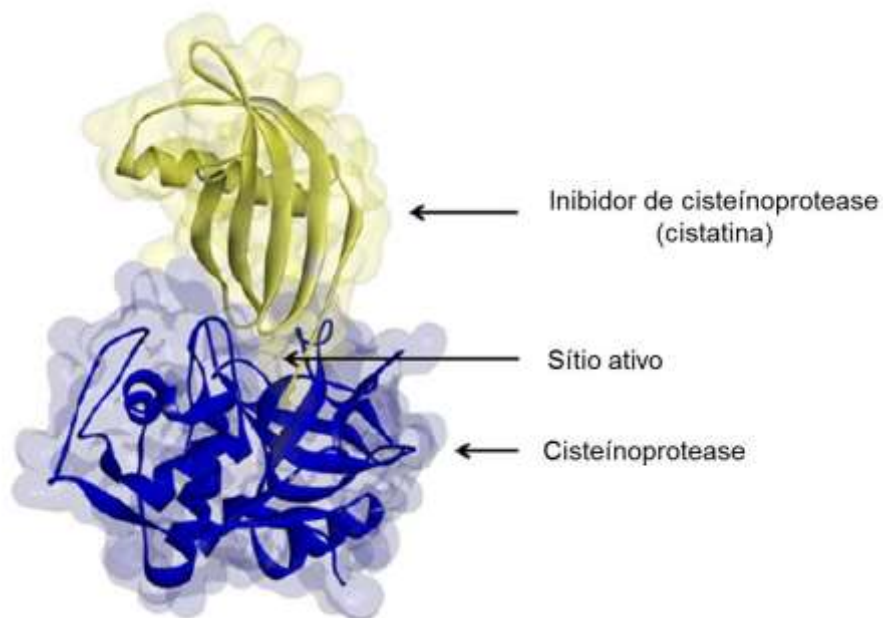


Figura 7. Formação de complexo estável entre enzima (cisteínoptase) e inibidor. Adaptado de Vorster *et al.* (2013).

Os inibidores são considerados moléculas estáveis, sendo resistentes à variação de temperatura e pH e à proteólise por proteases diferentes daquelas não inibidas por eles. Essa estabilidade tem sido atribuída à presença de pontes dissulfeto (Silva, 2010).

Em sementes, os inibidores de proteases são depositados em grandes quantidades durante o período de maturação, sugerindo sua função na deposição de proteínas de reserva, mascarando a atividade de proteases pré-existentes, assim

como durante a dormência na “proteção” das proteínas de reserva. Com o decorrer da germinação e o desenvolvimento das plântulas, proteínas de reserva são hidrolisadas, acompanhadas pelo aumento da atividade de proteases e decréscimo no conteúdo de inibidores (Figura 8) (Benchabane *et al.*, 2010; Kansal *et al.*, 2010).



Figura 8. Deposição e mobilização de proteínas de reserva associado à presença de proteases e inibidores de proteases nas sementes. Adaptado de Benchabane *et al.* (2010).

2.8.1. Classificação dos inibidores de proteases

Os inibidores de proteases de origem vegetal têm sido extensivamente isolados e caracterizados quanto aos aspectos estruturais e funcionais em muitas espécies de Fabaceae, especialmente, nas subfamílias Mimosoideae e Caesalpinioideae. Dentre os inibidores mais estudados, estão aqueles que afetam a atividade de serino e cisteínoproteases (Richardson, 1991; Haq *et al.*, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2007). Entretanto, novos inibidores têm sido descritos e identificados de acordo com a classificação proposta pela base de dados MEROPS (www.merops.sanger.ac.uk), onde novas famílias são criadas quando novos inibidores apresentam sequências peptídicas ou propriedades bioquímicas distintas (Rawlings *et al.*, 2008; Oliveira, 2011).

Os inibidores de serinoproteases são facilmente encontrados em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos da mesma planta, por isso, são os mais estudados dentre as classes de inibidores, com destaque para os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (Haq *et al.*, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2010; Klomklao *et al.*, 2011).

Os inibidores do tipo Kunitz ocorrem, predominantemente, nas famílias Fabaceae, Solanaceae e Gramineae, podendo ser encontrados em todas as partes das plantas. Em Fabaceae, esses inibidores apresentam cadeia polipeptídica única, com massa molecular em torno de 20 kDa, baixo conteúdo de cisteína (normalmente quatro resíduos formando duas pontes dissulfeto intracadeia) e um único sítio reativo que lhes permite inibir somente uma molécula de enzima, formando um complexo 1:1 (inibidor: enzima), geralmente, inibindo a tripsina. Contudo, muitos inibem fracamente a quimotripsina, bem como podem ser ativos contra outras classes de enzimas, que não serinoproteases, tais como papaína e bromelaína (proteases cisteínicas) (Figura 9) (Richardson, 1991; Haq *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2010; Klomklao *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013).

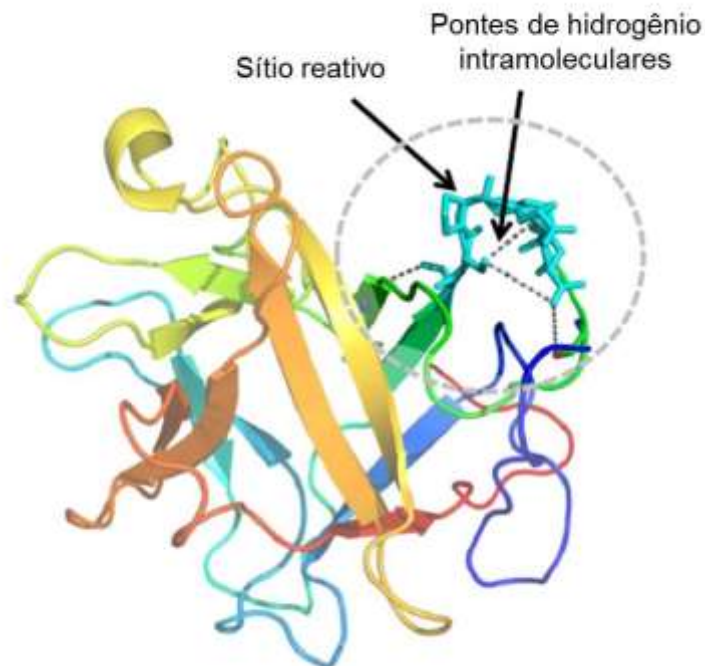


Figura 9. Modelo estrutural de um inibidor do tipo Kunitz. Adaptado de Joshi *et al.* (2013).

Os inibidores Bowman-Birk também são extensivamente encontrados nas famílias Fabaceae, Solanaceae e Gramineae e, são caracterizados por apresentarem massa molecular variando de 8 a 10 kDa e pela presença, em sua grande maioria, de dois domínios ou sítios inibitórios, podendo também ser

encontrados inibidores com três, quatro e oito domínios (Figura 10) (Richardson, 1991; Zhou *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2010; Kumar e Gowda, 2013).

Esses dois domínios inibitórios, característicos desses inibidores, são formados devido à presença de cisteínas (aproximadamente 14 resíduos) em sua estrutura protéica, as quais formam 7 pontes dissulfeto intracadeia, permitindo a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, capazes de inibir simultaneamente duas moléculas de tripsina ou ainda uma molécula de tripsina e outra de quimotripsina ou elastase, formando os complexos 1:2 (inibidor: tripsina: tripsina) ou 1:1:1 (inibidor: tripsina: quimotripsina/elastase), localizados em extremos opostos da molécula (Tsunogae *et al.*, 1986; Gariani e Leatherbarrow, 1997; Clemente e Domoney, 2006; Rocco *et al.*, 2011).

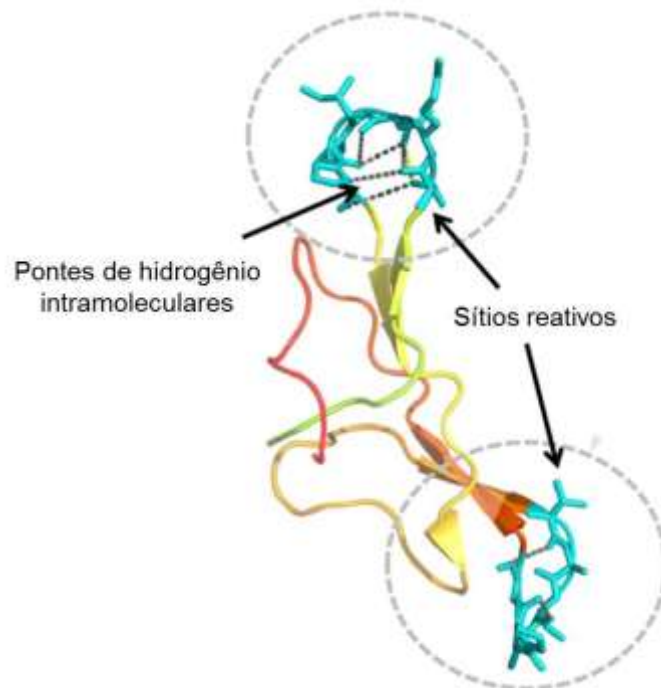


Figura 10. Modelo estrutural de um inibidor do tipo Bowman-Birk. Adaptado de Joshi *et al.* (2013).

Inibidores de cisteínoproteases, por sua vez, são responsáveis pela inibição da atividade da papaína, actinidina ou bromelaína, sendo a inibição da papaína uma das atividades mais bem estudadas. Os membros dessa classe também são denominados cistatinas e estão agrupados em quatro famílias (cistatina I, cistatina II, cistatina III e cistatina IV), que são assim designados devido à similaridade das

sequências primárias, das massas moleculares, do número de pontes dissulfeto e da localização subcelular (Xavier-Filho, 1992; Oliveira *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2010).

Os inibidores da família cistatina IV, também conhecidos como fitocistatina, representam todos os inibidores de cisteínoproteases descritos em plantas, sendo amplamente identificados em monocotiledôneas e eudicotiledôneas. Essas proteínas apresentam massa molecular variando de 5 a 87 kDa e estão divididas em dois grupos, um constituído de um único domínio (compreendendo a maioria das fitocistatinas) e o outro constituído de múltiplos domínios (compreendendo os inibidores isolados de tubérculos de batata e de folhas de tomate) (Pernas *et al.*, 1998; Keyster *et al.*, 2013).

2.9. Diversidade e características das espécies da família Fabaceae

A Fabaceae compreende a terceira maior família botânica juntamente com a Orchidaceae e a Asteraceae, abrangendo cerca de 730 gêneros e 19.325 espécies, as quais estão presentes em diversos ecossistemas do mundo (Lewis *et al.*, 2005). No Brasil, é uma das mais representativas, com cerca de 2.100 espécies nativas, reunidas em 188 gêneros e distribuídas em diferentes ecossistemas. Dentre as estimativas de espécies de Fabaceae para a Amazônia, uma listagem baseada nos registros de herbários locais reúne 1241 espécies distribuídas em 148 gêneros. Nessa região, as leguminosas ocorrem nos mais diferentes *habitats*, incluindo matas primárias, várzeas, savanas, campinarana, igapós e áreas secundárias e abertas (Lima *et al.*, 2007).

A família Fabaceae está dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (antiga Papilionoideae), com boa parte de suas espécies, originalmente pertencentes à flora brasileira, assumindo os mais diversificados habitats ou formas vegetativas de vida (árvores de pequeno a grande porte, arbustos, cipós e ervas) (Polhill e Raven, 1981; Barroso *et al.*, 1991; Joly, 1993; Silva e Souza, 2002; Lewis *et al.*, 2005).

Sua importância econômica é grande e muito diversificada, sendo utilizada desde a alimentação humana e animal, até na produção de corantes, óleos, perfumes e inseticidas, além de apresentar uso medicinal, agrônômico

(enriquecimento de solos), ornamental e, principalmente, na produção de madeiras nobres e valiosas usadas na marcenaria e em construções em geral (Ferreira *et al.*, 2004). As leguminosas também são apontadas como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, particularmente nos países subdesenvolvidos (Lima *et al.*, 1994).

2.9.1. Aspectos gerais de *Parkia multijuga* Benth.

A espécie *Parkia multijuga*, também conhecida por faveira, paricá - grande da terra firme, benguê, arara-tucupi e visgueiro, pertencente à subfamília Mimosoideae, apresenta ampla distribuição em toda a Amazônia, com ocorrência em mata primária ou secundária e várzea alta em solo argiloso (Ramos *et al.*, 2000; Lorenzi, 2008). É uma espécie arbórea de grande porte, de fuste cilíndrico e casca cinza ou avermelhada, que exsuda resina (Figura 11). Seu principal potencial econômico está associado ao seu valor madeireiro, podendo também ser utilizada nas indústrias de celulose e papel e em plantios com a finalidade de recuperação de áreas degradadas devido ao seu rápido crescimento (Nascimento *et al.*, 2003; Carvalho, 2009).



Figura 11. Aspectos do fruto e sementes de *P. multijuga*. Fotos: Larissa Ramos Chevreuil.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade de proteases e de inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*, além de purificar e caracterizar a atividade de inibidores de tripsina, visando compreender os mecanismos da regulação proteica associada à germinação e identificar características bioquímicas de inibidores de proteases com uso potencial na área biotecnológica.

3.2. Objetivos específicos

- Monitorar a síntese e/ou a degradação de proteínas durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes *P. multijuga*;
- Detectar a atividade de proteases (serino e cisteínoproteases) e de inibidores de proteases (inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína) durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes *P. multijuga*;
- Purificar inibidores de tripsina em sementes *P. multijuga*;
- Caracterizar a atividade dos inibidores purificados quanto à massa molecular, especificidade inibitória e estabilidade frente à variação de temperatura e pH;
- Determinar as constantes inibitórias dos inibidores de proteases purificados de sementes de *P. multijuga*;
- Determinar a sequência N-terminal dos inibidores de proteases purificados.

4. Referências Bibliográficas

Abdala, A.P.; Takeda, I.H.; Freitas Jr., J.O.; Alves, K.B. 1999. Purification and partial characterization of *Phaseolus vulgaris* seed aminopeptidase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 1489-1492.

Angelovici, R.; Galili, G.; Fernie, A.R.; Fait, A. 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, 15(4): 211-218.

Bariane, A.; Gonçalves, J.F.C.; Chevreuil, L.R.; Pereira, J.R.P.C.; Souza, L.A.G.; Bentes, J.L.S.; Pando, S.C. 2012. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 38: 131-138.

Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães, E.F.; Lima, H.C.de. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil, vol 2*. Imprensa Universitária, Minas Gerais. 377p.

Benchabane, M.; Schlüter, U.; Vorster, J.; Goulet, M.C.; Michaud, D. 2010. Plant cystatins. *Biochimie*, 92: 1657-1666.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Bewley, J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, Lexington, KY, USA. 392 pp.

Bhattacharyya, A.; Mazumar, S.; Leighton, S.M.; Babu, C.R. 2006. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization and kinetic properties. *Phytochemistry*, 67: 232 – 241.

Bhattacharyya, A.; Rai, S.; Babu, C.R. 2007. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, (45): 169-177.

Bode, W.; Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477:241-252.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brasil. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. 1992. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNPV/CLAV. 365 pp.

Buckeridge, M. S.; Aidar, M. P. M.; Santos, H. P. dos; Tine, M. A. S. 2004b. Acúmulo de reservas. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 31-50.

Buckeridge, M. S.; Santos, H.P.; Tiné, M.A.S.; Aidar, M.P.M. 2004a. Mobilização de reservas. In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 163-185.

Carvalho, P.E.R. 2009. *Faveira-Benguê, Parkia multijuga*, Comunicado Técnico, Colombo: Embrapa Florestas, Colombo, PR, BR. 6 pp.

Chan, Y.S.; Zhang, Y.; Ng, T.B. 2013. Brown kidney bean Bowman-Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 1306-1314.

Clemente, A.; Domoney, C. 2006. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Current Protein and Peptide Science*, 7: 201-206.

Davy, A.; Svendsen, I.; Sorensen, S.O.; Sorensen, M.B.; Rouster, J.; Meldal, M.; Simpson, D.J.; Cameron-Mills. 1998. Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B. *Plant Physiology*, 117: 255-261.

De Castro, R.D.; Hilhorst, H.W.M. 2000. Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 105-136.

De Castro, R.D.; Hilhorst, H.W.M. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. *In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 149-162.

Dubey, V.K.; Pande, M.; Singh, B.K.; Jagannadham, M.V. 2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6(9): 1077-1086.

Elpidina, E.N.; Voskoboinikova, M.A.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E. 1991. Localization of a metalloproteinase and its inhibitor in the protein bodies of buckwheat seeds. *Planta*, 185: 46-52.

Ferreira, G.C.; Hopkins, M.J.G.; Secco, R.S. 2004. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies de leguminosas comercializadas no estado do Pará, como “angelim”. *Acta Amazonica*, 34 (2): 219 – 232.

Gariani, T.; Leatherbarrow, R.J. 1997. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *Journal of Peptide Research*, 49 (6): 467 – 475.

Goldberg, R.B.; Paiva, G.; Yadegari, R. 1994. Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science*, 266: 605-614.

Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(2): 139-142.

Habib, H.; Fazili, K.M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (3): 68 – 85.

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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431:145-159.

Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. 2005. Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean). *Biochimie*, 87: 1127 – 1136.

Herman, E.M.; Larkins, B.A. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell*, 11: 601-613.

Hernández-Nistal, J.; Martím, I.; Jiménez, T.; Dopico, B.; Labrador, E. 2009. Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 181-187.

Holdsworth, M.J.; Bentsink, L.; Soppe, W.J.J. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179: 33-54.

Joly, A.B. 1993. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. Ed. Nacional, São Paulo. 777p.

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 (11): 5087-5094.

- Kansal, R.; Kuhar, K.; Gupta, R.N.; Gupta, V.K.; Koundal, K.R. 2010. Trypsin inhibitor profile in developing and germination seeds of mungbean and chickpea. *Progressive Agriculture*, 10(2): 225-231.
- Keyster, M.; Adams, R.; Klein, A.; Ludidi, N. 2013. Nitric oxide (NO) regulates the expression of single-domain cystatins in *Glycine max* (soybean). *Plant Omics Journal*, 6(3): 183-192.
- Kim, H.T.; Choi, U.K.; Ryu, H.S.; Lee, S.J.; Kwon, O.S. 2011. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814: 1178-1187.
- Klomklao, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H.; Chaijan, M. 2011. Extration, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiate* (L.) R. Wilczek). *Food Chemistry*, 129: 1348-1354.
- Kuhar, K.; Kansal, R.; Mishra, A.; Koundal, K.R.; Gupta, V.K. 2012. Cloning, characterization and expression analysis of a novel gene encoding Kunitz-type protease inhibitor from *Dolichos biflorus*. *3 Biotech*, 2(3): 199-209.
- Kumar, V.; Gowda, L.R. 2013. Production of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor by an intein mediated protein purification system. *Protein Expression and Purification*, 89: 16-24.
- Labouriau, L.G. 1983. *A germinação de sementes*. Organização dos estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia, 171 pp.
- Laskowski, M.; Qasim, M. A. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochemical Biophysical Acta*, 1477: 324-337.
- Lewis, G.; Schire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew, 577p.

- Lima, H.C.; Correia, C.M.B.; Farias, D.S. 1994. Leguminosae. *In*: Lima, M.P.M.; R.R. Guedes – Bruni (Eds.). *Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo – RJ: Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 167 – 228.
- Lima, L.C.P.; Garcia, F.C.P.; Sartori, A.L.B. 2007. Leguminosae nas florestas estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: ervas, arbustos, subarbustos, lianas e trepadeiras. *Rodriguésia*, 58(2): 331-358.
- Lorenzi, H. 2008. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Platarum. 5 ed. 384p.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Franco, O.L.; Migliolo, L.; Oliveira, C.F.R. 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 158: 164-172.
- Magni, C; Sessa, F; Tedeschi, G; Negri, A; Scarafoni, A; Consonni, A; Duranti, M. 2012. Identification in lupin seed of a serine-endopeptidase activity cleaving between twin arginine pairs and causing limited proteolysis of seed storage proteins. *Molecular Plant*, 1-9.
- Marilyn, A.L.; Harada, J.J. 1993. Embryogenesis in higher plants: Na overview. *The Plant Cell*, 5: 1362-1269.
- Martinez, A.P.C. 2011. *Efeito dos processos de irradiação e germinação nos aspectos nutricionais, sensoriais e microbiológicos em grão de soja (Glycine max Merrill) cultivar BRS216*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 217 pp.
- Martínez-Camacho, J.L.; Vara, L. G.; Hamabata, A.; Mora-Escobedo, R.; Calderón-Salinas, V. 2004. A pH-stating mechanism in isolated wheat (*Triticum aestivum*) aleurone layers involves malic acid transport. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1289-1298.

- Mello, G.C.; Desouza, I.A.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Antunes, E.; Macedo, M.L.R. 2006. Oedematogenic activity induced by Kunitz – type inhibitros from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon*, 47: 150 – 155.
- Müntz, K.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A.; Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1741-1752.
- Nascimento, W. M. O.; Ramos, N.P.; Carpi, V.A.F.; Scarpate Filho, J. A.; Cruz, E.D. 2003. Temperatura e substrato para germinação de sementes de *Parkia platycephala* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista de Agricultura Tropical*, 7(1): 119-129.
- Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224: 350-357.
- Nonogaki, H.; Bassel, G.W.; Bewley, J.D. 2010. Germination – Still a mystery. *Plant Science*, 179 (6): 574-581.
- Oliveira, A.S.; Xavier-Filho, J.; Sales, M.P.; 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46 (1): 91 – 104.
- Oliveira, C.F.R. 2011. *Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de Entada acaciifolia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas/ Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 111pp.
- Oliveira, L.O. 2010. *Uma visão integrada dos eventos proteolíticos de sementes de Vigna unguiculata ao longo dos processos germinativos e pós-germinativos com ênfase em proteinases cisteínicas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 75 pp.
- Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Corpas, F.J.; Romero-Puertas, M.C.; McCarthy, I.; del Rio, L.A. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 521-530.

- Perez, S.C.J.G. de A. 2004. Envoltórios. *In: Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (Orgs). Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, p. 125-134.
- Pernas, M.; Sanchez, M.R.; Gomez, L.; Salcedo, G. 1998. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinase from closely related pests. *Plant Mol. Biol.*, 38: 1235 – 1242.
- Pesquet, E. 2012. Plant proteases – from detection to function. *Physiologia Plantarum*, 145: 1-4.
- Polhill, R.M.; Raven, P. H. 1981. *Advances in Legume Systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens, England: 425p.
- Popinigis, F. 1985. *Fisiologia da semente*. 2ª ed. Brasília, DF. 289 pp.
- Powers, J.C.; Asgian, J.L.; Ekici, O.D.; James, K.E. 2002. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. *Chemical Reviews.*, 102: 4639 – 4750.
- Prasad, E.R.; Dutta-Gupta, A.; Padmasree, K. 2010. Purification and characterization of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of black gram (*Vigna mungo*). *Phytochemistry*, 71: 363-372.
- Rajjou, L.R.; Duval, M.; Gallardo, K.; Catusse, J.; Bally, J.; Job, C.; Job. D. 2012. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63:3.1-3.27.
- Ramos, F.N.; Souza, A.F.; Loureiro, M.B.; Cruz, A.P.M.; Andrade, A.C.S. 2000. Comparação entre métodos de secagem de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosae Mimosoideae). *Revista Árvore*, 24(2): 175-179.
- Rawlings, N.D.; Morton, F.R.; Kok, C.Y.; Kong, J.; Barret, A.J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36: 320-325.
- Rawlings, N.D.; Tolle, D.P.; Barret, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705 – 716.

Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5:259-305.

Rocco, M.; Malorni, L.; Chambery, A.; Poerio, E.; Parente, A.; Di Maro, A. 2011. A Bowman-Birk inhibitor with anti-elastase activity from *Lathyrus sativus* L. seeds. *Molecular Biosystems*, 7: 2500-2507.

Rodriguez, S.V.; Tanda, A.C.; Hernandez, V.A.; Onofre, E.C.; Labra, A.B.; Rangel, A.G. 2010. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 469-465.

Rufino, F.P.S.; Pedroso, V.M.A.; Araujo, J.N.; França, A.F.J.; Rabêlo, L.M.A.; Migliolo, L.; Kiyota, S.; Santos, E.A.; Franco, O.L.; Oliveira, A.S. 2013. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 70-76.

Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183-197.

Shee, C.; Sharma, A.K. 2008. Storage and affinity properties of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor. *Food Chemistry*, 107: 312-319.

Silva, D.S. 2010. *Efeito do inibidor de tripsina de sementes de Adenantha pavonina sobre os lepidópteros Anticarsia gemmatalis e Angasta kuehniella*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas/ Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 90 pp.

Silva, M.F.; Souza, L.A.G. 2002. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo Rio Negro, Amazonas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, série Botânica, 18 (1): 3 – 35.

Tan-Wilson, A.L.; Wilson, K.A. 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145: 140-153.

Tiedemann, J.; Neubohn, B.; Müntz, K. 2000. Different functions of cicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta*, 211:1-12.

Tsiatsiani, L.; Gevaert, K.; Breusegem, F.V. 2012. Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? *Physiologia Plantarum*, 145: 28-40.

Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S.; Takahashi, K. 1986. Structure of the trypsin – binding domain Bowman – Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. *The Journal of Biochemistry*, 100: 1637 – 1643.

van der Hoorn, R.A.L. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanism. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 191-223.

Vitale, A.; Hinz, G. 2005. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science*, 10(7): 316-323.

Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. 2000. *Fundamentos de Bioquímica*. Editora Artes Médicas Sul LTDA, Porto Alegre, RS, BR. 931 pp.

Vorster, B.J.; Schlüter, U.; Plessis, M.; van Wyk, S.; Makgopa, M.E.; Ncube, I.; Quain, M.D.; Kunert, K.; Foyer, C.H. 2013. The cysteine protease-cysteine protease inhibitor system explored in soybean nodule development. *Agronomy*, 3: 550-570.

Wang, J.; Li, Y.; Lo, S.W.; Hillmer, S.; Sun, S.S.M.; Robinson, D.G.; Jiang, L. 2007. Protein Mobilization in germinating mung bean seeds involves vacuolar sorting receptors and multivesicular bodies. *Plant Physiology*, 143: 1628-1639.

Weeda, S.M.; Kumar, G.N.M.; Knowles, N.R. 2010. Correlative changes in proteases and protease inhibitors during mobilisation of protein from potato (*Solanum tuberosum*) seed tubers. *Functional Plant Biology*, 37: 32-42.

- Xavier-Filho, J. 1992. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plant. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 4(1): 1-8.
- Yang, P.; Li, X.; Wang, X.; Chen, H. Chen, F.; Shen, S. 2007. Proteomic analysis of rize (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics*, 7: 3358-3368.
- Zakharov, A.; Carchilam, M.; Stepurina, T.; Rotari, V.; Wilson, K.; Vaintraub, I. 2004. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean *Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany*, 55(406): 2241-2249.
- Zhou, J.Y.; Liao, H.; Zhang, N.H.; Tang, L.; Xu, Y.; Chen, F. 2008. Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizzia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. *Biotechnology Letters*, 30: 1495-1499.

Capítulo 1

Atividade de proteases e de inibidores de proteases durante os períodos de germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*

1. Introdução

Sementes são propágulos sexuais compostos por vários tipos de tecidos diferenciados, que também exercem a função de acumular reservas, incluindo proteínas, carboidratos e lipídeos, moléculas essenciais para prover a nutrição necessária visando o crescimento e desenvolvimento do embrião e, por conseguinte, da plântula (Buckeridge *et al.*, 2004; Rajjou *et al.*, 2012).

Durante o estágio de maturação das sementes, os vegetais acumulam grandes quantidades de proteínas de reserva, onde os níveis finais das diversas proteínas formadas e armazenadas na semente dependem da transcrição, tradução e das mudanças inerentes a esses processos, assim como da renovação, acúmulo e utilização dessas moléculas. Para determinados peptídeos, a transcrição e a tradução podem exibir variações cronológicas durante a maturação das sementes, podendo desempenhar papel importante para o esclarecimento das funções fisiológicas dos inibidores de proteases na planta, uma vez que, alguns iso-inibidores estão presentes, principalmente, em determinadas fases do desenvolvimento (Cesar, 2006).

O acúmulo de proteínas de reserva ocorre durante o período de desenvolvimento das sementes, sendo depositadas em compartimentos delimitados por membranas, denominados corpos proteicos (Buckeridge *et al.*, 2004). Durante o período de deposição, a degradação e o *turnover* das proteínas de reservas são considerados insignificantes, indicando que essas proteínas são protegidas contra o ataque proteolítico prematuro (Müntz *et al.*, 2001; Tan-Wilson e Wilson, 2012). Em períodos específicos da germinação e desenvolvimento da plântula, a mobilização das proteínas de reserva é requerida, indicando que, os mecanismos de proteção contra a degradação prematura foram superados ou provisoriamente inibidos (Müntz *et al.*, 2001; Weeda *et al.*, 2010).

Proteínas de reserva, em particular, são mobilizadas por meio da atividade de proteases, sendo hidrolisadas à peptídeos solúveis e, posteriormente, reduzidas a aminoácidos livres, utilizados para a síntese de novas proteínas associadas ao desenvolvimento do embrião (Bewley *et al.*, 2013).

Diversos mecanismos controlam a hidrólise de proteínas em resposta à necessidade nutricional durante a fase heterotrófica do desenvolvimento da plântula. Dentre os mecanismos pelo qual a atividade de proteases é controlada destacam-se o controle hormonal, a diferença de pH, a compartimentalização e as interações com inibidores específicos (Yamada *et al.*, 2000; Weeda *et al.*, 2010).

Os inibidores de proteases apresentam distribuição homogênea nos cotilédones das sementes, contudo, existem diferenças significativas entre sementes em desenvolvimento e sementes germinadas (Tang *et al.*, 1993; Cesar, 2006). Espécies de Fabaceae (antiga família Leguminosae) são conhecidas por produzirem inibidores de proteases que podem assumir importantes funções fisiológicas nessas plantas (Kansal *et al.*, 2010; Alizadeh *et al.*, 2012). Esses inibidores são acumulados em grandes quantidades durante a maturação da semente, sugerindo sua atuação tanto na deposição de proteínas de reserva, mascarando a atividade pré-existente de proteases vegetais, quanto na regulação dessas proteínas durante o período de dormência. Além disso, os inibidores de proteases são considerados proteínas de reserva, fornecendo aminoácidos sulfurados e nitrogênio para a síntese de novas moléculas necessárias ao crescimento da plântula. Esses inibidores também têm sido relacionados a processos de defesa vegetal contra pragas e fitopatógenos, inibindo proteases dos possíveis predadores (Kumar *et al.*, 2002; Kansal *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2013).

A biossíntese e a degradação de proteínas, em geral, e os inibidores de proteases, em particular, exercem importante função na regulação da relação decréscimo/acrécimo de nitrogênio, essencial para o crescimento e desenvolvimento da plântula (Sreerama e Gowda, 1998). Estudos envolvendo a degradação dos compostos de reserva e a regulação da atividade metabólica durante a germinação de sementes de leguminosas possibilitam um maior conhecimento da biologia da germinação e das implicações com o metabolismo das proteínas. Adicionalmente, considerando a importância das alternativas dos sistemas de produção sustentáveis, a identificação de novos produtos na diversidade da flora tropical apresenta-se com especial relevância. Diante do uso indiscriminado de agrotóxicos, espera-se que a obtenção e a caracterização de moléculas que exibam ação contra microorganismos fitopatogênicos seja plenamente possível a partir de plantas oriundas da diversidade amazônica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade de proteases e de inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*.

2.2. Objetivos específicos

- Obter extratos proteicos dos diferentes estádios de desenvolvimento (germinação e pré e pós-germinação);
- Acompanhar a mobilização de proteínas nos diferentes extratos proteicos, a partir de eletroforese em géis 2D;
- Detectar a atividade de proteases (serino e cisteínoproteases) e de inibidores de proteases (inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína) nos diferentes estádios de desenvolvimento;
- Purificar os inibidores de tripsina detectados durante os diferentes estádios de desenvolvimento.

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal

O material biológico (sementes de *P. multijuga*) foi adquirido da empresa Connarus Ambiental LTDA, coletadas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã/AM em novembro de 2010 e, identificadas como lote 0001/10, renasem 00169/2010.

Após assepsia em hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos, as sementes tiveram a dormência quebrada por desponete do lado oposto ao eixo embrionário e, após embebição durante 24 horas, foram acondicionadas em bandejas plásticas (44 x 28,5 x 8,2 cm) utilizando vermiculita como substrato e, colocadas em câmara de germinação (ELETROlab, modelo EL 202) à temperatura constante de 25°C, providas de lâmpadas fluorescentes de luz branca com fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro), com acompanhamento e contagem diária, usando como critério de germinação a emissão da radícula com 2 mm.

As análises de mobilização das proteínas de reserva (proteases e inibidores de proteases) foram realizadas em sementes quiescentes (SQ); cotilédones, após 24 h de embebição (EM); emissão de radícula, após 5 dias de experimentação (RA), exposição do nó cotiledonar, após 7 dias de experimentação (NO) e emissão da parte aérea, após 12 dias de experimentação (PA) (Figura 12).

A porcentagem de germinação (G) e o tempo médio de germinação (TMG) foram calculados de acordo com Labouriau e Valadares (1976) e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Maguire (1962).

Em cada estágio avaliado foi realizada a dissecação da semente, separando os cotilédones do eixo embrionário e do tegumento. Os cotilédones foram liofilizados e triturados em moinho analítico (Ika-Werke/M20), até a obtenção de material finamente pulverizado (Figura 13).

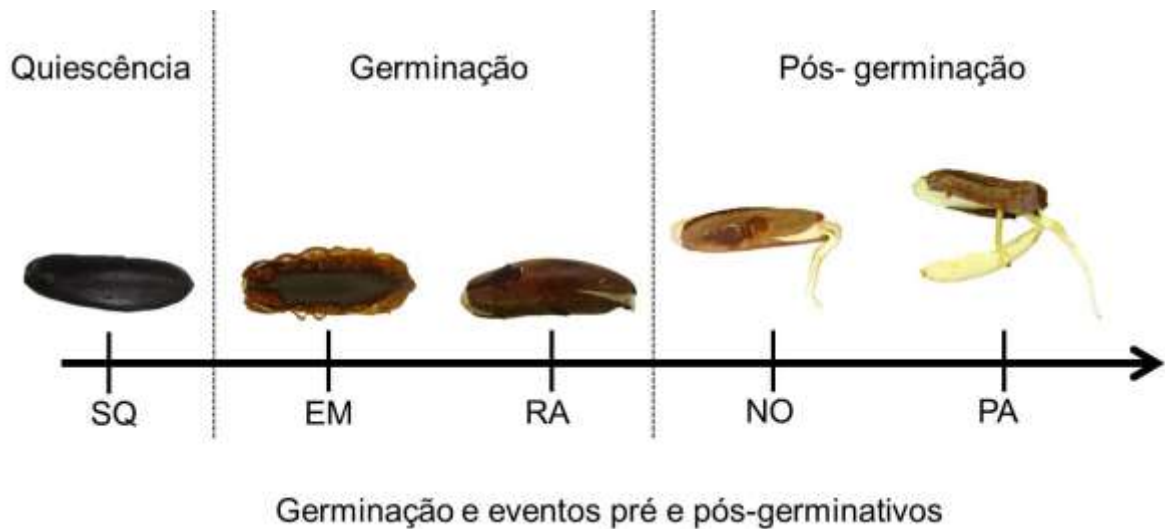


Figura 12. Estádios de germinação e eventos pré e pós-germinativos de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após 24 h de embebição. RA: emissão da radícula. NO: exposição do nó cotilédono. PA: emissão da parte aérea. Pré-germinação: SQ. Germinação: EM e RA. Pós-germinação: NO e PA.

3.2. Extração de proteínas

O material finamente pulverizado, proveniente dos diferentes estádios (germinação e pré e pós-germinação), foi submetido à extração salina em NaCl 0,15 M (10% p/v). A extração ocorreu sob homogeneização durante duas horas à temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), seguida de centrifugação a $11.000 \times g$ durante 20 minutos a 10°C . O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas, para retirada do sal e, então, liofilizado, resultando no extrato proteico.

3.3. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi estimada a partir da incubação de $50 \mu\text{L}$ das amostras com $2,5 \text{ mL}$ do reagente de Bradford (BioAgency) durante 10 minutos a temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA, BioAgency) de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O teor de

proteína foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a 595 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences).

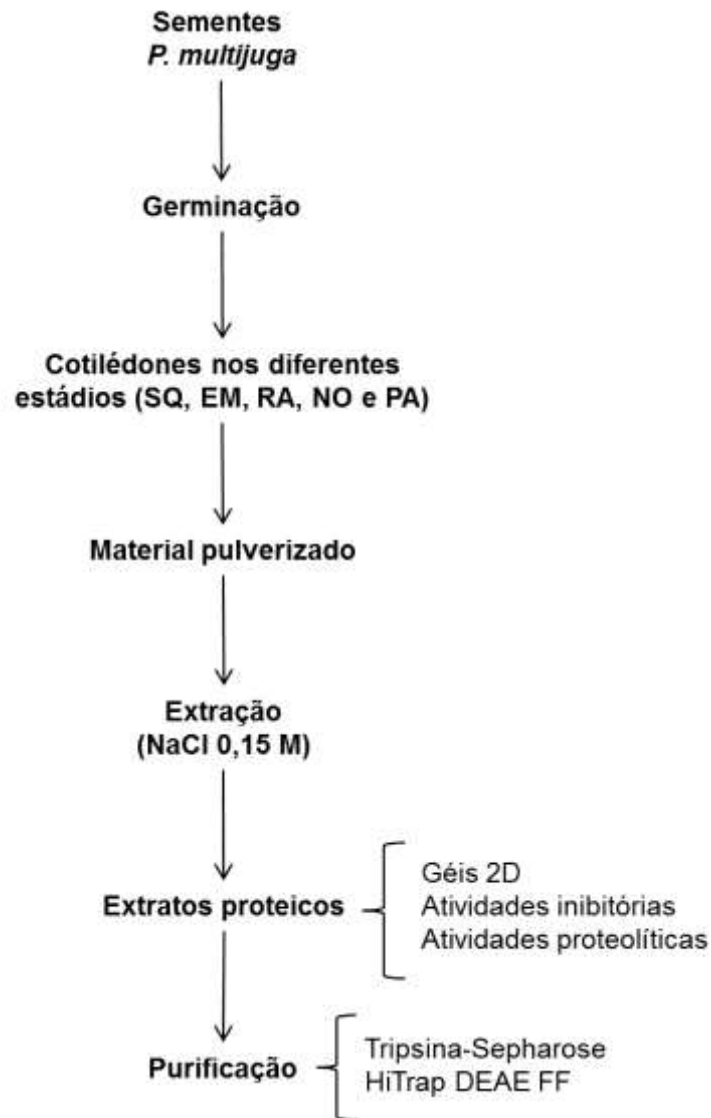


Figura 13. Fluxograma das principais etapas metodológicas.

3.4. Atividade de serinoproteases

A atividade serínica foi estimada a partir de ensaio enzimático contendo 100 μL da amostra, 200 μL do substrato BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida, Sigma) 1,25 mM e 200 μL de tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5. A reação foi incubada durante 30 minutos a 37°C e, após este período, foi paralisada pela adição de 150

μL de ácido acético 30% v/v, sendo posteriormente realizadas leituras espectrofotométricas a 405 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram realizados com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 0,01.

3.5. Atividade de cisteínoproteases

A atividade de cisteínoproteases foi estimada a partir de ensaio enzimático contendo 50 μL da amostra e 40 μL de DTT (Gibco) 3 mM e EDTA (Gibco) 2 mM, pré-incubados durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, 200 μL do substrato BANA (Sigma) 1 mM e 160 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, foram adicionados ao meio de pré-incubação, incubando-se novamente por mais 30 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de HCl 2% v/v em etanol e, para conferir cor à reação foi adicionado 500 μL de DMACA (Sigma) 0,06% m/v. Após 40 minutos em repouso, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 540 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram realizados com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorvância em 0,01.

3.6. Inibição da tripsina

As amostras foram, inicialmente, ressuspendidas em Tris HCl 50 mM, pH 7,5 e aquecidas até temperatura de ebulição durante 10 minutos, com a finalidade de eliminar qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A inibição da tripsina foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 290 μL de tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, 10 μL de solução de tripsina bovina (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 μL da

amostra. A mistura foi pré-incubada durante 30 minutos a 37°C e, em seguida, acrescentou-se 200 µL do substrato BAPNA (Sigma) 1,25 mM, prosseguindo a incubação por mais 30 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 150 µL de ácido acético 30% v/v, sendo realizadas leituras espectrofotométricas a 405 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a inibição de uma unidade de atividade de protease.

3.7. Inibição da quimotripsina

Para a inibição da quimotripsina, as amostras foram ressuspensas em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5 e aquecidas até temperatura de ebulição durante 10 minutos, com a finalidade de eliminar qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A inibição da quimotripsina foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 50 µL de solução de quimotripsina bovina (0,2 mg/mL, Sigma), 200 µL da amostra e 250 µL do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Posteriormente, a solução foi incubada a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, 200 µL de Azocaseína 1% m/v foram adicionados a essa solução, prosseguindo-se a incubação a 37°C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de TCA 20% m/v (Sigma). As soluções foram, então, centrifugadas a 3250 x g, durante 20 minutos e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µL de NaOH 2 M, sendo realizadas leituras espectrofotométricas dos produtos da reação a 420 nm em espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences. O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a inibição de uma unidade de atividade de protease.

3.8. Inibição da papaína

Para inibição da papaína, as amostras foram ressuspendidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 e aquecidas até temperatura de ebulição durante 10 minutos, com a finalidade de eliminar qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A atividade inibitória da papaína foi estimada por meio de ensaio enzimático contendo 240 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µL de papaína (0,1 mg/mL, Sigma) e 40 µL de DTT (Gibco) 3 mM e EDTA (Gibco) 2 mM. A mistura foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$). Posteriormente, acrescentou-se 200 µL das amostras, prosseguindo a incubação durante 30 minutos a 37°C . Após esse período, foi adicionado o substrato BANA (Sigma) 1 mM, incubando-se por mais 30 minutos a 37°C . A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de HCl 2% v/v em etanol e, para conferir cor à reação, foram adicionados 500 µL de DMACA (Sigma) 0,06% m/v. Após 40 minutos em repouso, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 540 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a inibição de uma unidade de atividade de protease.

3.9. Inibição da bromelaína

Para inibição da bromelaína, as amostras foram ressuspendidas em tampão acetato de sódio 300 mM, pH 5,5 e aquecidas até temperatura de ebulição durante 10 minutos, com a finalidade de eliminar qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A inibição da bromelaína foi detectada por meio de ensaio enzimático contendo 275 µL de tampão acetato de sódio 300 mM, pH 5,5, 25 µL de bromelaína (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 µL da amostra. As soluções foram incubadas durante 30 minutos a 37°C . Posteriormente, foram adicionados 200 µL do substrato azocaseína 1% (Sigma), procedendo a incubação por mais 1 hora a 37°C . A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de TCA 20% m/v. As amostras foram, então,

centrifugadas a 3.300 x g durante 20 minutos. Após a centrifugação, 400 µL do sobrenadante foi alcalinizado com 400 µL de NaOH 2 M. Posteriormente, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 540 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram conduzidos com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a inibição de uma unidade de atividade de protease.

3.10. Purificação dos inibidores de tripsina

Os extratos proteicos, provenientes dos diferentes estádios estudados, aquecidos até temperatura de ebulição durante 10 minutos, foram submetidos à cromatografia de afinidade em tripsina – Sepharose 4B (6,0 cm x 1,5 cm) e equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Frações de 2 mL foram coletadas por meio de coletor de frações a um fluxo de 30 mL/ h. As frações retidas foram eluídas com HCl 5 mM, dialisado, liofilizado e submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap DEAE FF (2,5 cm x 0,7 cm, Ge Healthcare), pré-equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 20 mM pH 8,0. As frações foram coletadas a partir de um gradiente de bicarbonato de amônio (20 – 500 mM, pH 8,0) a um fluxo de 0,5 mL/min, utilizando um ÄKTApurifier (Ge). As amostras referentes aos picos obtidos foram liofilizadas e submetidas às análises posteriores.

3.11. SDS-PAGE

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8% m/v. O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de separação 20%, em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, sendo acrescentado em ambos SDS 20% m/v. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% m/v.

As frações provenientes da cromatografia em tripsina-Sepharose foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% m/v de SDS, 10% m/v de glicerol e 1% m/v de β -mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 200 volts, 15 mA/ gel, durante 2 horas. Foram utilizados marcadores de massas moleculares da Promega (10 kDa - 200 kDa).

Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1% v/v, etanol e água destilada 1:4:5 v/v/v durante 2 horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v).

3.12. Eletroforese em gel 2D

Os extratos proteicos provenientes das diferentes etapas de germinação, pré e pós-germinação (800 μ g) foram ressuspendidos em tampão de rehidratação (8 M ureia, CHAPS 2%, IPG Buffer pH 3-10 e azul de bromofenol 0,002%) e incubados juntamente com as fitas para focalização (13 cm, pH 3-10), à temperatura ambiente durante 16 horas. Posteriormente, as fitas foram submetidas à focalização isoeletrica utilizando o sistema de eletroforese Ettan IPGphor 3 (Ge Healthcare) acumulando o total de 58000 Vh (Fase 1: 300, 200 Vh; Fase 2: gradiente 300 - 1000 V, 300 Vh; Fase 3: gradiente 1000 - 5000 V; 4000 Vh; Fase 4: 5000 V, 1250 Vh). Após focalização, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (6 M Ureia, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), Glicerol 3% (v/v), SDS 2% (m/v) e Azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 1% (m/v) sob agitação constante durante 15 minutos e, posteriormente incubadas em mesmo tampão de equilíbrio, contendo iodoacetamida 2,5% (m/v)

Após a separação da primeira dimensão, as fitas foram sobrepostas em géis de poliácridamida contendo SDS (12,5%) e a separação da segunda dimensão realizada em sistema de eletroforese SE Ruby e Power Supply – EPS 601 (Ge Healthcare). Após a corrida os géis foram corados com coomassie coloidal. Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 kDa -200 kDa).

As identificação e análises dos *spots* foram realizadas utilizando o *software* ImageMaster 2D Platinum 6.0 (Ge).

4. Resultados

As sementes de *P. multijuga* apresentaram alta germinabilidade, na ordem de 95%, tempo médio de germinação de $5 \pm 0,8$ dias e, emissão da parte aérea em $12 \pm 0,6$ dias. O índice de velocidade de germinação foi de $2,07 \pm 0,2$ sementes/dia.

Durante a germinação das sementes de *P. multijuga* observou-se decréscimo expressivo no conteúdo de proteínas até a emissão da parte aérea (PA) das plântulas, atingindo concentração proteica aproximadamente 6 vezes menor quando comparada com a concentração inicial na semente quiescente (Figura 14). No entanto, deve-se registrar que não houve decréscimo uniforme ao longo do período de estudo entre o estágio de semente quiescente (SQ) e PA, verificando-se pequena redução da percentagem, cerca de 10% do conteúdo de proteínas, entre SQ e a emissão da radícula (RA), seguido de intenso decréscimo entre os estádios RA e PA.

Análises da eletroforese em géis 2D revelaram a presença de proteínas com massa molecular aparente na faixa de 15 a 25 kDa e de 35 a 75 kDa nos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios estudados (Figura 15).

Durante a germinação e pós-germinação confirmou-se a degradação das proteínas, principalmente daquelas que compreendem a faixa de 35 a 75 kDa, durante o estágio PA. Em contraste, proteínas de, aproximadamente, 9 kDa foram sintetizadas durante a embebição (EM). Proteínas com massa molecular aparente entre 10 e 15 kDa, correspondendo, provavelmente, aos inibidores de proteases, permaneceram presentes até o estágio final do desenvolvimento (PA) (Figura 15).

No que diz respeito às atividades inibitórias nos extratos proteicos dos diferentes estádios, verificou-se estabilidade na inibição de serinoproteases, sendo a inibição da tripsina cerca de 20 vezes maior quando comparada à da quimotripsina (Figura 16).

A inibição de cisteínoproteases (papaína e bromelaína) apresentou-se mais variável ao longo da germinação e pós-germinação, comparada às inibições serínicas, onde para a bromelaína detectou-se o máximo de inibição no período de

expansão do nó cotiledonar (NO), com redução da atividade em PA, enquanto a inibição da papaína foi máxima em EM (Figura 16).

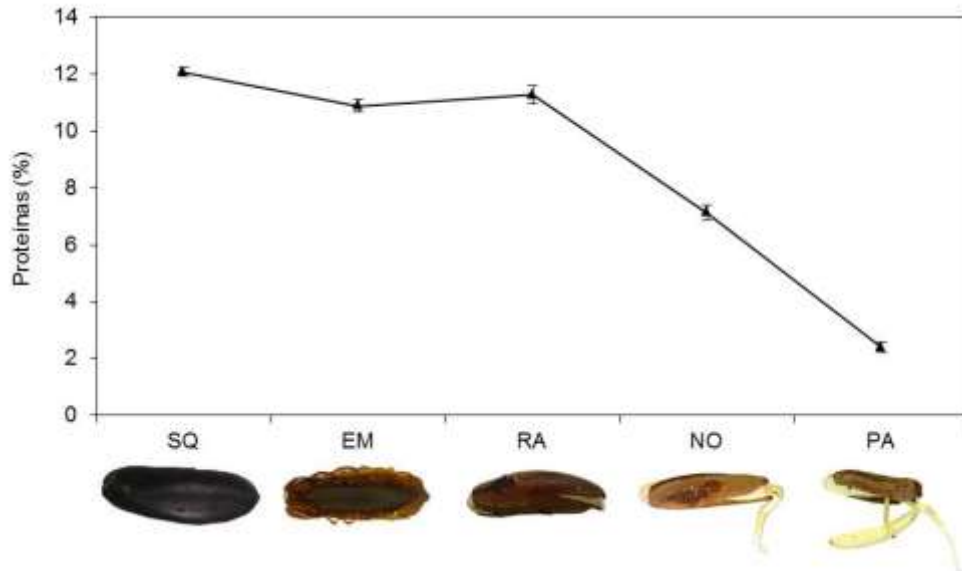


Figura 14. Mudanças na concentração de proteínas solúveis nos diferentes estádios de germinação e pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea. Cálculo de concentração de proteínas baseado na massa seca dos extratos proteicos.

Quanto à determinação de proteases, observou-se atividades constantes de serino e cisteíno proteases até o período NO, com elevado acréscimo em PA para ambas as classes enzimáticas, coincidindo com o período de maior degradação proteica (Figuras 14 e 17).

A purificação dos inibidores de tripsina envolveu duas etapas cromatográficas (afinidade e troca iônica), onde os perfis cromatográficos provenientes da tripsina-Sepharose (afinidade) foram similares em todos os estádios estudados, apresentando dois picos distintos. O primeiro pico (PI) corresponde àquelas moléculas que não interagem com a tripsina imobilizada na resina cromatográfica, ao passo que o segundo pico (PII) refere-se às proteínas com afinidade de interação e liberadas após adição de HCl, correspondendo, provavelmente, aos inibidores de proteases (Figura 18).

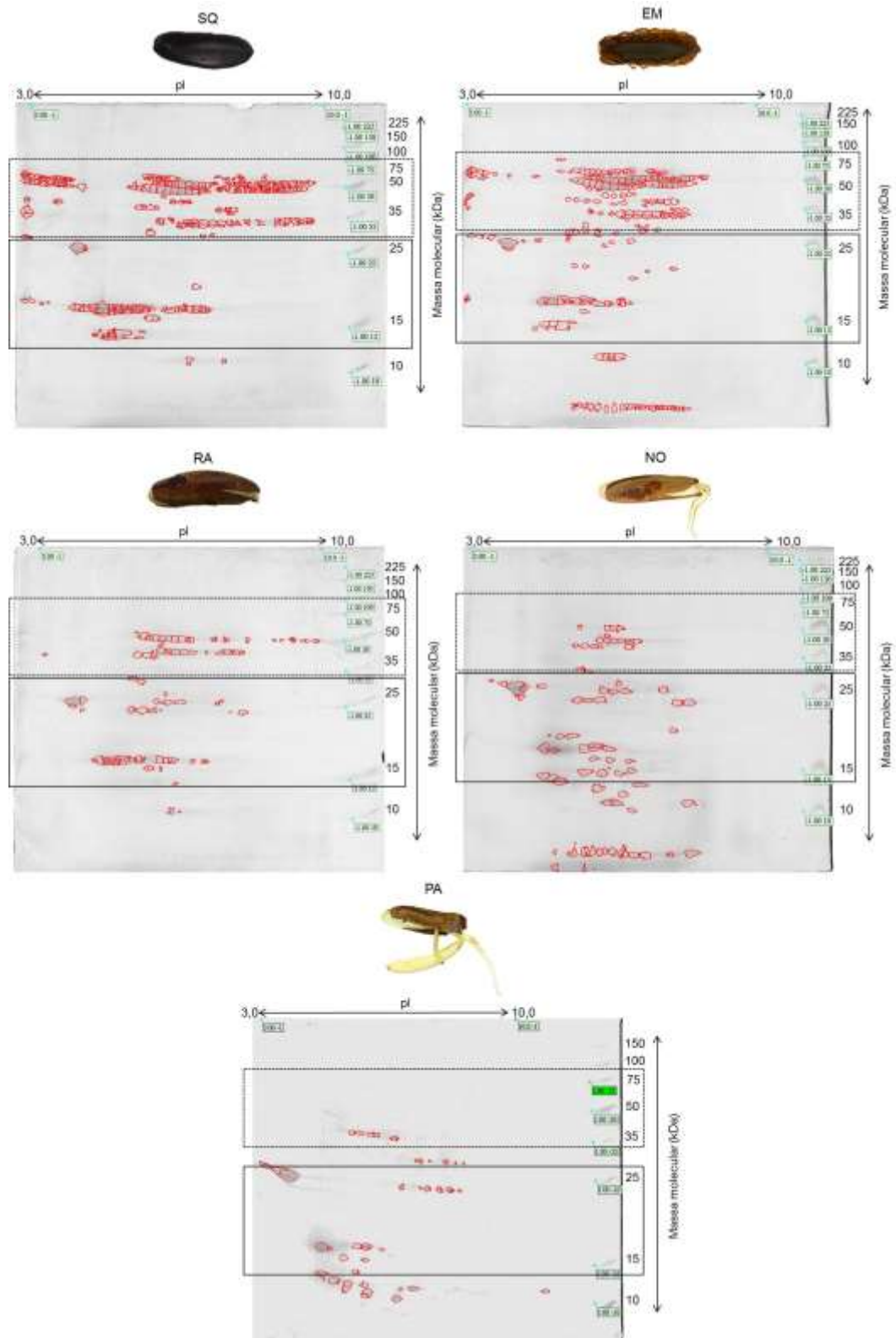


Figura 15. Eletroforese em géis 2D dos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea.

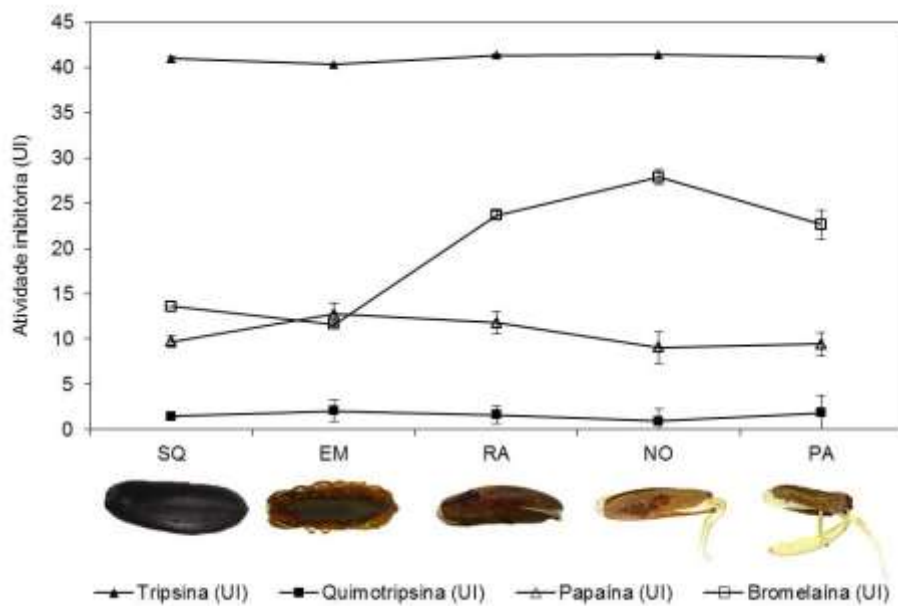


Figura 16. Atividade de inibidores de proteases nos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea.

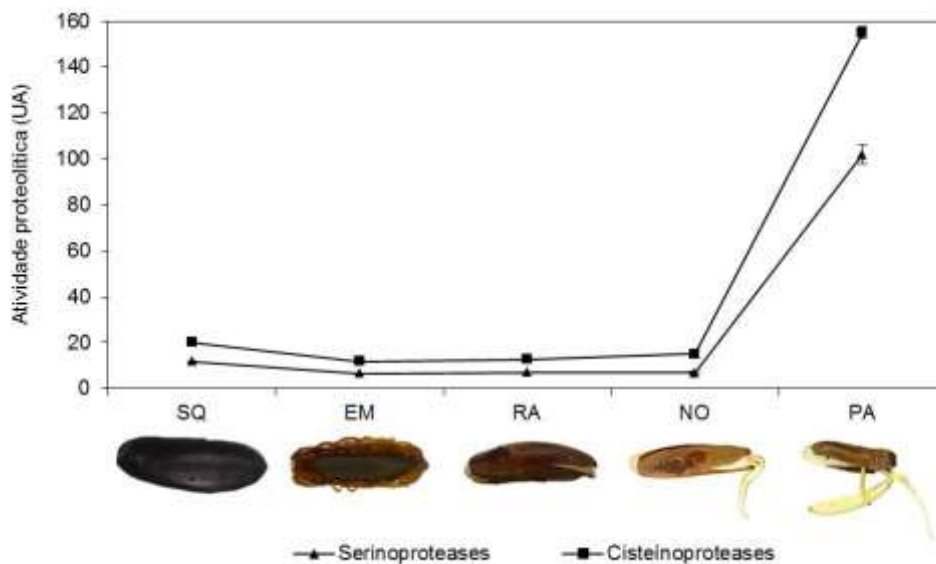


Figura 17. Atividade de proteases nos extratos proteicos provenientes dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea.

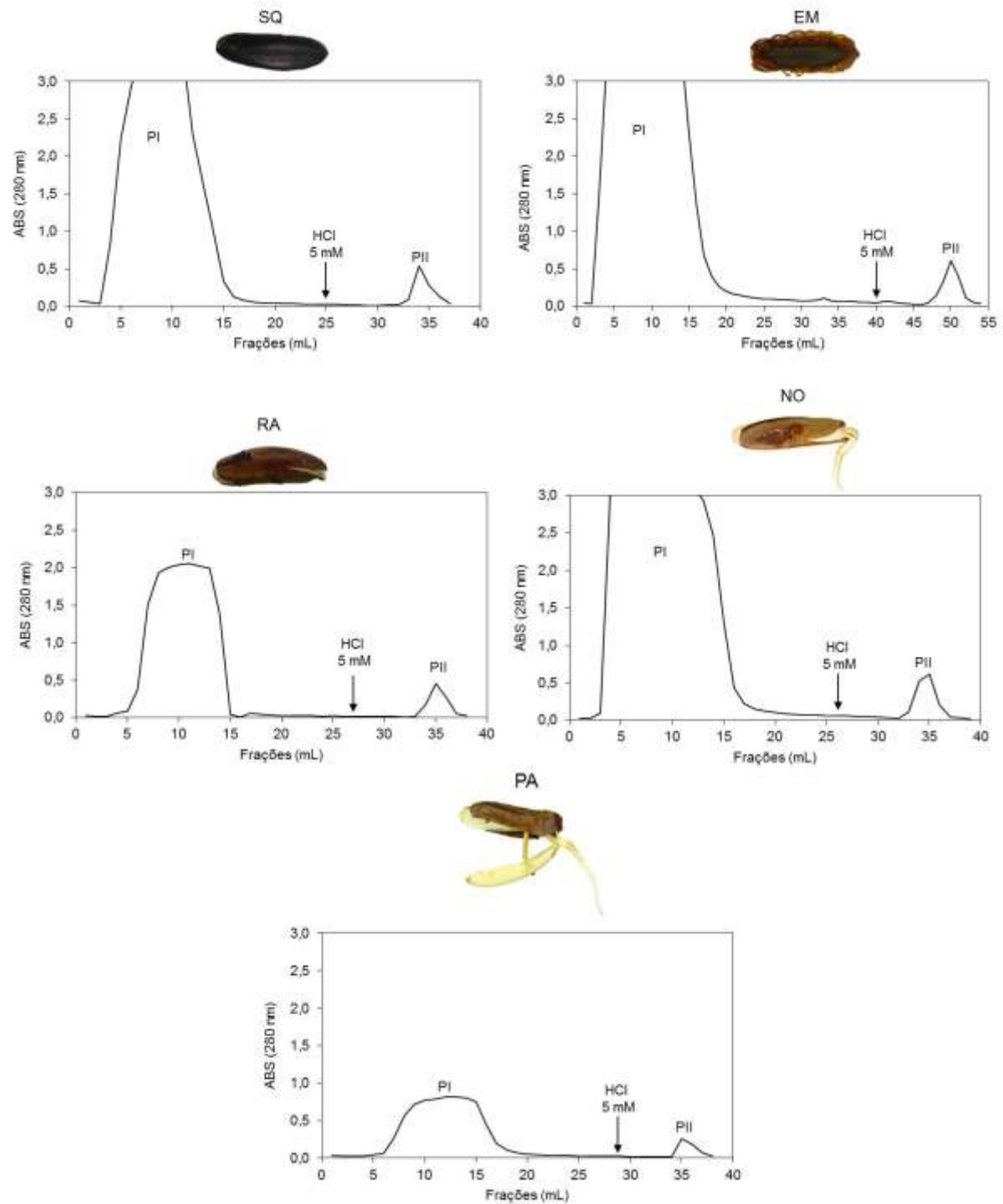


Figura 18. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose 4B dos extratos proteicos dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: Semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea.

Os perfis proteicos em SDS-PAGE das frações provenientes da tripsina-Sepharose confirmaram a similaridade na purificação dos inibidores de tripsina durante todo o processo de germinação e de pré e pós-germinação, os quais apresentaram banda única com massa molecular aparente de aproximadamente 9 kDa (Figura 19).

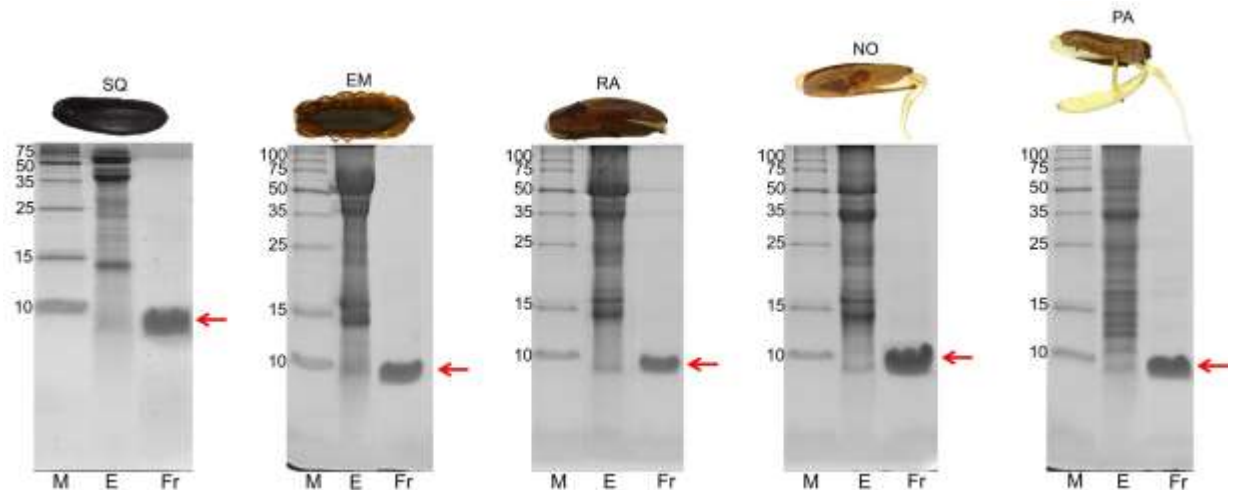


Figura 19. SDS-PAGE das frações provenientes da cromatografia em tripsina-Sepharose dos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. SQ: semente quiescente. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea. M: Marcador molecular. E: extrato proteico. Fr: Frações (PII).

As cromatografias de troca iônica em DEAE das frações provenientes das cromatografias de afinidade resultaram na separação de dois picos distintos, também similares durante todos os estádios estudados, exceto em PA, onde a separação dos picos não foi tão evidente, com predominância de um pico majoritário correspondente ao segundo pico dos demais perfis cromatográficos (Figura 20).

Cada pico proveniente da DEAE compreende diferentes inibidores de tripsina, de mesma massa molecular (aproximadamente 12 kDa) e pontos isoelétricos divergentes (dados não apresentados).

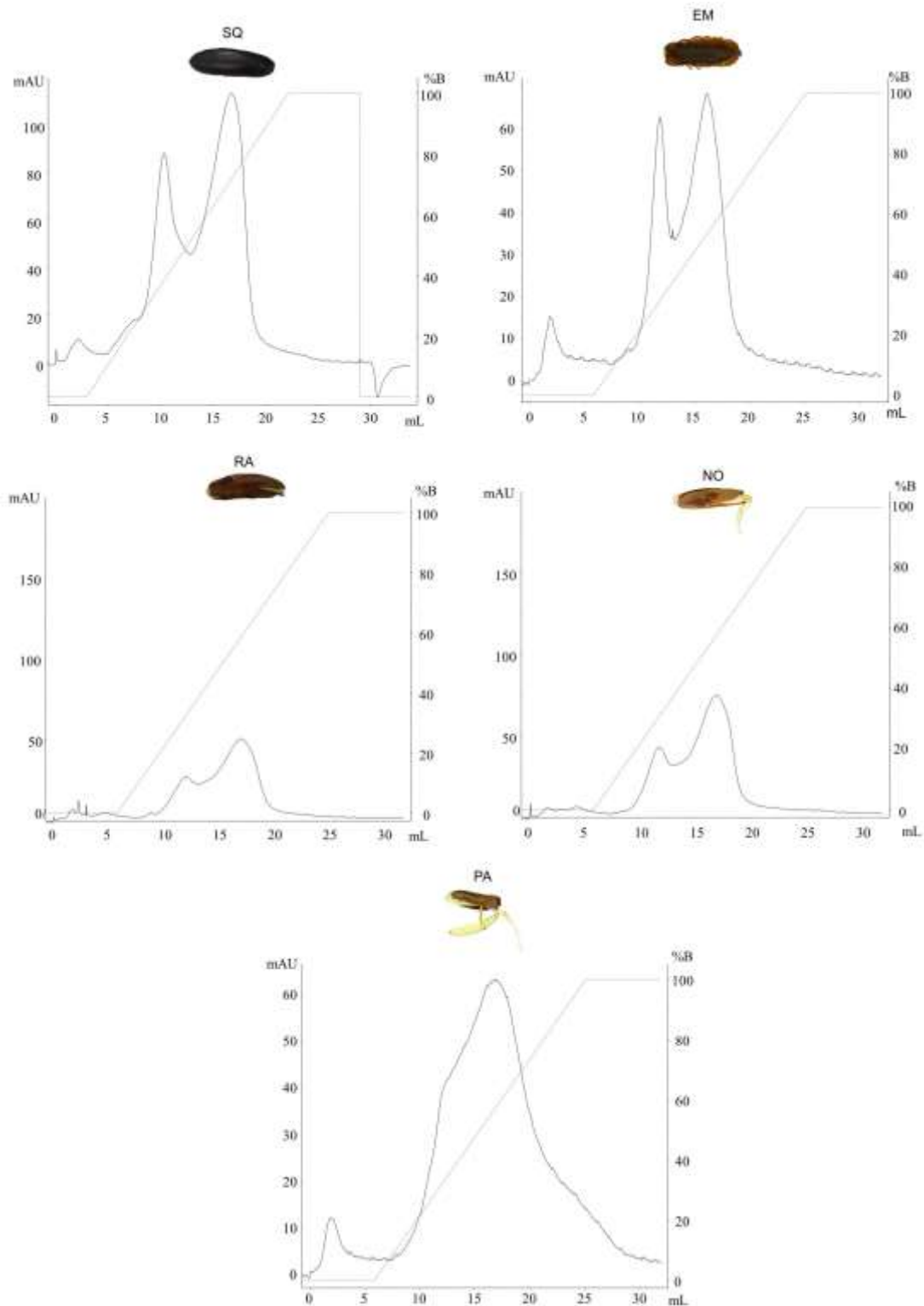


Figura 20. Cromatografia de troca iônica em HiTrap DEAE FF das frações parcialmente purificadas nos diferentes estádios de germinação e de pré e pós-germinação de sementes de *P. multijuga*. EM: após embebição. RA: emissão da radícula. NO: expansão do nó cotiledonar. PA: emissão da parte aérea. %B: concentração de bicarbonato de amônio 500 mM pH 8,0.

5. Discussão

O comportamento das sementes ao longo do processo germinativo compreende vários aspectos, como por exemplo, tempo, taxa, homogeneidade e sincronismo, os quais são importantes para a compreensão da dinâmica deste processo, tornando possível prever o grau de sucesso de uma espécie a partir da sua capacidade de germinação (Ranal e Santana, 2006).

O critério de germinação é muitas vezes usado erroneamente, sendo confundido com o crescimento/desenvolvimento da plântula, que indica que a germinação foi finalizada (Bewley e Black, 1994). O processo global da germinação é constituído de três etapas, incluindo a embebição, a ativação do processo e o crescimento seminal que é finalizado com a protusão da radícula (Labouriau, 1983; Bewley, 1997). Durante a germinação dois processos metabólicos podem ser detalhados, o primeiro, diz respeito à mobilização de reservas a partir da ação de enzimas hidrolíticas e, depois, o uso dos produtos hidrolizados dará suporte a novas estruturas celulares até a formação completa da plântula (Fu *et al.*, 2005; Soltani, 2006; Alencar *et al.*, 2012).

No sentido prático, estabelecer o início e o término de cada evento torna-se difícil uma vez que, os eventos moleculares e celulares apresentam complexidade multicelular e tecidual e a reativação do processo é gradual (Ranal e Santana, 2006). Desse modo, a precisa determinação do início do processo germinativo por meio de algum critério molecular ou celular é substituída por critérios macroscópicos como o crescimento do embrião, conferindo certo rigor, se o mesmo ponto de referência for adotado por vários autores (Ranal e Santana, 2006).

O único estágio da germinação com alta precisão de mensuração é o término. Portanto, o estabelecimento de um critério de fácil caracterização e comum torna-se essencial, pois na ausência dele, a capacidade de germinação pode ser sub ou sobre estimada, dificultando a comparação entre resultados laboratoriais, aumentando as informações contraditórias acerca do processo (Bewley e Black, 1994; Ranal e Santana, 2006).

A capacidade de germinação de uma semente, levando-se em conta o critério germinada/ não-germinada consiste em um atributo qualitativo do processo, geralmente convertido em um atributo quantitativo, como a percentagem de germinação. Dessa forma, a germinação das sementes de uma amostra representa a percentagem de sementes na qual o processo germinativo chegou ao fim, nas condições experimentais, por meio do crescimento intraseminal, que resulta na proeminência do embrião vivo na forma de emissão da radícula (Ranal e Santana, 2006).

Sementes de *P. multijuga*, quando submetidas à germinação a 25°C em vermiculita foram capazes de germinar em curto espaço de tempo (tempo médio de 5 dias) e com alta percentagem de sementes germinadas (95%). No entanto, sabe-se que os fatores físicos do meio podem alterar de forma determinante o processo germinativo. Na germinação de sementes de *P. multijuga*, quando realizada à temperatura de 30°C, um maior tempo médio de germinação (9,5 dias) foi observado, demonstrando, dessa forma, a influência da temperatura sobre o processo germinativo (Santos, 2011). A temperatura de germinação afeta diretamente o metabolismo celular, causando alterações na integridade das membranas biológicas, assim como nas reações enzimáticas. Portanto, variações térmicas podem condicionar respostas diferentes na germinação, tanto estimulando quanto inibindo o processo (Amri, 2010).

Durante a germinação das sementes de *P. multijuga*, a mobilização expressiva de proteínas após a emissão da radícula (período considerado evento pós-germinativo) parece estar relacionada à síntese de novas proteínas especializadas, possibilitando a mudança da fase heterotrófica para a autotrófica.

Estudos envolvendo a germinação de sementes de *Sesbania virgata* demonstraram que a protusão da radícula ocorre um dia após a embebição, com mobilização de proteínas a partir do quarto dia, também compreendendo eventos pós-germinativos (Tonini *et al.*, 2010). Em *Cereus jamacaru* observou-se alta mobilização proteica após a protusão da radícula, sendo a redução no conteúdo de proteínas acompanhado por um aumento no conteúdo de aminoácidos livres, sugerindo que, durante a mobilização, esses aminoácidos são transferidos para sustentar o crescimento do embrião (Alencar *et al.*, 2012). Esses resultados corroboram com o que tem sido relatado na literatura científica onde, após a germinação, o metabolismo é largamente catabólico com a maioria das reservas

sendo mobilizadas e utilizadas para suportar o crescimento inicial das plântulas (Bewley *et al.*, 2013).

A mobilização de proteínas durante a germinação e nos eventos pós-germinativos de sementes de *P. multijuga* foi confirmada a partir de análises de eletroforeses em géis 2D, onde a presença e a intensidade dos “spots” reduziram ao longo do processo germinativo e pós-germinativo. A utilização da técnica de eletroforese consiste em importante metodologia para acompanhamento da síntese e/ou degradação de proteínas durante a germinação das sementes. Uma análise visual do perfil de proteínas totais durante a germinação de *Glycine max* demonstrou claramente que as proteínas principais reduziram significativa e gradualmente ao longo do tempo, coincidindo com os resultados obtidos no presente estudo (Kim *et al.*, 2011).

As proteínas compreendem uma das principais reservas estocadas durante o estágio final de desenvolvimento das sementes, sendo consideradas essenciais para prover a nutrição necessária e para dar suporte ao estabelecimento da plântula (Alencar *et al.*, 2012). Vários mecanismos são desenvolvidos para controlar a quebra dessas reservas em resposta à necessidade nutricional durante a fase heterotrófica do desenvolvimento da plântula e, dentre os mecanismos desenvolvidos para controlar a atividade de proteases, responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, incluem-se a compartimentalização e as interações com inibidores específicos (Weeda *et al.*, 2010). Assim, a perda de compartimentalização e a ativação de proteases pela dissociação com os inibidores, observada durante a germinação, são mecanismos que facilitam o catabolismo de proteínas de reserva, mediado por proteases (Tiedemann *et al.*, 2001; Weeda *et al.*, 2010).

Em sementes de muitas espécies de eudicotiledôneas, cisteínoproteases são catalisadoras da clivagem endoproteolítica durante a mobilização de proteínas de reserva. Em espécies de Fabaceae, a inicialização da proteólise por cisteínoproteases (papaína e/ou bromelaína) facilita a completa quebra das proteínas de reserva por outras proteases (Tiedemann *et al.*, 2001; Weeda *et al.*, 2010). Adicionalmente, inibidores de tripsina são acumulados em grandes quantidades durante a maturação da semente, sugerindo sua atuação na deposição de proteínas de reserva, na regulação da atividade de proteases e na defesa vegetal (Kumar *et al.*, 2002; Kansal *et al.*, 2010).

O período durante a germinação e o subsequente crescimento das plântulas é caracterizado pela quebra de proteínas de reserva das sementes, sendo acompanhado pelo aumento na atividade de proteases e decréscimo nos níveis de inibidores de tripsina (Kansal *et al.*, 2010). Durante a germinação das sementes de *P. multijuga*, a atividade dos inibidores de serinoproteases (tripsina e quimotripsina) permaneceu inalterada, com alta inibição para tripsina. Dentre os inibidores de cisteínoproteases (papaína e bromelaína), a inibição da bromelaína apresentou variação ao longo dos processos germinativo e pós-germinativo. Da mesma forma, as atividades de serino e cisteínoproteases permaneceram inalteradas até o estágio que precedeu a emissão da parte aérea e, após esse período, sofreram acréscimos expressivos, coincidindo com o período de maior degradação proteica.

Estudos envolvendo a germinação de *Vigna radiata* e *Cicer arietinum* demonstraram pequenas variações na atividade inibitória contra a tripsina durante a germinação e, o decréscimo dessa atividade foi atribuído à atividade de proteases responsáveis por promover a degradação de proteínas, tornando o nitrogênio disponível para o crescimento da plântula (Kansal *et al.*, 2010). Investigações a respeito da atividade antitriptica durante a germinação de sementes também foram descritas para *Phaseolus vulgaris*. Para essa espécie, reduções na inibição da tripsina foram observadas após sete dias de germinação, ao passo que em sementes de *Dolichos biflorus*, os inibidores do tipo Bowman-Birk presentes nas sementes quiescentes desapareceram rapidamente, com o concomitante aparecimento de novas espécies de inibidores ativos (Savelkoul *et al.*, 1994; Sreerama e Gowda, 1998). Na germinação de sementes de *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis* e *Lablab purpureus*, os níveis de inibidores de tripsina decresceram significativamente, enquanto em *Stizolobium niveum* não foi observada qualquer mudança nessa classe de proteínas (Aguilera *et al.*, 2013). Em relação aos inibidores de quimotripsina, as reduções no decorrer da germinação também foram significantes em *L. purpureus*, *S. niveum* e *C. ensiformis*, ao passo que *V. unguiculata* não apresentou qualquer decréscimo notável (Aguilera *et al.*, 2013).

Em tubérculos, o conteúdo de cisteínoproteases aumenta substancialmente durante o estabelecimento da planta, podendo ser responsável por degradar inibidores de tripsina. Portanto, o aumento da atividade de cisteínoproteases pode limitar o acúmulo de inibidores de serinoproteases (inibidores de tripsina) durante os estádios tardios da germinação, apesar do aumento nos níveis de transcrição de

serinoproteases (Weeda *et al.*, 2010). Assim, a perda de inibidores de serinoproteases pode levar ao aumento na atividade de serinoproteases, o que facilita a realização do processo proteolítico iniciado por cisteínoproteases (Weeda *et al.*, 2010).

Para inibidores de proteases estarem envolvidos na regulação do catabolismo proteico durante o desenvolvimento da planta, o seu desaparecimento deve preceder ou, pelo menos, ser concomitante ao aumento da atividade de proteases e da perda de proteínas de reserva (Weeda *et al.*, 2010). Nesse sentido, inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína parecem estar envolvidos na regulação da atividade de serino e cisteínoproteases durante a germinação e nos eventos pós-germinativos das sementes de *P. multijuga*, uma vez que, as atividades inibitórias foram superiores às proteolíticas ao longo de todos os estádios até NO, com acréscimo expressivo na atividade de proteases em PA, que corresponde ao período de maior degradação proteica.

Em função dessa dinâmica nas atividades das proteases e dos inibidores de proteases, a germinação é um processo que induz qualitativa e quantitativamente mudanças nos níveis proteicos em sementes de leguminosas (Kumar *et al.*, 2002).

Os perfis cromatográficos e análises em eletroforeses demonstraram que os mesmos inibidores e/ou iso-inibidores foram purificados ao longo da germinação e pós-germinação das sementes de *P. multijuga*, exceto quando ocorreu a emissão da parte aérea, onde observou-se a predominância de um pico majoritário que corresponde, provavelmente, às frações que compreendem o segundo pico dos perfis cromatográficos dos outros estádios estudados.

Dessa maneira, o processo germinativo pode ser considerado como um efetivo e promissor processo que possibilita o aumento da bioatividade de sementes de espécies de Fabaceae não convencionais (Aguilera *et al.*, 2013).

Alguns estudos tem demonstrado que, durante a germinação, ocorre o desaparecimento de formas de inibidores típicos nas sementes quiescentes, além do aparecimento de outras isoformas nos cotilédones (Cesar, 2006). O aparecimento de novas formas de inibidores durante o processo de germinação, concomitante ao desaparecimento de formas provenientes da semente madura, assim como, a detecção de inibidores com atividades inibitórias e mobilidades eletroforéticas semelhantes, sugeriram que as novas formas foram resultantes de processamentos proteolíticos a partir do inibidor presente na semente quiescente. Adicionalmente,

análises da sequência de aminoácidos de várias formas de inibidores demonstraram a existência de alta homologia entre eles durante a germinação, com pequenas diferenças, principalmente, nas regiões amino e carboxi-terminais, indicando modificações por ação de proteases específicas (Sreerama e Gowda, 1998; Cesar, 2006).

O desaparecimento do inibidor de tripsina durante a germinação de sementes de *Vigna radiata* reforça essa ideia, onde concomitante ao desaparecimento do principal inibidor (inibidor F), surgiram três novas espécies ativas de inibidores (E, C e A) derivadas de F. Desses inibidores, apenas F, E e C foram caracterizadas e, análises de sequências indicaram que E e C são derivadas de F, por meio de proteólise limitada específica, não correspondendo a uma nova proteína formada por um gene distinto, via *turnover*. Por combinação dos dados composicionais e terminais de E e C, com a sequência de aminoácidos de F, demonstrou-se que eventos proteolíticos formaram esses dois inibidores, onde E é derivado de F pela hidrólise em Asp⁷⁶-Lys⁷⁷, enquanto C é produzido pela perda de Met⁷⁵-Asp⁷⁶, Ser¹-Ser⁸ com hidrólise em Ala³⁵-Asp³⁶ (Wilson e Chen, 1983; Cesar, 2006).

Nesse sentido, os inibidores de tripsina purificados durante a germinação e nos eventos pré e pós-germinativos de sementes de *P. multijuga*, podem ser resultantes da proteólise limitada de um inibidor principal pré-existente nas sementes quiescentes. Entretanto, análises de sequenciamento de aminoácidos e a comparação da composição dos aminoácidos entre as sequências são necessárias para confirmar se, de fato, esses inibidores são resultantes da proteólise limitada.

6. Conclusão

Inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína devem participar da regulação da atividade de serino e cisteínoproteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *P. multijuga*.

As principais evidências da presença/participação de inibidores de tripsina durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos em sementes de *P. multijuga* são a especificidade inibitória contra a tripsina, a similaridade das massas moleculares aparentes e a purificação dos inibidores de tripsina em todos os estádios estudados. Desta forma, sugere-se que a ação dos inibidores de proteases durante a germinação deve ser produto da expressão diferencial dos mesmos ao longo desse processo, com aumento das concentrações nas sementes quiescentes e durante a embebição, seguida de diminuição durante a emissão da radícula e, novamente, incremento, durante a expansão do nó cotiledonar e emissão da parte aérea.

A atividade de proteases foi mais efetiva nos eventos pós-germinativos, sugerindo participação dessas enzimas na mobilização de proteínas.

7. Referências Bibliográficas

Aguilera, Y.; Díaz, M.F.; Jiménez, T.; Benítez, V.; Herrera, T.; Cuadrado, C.; Martín-Pedrosa, M.; Martín-Cabrejas, M.A. 2013. Changes in nonnutritional factors and antioxidante activity during germination of nonconventional legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 8120-8125.

Alencar, N.L.M.; Inneco, R.; Gomes-Filho, E.; Gallão, M.I.; Alvarez-Pizarro, J.C.; Prisco, J.T.; Oliveira, A.B. 2012. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *Jamacaru* (Cactaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(3): 823-832.

Alizadeh, H.; Leung, D.W.M.; Edwards, Y. 2012. Changes in trypsin inhibitory activity of development seed parts and pod of red kidney bean. *Agronomy New Zealand*, 42: 171-180.

Amri, E. 2010. Germination of *Terminalia sericea* Buch ex Dc. seeds: Effects of temperature regime, photoperiod, gibberellic acid and potassium nitrate. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 8(6): 722-727.

Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Bewley, J.D.; Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Publishing Corporation, New York, NY, USA. 445 pp.

Bewley, J.D.; Bradford, K.J.; Hilhorst, H.W.M.; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, Lexington, KY, USA. 392 pp.

Buckeridge, M.S.; Aidar, M.P.M.; Santos, H.P.; Tiné, M.A. 2004. Acúmulo de reservas. *In*: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, p. 31-50.

Cesar, J.J. 2006. *Formação de inibidores Bowman-Birk durante a germinação de Macrotyloma axillare*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto/ Instituto de Ciências exatas e Biológicas, Ouro Preto, Minas Gerais. 96 pp.

Chan, Y. S.; Zhang, Y.; Ng, T.B. 2013. Brown kidney bean Bowman-Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 1306-1314.

Fu, Q.; Wang, B.C.; Jin, X.; Li, H.B.; Han, P.; Wei, K.H.; Zhang, X.M.; Zhu, Y.X. 2005. Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating Arabidopsis seeds and young seedlings. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6): 650-660.

Kansal, R.; Kuhar, K.; Gupta, R.N.; Gupta, V.K.; Koundal, K.R. 2010. Trypsin inhibitor profile in developing and germination seeds of mungbean and chickpea. *Progressive Agriculture*, 10(2): 225-231.

Kim, H.T.; Choi, U.K.; Ryu, H.S.; Lee, S.J.; Kwon, O.S. 2011. Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814: 1178-1187.

Kumar, P.; Sreerama, Y.N.; Gowda, L.R. 2002. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry*, 60: 581-588.

Labouriau, L.G. 1983. *A germinação de sementes*. Organização dos estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia, 171 pp.

Labouriau, L.G.; Valadares, M.B. 1976. On the physiology of seed of *Calotropis procera*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42(2): 235-264.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(1): 176-177.

Müntz, K.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A.; Tiedemann, J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1741-1752.

Rajjou, L.R.; Duval, M.; Gallardo, K.; Catusse, J.; Bally, J.; Job, C.; Job, D. 2012. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63:3.1-3.27.

Ranal, M.A.; Santana, D.G. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica*, 29(1): 1-11.

Santos, R.P. 2011. *Características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas de sementes de Parkia multijuga Benth e Parkia pendula (Willd.) Benth (Fabaceae-Momosoideae) submetidas a diferentes temperaturas*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 113 pp.

Savelkoul, F.H.M.G.; Tamminga, S.; Leenaars, P.P.A.M.; Schering, J.; Maat, D.W.T. 1994. The degradation of lectins, phaseolin and trypsin inhibitors during germination of white kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45:213-222.

Soltani, A.; Gholipour, M.; Zeinali, E. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 55: 195-200.

Sreerama, Y.N.; Gowda, L.R. 1998. Bowman-Birk type proteinase inhibitor profiles of horse gram (*Dolichos biflorus*) during germination and seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2596-2600.

Tang, W.; Diaz, P.; Wilson, K.A.; Tan-Wilson, A.L. 1993. Spatial distribution of protein accumulation in soybean seed. *Phytochemistry*, 33:11289-1295.

Tan-Wilson, A.L.; Wilson, K.A. 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145: 140-153.

Tiedemann, J.; Schlereth, A.; Müntz, K. 2001. Differential tissue-specific expression of cysteine proteinases forms the basis for the fine-tuned mobilization of storage globulin during and after germination in legume seeds. *Planta*, 212: 728-738.

Tonini, P.P.; Carrara, T.B.; Buckeridge, M.S. 2010. Storage proteins and cell wall mobilization in seeds of *Sesbania virgate* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees*, 24: 675-684.

Weeda, S.M.; Kumar, G.N.M.; Knowles, N.R. 2010. Correlative changes in proteases and protease inhibitors during mobilisation of protein from potato (*Solanum tuberosum*) seed tubers. *Functional Plant Biology*, 37: 32-42.

Wilson, K.A.; Chen, J.C. 1983. Amino-acid-sequence of mung bean trypsin-inhibitor and its modified forms appearing during germination. *Plant Physiology*, 71: 341-349.

Yamada, T.; Ohta, H.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A.; Shimada, H.; Tsuchiya, T.; Masuda, T.; Takamiya, K. 2000. A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. *Plant cell Physiology*, 41(2): 185-191.

Capítulo 2

Purificação de inibidores de tripsina de sementes de *Parkia multijuga* Benth.

1. Introdução

O conteúdo de proteínas nas sementes tem importância e desdobramentos importantes ao considerar diferentes abordagens: biológicas, comercial, tecnológica e etc. O fato é que, o processamento metabólico dessas moléculas envolve muitas rotas metabólicas e elevado custo energético. Assim, a regulação da síntese ou degradação proteica assume papel relevante. Nesse aspecto, a presença de inibidores de proteases em proporções relativamente altas nas sementes sugere a importância dessas moléculas no metabolismo de proteínas, podendo atuar como reguladoras da atividade de proteases, de modo a prevenir a degradação prematura de proteínas de reserva durante a sua síntese, processamento e empacotamento nos corpos proteicos ao longo do desenvolvimento da semente, como proteínas de reserva e na defesa vegetal, inibindo proteases inoculadas por insetos e microorganismos (Hernández-Nistal *et al.*, 2009; Hartl *et al.*, 2011).

Inibidores de proteases compreendem uma das mais abundantes classes de proteínas, sendo comumente encontradas em um grande número de famílias botânicas, particularmente em sementes de Fabaceae, podendo corresponder de 6 a 11% do conteúdo de proteínas solúveis (Hernández-Nistal *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2013; Rufino *et al.*, 2013). Conceitualmente, inibidores de proteases são proteínas que competem com os substratos pelo sítio ativo das proteases, bloqueando reversível ou irreversivelmente a atividade catalítica da enzima (Valueva e Mosolov, 1999; Sabotic e Kos, 2012). A inibição da atividade enzimática pelos inibidores de proteases é dependente da formação de um complexo estável entre enzima e inibidor, a partir da complementariedade de aminoácidos presentes no sítio reativo do inibidor com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, determinando uma interação altamente específica com suas enzimas proteolíticas alvo (Haq *et al.*, 2004; Macedo e Freire, 2011).

A diferença mais importante entre os inibidores de proteases e os substratos é que os inibidores possuem pontes dissulfeto estruturando o seu sítio reativo. Assim, após hidrólise da ligação peptídica do sítio reativo, os inibidores são mantidos sem mudanças conformacionais significativas (Birk, 2003; Oliveira, 2011).

Os inibidores de proteases ao interagirem com enzimas proteolíticas dificultam as mudanças de conformação necessárias à catálise, gerando um complexo típico enzima-inibidor, com uma barreira energética desfavorável à hidrólise, sendo assim, muito estável. Contudo, apesar da alta afinidade pela enzima alvo e de sua grande estabilidade, a permanência prolongada do inibidor associado à enzima pode acarretar a sua hidrólise (Cesar, 2006).

A contribuição do resíduo de aminoácido na posição P₁ da região envolvida na ligação é determinante na interação enzima-inibidor. Dessa maneira, quando essa posição é ocupada por um resíduo de lisina ou arginina, o inibidor será específico para a tripsina, ao passo que, quando essa posição é ocupada pelos aminoácidos tirosina, leucina ou fenilalanina, o inibidor será específico para a quimotripsina (Bode e Huber, 2000; Oliva *et al.*, 2010). Considerando essa especificidade inibitória, os inibidores de proteases são classificados de acordo com a classe de enzima a qual inibem, compreendendo os inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloproteases (Valueva e Mosolov, 1999; Macedo e Freire, 2011). Entretanto, novos inibidores têm sido relatados e classificados segundo o banco de dados MEROPS (www.merops.sanger.ac.uk), onde inibidores com sequências de aminoácidos e propriedades bioquímicas distintas são classificados em novas famílias (Rawlings *et al.*, 2008; Oliveira, 2011).

Sementes de Fabaceae normalmente contém inibidores de tripsina e quimotripsina (inibidores de serinoproteases), pertencentes às famílias Kunitz e Bowman-Birk (Klomklao *et al.*, 2011). Inibidores do tipo Kunitz são encontrados, principalmente, em sementes das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae e, são caracterizados por conter, aproximadamente, 170 a 200 resíduos de aminoácidos, com massa molecular em torno de 20 kDa, apresentando regiões N-terminais altamente conservadas e poucos resíduos de cisteína, formando um ou dois pares de pontes dissulfeto intramoleculares (Klomklao *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013).

Inibidores do tipo Bowman-Birk são observados em Faboideae e, correspondem a peptídeos com massa molecular de 6 a 16 kDa, compostos por um arranjo binário de dois subdomínios, onde cada um contém um sítio reativo, podendo inibir independentemente duas proteases, não necessariamente idênticas (Klomklao *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013; Kumar e Gowda, 2013).

É importante ressaltar que, apesar de algumas diferenças serem observadas, a estrutura e o mecanismo de ação são bem preservados entre os inibidores de serinoproteases (Oliveira, 2011). Em espécies vegetais da família Fabaceae, estudos tem apontado evidências de que inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk podem estar relacionados à evolução dessa família botânica (Kimura *et al.*, 1994). Assim, espécies arbóreas de clima tropical apresentam, em sua grande maioria, inibidores do tipo Kunitz e herbáceas apresentam inibidores do tipo Bowman-Birk, enquanto que espécies arbóreas e herbáceas de clima temperado registram apenas inibidores do tipo Bowman-Birk (Norioka *et al.*, 1988).

Quando a abordagem remete às questões filogenéticas, o tipo de inibidor pode ser associado às divergências dentro das subfamílias de Fabaceae, apresentando evidências de que as espécies pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, conteriam, predominantemente, inibidores do tipo Kunitz, correlacionando subfamília mais ancestral com proteínas menos evoluídas. Por outro lado, espécies da subfamília Faboideae exibem inibidores, principalmente, do tipo Bowman-Birk, justificando a lógica de correlação entre as subfamílias mais derivadas na escala filogenética com a presença de inibidores mais evoluídos. Quanto às espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae, tem-se relatos de inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk e, portanto, ocupariam uma posição intermediária ao longo da escala de evolução (Norioka *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 2000; Maqtari e Saad, 2010).

Embora os inibidores de proteases sejam proteínas vegetais bem caracterizadas para algumas funções, atualmente, grande parte das pesquisas relacionadas a essas moléculas envolve a sua purificação, caracterização e prospecção de potenciais atividades biológicas a partir de sementes de plantas herbáceas ou arbustos, com poucos estudos envolvendo espécies arbóreas, que correspondem às espécies vegetais com significativa presença na composição florística da Amazônia (Chevreuil *et al.*, 2009; Souza, 2012). Estudos preliminares, envolvendo espécies de Fabaceae arbóreas pertencentes à flora Amazônica, demonstraram a presença de inibidores de proteases nos diferentes tecidos vegetais, indicando a potencialidade dessas espécies para o investimento em pesquisas relacionadas à purificação, caracterização e testes de suas possíveis atividades biológicas visando aplicações biotecnológicas, por se tratarem de

moléculas ainda não descritas na literatura científica (Calderon *et al.*, 2001; Chevreuil *et al.*, 2009; Chevreuil *et al.*, 2011).

A identificação do potencial econômico, derivado de subprodutos não madeiráveis, confirma importante etapa para o aumento dos conhecimentos sobre as espécies vegetais e reforça as perspectivas de obtenção de conhecimentos científicos mais robustos voltados para a preservação, conservação e uso das florestas tropicais. Considerando o foco nas alternativas tecnológicas oriundas de sistemas de produção sustentáveis, a obtenção de novos produtos provenientes da diversidade da flora tropical encontra na biotecnologia excelente modelo de prospecção de produtos de alto valor agregado. Nesse contexto, o aproveitamento econômico das leguminosas arbóreas distingue-se pela multiplicidade de potenciais. Portanto, a fundamentação dessa potencialidade em uma caracterização criteriosa e abrangente, certamente, promoverá o uso mais adequado das espécies, dos novos materiais e das biomoléculas (como as proteínas), além de servir de base para instalação de indústrias com viés biotecnológico. Entretanto, essa possibilidade relacionada às novas abordagens da bioindústria somente será efetivamente aplicada quando as matérias-primas forem convertidas em produtos.

No caso das proteínas, não há como confirmar a função/aplicação biotecnológica sem antes caracterizar adequadamente a molécula e, para tanto, a purificação, que precede a etapa de caracterização, é condição “sine qua non” para se obter a molécula purificada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Purificar e caracterizar a atividade de inibidores de tripsina de sementes de *Parkia multijuga*.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar inibidores de tripsina utilizando diferentes etapas cromatográficas;
- Acompanhar as etapas de purificação por SDS-PAGE e eletroforese em géis 2D;
- Caracterizar a atividade dos inibidores quanto à massa molecular aparente, ponto isoelétrico, especificidade inibitória e à variação de pH e temperatura;
- Determinar a constante inibitória;
- Obter o sequenciamento de resíduos da região amino-terminal.

3. Material e Métodos

3.1. Purificação dos inibidores de tripsina

Sementes de *P. multijuga* foram adquiridas da empresa Connarus Ambiental LTDA, coletadas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã/AM em novembro de 2010 e, identificadas como lote 0001/10, renasem 00169/2010.

O material finamente pulverizado das sementes quiescentes (10 g), moído em moinho de facas (Ika-Werke/ M20), foi submetido à extração em NaCl 150 mM (1:10, p/v) sob homogeneização constante durante duas horas à temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$). Após a centrifugação a $11.000 \times g$ durante 20 minutos a 10°C , o sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas, para desalinização, e liofilizado, resultando no extrato proteico.

O extrato proteico (20 mg/ mL) foi aplicado em coluna de tripsina–Sepharose 4B (6,0 cm x 1,5 cm) equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Frações de 2 mL foram coletadas por meio de coletor de frações a um fluxo de 30 mL/h. As frações correspondentes ao pico retido foi eluído com HCl 5 mM, dialisado, liofilizado e submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18 (25 mm x 4.6 mm, Supelco), usando UFLC (Shimadzu Prominence) com gradiente de solvente A (TFA 0,1%) e solvente B (ACN 99,9% contendo TFA 0,1%). As frações obtidas, após liofilização, foram submetidas à cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap DEAE FF (2,5 cm x 0,7 cm, Ge Healthcare), pré-equilibrada em tampão 20 mM bicarbonato de amônio (pH 8,0). As frações foram coletadas a partir do gradiente de bicarbonato de amônio (20 – 500 mM) a um fluxo de 0,5 mL/min, utilizando um ÄKTApurifier (GE Healthcare). As amostras referentes aos picos obtidos foram liofilizados e submetidos às análises posteriores (Figura 21).

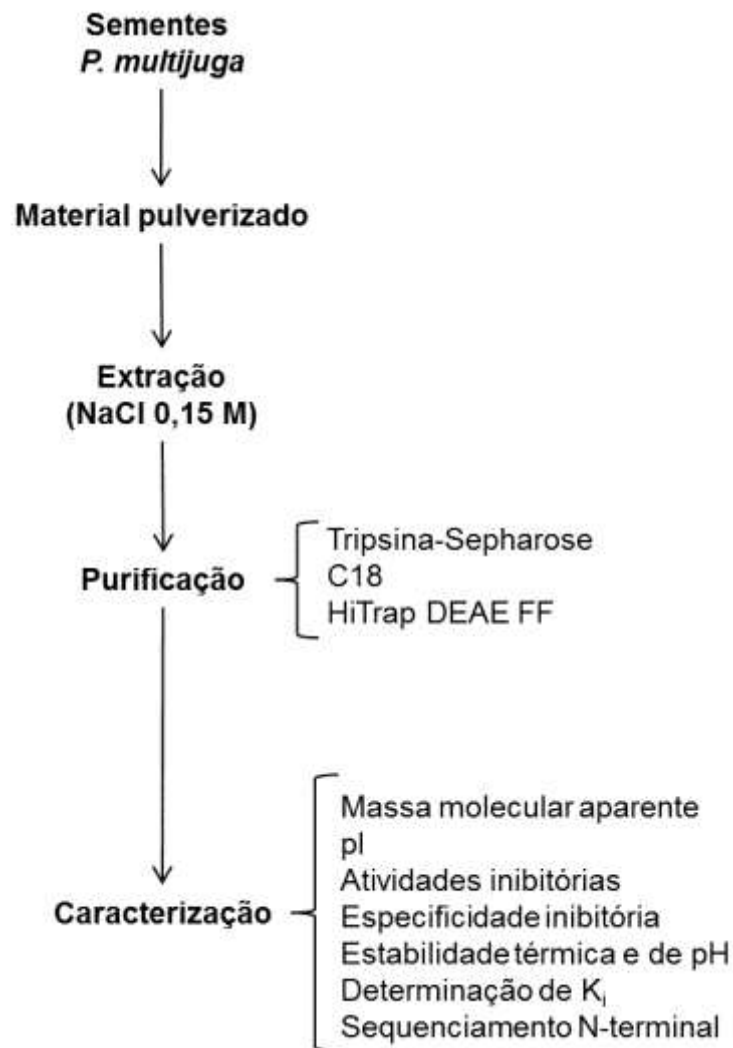


Figura 21. Fluxograma das principais etapas de extração, purificação e caracterização dos inibidores de tripsina.

3.2. Atividade inibitória da tripsina

As amostras, provenientes das etapas de purificação dos inibidores de tripsina, foram ressuspendidas em Tris HCl 50 mM (pH 7,5) e aquecidas até temperatura de ebulição durante 5 minutos, com a finalidade de excluir qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A inibição da tripsina foi determinada por meio de ensaio enzimático contendo 290 μ L de tampão Tris HCl 50 mM (pH 7,5), 10 μ L de solução de tripsina (0,1 mg/mL, Sigma) e 200 μ L de amostra. A mistura foi pré-incubada durante 30 minutos a 37°C e, em seguida, acrescentou-se 200 μ L do

substrato 1,25 mM BAPNA (Sigma), prosseguindo a incubação por mais 30 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 150 µL de ácido acético 30% (v/v), sendo realizadas leituras espectrofotométricas a 405 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences).

O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram realizados com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas.

3.3. Atividade inibitória da quimotripsina

As amostras, provenientes das etapas de purificação dos inibidores de tripsina, foram ressuspendidas em tampão Tris HCl 50 mM (pH 7,5) e aquecidas até temperatura de ebulição durante 5 minutos, com a finalidade de excluir qualquer atividade proteolítica presente na amostra. A inibição da quimotripsina foi determinada por meio de ensaio enzimático contendo 50 µL de quimotripsina (0,2 mg/mL, Sigma), 200 µL da amostra e 250 µL do tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Posteriormente, a solução foi incubada a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, 200 µL de Azocaseína 1% (m/v) foram adicionados a esta solução, prosseguindo-se a incubação a 37°C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de TCA 20% (m/v) (ácido tricloroacético, Sigma). As amostras foram centrifugadas a 3250 x *g*, durante 20 minutos e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µL de NaOH 2 M, sendo realizadas leituras espectrofotométricas dos produtos da reação a 420 nm em espectrofotômetro (UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences).

O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada amostra, ensaios controles foram realizados com os mesmos reagentes, diferindo na ordem de adição do substrato, que foi introduzido no momento em que as reações foram interrompidas.

3.4. Eletroforese em sistema SDS-PAGE

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida a 30% (m/v) e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8% (m/v). O gel de concentração a 5% (m/v) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e o gel de separação 20% (m/v), em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), sendo acrescentado em ambos SDS 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED e PSA 10% (m/v).

As frações, correspondentes aos picos com afinidade de interação com a resina tripsina-Sepharose, foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), contendo 1% (m/v) de SDS, 10% (m/v) de glicerol e 1% (m/v) de β -mercaptoetanol e posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), a 200 volts, 15 mA/ gel, durante 2 horas.

Foram utilizados marcadores de massa moleculares da Promega (10 kDa - 200 kDa).

Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético 0,1% (v/v), etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante 2 horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v).

3.5. Eletroforese em Gel 2D

Os inibidores de tripsina purificados (10 μ g) foram ressuspendidos em tampão de rehidratação (8 M ureia, CHAPS 2%, IPG Buffer pH 3-10 e azul de bromofenol 0,002%) e incubados juntamente com as fitas para focalização (13 cm, pH 3-10), à temperatura ambiente durante 16 horas. Posteriormente, as fitas foram submetidas à focalização isoelétrica utilizando o sistema de eletroforese Ettan IPGphor 3 (Ge Healthcare) acumulando o total de 58000 Vh (Fase 1: 300, 200 Vh; Fase 2: gradiente 300 - 1000 V, 300 Vh; Fase 3: gradiente 1000 - 5000 V; 4000 Vh; Fase 4: 5000 V, 1250 Vh). Após focalização, as fitas foram equilibradas em tampão de equilíbrio (6 M Ureia, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), Glicerol 3% (v/v), SDS 2% (m/v) e Azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 1% (m/v) sob agitação constante durante

15 minutos e, posteriormente incubadas em mesmo tampão de equilíbrio, contendo iodoacetamida 2,5% (m/v).

Após a separação da primeira dimensão, as fitas foram sobrepostas em géis de poliacrilamida contendo SDS (12,5%) e a separação da segunda dimensão realizada em sistema de eletroforese Mini-ve e Power Supply – EPS 601 (Ge Healthcare). Após a corrida os géis foram corados com coomassie coloidal. Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 kDa -200 kDa).

As identificação e análises dos *spots* foram realizadas utilizando o *software* ImageMaster 2D Platinum 6.0 (Ge).

3.6. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica dos inibidores purificados foi testada pela incubação em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e submetidas a ensaios de atividade inibitória da tripsina.

3.7. Estabilidade quanto à variação de pH

A estabilidade quanto à variação de pH dos inibidores purificados foi testada pela incubação em diferentes tampões: glicina 100 mM (pH 2,0 - 3,0); citrato de sódio 100 mM (pH 4,0); acetato de sódio 100 mM (pH 5,0); fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0 – 7,0); Tris – HCl 100 mM (pH 8,0 – 9,0); bicarbonato de sódio 100 mM (pH 10,0); glicina 100 mM (pH 11,0 – 12,0). Após incubação em cada tampão durante 1 hora à temperatura ambiente, as amostras foram submetidas a ensaios de inibição da tripsina.

3.8. Estudos cinéticos - K_i

As constantes inibitórias (K_i) foram determinadas a partir de concentrações crescentes dos inibidores purificados (0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,51; 0,82; 1,6; 3,3 e 5,1 μg), submetidos a ensaios de inibição da tripsina. Os valores de K_i foram determinados usando o software ENZFITTER versão 1.05 (EGA).

3.9. Análise da sequência amino-terminal

Os inibidores purificados tiveram a sequência amino-terminal determinada utilizando um sequenciador automatizado de peptídeos (PPSQ-33A, Shimadzu). As sequências foram comparadas a partir de alinhamentos múltiplos utilizando o programa on-line BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os alinhamentos múltiplos de sequências homólogas foram realizados utilizando o programa CLUSTAL / Uniprot (www.uniprot.org).

4. Resultados

A purificação dos inibidores de proteases extraídos de sementes quiescentes de *P. multijuga* envolveu três etapas cromatográficas. Inicialmente, o extrato proteico foi submetido à cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose, resultando em dois picos distintos, onde as frações correspondentes às moléculas que interagiram com a coluna cromatográfica (PmTI), após eletroforese monodimensional apresentaram banda única de, aproximadamente, 9 kDa (Figura 22).

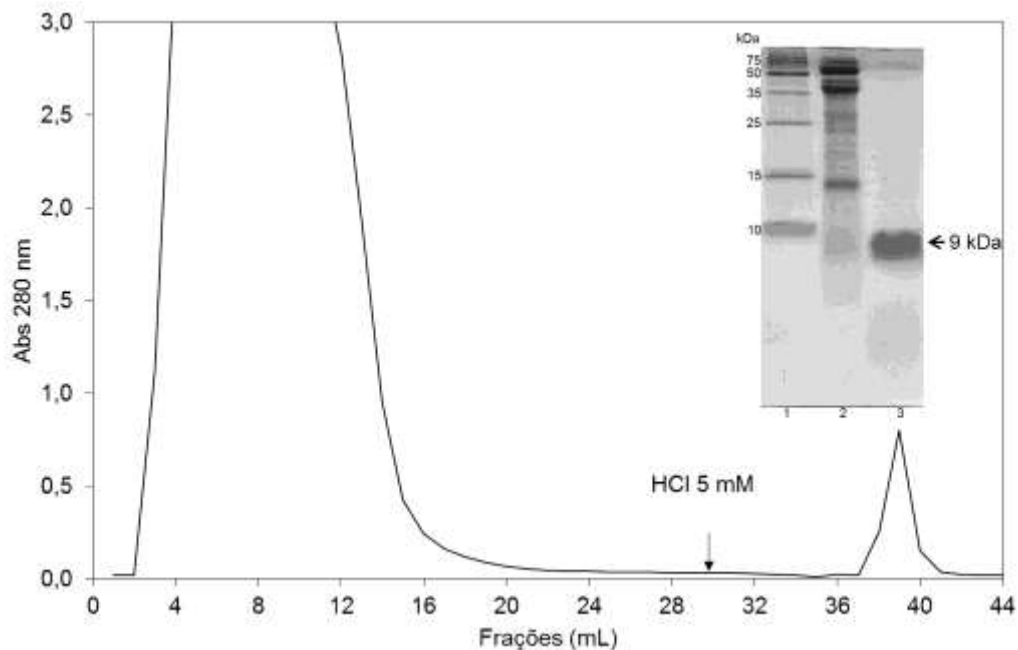


Figura 22. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose do extrato proteico de sementes de *P. multijuga* e SDS-PAGE 20% das frações com afinidade de interação pela resina. 1: Marcador molecular. 2: Extrato proteico. 3: frações com afinidade pela resina. Fluxo cromatográfico: 30 mL/h.

A cromatografia de fase reversa em coluna C18, das frações provenientes da tripsina-Sepharose resultou em um pico único e a eletroforese em gel 2D revelou a presença de duas proteínas distintas nessa fração, com massa molecular aparente

de, aproximadamente, 12 kDa e pontos isoelétricos de 5,8 e 7,2, indicando a purificação parcial dos inibidores de tripsina (Figuras 23 e 24).

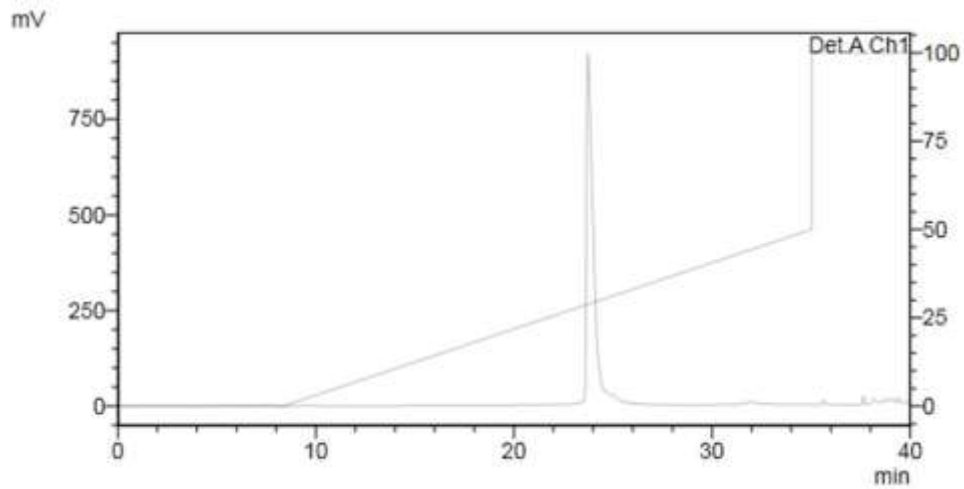


Figura 23. Perfil de eluição em cromatografia de fase reversa em coluna C18, UFLC (Shimadzu Prominence), das frações provenientes da tripsina-Sepharose a um fluxo de 1 mL/min.

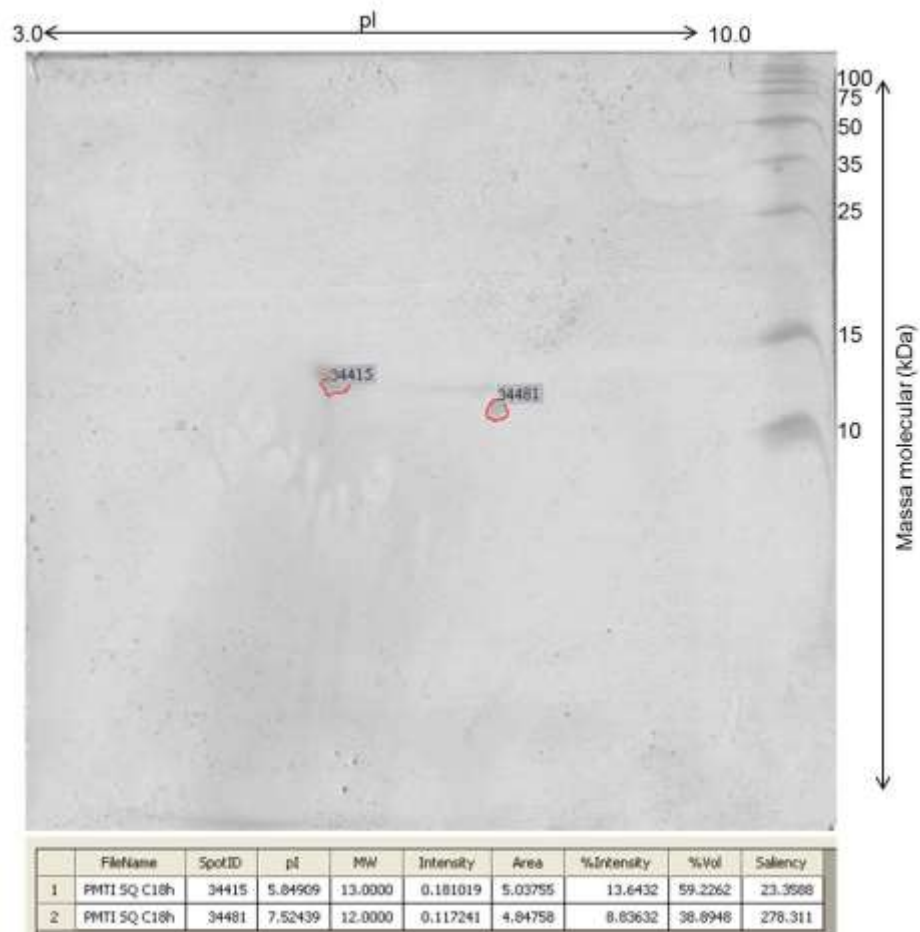


Figura 24. Eletroforese em gel 2D das frações provenientes da cromatografia de fase reversa em C18. Marcador de massa molecular: Promega.

Após a cromatografia de troca iônica em DEAE das frações provenientes da cromatografia em fase reversa, obteve-se a separação de dois inibidores, confirmados a partir da eletroforese em géis 2D (Figura 25). Os inibidores de tripsina purificados foram denominados PmTI1 e PmTI2 e, apresentaram pI de 6,0 e 7,6, respectivamente, com massa molecular de aproximadamente 12 kDa (Figura 26A e 26B).

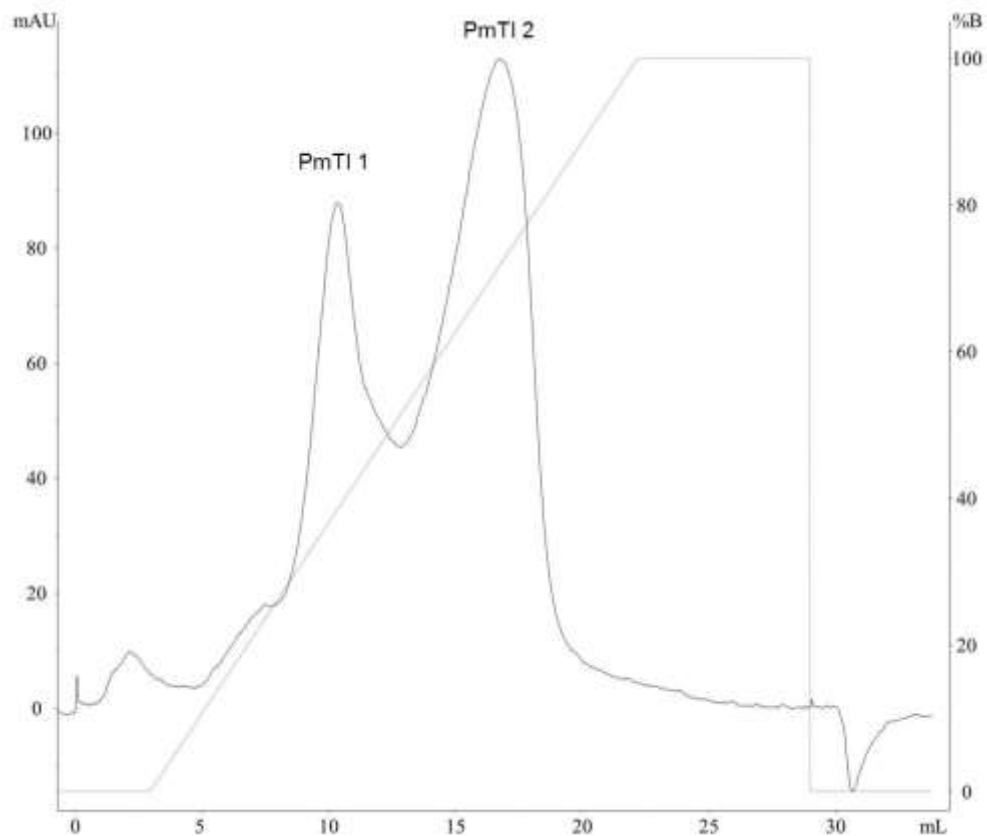


Figura 25. Perfil de eluição em cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap DEAE FF das frações provenientes da cromatografia de fase reversa em coluna C18, a um fluxo de 0,5 mL/min.

Os inibidores purificados (PmTI1 e PmTI2), a partir das cromatografias de afinidade e troca iônica, apresentaram alta especificidade de inibição contra a tripsina, entretanto, PmTI1 apresentou atividade inibitória secundária contra a quimotripsina, sendo essa atividade 27 vezes menor quando comparada à atividade inibitória da tripsina (Figura 27).

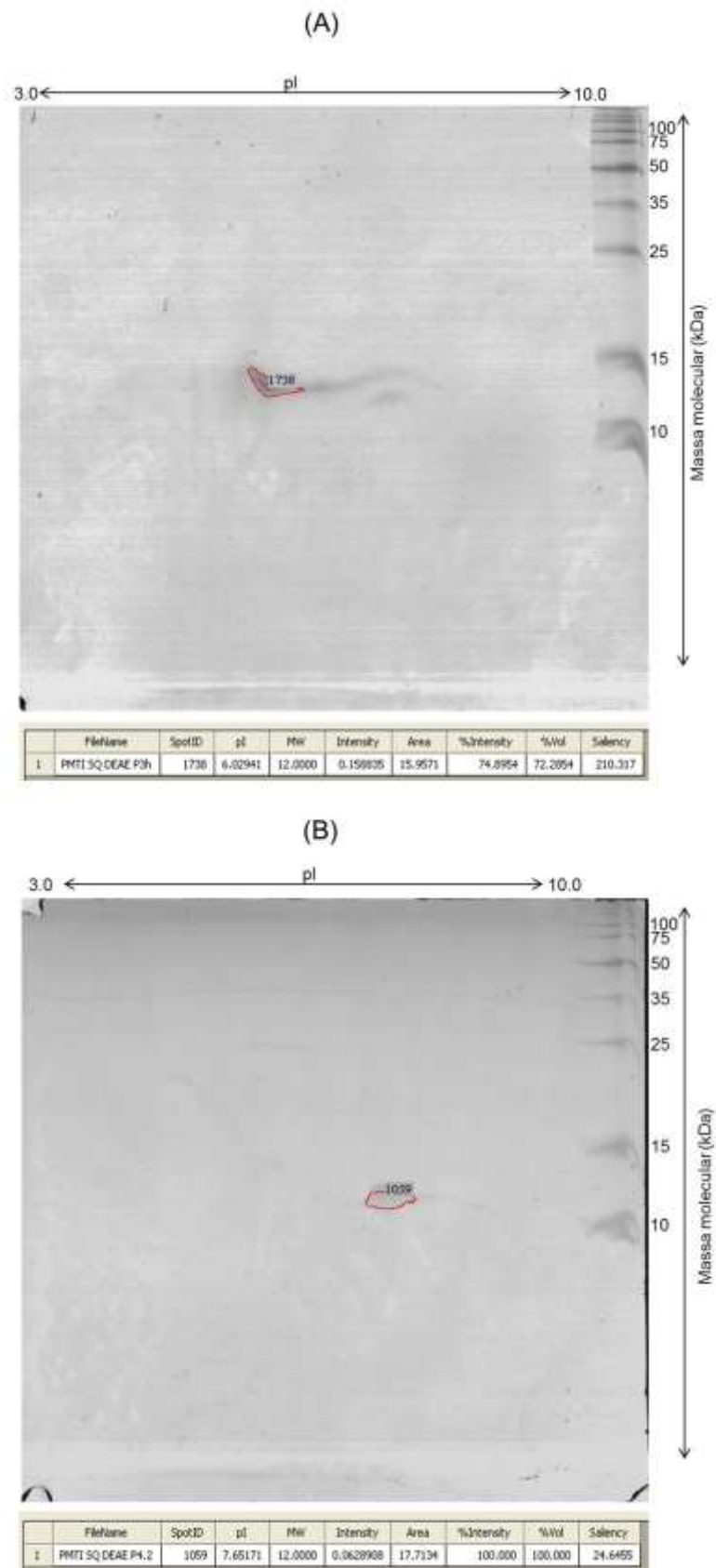


Figura 26. Eletroforese em gel 2D das frações provenientes da cromatografia de troca aniônica em HiTrap DEAE FF. Marcadores Promega. A: PmTI1. B: PmTI2.

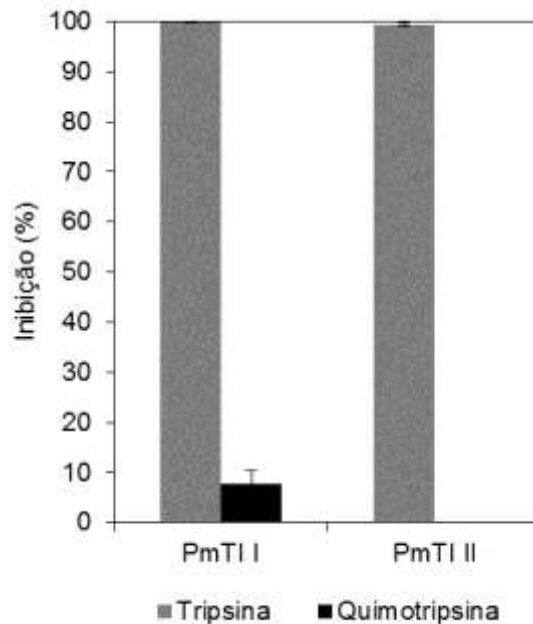


Figura 27. Especificidade da atividade inibitória de PmTI1 e PmTI2 contra serinoproteases.

A partir da extrapolação das curvas de inibição para o ponto de intersecção com a abscissa, foi possível calcular a concentração de inibidor que é capaz de promover inibição máxima da tripsina. A máxima inibição enzimática foi obtida na presença de, aproximadamente, 0,16 e 0,32 μg de proteína para PmTI1 e PmTI2, respectivamente (Figura 28).

Os valores de K_i , determinados por meio de análises de software, revelaram constantes inibitórias de $3,9 \times 10^{-8}$ M e $5,56 \times 10^{-8}$ M para PmTI1 e PmTI2, respectivamente, demonstrando que PmTI1 apresenta maior afinidade pela tripsina, comparado à PmTI2.

O efeito da temperatura sobre PmTI1 e PmTI2 demonstrou que a atividade inibitória é estável até 100°C , assim como a pré-incubação dos inibidores em diferentes faixas de pH não afetou a atividade inibitória contra a tripsina (Figuras 29A e 29B).

As seqüências N-terminais dos inibidores de tripsina purificados foram: TYACCDKCLCTKSFPPQCQCRDTGGTCHSACKKCICTRSYPPNCRQCQNVTH e SYPRQCKCLDTTKFCYKCKSDCCGGCHHCAACC para PmTI1 e PmTI2, respectivamente. As seqüências foram separadamente submetidas a análises em

BLAST e alinhadas (Uniprot), estando os inibidores purificados estruturalmente relacionados aos inibidores do tipo Bowman-Birk (BBIs) de espécies de leguminosas pertencentes à subfamília Faboideae, com identidade variando de 64 a 81% (Figuras 30 e 31).

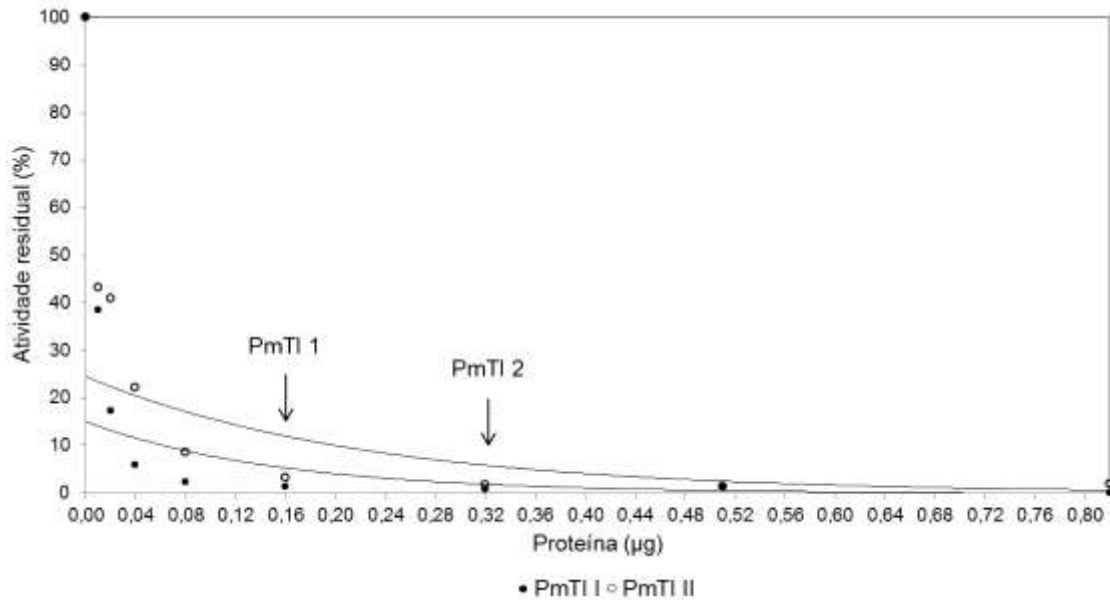


Figura 28. Curvas de inibição da tripsina bovina pelos inibidores PmTI1 e PmTI2. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com o BAPNA na presença de diferentes concentrações dos inibidores.

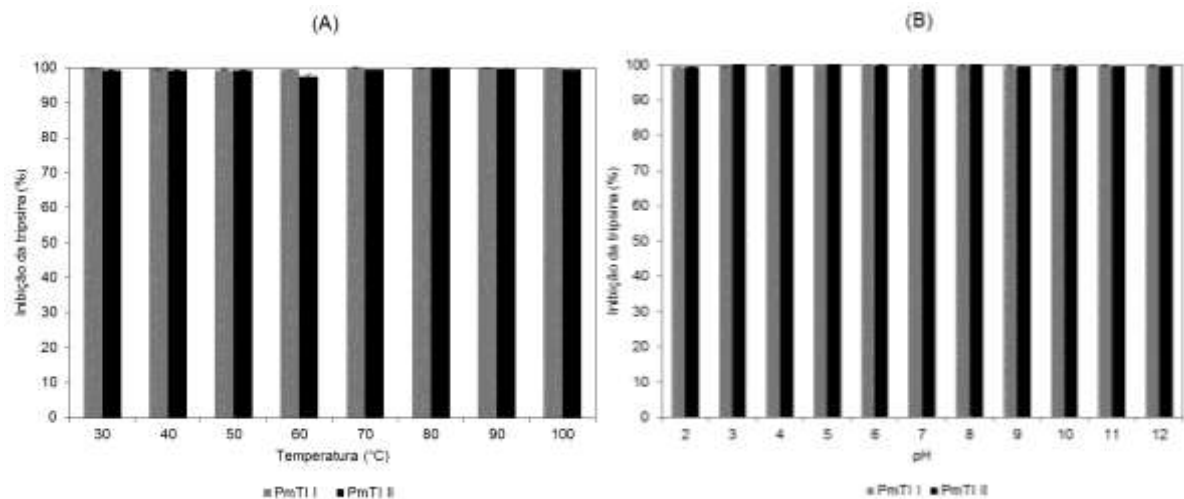


Figura 29. Estabilidade da atividade dos inibidores de tripsina PmTI1 e PmTI2. A: Estabilidade térmica. B: Estabilidade quanto à variação de pH.

			Id (%)
PmTI2	-----	-----	
<i>Vicia angustifolia</i> (P01065)	-----	-----GDDVKSACCDTCLC	14 69
<i>Canavalia lineata</i> (Q7M1Q0)	-----	-----DHSDDSESSKPCDCECKC	19 64
<i>Glycine max</i> (P01064)	-----	-----MC-----ILSFLKSDQS---SSYDDDEYSKPCDLCMC	30 72
<i>Pisum sativum</i> (Q41066)	MELMNKKVMMKLA	LMVFLLSFAANVVNARFDSTSFITQ---VLSNGDDVKSACCDTCLC	56 75
<i>Phaseolus microcarpus</i> (A4Q975)	-----	-----MMVLKVCLLLVLVFLVGVTTARMDLNHLIR-NHHDDSSDEPSESSEPCDLCMC	50 75
<i>Phaseolus grayanus</i> (B1GYE5)	-----	-----MMVLKVCLLLVLVFLVGVTTARMDLNHLIRSNHHDDSSDEPSESSEPCDLCMC	51 75
<i>Phaseolus zimapanensis</i> (A8KRN4)	-----	-----MMVLKVCLLLVLVFLVGVTTARMDLNHLIRGNHHDDSSDEPSESSEPCDLCVC	51 75
<i>Phaseolus hintonii</i> (A8KRM8)	-----	-----MMVLKVCLLLVLVFLVGVTTARMDLNHLIRGNHHDDSSDEPSESSEPCDLCVC	51 75
<i>Phaseolus oligospermus</i> (A7DZQ6)	-----	-----MMVLKVCLLLVLVFLVGVTTARMDLNHLIRSNHHDDSSDEPSESSEPCDLCMC	51 75
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y1)	MELMNKKAMM	KLALMLFLLGFTANVVNARFDSTSFITQ---VLSNGDDAKSACCDTCLC	56 75
<i>Erythrina variegata</i> (P81705)	-----	-----TSACCDKCFPC	10 68
<i>Glycine max</i> (K7LE73)	MGL---	KNNMVVLKVCFLVFLVFLVGVTNARMELNLFKSD---NSSDDDESSKPCDLCMC	53 78
<i>Glycine soja</i> (Q8RU22)	MGL---	KNNMVVLKVCFLVFLVFLVGVTNARMELNLFKSD---HSSDDDESSKPCDLCMC	53 78
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y4)	MELMNKKAIM	KLALMLFLLGFTANVVNARFDSTSFITQ---VLSNGDDAKSACCDTCLC	56 81
PmTI2		-----SYPRQCKCLDTHKFCYKCKSDCCGGCHHCA	31
<i>Vicia angustifolia</i> (P01065)	TRSDPPTCR	CDVVG-ERCHSACNHCVCNYSNPPQCQCFDTHKFCYKACHSSEKEEVIKN-	72
<i>Canavalia lineata</i> (Q7M1Q0)	TKSEPPQC	QCVDTRELSCHSACKLCLCALSEPAKCRCVDTTDFCYKPKSGGGDED----	75
<i>Glycine max</i> (P01064)	TRSMPPQC	SCEDI RLNSCHSDCKSCMCTRSQPGQCRCLDTNDFCYKPKCSRDD-----	83
<i>Pisum sativum</i> (Q41066)	TKSDPPTCR	CDVVG-ETCHSACDSCICALSYPPQCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN-	114
<i>Phaseolus microcarpus</i> (A4Q975)	THSIPPIC	QCKDIRLNSCHSACKTCMCTRSMPGKRCRLDTHDFCYKSKSSGEDDD----	106
<i>Phaseolus grayanus</i> (B1GYE5)	ADSIPPIC	QCTDIRLNSCHSACKSCMCTRSMPGTCRCLDTHDFCYKSKSSGEDDD----	107
<i>Phaseolus zimapanensis</i> (A8KRN4)	TDSIPPIC	QCTDIRLNSCHSACKTCMCTRSMPGKRCRLDTHDFCYKSKSSGEDDD----	107
<i>Phaseolus hintonii</i> (A8KRM8)	TDSIPPIC	QCTDIRLNSCHSACKTCMCTRSMPGKRCRLDTHDFCYKSKSSGEDDD----	107
<i>Phaseolus oligospermus</i> (A7DZQ6)	TDSIPPIC	QCTDIRLNSCHSACKSCMCTRSMPGKRCRLDTHDFCYKSKSSGEDDD----	107
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y1)	TKSNPPI	CRCDIR-ETCHSACNSVCVASTIPPQCRCFDTHKFCYKACHNSEKEEVLVNN-	114
<i>Erythrina variegata</i> (P81705)	TKSNPPI	CQCRDVG-ETCHSACKFCICALSYPAQCHCLDQNTFCYDKCDSDS-----	61
<i>Glycine max</i> (K7LE73)	TASMPQC	HCADIRLNSCHSACDRCACTRSMPGQCRCLDTHDFCYKPKSSDEDDEDD----	109
<i>Glycine soja</i> (Q8RU22)	TASMPQC	HCADIRLNSCHSACDRCACTRSMPGQCRCLDTHDFCYKPKSSDEDDEDD----	109
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y4)	TKSNPPT	CRCDVVG-ETCHSACNSCICALSYPPQCRCFDTHKFCYKACHNSKKEEVIKN-	114
PmTI2	ACC 34		
<i>Vicia angustifolia</i> (P01065)	---		
<i>Canavalia lineata</i> (Q7M1Q0)	---		
<i>Glycine max</i> (P01064)	---		
<i>Pisum sativum</i> (Q41066)	---		
<i>Phaseolus microcarpus</i> (A4Q975)	---		
<i>Phaseolus grayanus</i> (B1GYE5)	---		
<i>Phaseolus zimapanensis</i> (A8KRN4)	---		
<i>Phaseolus hintonii</i> (A8KRM8)	---		
<i>Phaseolus oligospermus</i> (A7DZQ6)	---		
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y1)	---		
<i>Erythrina variegata</i> (P81705)	---		
<i>Glycine max</i> (K7LE73)	---		
<i>Glycine soja</i> (Q8RU22)	---		
<i>Lathyrus sativus</i> (L7N9Y4)	---		

Figura 31. Sequência amino-terminal de PmTI2 e alinhamento com inibidores Bowman-Birk isolados de leguminosas. Letras em destaque no box indicam os dois sítios reativos. Asteriscos indicam resíduos idênticos em todas as sequências. Asteriscos brancos com destaques em preto indicam resíduos conservados de cisteína. Id: Identidade.

Análises da sequência de PmTI2 não permitiram identificar os sítios reativos a partir da homologia com outros BBIs. No entanto, o primeiro resíduo de aminoácido da sequência coincide com os aminoácidos P₁' (Ser) conservados no segundo sítio reativo dos BBIs similares (Figura 31).

5. Discussão

Espécies pertencentes à família Fabaceae apresentam diferenças na distribuição de inibidores de proteinases, especificamente entre os órgãos reprodutivos, de armazenamento e em tecidos vegetativos da maioria das famílias de plantas (Bhattacharyya e Babu, 2009). Em plantas superiores, estudos têm caracterizado várias famílias de inibidores, em particular, aqueles que constituem os inibidores de serinoproteases de leguminosas, como, por exemplo, em *Pithecellobium dumosum*, *Erythrina caffra*, *Crotalaria paulina*, *Dimorphandra molis*, *Swartzia pickelli*, *Adenantha pavonina*, *Leucaena leucocephala*, *Bauhinia variegata*, *Derris trifoliata*, *Acacia nilotica*, *Bauhinia purpurea* (Bhattacharyya e Babu, 2009; Sun *et al.*, 2010; Babu *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2012; Rufino *et al.*, 2013).

Apesar de vários estudos envolverem a purificação, caracterização molecular e biológica de inibidores de serinoproteases de sementes de leguminosas, informações acerca de espécies de Fabaceae arbóreas pertencentes à flora Amazônica ainda são escassas, considerando que elas representam grande repositório de diversidade de inibidores de proteases. Além disso, o padrão de distribuição desses inibidores nas sementes tem demonstrado uma relação evolutiva entre a família de inibidores de proteases e as subfamílias de Fabaceae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) (Norioka *et al.*, 1988; Gomes *et al.*, 2005; Bhattacharyya e Babu, 2009).

Inibidores de tripsina de sementes de *P. multijuga* (PmTI1 e PmTI2) foram purificados a partir de três etapas cromatográficas, compreendendo as cromatografias de afinidade em tripsina-Sepharose, fase reversa em C18 e troca aniônica em DEAE, as quais correspondem às principais técnicas de obtenção dessa classe proteica, como os inibidores de outras espécies de Mimosoideae, *Albizia lebeck*, *Adenantha pavonina* e *Acacia polyphylla*, os quais foram purificados a partir das cromatografias de exclusão molecular, afinidade em tripsina-Sepharose, troca aniônica e fase reversa (Sharma *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013a).

Em sementes de *P. multijuga*, após a purificação dos inibidores, PmTI1 e PmTI2 apresentaram massa molecular aparente de, aproximadamente, 12 kDa e, alta inibição para a tripsina, com insignificante atividade inibitória contra a quimotripsina.

A alta especificidade contra a tripsina, encontrada para ambos inibidores, corrobora com resultados encontrados para outros inibidores purificados de sementes de *Inga cylindrica* e *Erythrina velutina*, ao passo que, inibidores de *Dolichos biflorus* e *Capsicum annum* também foram capazes de inibir a atividade da quimotripsina (Calderon *et al.*, 2010; Kuhar *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013b; Ribeiro *et al.*, 2013).

Vários estudos têm demonstrado variações na atividade de inibidores do tipo Kunitz, onde alguns inibidores dessa família são específicos para a tripsina ou para a quimotripsina, ao passo que outros são potentes inibidores de tripsina, porém podem inibir também a quimotripsina com menor especificidade, ou podem ainda inibir enzimas de outras classes, como a papaína pertencente às cisteíno proteases (Macedo *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2012). A diferença de especificidade entre os dois tipos de inibidores pode ser explicada, uma vez que os inibidores Kunitz são caracterizados por apresentar sítio reativo único, inibindo, principalmente a tripsina, podendo também inibir fracamente a quimotripsina. Inibidores do tipo Bowman-Birk possuem em sua estrutura dois domínios ativos localizados em lados opostos, que podem agir de forma independente, podendo inibir duas moléculas de tripsina ou quimotripsina ou, inibir uma tripsina e uma quimotripsina (Laskowski e Qasim, 2000; Kuhar *et al.*, 2013).

Com a finalidade de determinar o mecanismo de inibição dos inibidores purificados contra a tripsina, as constantes inibitórias foram obtidas de acordo com o procedimento de Morrison (Morrison, 1982) e adaptadas ao programa computacional Enzfitter. Esse modelo é do tipo “slow tight-binding”, onde “slow” significa que a inibição não é imediata e “tight-binding” refere-se ao fato de que a inibição é significativa em concentrações próximas às da enzima que está sendo inibida e, quanto menor for a K_i , mais forte será a interação, indicando a magnitude da afinidade entre enzima e inibidor.

Os valores de K_i encontrados para PmTI1 e PmTI2 (na ordem de 10^{-8} M), quando comparados à outros inibidores de sementes de leguminosas, apresentaram maior afinidade pela tripsina que em *Poecilanthe parviflora* ($1,0 \times 10^{-7}$ M) e *Cassia*

obtusifolia ($0,3 \times 10^{-6}$ M), pertencentes à subfamília Faboideae e Caesalpinioideae, respectivamente (Garcia *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2007). Contudo, os valores revelaram afinidade menor quando comparados a outras espécies da subfamília Mimosoideae, como *Inga cylindrica* ($4,3 \times 10^{-9}$ M), *Entada acaciifolia* ($1,7 \times 10^{-9}$ M) e *Acacia victoriae* ($1,06 \times 10^{-8}$ M) (Calderon *et al.*, 2010; Ee *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012).

A formação do complexo estável enzima-inibidor ocorre rapidamente, porém sua dissociação é lenta, resultando na enzima livre e um inibidor clivado (Franco *et al.*, 1999; Oliveira, 2011). A interação enzima-inibidor ocorre em uma região molecular do inibidor (sítio reativo) caracterizada por uma alça ligante exposta responsável pela ligação ao sítio ativo da enzima alvo, permitindo a formação de um complexo altamente estável, com constantes de associação na ordem de 10^{-8} a 10^{-13} , podendo neutralizar completamente a atividade enzimática (Birk, 2003; Oliveira, 2011).

No estudo de estabilidade térmica, as atividades inibitórias de PmTI1 e PmTI2 foram resistentes ao aumento de temperatura na faixa de 30 a 100°C. Esses resultados divergem dos encontrados para inibidores de proteases de outras espécies citadas na literatura, que sofreram redução na atividade inibitória após incubação em altas temperaturas, como, por exemplo, os inibidores de tripsina de *Inga laurina* (ILTI), que apresentaram redução de 20% da inibição após exposição a 80°C e o inibidor de *Calliandra selloi* (CSTI), com redução de 50% da atividade inibitória à 100°C. Todavia, são semelhantes aos resultados encontrados para os inibidores de tripsina de *Erythrina velutina*, que foram estáveis na faixa de 37 a 100 °C (Macedo *et al.*, 2007; Yoshizaki *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2013b). Esses resultados mostram desuniformidade em relação à estabilidade térmica de diferentes inibidores.

No que diz respeito à estabilidade frente à variação de pH, PmTI1 e PmTI2 foram estáveis sobre condições variando de altamente ácida à altamente alcalina, mantendo sua atividade inibitória numa ampla faixa de pH de 2 a 12 unidades de potencial hidrogeniônico. Resultados similares têm sido reportados para outros inibidores isolados de sementes de leguminosas, como em *Inga cylindrica*, *Phaseolus vulgaris* cv. feijão marrom e *Pithecelobium dumosum* (Oliveira *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2013).

Vários estudos tem relatado a estabilidade da atividade de inibidores de proteases em condições extremas de temperatura e pH, o que tem sido associado à presença de pontes dissulfeto (Macedo *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2013). Embora as ligações dissulfeto intramoleculares sejam atribuídas como o principal fator na estabilidade funcional dos inibidores contra a presença de desnaturantes, fatores adicionais como localização e disposição das ligações dissulfeto dentro da molécula também são críticos para a estabilidade global do inibidor (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Yoshizaki *et al.*, 2007). Os inibidores do tipo Bowman-Birk são moléculas extremamente resistentes à temperatura, força iônica e variações de pH, devido ao alto conteúdo de ligações dissulfeto, tamanho reduzido e presença de ligações de hidrogênio. Assim, sua estrutura tridimensional apresenta-se muito estável, garantindo a sua atividade mesmo em condições extremas (Osman *et al.*, 2002; Cesar, 2006).

É importante ressaltar que, o conhecimento da estabilidade dos inibidores de proteases frente à variação de temperatura e pH constitui importante ferramenta nos processos de purificação dos inibidores, uma vez que a redução no conteúdo de proteínas solúveis, presentes no extrato bruto, por desnaturação térmica, facilita a obtenção e o isolamento dos inibidores, pois esses tratamentos interferem pouco na atividade do inibidor, mas, em contraste, alteram a concentração das proteínas na amostra (Cesar, 2006).

A sequência da região N- terminal das proteínas purificadas (PmTI1 e PmTI 2) notavelmente se assemelha à inibidores do tipo Bowman-Birk de espécies pertencentes à família Fabaceae. Esses inibidores, também conhecidos como inibidores de tripsina “double-headed”, são caracterizados por apresentarem dois sítios reativos que atuam como pseudo-substratos para proteases, permitindo a interação dessas proteínas com inibidores (Chan *et al.*, 2013). Muitos inibidores Bowman-Birk de leguminosas apresentam os sítios reativos localizados em lados opostos da molécula (regiões N- e C- terminais) e, possibilitam interações, simultâneas e independentes, com duas serinoproteases, não necessariamente idênticas (Scarafoni *et al.*, 2008).

Os resíduos de aminoácidos nos sítios reativos dos inibidores são usualmente designados P_4 , P_3 , P_2 , P_1 , P_1' , P_2' , P_3' , P_4' , P_5' , P_6' , onde P_1 confere a especificidade inibitória. Dessa maneira, quando P_1 é ocupado por resíduos de Arg ou Lys, o sítio reativo é específico para a inibição da tripsina, ao passo que, quando é ocupado por

Leu, Phe ou Tyr a inibição é específica para a quimotripsina. Em alguns casos, a posição P_1 pode ser ocupada por Ala, promovendo a inibição da elastase (Laskowski e Kato, 1980; De Paola *et al.*, 2012).

A interação do inibidor com a protease correspondente ocorre devido à inserção da região de ligação do inibidor (sítio reativo) à cavidade ligante da protease e, os resíduos que ocupam a posição P_1P_1' medeiam a formação e estabilização do complexo enzima-inibidor. Conseqüentemente, variações nos resíduos P_1 influenciam fortemente a especificidade contra proteases (Clemente e Domoney, 2006; Rocco *et al.*, 2011; De Paola *et al.*, 2012).

O sequenciamento de PmTI1 demonstrou que os sítios reativos de PmTI1, determinados por similaridade à outras sequências de inibidores Bowman-Birk de vegetais, apresentam os resíduos Lys¹² e Arg³⁸ ocupando a posição P_1 correspondente à cada sítio reativo, denotando atividade inibitória específica para a tripsina. Resultados similares (73% de identidade) foram descritos para inibidores isolados de sementes de *Lupinus albus*, onde as posições P_1 do primeiro e segundo sítios reativos são ocupadas pelo resíduo Arg (Arg¹⁵ e Arg⁴¹), caracterizando-o como inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk “double-headed” (Scarafoni *et al.*, 2008).

Embora as análises das sequências das alças de inibição revelem que essas sejam extremamente conservadas, os inibidores Bowman-Birk apresentam variações pontuais muito importantes que podem modificar suas especificidades, sendo as posições mais relevantes os resíduos que se encontram em P_1 e P_2' . O resíduo P_1 é responsável pela especificidade inibitória, ao passo que, variações na posição P_2' resultam em diferenças na estabilidade do inibidor quanto à sua velocidade de hidrólise (Gariani e Leatherbarrow, 1997; Cesar, 2006).

A presença do aminoácido isoleucina em P_2' resulta em valor baixo da constante inibitória, enquanto que substituições por outros aminoácidos de cadeia lateral alifática podem melhorar a potência inibitória. Aminoácidos carregados positivamente, como arginina e lisina, são bem tolerados e produzem constantes relativamente baixas, ao passo que, substituições com cadeias laterais carregadas negativamente resultam em inibidores fracos. O resíduo de glutamato, por exemplo, possui atividade inibitória insignificante, com valores de K_i superiores à 1 mM (Gariani *et al.*, 1999; Cesar, 2006).

Existem dois fatores importantes na estrutura dos inibidores do tipo Bowman-Birk que os tornam moléculas altamente eficientes. O primeiro fator corresponde à

conformação dos sítios reativos, os quais são complementares ao sítio ativo da enzima alvo, permitindo interação altamente estável entre enzima e inibidor. Outro fator importante diz respeito à rigidez estrutural ou conformação inflexível da alça de inibição, atribuída à presença de pontes dissulfeto e de hidrogênio e ao seu tamanho reduzido (José, 2002). Estudos envolvendo a estrutura tridimensional dos inibidores Bowman-Birk isolados de *Arachis hypogaea*, *Glycine max* e *Hordeum vulgare* revelam que nesses três inibidores, as pontes dissulfeto ocorrem entre os mesmos resíduos de cisteína (C₁-C₁₄, C₂-C₆, C₃-C₁₃, C₄-C₅, C₇-C₉, C₈-C₁₂, C₁₀-C₁₁), caracterizando-os como resíduos com posições altamente conservadas ao longo da evolução dessas moléculas (José, 2002).

A evolução de inibidores do tipo Bowman-Birk em soja tem sido proposta a partir de um inibidor ancestral com apenas uma alça de inibição, o qual seria um inibidor de tripsina ou de enzimas similares à tripsina que teria sofrido uma duplicação interna no gene, originando um inibidor com duas alças de inibição. Sustentando essa hipótese, a descoberta de inibidores com uma única alça de inibição isolados de trigo sugere que estes sejam os inibidores ancestrais dos inibidores Bowman-Birk com dupla alça de inibição (Baek *et al.*, 1994; Odani *et al.*, 1986; José, 2002).

No que diz respeito à evolução dos inibidores de serinoproteases em espécies de Fabaceae, os inibidores de tripsina isolados de *P. multijuga*, espécie pertencente à subfamília Mimosoideae, apresentaram alta homologia com inibidores de tripsina pertencentes à subfamília Faboideae. Dessa forma, sugere-se que *P. multijuga* corresponda a uma espécie que, possivelmente, encontra-se em estado de transição ao longo da escala de evolução dos inibidores em espécies pertencentes à família Fabaceae.

6. Conclusão

Considerando a massa molecular aparente dos inibidores PmTI1 e PmTI2, de, aproximadamente, 12 kDa, a atividade inibitória predominante contra a tripsina e as análises de homologia da região N-terminal, conclui-se que as duas proteínas purificadas a partir dos cotilédones de sementes quiescentes de *P. multijuga* correspondem a inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk.

7. Referências Bibliográficas

Babu, S.R.; Subrahmanyam, B.; Srinivasan; Santha, I.M. 2012. *In vivo* and *in vitro* effect of *Acacia nilotica* seed proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. *Journal of Biosciences*, 37(2): 269-276.

Baek, J.M.; Song, J.C.; Choi, Y.D.; Kim, S.I. 1994. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoforms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(5): 843-846.

Bhattacharyya, A.; Babu, C.R. 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, (70): 703-712.

Bhattacharyya, A.; Rai, S.; Babu, C.R. 2007. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, (45): 169-177.

Birk, Y. 2003. *Plant protease inhibitors: Significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering*. Springer-Verlag, Berlin, 170 pp.

Bode, W.; Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 241-252.

Calderon, L.A.; Almeida Filho, H.A.; Teles, R.C.L.; Medrano, F.J.; Bloch Jr, C.; Santoro, M.M.; Freitas, S.M. 2010. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon *Inga cylindrical* [Vell.] mart. seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2): 73-79.

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(6): 485-493.

Cesar, J.J. 2006. *Formação de inibidores Bowman-Birk durante a germinação de Macrotyloma axillare*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto/ Instituto de Ciências exatas e Biológicas, Ouro Preto, Minas Gerais. 96 pp.

Chan, Y.S.; Zhang, Y.; Ng, T.B. 2013. Brown kidney bean Bowman-Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 1306-1314.

Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Bariani, A.; Rodrigues, J.V.C.; Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*, 39(1): 199-206.

Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Schimpl, F.C.; Souza, C.S.C.R.; Souza, L.A.G.; Pando, S.C. 2011. Prospecção de inibidores de serinoproteinasas em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. *Acta Amazonica*, 41(1): 163-170.

Clemente, A.; Domoney, C. 2006. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Current Protein and Peptide Science*, 7: 201-206.

De Paola, D.; Blanco, E.; Pierri, C.L.; Sonnante, G. 2012. Isolation and characterization of novel variants of BBI coding genes from the legume *Lathyrus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 57: 45-53.

Ee, K.Y.; Zhao, J.; Rehman, A.; Agboola, S. 2011. Glycosylation, amino acid analysis and kinetic properties of a major Kunitz-type inhibitor from *Acacia victoria*. *Food Chemistry*, 129: 1224-1227.

Fang, E.F.; Bah, C.S.F.; Wong, J.H.; Pan, W.L.; Chan, Y.S.; Ye, X.J.; Ng, T.B. 2012. A potential human hepatocellular carcinoma inhibitor from *Bauhinia purpurea* L.

seeds: from purification to mechanism exploration. *Archives of Toxicology*, 86: 293-304.

Franco, O.L.; Melo, F.R.; Silva, M.C.M.; Grossi-de-Sá, M.F. 1999. Resistência de plantas a insetos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 10: 36-40.

Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, 23(5): 343-350.

Gariani, T.; Leatherbarrow, R.J. 1997. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *Journal of Peptide Research*, 49: 467-475.

Gariani, T.; McBride, J.D.; Leatherbarrow, R.J. 1999. The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin: Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1431: 232-237.

Gomes, C.E.M.; Barbosa, A.E.A.D.; Macedo, L.L.P.; Pitanga, J.C.M.; Moura, F.T.; Oliveira, A.S.; Moura, R.M.; Queiroz, A.F.S.; Macedo, F.P.; Andrade, L.B.S.; Vidal, M.S.; Sales, M.P. 2005. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1095-1102.

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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431:145-159.

Hartl, M.; Giri, A.P.; Kaur, H.; Baldwin, I.T. 2011. The multiple functions of plant serine protease inhibitors defense against herbivores and beyond. *Plant Signal & Behavior*, 6(7): 1009-1011.

Hernández-Nistal, J.; Martím, I.; Jiménez, T.; Dopico, B.; Labrador, E. 2009. Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 181-187.

José, M.O.A. 2002. *Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 108pp.

Kimura, M.; Kouzuma, Y.; Abe, K.; Yamasaki, N. 1994. On a Bowman-Birk Family proteinase inhibitor from *Erythrina variegata* seeds. *The Journal of Biochemistry*, 115(3): 369-372.

Klomklao, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H.; Chaijan, M. 2011. Extration, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiate* (L.) R. Wilczek). *Food Chemistry*, 129: 1348-1354.

Kuhar, K.; Kansal, R.; Subrahmanyam, B.; Koundal, K.R.; Miglani, K.; Gupta, V.K. 2013. A Bowman-Birk protease inhibitor with antifeedant and antifungal activity from *Dolichos biflorus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 1887-1903.

Kumar, V.; Gowda, L.R. 2013. Production of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor by an intein mediated protein purification system. *Protein Expression and Purification*, 89: 16-24.

Laskowski, M.Jr.; Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593-626.

Laskowski, M.Jr.; Qasim, M.A. 2000. What can the structure of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 324-337.

Liao, H.; Ren, W.; Kang, Z.; Jiang, J.H.; Zhao, X.J.; Du, L.F. 2007. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnology Letters*, 29: 653-658.

Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Cabrini, E.C.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621: 170-182.

Macedo, M.L.R.; Freire, M. das G.M. 2011. Insect digestive enzymes as a target for pest control. *Functional Plant Biology*, 8: 190-198.

Macedo, M.L.R.; Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Richardson, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104-1111.

Macedo, M.L.R.; Matos, D.G.G.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, 54: 553-558.

Machado, R.J.A.; Monteiro, N.K.V.; Migliolo, L.; Silva, O.N.; Pinto, M.F.S.; Oliveira, A.S.; Franco, O.L.; Kiyota, S.; Bemquerer, M.P.; Uchoa, A.F.; Morais, A.H.A.; Santos, E.A. 2013b. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. *Plos One*, 8(5): 1-14.

Machado, S.W.; Oliveira, C.F.R.; Bezerra, C.S.; Freire, M.G.M.; Kill, M.R.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2013a. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and Insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 2469-2478.

Maqtari, M.A.; Saad, A.B.M. 2010. Screening and purification of a chymotrypsin inhibitor from *Enterolobium saman* seeds. *Journal for Science*, 15: 19-29.

Morrison, J.F. 1982. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends in Biochemical Science*, 7: 102-105.

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(5): 1245-1252.

Odani, S.; Koide, T.; Ono, T. 1986. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. *The Journal of Biochemistry*, 100(4): 975-983.

Oliva, M.L.V.; Silva, M.C.C.; Sallai, R.C.; Brito, M.V.; Sampaio, M.U. 2010. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*, 92: 1667-1673.

Oliveira, A.S.; Migliolo, L.; Aquino, R.O.; Ribeiro, J.K.C.; Macedo, L.L.P.; Andrade, L.B.S.; Bemquerer, M.P.; Santos, E.A.; Kiyota, S.; Sales, M.P. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 858-865.

Oliveira, C.F.R. 2011. *Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de Entada acaciifolia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas/ Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 111pp.

Oliveira, C.F.R.; Vasconcelos, I.M.; Aparicio, R.; Freire, M.G.M.; Baldasso, P.A.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R.M. 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochemistry*, 47: 929-935.

Osman, M.A.; Reid, P.M.; Weber, C.W. 2002. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry*, 78: 419-423.

Rawlings, N.D.; Morton, F.R.; Kok, C.Y.; Kong, J.; Barret, A.J. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36: 320-325.

Ribeiro, S.F.F.; Fernandes, K.V.S.; Santos, I.S.; Taveira, G.B.; Carvalho, A.O.; Lopes, J.L.S.; Beltramini, L.M.; Rodrigues, R.; Vasconcelos, I.M.; Cunha, M.; Souza-Filho, G.A.; Gomes, V.M. 2013. New small proteinase inhibitors from *Capsicum annum* seeds: characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. *Peptide Science*, 100(2): 132-140.

Rocco, M.; Malorni, L.; Chambery, A.; Poerio, E.; Parente, A.; Di Maro, A. 2011. A Bowman-Birk inhibitor with anti-elastase activity from *Lathyrus sativus* L. seeds. *Molecular Biosystems*, 7: 2500-2507.

Rufino, F.P.S.; Pedroso, V.M.A.; Araujo, J.N.; França, A.F.J.; Rabêlo, L.M.A.; Migliolo, L.; Kiyota, S.; Santos, E.A.; Franco, O.L.; Oliveira, A.S. 2013. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 70-76.

Sabotic, J.; Kos, J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 1352-1375.

Scarafoni, A.; Consonni, A.; Galbusera, V.; Negri, A.; Tedeschi, G.; Rasmussen, P.; Magni, C.; Duranti, M. 2008. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry*, 69: 1820-1825.

Sharma, P.; Nath, A.K.; Kumari, R.; Bhardwaj, S.V. 2012. Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from *Albizia lebbeck* seeds. *Journal of Forestry Research*, 23(1): 131-137.

Silva, W.; Freire, M.G.M.; Parra, J.R.P.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2012. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. *Process Biochemistry*, 47: 257-263.

Souza, L.A.G. 2012. *Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro*. FINEP, Manaus, AM. 118p.

Sun, J.; Wang, H.; Ng, T.B. 2010. Trypsin isoinhibitors with antiproliferative activity toward leukemia cells from *Phaseolus vulgaris* cv “white cloud bean”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010:1-8.

Valueva, T.A.; Mosolov, M.M. 1999. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46 (3): 307-321.

Yoshizaki, L.; Troncoso, M.F.; Lopes, J.L.S.; Hellman, U.; Beltramini, L.M.; Wolfenstein-Todel, C. 2007. *Calliandra selloi* Macbride trypsin inhibitor: Isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. *Phytochemistry*, 68: 2625-2634.

5. Conclusão Geral

Inibidores de serino e cisteínoproteases devem participar da regulação da atividade de enzimas proteolíticas durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *P. multijuga*, alterando a concentração dessas proteases ao longo do processo.

Inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk (PmTI1 e PmTI2) encontrados em todo o processo de germinação e durante os eventos pré e pós-germinativos, foram caracterizados estruturalmente por apresentarem alta estabilidade à temperaturas elevadas e à variações de pH.

A atividade de proteases em sementes de *P. multijuga* parece mais efetiva nos eventos pós-germinativos, sugerindo a participação dessas enzimas na mobilização de proteínas.

Este estudo consiste em um dos primeiros relatos envolvendo a purificação de inibidores de tripsina em sementes do gênero *Parkia*, e fornece informações importantes para o uso potencial dessa espécie no que diz respeito à obtenção de biomoléculas ativas.

ANEXOS

Ata da comissão examinadora da aula de qualificação:



DIVISÃO DOS
CURSOS DE
PÓS-GRADUAÇÃO

AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER

Aluno(a): **LARISSA RAMOS CHEVREUIL**

Curso: BOTÂNICA

Nível: Doutorado

Orientador(a): José Francisco de Carvalho Gonçalves (INPA)

Título:

**"METABOLISMO DE INIBIDORES DE PROTEINASES DURANTE A GERMINAÇÃO:
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE SEMENTES DE
ESPÉCIES DO GÊNERO PARKIA"**

BANCA JULGADORA:

TITULARES:

LEONARDO DE AZEVEDO CALDERON (UNIR)
IZA MARINEVES ALMEIDA DA ROCHA (UFAM)
DOUGLAS A. STEINMACHER (INSTITUTO BIOMÁTICA-SP)
ISOLDE DOROTHEA KOSSMAN FERRAZ (INPA)
PAULA CRISTINA DA SILVA ÂNGELO (EMBRAPA)

SUPLENTE:

EDMAR VAZ DE ANDRADE (INPA)
MARIA DA GLÓRIA G. DE MELO (UEA)

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
LEONARDO DE AZEVEDO CALDERON	(X) Aprovado () Reprovado	
IZA MARINEVES ALMEIDA DA ROCHA	(X) Aprovado () Reprovado	
MARIA DA GLÓRIA G. DE MELO	(X) Aprovado () Reprovado	
ISOLDE DOROTHEA KOSSMAN	(X) Aprovado () Reprovado	
PAULA CRISTINA DA SILVA ÂNGELO	(X) Aprovado () Reprovado	

Manaus (AM), 01 de março de 2012.

OBS: *A aluna apresentou em 38 minutos a aula de qualificação e respondeu com propriedade as questões propostas pela banca demonstrando domínio do tema. A banca aprovou o título empregando as competências.*

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Av. André Araújo, 2936 - Bairro: Aleixo - Caixa Postal: 478 - CEP: 69.060-001, Manaus/AM.
Fone: (+55) 92 3643-3119
site: <http://pg.inpa.gov.br>

Fax: (+55) 92 3643-3119
e-mail: curso@inpa.gov.br

Ata da comissão examinadora da defesa pública:



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Aos vinte oito dias do mês de novembro 2013, às 09h00min, no mini auditório da diretoria do INPA, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: **Dra. Célia Regina R. da Silva Carlini**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Dr. Paulo Mazzafera**, da Universidade Estadual de Campinas, **Dr. Paulo Henrique P. Peixoto**, da Universidade Federal de Juiz de Fora, **Dra. Martha Maria Passador**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA e **Dr. Marcio Viana Ramos** da Universidade Federal do Ceará, tendo como suplente o Dr. Andreimar Martins Soares da Fio Cruz/ RD e Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **TESE DOUTORADO** da discente **LARISSA RAMOS CHEVREUIL**, intitulada "PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE DE PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES DURANTE A GERMINAÇÃO E EM EVENTOS PRÉ E PÓS-GERMINATIVOS DE SEMENTES DE *PARKIA MULTIJUGA*" sob a orientação Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves e co-orientação Dr. Leonardo de Azevedo Calderon.

Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, o (a) discente foi argüido (a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
CÉLIA REGINA R. DA SILVA CARLINI	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado
LUIZ AUGUSTO GOMES DE SOUZA	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado
PAULO HENRIQUE P. PEIXOTO	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado
MARTHA MARIA PASSADOR	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado
MÁRCIO VIANA RAMOS	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado

OBS:

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador Substituto do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 272/2012 DCB/INPA