

DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES EM SEMENTES DE *Punica granatum*

Lara Franca Colares^{a,*}, Antero Ricardo Santos Neto^a, Isac Henrique Cordeiro^a, Sandra Bertelli Ribeiro de Castro^b, Rodrigo Moreira Verly^c, Caio Cesar de Souza Alves^d e Alessandra de Paula Carli^a

^aInstituto de Ciências, Engenharia e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39803-371 Teófilo Otoni – MG, Brasil

^bDepartamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 35010-177 Governador Valadares – MG, Brasil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39100-000 Diamantina – MG, Brasil

^dFaculdade de Medicina do Mucuri, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39803-371 Teófilo Otoni – MG, Brasil

Recebido em 25/07/2016; aceito em 31/10/2016; publicado na web em 21/11/2016

DETECTION OF PROTEASE INHIBITORS IN SEEDS OF *Punica granatum*. The use of plants as a way to prevent and treat disease comes from ancient times. With the increasing return on consumption of plants for medicinal purposes, the plant-based medicines have gained greater appreciation. Protease inhibitors are compounds that can decrease activity of an enzyme. They are found in plants, especially in Fabaceae, Poaceae, and Solanaceae families, and show satisfactory use to treat diseases due to their regulatory activities and selective proteolytic degradation of target substrates. This study aimed to obtain protease inhibitors in the seeds of *Punica granatum*, due its use in traditional medicine. The alcohol-acid solution was used to extract and isolate the protease inhibitors in *P. granatum* seeds and *Glycine max* grains. The extract of *P. granatum* seeds showed similar concentration of protease inhibitors when compared to *G. max*. A 14 kDa band was detected by electrophoresis on polyacrylamide gel, which was characterized by high-performance liquid chromatography as protease inhibitors. The extract of *P. granatum* seeds showed a potent trypsin inhibitor activity (EC₅₀ 18.2 ng mL⁻¹). This study showed for the first time the extraction, purification, and identification of protease inhibitors in *Punica granatum* seeds.

Keywords: protease inhibitors; *Punica granatum* seeds; traditional medicine.

INTRODUÇÃO

As plantas biossintetizam substâncias, conhecidas como metabólitos secundários, que desempenham importantes atividades biológicas na adaptação e na propagação das espécies vegetais.¹ Assim como os metabólitos secundários, os inibidores de proteases estão presentes em plantas e são encontrados principalmente em leguminosas em geral, das famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae.^{2,3} Os inibidores de proteases apresentam diferentes funções como: proteína de reserva, agente regulador de proteases endógenas, proteção dos fluídos e tecidos da degradação pela atividade proteolítica,⁴ além da defesa direta ou indireta contra os ataques de insetos e infecções por patógenos.⁵

Por terem a capacidade de diminuir a atividade de uma enzima, os inibidores de proteases podem ser enquadrados em três grupos diferentes, levando em consideração suas especificidades: inibidores que reagem com mais de uma classe de proteases, os que são específicos para uma das classes e aqueles que apresentam alta especificidade para uma única protease.⁶ Quando se analisa a estrutura, estes podem ser classificados em grupos que apresentam baixo peso molecular e grupos dos inibidores peptídicos com uma ou mais cadeias polipeptídicas. Existe ainda a classificação de acordo com o tipo de protease que inibem: serino, aspartato, treonino, cisteíno e metalo-proteases.⁷

As serino-proteases possuem seus inibidores subdivididos em 16 classes, entretanto, destacam-se: os inibidores de tripsina do tipo Kunitz, os inibidores de Bowman-Birk (BBI) e os inibidores presentes na batata do tipo I e II.⁸

Pesquisas têm demonstrado a utilização de inibidores de proteases no tratamento de enfermidades devido suas funções de regulação

de diferentes processos em que as proteases estão envolvidas, que englobam a quebra de proteínas intracelulares, transcrição, ciclo celular, invasão celular e apoptose, através da degradação seletiva de substratos alvo.^{4,9}

A *Punica granatum* é árvore de pequeno porte oriunda da África boreal, facilmente cultivada nas regiões quentes e temperadas do mundo inteiro, que pertence à família Lythraceae (antiga Punicaceae) e apresenta taninos, alcaloides, amido, ácido gálico, vitaminas B2, C e D, magnésio e ferro em seus constituintes.¹⁰ Apesar dos inibidores de proteases serem tradicionalmente encontrados em leguminosas, a *P. granatum* foi selecionada para se avaliar a capacidade de obtenção de inibidores de proteases, nunca encontrados nas sementes dessa espécie vegetal, visto a sua utilização na medicina tradicional.

PARTE EXPERIMENTAL

Purificação de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*

Os frutos, para separação das sementes de *P. granatum*, foram coletados no município de Araçuaí-MG em outubro e novembro de 2015. O grão de *Glycine max* foi adquirido no comércio local de Teófilo Otoni-MG. A extração proteica na *G. max* foi realizada como medida padrão de comparação para inibidores de proteases, seguindo a metodologia proposta por Yavelow e seus colaboradores,¹¹ a qual foi adaptada para as sementes de *P. granatum*.

Para a extração, 100 g das sementes foram trituradas. Após a trituração foi acrescentado 10% p/v de etanol a 60% e mantido por 1 h a 55 °C com agitação constante e, em seguida, foi resfriado rapidamente em banho de gelo e disposto em repouso por 24 horas a 4 °C. O material oriundo desse tratamento foi submetido à centrifugação

*e-mail: laraf_colares@hotmail.com

a 6.500 × g, por 30 min a 4 °C para remoção de fibras insolúveis presentes. A mistura foi então filtrada em gaze e acidificada com HCl até atingir pH 5,3. Procedeu-se a precipitação dos inibidores de proteases, com a adição de volumes crescentes de Acetona P.A. (-20 °C), mantido em banho de gelo. O extrato enriquecido obtido foi submetido à centrifugação a 6.500 × g por 30 min. O precipitado foi suspenso em 5 mL de água destilada e armazenado a -80 °C para posterior análise.

Espectrofotometria do extrato enriquecido de inibidores de proteases

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford¹² e a análise foi realizada no espectrofotômetro AJX-6100PC (Espectrofotômetro Duplo Feixe, MICRONAL) no comprimento de onda 595 nanômetros (nm). Os dados foram gerados pelo *software* UV-Vis Analyst versão 5.3. Após este procedimento, os extratos enriquecidos de sementes de *P. granatum* e grãos de *G. max* foram diluídos em água destilada (100x) e submetidos à varredura de comprimento de onda entre 199 e 700 nm (UV-Vis Cary 50, Varian). Os dados foram gerados pelo *software* Scan versão 3.0 e analisados pelo programa OriginPro versão 8.0.

Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS: Detecção dos inibidores de proteases

As amostras provenientes da purificação foram submetidas à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% SDS-PAGE. Foi usado o padrão de peso molecular de 10 a 250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). A coloração foi realizada com *Coomassie Blue* R-250 a 0,025% em metanol 25% e 5% de ácido acético, em agitação branda de 2 horas. Em seguida os géis foram descorados em solução de 40% metanol e 10% ácido acético até a visualização plena das bandas.

Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos enriquecidos de inibidores de proteases

As amostras dos sobrenadantes dos extratos enriquecidos de *P. granatum* e *G. max* foram diluídas em água destilada (1:10). 20 µL desta diluição foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) (Supelcosi, Sigma-Aldrich) em sistema de HPLC (ProStar, Varian) sob um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ durante 45 minutos e os dados analisados no programa Origin.

Potencial Zeta do extrato enriquecido de inibidores de proteases

As amostras para determinação do potencial Zeta dos inibidores de proteases foram preparadas a partir da diluição de 10 vezes do sobrenadante do extrato enriquecido da *P. granatum* em água destilada, e medida por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer Nano – ZS, Malvern) no *software* Zetasizer versão 7.11.

Atividade inibitória anti-tripsina

O substrato utilizado foi o cloridrato de N-α-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (DL-BAPNA), preparado dissolvendo 196 mg do composto em 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) para uma concentração final de 9 × 10⁻² mol L⁻¹. Esta solução foi mantida no congelador como solução estoque e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ contendo MgCl₂, 20 mmol L⁻¹ e pH 8,1 para a concentração de 9 × 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Para obter uma concentração que inibe entre 50% da atividade da tripsina, foram realizadas diluições seriadas do inibidor. A cada tubo de ensaio se adicionou-se 200 µL de DL-BAPNA, 20 µL de tripsina (0,05 mg mL⁻¹) e 20 µL do inibidor. Nos tubos brancos foram adicionados 200 µL de substrato e 40 µL de água, enquanto que os tubos controles de atividade enzimática continuaram com 200 µL de substrato, 20 µL de enzima e 20 µL de água.

Os tubos de reação passaram por agitação em vórtex e foram posteriormente incubados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi interrompida com 40 µL de ácido acético 60% v/v e adicionado 250 µL de água destilada. A quantificação da atividade inibitória ocorreu em espectrofotômetro AJX-6100PC (Espectrofotômetro Duplo Feixe, MICRONAL) no comprimento de onda 410 nanômetros (nm). Os dados foram gerados pelo *software* UV-Vis Analyst versão 5.3.

A concentração do extrato enriquecido a base de sementes de *P. granatum* que induz metade do efeito máximo (EC50) foi calculada através da análise da regressão não-linear da curva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Punica granatum* apresenta quantidade de proteínas semelhante à *Glycine max

O extrato enriquecido a base de sementes de *P. granatum* teve uma concentração de proteínas semelhante à obtida na *G. max* grão (Figura 1).

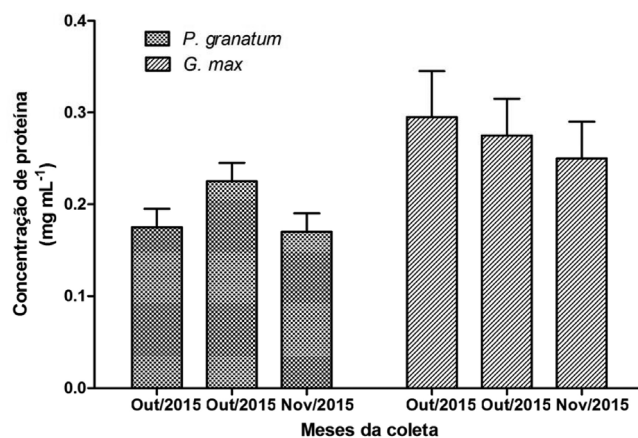


Figura 1. Quantificação de inibidores de proteases do extrato enriquecido de sementes de *Punica granatum* e de *Glycine max*. Os extratos enriquecidos de sementes de *P. granatum* e a base de *G. max* grão, obtidos de extrações em diferentes datas foram detectadas pelo método de Bradford (1976) a uma absorbância de 595 nm. Barras=média±desv.padrão

A metodologia para extração proteica proposta por Yavelow e seus colaboradores¹¹ foi empregada pela primeira vez em sementes de *P. granatum* para isolamento e purificação de inibidores de proteases.

Intensidade de absorbância para inibidores de proteases em *Punica granatum*

O espectro de absorção mostrou para cada espécie dois picos para inibidores de proteases. O extrato enriquecido de *P. granatum* teve seus picos em 212 nm e 268 nm e o extrato de *G. max* apresenta seus picos em 235 nm e 268 nm (Figura 2).

Os picos identificados na *P. granatum* podem ser caracterizados como inibidores de proteases de acordo com o demonstrado por Leal¹³ e Clemente e colaboradores¹⁴ em seus estudos com extratos de *G.*

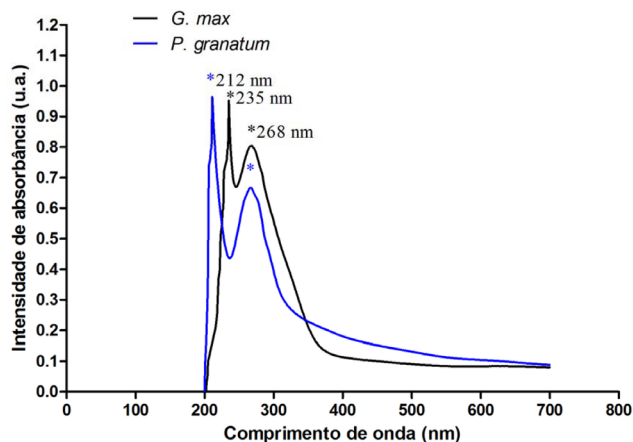


Figura 2. Espectro de absorção molecular de inibidores de proteases dos extratos enriquecidos a base de sementes de *Punica granatum* (—) e grãos de *Glycine max* (—). As amostras apresentaram curvas analíticas de absorção em 212 nm para *P. granatum*, 235 nm para *G. max* e 268 nm para ambos os extratos, sendo monitorados de 199 a 700 nm. A varredura foi realizada com as amostras diluídas em água destilada e a temperatura ambiente

max, que observaram picos de intensidade de absorbância.

Os valores diferentes podem ser referentes à absorção dos dois sítios ativos dos inibidores de proteases, podendo ser a absorção em 268 nm referente à quimotripsina que, como demonstrado por estudos de Apura e colaboradores,¹⁵ está bem próxima da absorbância em UV de 250 nm da α -quimotripsina, isso devido sua constituição por vários aminoácidos aromáticos, e, quanto à absorção em 212 nm para o extrato de semente de *P. granatum*, a mesma se refere à absorbância da tripsina.

Deteção de inibidores de proteases em *Punica granatum* por eletroforese

O gel de poliacrilamida identificou a presença de uma banda de inibidor de proteases na altura de 14 kDa (Figura 3). Uma banda com o mesmo peso molecular foi encontrada no extrato a base de *Glycine max* grão, utilizado como padrão de comparação. Em *G. max* também foram detectadas bandas nas alturas de 17, 21 e 30 kDa aproximadamente.

Estudos com a leguminosa da espécie *Vigna* sp. têm demonstrado o peso molecular dos inibidores de proteases de tripsina e do tipo Bowman-Birk (BBI) como sendo de 10-16 kDa,^{16,17} podendo essa banda representar a forma do dímero do inibidor, comportamento recorrente em inibidores BBI encontrado em várias leguminosas.¹⁸ Desta forma, no presente trabalho, a banda de 14 kDa pode ser considerada como sendo um dímero de inibidor de quimotripsina e tripsina.

A presença de diversas massas moleculares proteicas na preparação do extrato a base de *G. max* grão é justificável pelo fato da mesma possuir ampla distribuição de inibidores de proteases do tipo Kunitz e lectinas em suas sementes, que apresentam massas moleculares em torno de 21-22 e 30-35 kDa,¹⁹ respectivamente, sugerindo, assim, que as demais bandas aparentes no perfil eletroforético sejam das mesmas.

Diante disso, o extrato enriquecido de sementes de *P. granatum* demonstrou por meio do perfil eletroforético a presença de inibidor de proteases detectado pela absorbância apresentada no espectro e absorção (Figura 2).

A intensidade da curva analítica de absorção do extrato de *P. granatum* relativamente semelhante com a da *G. max* grão pode estar relacionada com a concentração de inibidores de proteases presente nos extratos, como demonstrado por meio das bandas aparentes no gel de poliacrilamida.

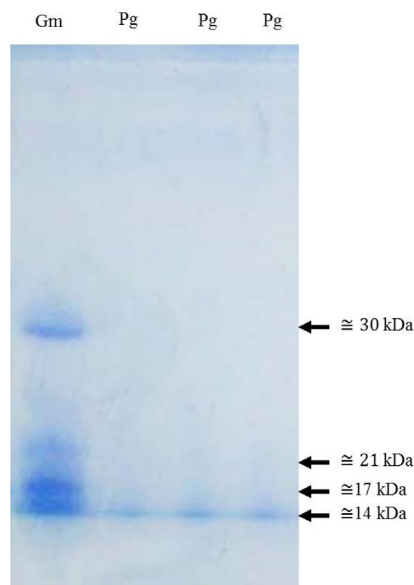


Figura 3. Perfil eletroforético (12% SDS-PAGE) do extrato enriquecido a base de sementes de *Punica granatum*. Legenda: Gm: extrato a base de *Glycine max* grão (padrão de inibidores de proteases). Pg: extrato a base de sementes de *P. granatum*. Foi aplicado em cada poço, 20 μ l de amostra. Gel corado com Coomassie Blue R-250. Seta= peso molecular aproximado das bandas (kDa)

Perfil cromatográfico igual para a *Punica granatum* e a *Glycine max* para presença de inibidores de proteases

O cromatograma detectou para ambos os extratos dois picos simétricos com tempos de retenção em 12 e 13 minutos, e outros dois picos em 28 e 40 minutos com intensidades diferentes (Figura 4).

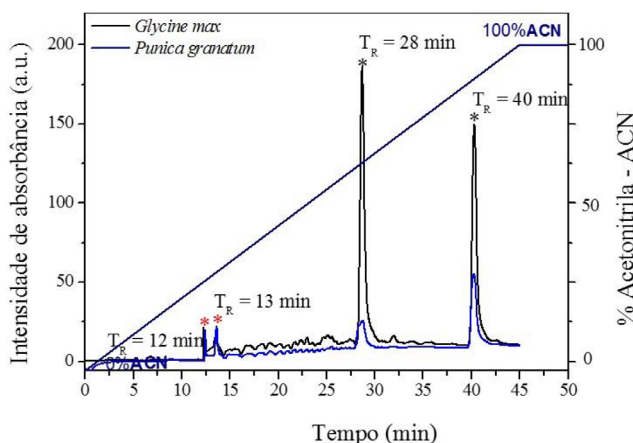


Figura 4. Perfil cromatográfico em HPLC obtido da leitura da amostra do extrato enriquecido a base de sementes de *Punica granatum* e *Glycine max* grão. Condições cromatográficas: Coluna utilizada LC₁₈ (25 cm x 4,6 mm) Supelcosil, 2,2 mL. Fase Móvel: A: H₂O + TFA 0,1%; B: ACN + TFA 0,08%. Eluição por gradiente: 0 a 100% B em 45 min; fluxo: 0,8 mL min⁻¹. *Picos de absorção de inibidores de proteases de interesse

Os dois primeiros picos de retenção (12 e 13 minutos) possivelmente representam na *G. max* os inibidores de proteases da família Bowman-Birk (BBI),^{13,20} e são os mesmos referentes ao dímero do inibidor de proteases detectados no gel de poliacrilamida em 14 kDa. O fato de aparecerem dois picos no cromatograma referentes a apenas uma banda de inibidor de proteases no gel, pode estar relacionado com a não divisão do dímero em duas isoformas, comportamento recorrente para inibidores de proteases.¹⁸

O cromatograma apresentou, ainda, outros dois picos em tempos de retenção de 28 e 40 minutos, que supostamente representam alguma proteína que não foi detectada no extrato de *P. granatum* pelo gel de poliacrilamida, devido a sua baixa sensibilidade comparada ao sistema de HPLC para detecção de partículas, ou possível falha no processo de coloração do gel.

Já para o extrato de *G. max* os picos nos tempos de retenção de 28 e 40 minutos tiveram uma maior intensidade e simetria, podendo ser a representação das outras bandas aparentes no gel, uma vez que a *G. max* possui ampla distribuição de inibidores de proteases do tipo Kunitz e das lectinas em suas sementes, que apresentam massas moleculares em torno de 21-22 e 30-35 kDa, respectivamente.¹⁹

Sendo assim, tendo o perfil cromatográfico do extrato de grãos de *G. max* como padrão de comparação, pode-se supor que os tempos de retenção de 12 e 13 minutos são referentes à presença de inibidores de proteases do tipo BBI. Os demais picos em 20 e 48 minutos, assim como descrito para as leguminosas, nos extratos de *P. granatum* e *G. max*, possivelmente são relativos aos inibidores de proteases do tipo Kunitz e lectina.

No que se refere à afinidade com a coluna, os dois primeiros picos de ambos os extratos enriquecidos tiveram uma hidrofobicidade de 40 e 43,3%, referentes aos tempos de retenção de 12 e 13 minutos respectivamente, o que pode confirmar que essas proteínas detectadas são relativamente hidrofílicas e detentoras de baixo peso molecular, característica de inibidores de proteases do tipo BBI.⁹

Distribuição do potencial Zeta dos inibidores de proteases

Conforme demonstrado na Tabela 1, a amostra do extrato de *Punica granatum* obteve um valor negativo como o esperado para proteínas.

Tabela 1. Potencial Zeta e das partículas dos inibidores de proteases

	Potencial Zeta ζ (mV)
<i>Punica granatum</i>	-22,9

Considerando que a concentração de proteínas exerce um aumento no valor do potencial Zeta, indicando assim a formação de partículas com maior densidade de carga superficial,²¹ o extrato de sementes de *P. granatum* mostrou uma concentração significativa de inibidores de proteases.

Atividade anti-tripsina

Para a caracterização dos inibidores obtidos no gel de poliacrilamida e no HPLC foi realizada a atividade anti-tripsina do extrato enriquecido a base de sementes de *P. granatum*. O extrato apresentou uma potente ação inibitória da atividade da tripsina (Figura 5). A inibição de 50% da atividade da tripsina (EC50) foi alcançada na concentração de $1,82 \times 10^{-5}$ mg mL⁻¹.

O inibidor do tipo BBI, que apresenta banda característica entre 10 e 17 kDa e com picos de tempo de retenção aos 12 e 13 minutos no HPLC, é descrito como um potente redutor da atividade da tripsina,⁹ sugerindo que o produto obtido no extrato enriquecido das sementes de *P. granatum* seja do tipo BBI. Novos estudos devem ser realizados para a caracterização dos picos com tempo de retenção em 28 e 40 min encontrados no HPLC.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a detecção e purificação de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*.

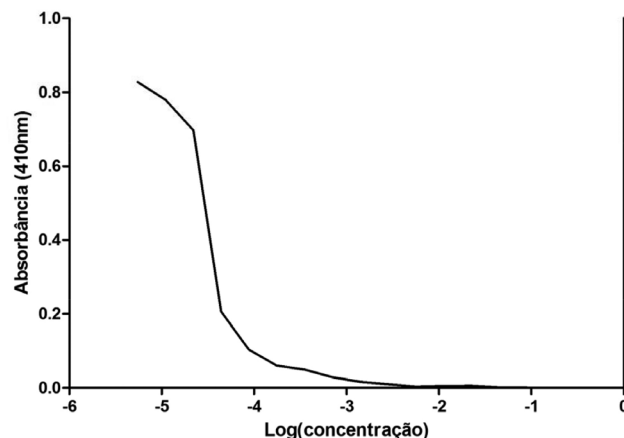


Figura 5. Atividade anti-tripsina do extrato enriquecido a base de sementes de *Punica granatum*. 20 μ L de diluições seriadas do inibidor foram adicionadas a cada tubo de ensaio que continha 200 μ L de DL-BAPNA (*N*- α -benzoyl-DL-arginil-*p*-nitroanilida) e 20 μ L de tripsina (0,05 mg mL⁻¹). A quantificação da atividade inibitória foi analisada em 410 nm. A EC50 foi calculada através da análise da regressão não-linear da curva

A caracterização do inibidor de protease da família Bowman-Birk em sementes de *Punica granatum* foi comprovada por meio do gel de poliacrilamida com a detecção da presença de bandas, dos perfis cromatográficos em HPLC e da atividade enzimática característicos deste inibidor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LASEB - Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM / Campus JK e ao PPGTAS – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da UFVJM / Campus Mucuri pelo apoio ao desenvolvimento desse estudo.

REFERÊNCIAS

- Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, 2ª ed., John Wiley & Sons: England, 2002.
- Hammond, R. W.; Foard, D. E.; Larkins, B. A.; *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 9883.
- Baek, J. M.; Song, J. C.; Choi, Y. D.; Kim, S. I.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1994**, 58, 843.
- Ryan, C. A.; *Annu. Rev. Phytopathol.* **1990**, 28, 425; Richardson, M.; *Methods Plant Biochem.* **1991**, 5, 259; Walker, A. J.; Ford, L.; Majerus, M. E. N.; Geoghegan, A. E.; Birch, N.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R.; *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 28, 173.
- Carlini, C. R.; Grossi-de-Sa, M. F.; *Toxicon* **2002**, 40, 1515; Lawrence, P. K.; Koundal, K. R.; *Electron. J. Biotechnol.* **2002**, 5, 93.
- Tremacoldi, C. R.; *Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas*, 1ª ed. Versão Eletrônica, Embrapa Amazônia Oriental: Belém, 2009.
- Power, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. C.; James, K. E.; *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4639.
- Ryan, C. A.; *Annu. Rev. Phytopathol.* **1990**, 28, 425.
- Touil, T.; Ciric, B.; Ventur, E.; Shindler, K.; S.; Gran, B.; Rostami, A.; *J. Neurol. Sci.* **2008**, 271, 191; Clardy, J.; Walsh, C.; *Nature* **2004**, 432, 829.
- Grandi, T. S. M.; *Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas*, 1ª ed., Adaequatio Estúdio: Belo Horizonte, 2014.
- Yavelow, J.; Collins, M.; Birk, Y.; Troll, W.; Kennedy, A. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, 82, 5395.

12. Bradford, M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
13. Leal, S. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil, 2010.
14. Clemente, A.; Moreno, F. M.; Manzone, M. Del C. M.; Jimenez, E.; Domoney, C.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 396.
15. Apura, J.; Mendes, M.; Uva, M.; *Instituto Superior Técnico* **2012**, 14.
16. Kumar, K.; Kansal, R.; Subrahmanyam, B.; Koundal, K. R.; Miglani, K.; Gupta, V. K.; *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 1887.
17. Sammour, R. H. A.; *Turk. J. Biol.* **2006**, *30*, 207.
18. Bergeron, D.; Nielsen, S. S.; *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1544; Fields, C.; Mallee, P.; Muzard, J.; Lee, G. U.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 1831.
19. Song, H. K.; Suh, S. W.; *J. Mol. Biol.* **1998**, *275*, 347; Sharon, N.; Lis, H.; *FASEB J.* **1990**, *4*, 3198.
20. Gariani, T.; Leatherbarrow, R. J.; *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 467.
21. Fayad, S. J.; Ramos, B. G. Z.; Soldi, V.; Minatti, E.; *Quim. Nova* **2015**, *38*, 91.