



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inibidores de Proteinases Aspárticas com Actividade Antimicrobiana

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra).

Sara de Almeida Handem

2013

Agradecimentos

À Professora Doutora Paula Veríssimo, agradeço profundamente por toda a orientação, paciência, disponibilidade, incentivo, boa disposição e por tudo o que me ensinou e que aprendi com *munto* gosto.

Ao Professora Doutor Euclides Pires, agradeço a oportunidade de desenvolver a minha dissertação de mestrado no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

A todos aqueles que partilharam comigo o Laboratório de Biotecnologia Molecular, principalmente ao Denis, à Sofy, ao Bruno e à Ana. Um *munto* obrigado por não terem sido simples colegas de trabalho, mas uma pequena família, sempre unida e feliz.

Ao Pedro, não só pelo apoio como grande amigo que és, mas principalmente por toda a paciência e disponibilidade para me ensinar *todas aquelas coisas esquisitas* sobre microrganismos. Sem ti, essa parte do trabalho não teria sido possível.

Ao Codessinho, um super obrigado por me salvares a vida ao emprestar-me um portátil para escrever esta dissertação. Sempre ouvi dizer que os melhores amigos se veem nas horas boas e, principalmente, nas horas más.

A todos os meus amigos de sempre e para sempre: Mariana, Ana Cristina, Carlos, Paulo, Luís Miguel, Cláudia, Gonçalo, André, manas Marisa e Diana, Inês e Abacaxi. Um muito obrigado por todos os momentos e mais alguns.

Ao Denis, por tudo e mais alguma coisa. Tu sabes...

Às Avós e aos Tios, um muito obrigado por todo o apoio, carinho e força ao longo deste percurso que foi Coimbra.

À Cláudia, a caçula da família, por ser a melhor irmã do mundo. Porque um dia vamos fazer tudo aquilo que sonhámos e planeámos, porque vivemos Coimbra juntas. Obrigado por seres como és.

E, finalmente, à minha Mãe e ao meu Pai, por todo o amor e carinho incondicionais, força e incentivo, paciência, compreensão e união. Obrigado por fazerem de mim aquilo que sou hoje e por me deixarem percorrer o meu caminho... e por, um dia, terem escrito na minha *Moleskine*:

“Em questões de Ciência, a autoridade de milhares não vale o humilde raciocínio de um único indivíduo”, foi isto que disse Galileu, e outro houve, bioquímico, que é da opinião que “descobrir consiste em ver o que toda a gente viu, mas pensar o que ninguém pensou”.

Índice

Abreviaturas	VII
Resumo	XI
Abstract	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteases	3
1.1.1 Proteinases aspárticas	5
1.2 Inibidores de proteinases	9
1.2.1 Classificação dos inibidores de proteinases	10
1.2.2 Inibidores proteicos de proteinases aspárticas	11
1.2.3 Inibidores não-proteicos de proteinases aspárticas	18
1.3 Peptídeos antimicrobianos.....	19
1.3.1 Inibidores de proteinases com actividade antimicrobiana	20
1.4 Aplicações biológicas.....	21
1.5 <i>Cynara cardunculus</i> L.....	22
1.6 Objectivos do trabalho	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Material biológico.....	27
2.2 Preparação do extracto total de sementes de <i>C. cardunculus</i> L.....	27
2.3 Tratamento térmico do extracto total de sementes de <i>C. cardunculus</i> L.	27
2.4 Análise do conteúdo proteico	28
2.4.1 Quantificação proteica	28
2.4.2 Electroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	28
2.4.2.1 Revelação com Coomassie Brilliant Blue R-250	29
2.4.2.2 Revelação com Nitrato de prata.....	29

2.5	Análise da actividade proteolítica	30
2.5.1	Zimografia	30
2.5.2	Zimografia reversa	30
2.5.3	Ensaio enzimáticos	31
2.5.4	Ensaio de inibição enzimática	32
2.6	Purificação e caracterização do extracto desnaturado de sementes de <i>C. cardunculus</i> L.	33
2.6.1	Cromatografia de exclusão molecular	33
2.6.2	Cromatografia de fase reversaZimografia reversa	34
2.6.3	Cromatografia bidimensional de camada fina	35
2.6.3.1	Revelação dos cromatogramas	36
2.6.3.2	Extração de fracções lipídicas.....	37
2.7	Ensaio antimicrobianos.....	37
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	Extração da actividade inibitória de sementes de <i>C. cardunculus</i> L.....	41
3.2	Análise do conteúdo proteico dos extractos de sementes.....	43
3.3	Análise da actividade proteolítica dos extractos de sementes.....	44
3.4	Purificação das fracções inibitórias do extracto de sementes.....	48
3.5	Caracterização das fracções inibitórias do extracto de sementes	55
3.6	Avaliação da actividade antimicrobiana das fracções inibitórias do extracto de sementes	62
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
	Referências Bibliográficas	69

Abreviaturas

ASG	Esteril-glucosídeo acilado
BACE	β -secretase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CER	Cerebrosídeo
CFR	Cromatografia de fase reversa
DGDG	Digalactosildiácilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	2,4-Dinitrofenil
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EC	Número de identificação das enzimas (<i>Enzyme <u>c</u>omission number</i>)
FPLC	Cromatografia líquida a pressão moderada (<i>Fast <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de elevada pressão (<i>High <u>p</u>erformance <u>l</u>iquid <u>c</u>hromatography</i>)
IA ₃	Inibidor endógeno da proteinase A vacuolar de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Inhibitor <u>A</u>₃</i>)
IP	Inibidor de proteinase
K _i	Constante de inibição
LC-MS	Cromatografia líquida-espectrometria de massa
MGDG	Monogalactosildiácilglicerol
MOCA	<i>7-Methoxycoumaryl-4-yl-acetyl</i>
NA	Meio de cultura sólido <i>Nutrient Agar</i>

NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
PA	Proteinase aspártica
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PDI	Inibidor da catepsina D (<i><u>P</u>otato <u>c</u>athepsin <u>D</u> <u>i</u>nhibitor</i>)
PI-3	Inibidor-3 da pepsina (<i><u>P</u>epsin <u>i</u>nhibitor-<u>3</u></i>)
PM	Peso molecular
PVP	Polivinilpirrolidona
RFU	Unidade de fluorescência relativa
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SG	Esteril-glucosídeo
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SQAPI	Inibidor de proteinases aspárticas (<i><u>S</u>quash <u>a</u>spartic <u>p</u>roteinase <u>i</u>nhibitor</i>)
SQD	Sulfoquinovosildiilglicerol
STI	Inibidor de tripsina (<i><u>S</u>oybean <u>T</u>rypsin <u>I</u>nhibitor</i>)
TLC	Cromatografia de camada fina (<i><u>T</u>hin-<u>l</u>ayer <u>c</u>hromatography</i>)
UV	Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
YNB	Meio de cultura sólido <i><u>Y</u>east <u>N</u>itrogen <u>B</u>ase</i>
YprA	Proteinase A vacuolar de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i><u>Y</u>east <u>P</u>roteinase <u>A</u></i>)
YPD	Meio de cultura sólido <i><u>Y</u>east <u>P</u>otato <u>D</u>extrose</i>

Abreviaturas de Aminoácidos			
Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Grupo químico
Aspartato	Asp	D	Polar ácido
Alanina	Ala	A	Não polar
Arginina	Arg	R	Polar básico
Asparagina	Asn	N	Polar neutro
Cisteína	Cys	C	Polar neutro
Fenilalanina	Phe	F	Não polar
Glicina	Gly	G	Polar neutro
Glutamato	Glu	E	Polar ácido
Glutamina	Glu	Q	Polar neutro
Histidina	His	H	Polar básico
Isoleucina	Ile	I	Não polar
Leucina	Leu	L	Não polar
Lisina	Lys	K	Polar básico
Metionina	Met	M	Não polar
Prolina	Pro	P	Não polar
Serina	Ser	S	Polar neutro
Statina	Sta	-	-
Treonina	Thr	T	Polar neutro
Triptofano	Trp	W	Não polar
Tirosina	Tyr	Y	Polar neutro
Valina	Val	V	Não polar

Resumo

Os inibidores de proteinases encontram-se amplamente distribuídos no reino das plantas, particularmente em sementes e outros órgãos de reserva. Apesar de existir uma vasta literatura sobre a ocorrência de inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas e metaloproteinases, há uma lacuna significativa na literatura sobre inibidores naturais de proteinases aspárticas. No entanto, as proteinases aspárticas são uma classe de enzimas que se encontra amplamente distribuída na natureza e tem sido implicada em vários processos fisiológicos e patológicos, como a hipertensão, a SIDA, a doença de Alzheimer e a infecção por microrganismos patogénicos. A raridade de inibidores naturais desta classe de proteinases pode ser devido ao facto de a maior parte das proteinases aspárticas ser sintetizada já numa forma inactiva (zimogénio) por si só, que é apenas clivada e activada quando necessário.

Assim sendo, o primeiro objectivo deste trabalho consistiu na identificação, purificação e caracterização de inibidores de proteinases aspárticas em extractos de sementes dormentes de *Cynara cardunculus* L. Para isso foi criada a melhor abordagem possível de extracção, seguida de análise do conteúdo proteico, por técnicas de PAGE, e da actividade proteolítica e inibitória dos extractos, por técnicas de zimografia e ensaios enzimáticos. Após detecção de actividade inibitória da pepsina nos extractos de sementes, procedeu-se à purificação das fracções inibitórias do extracto desnaturado, por cromatografia de exclusão molecular seguida de cromatografia de fase reversa. As fracções recolhidas foram analisadas para actividade inibitória da pepsina, sendo que as fracções da exclusão molecular inibiram significativamente a enzima, enquanto as fracções da fase reversa não apresentaram qualquer inibição. As fracções da exclusão molecular apresentaram também actividade inibitória contra outras proteinases aspárticas, como a quimosina e a cardosina A.

Em termos de conteúdo proteico, nenhuma das fracções apresentou bandas proteicas em SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE, indicando que as moléculas responsáveis pela inibição ou são péptidos pequenos, que não são detectados pelas técnicas de PAGE, ou são moléculas de natureza proteica.

De modo a caracterizar parte do conteúdo das fracções inibitórias, estas foram sujeitas a uma cromatografia bidimensional de camada fina, tendo-se detectado a presença de fracções lipídicas com características amino- e glicolípídicas. Estas foram isoladas e separadas por cromatografia de fase reversa, tendo-se obtido um perfil semelhante para ambas as fracções, o que indica que podemos estar na presença de moléculas glicolípídicas incorporadas com resíduos aminoácidos.

O segundo objectivo do trabalho consistiu na avaliação da capacidade antimicrobiana das fracções inibitórias purificadas do extracto desnaturado. Para isso foram realizados ensaios antimicrobianos, pelo método de difusão em discos, contra estirpes patogénicas de bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e de leveduras (*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os resultados obtidos mostraram uma actividade inibitória das fracções apenas contra *E.coli*.

Palavras-chave: sementes; *Cynara cardunculus* L.; proteinases aspárticas; Inibidores de proteinases aspárticas; actividade inibitória; actividade antimicrobiana

Abstract

Proteinase inhibitors are widely distributed among the plant kingdom, particularly in seeds and other reserve organs. Regardless of the extensive literature about the occurrence of serinic, cysteinic and metallo-proteinases inhibitors, there is a significant gap in the literature about naturally occurring aspartic proteinase inhibitors. However, aspartic proteinases are a class of enzymes that is widely distributed in nature and has been implicated in several patho- and physiological processes, such as hypertension, AIDS, Alzheimer's disease and infections by pathogenic microorganisms. The rarity of naturally occurring inhibitors of this proteinases' class can be explained by the fact that most of the aspartic proteinases are synthesized by itself in a inactive form (zymogen), that is only cleaved and activated when necessary.

Therefore, the first aim of this work was the identification, purification and characterization of aspartic proteinase inhibitors in *Cynara cardunculus* L. dormant seed extracts. Thereunto, it was created the best possible extraction approach, followed by analysis of protein profile, by PAGE techniques, and proteolytic and inhibitory activity of the extracts, by zymography techniques and enzymatic assays. After detection of inhibitory activity against pepsin in the seed extracts, the next step was the purification of the inhibitory fractions of the denaturated extract, by molecular exclusion chromatography followed by reverse-phase chromatography. The collected fractions were tested for inhibitory activity against pepsin: molecular exclusion fractions significantly inhibited pepsin, while reverse-phase fractions showed no inhibition of this enzyme. The molecular exclusion fractions also showed significant inhibitory activity toward other aspartic proteinases, namely chymosin and cardosin A.

In terms of protein profile, none of the fractions showed protein bands in SDS-PAGE or Tricina-SDS-PAGE, meaning that the molecules responsible for the inhibition are either small peptides, which are not detected by the PAGE techniques, or molecules of non-protein nature.

In order to characterize part of the inhibitory fractions' content, these were applied to a bidimensional thin-layer chromatography, where it was detected the presence of lipidic fractions with amino- and glycolipid features. These lipidic fractions were isolated and separated by reverse-phase chromatography, where the profile was

similar for both fractions, indicating that we can be in the presence of glycolipidic molecules incorporated with amino acids residues.

The second aim of this work was the evaluation of the inhibitory fractions' antimicrobial ability. Thereunto, antimicrobial assays were carried out by the disk diffusion method, against pathogenic bacterial (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and yeast (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*) strains. The results showed inhibitory activity of the fractions only against *E.coli*.

Keywords: seeds; *Cynara cardunculus* L.; aspartic proteinase; aspartic proteinase inhibitors; inhibitory activity; antimicrobial activity

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os inibidores de proteinases (IPs) encontram-se amplamente distribuídos no reino das plantas, sendo que as sementes e outros órgãos de reserva são, de longe, as fontes mais ricas destas moléculas (Kulkarni & Rao, 2009). Mais especificamente, em sementes de gimnospermas e de angiospermas mono- e dicotiledóneas, os IPs constituem cerca de 5-10% do conteúdo total de proteínas hidrossolúveis (Mutlu & Gal, 1999). Apesar de existir uma vasta literatura sobre a ocorrência de inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas e metaloproteinases em sementes, há uma lacuna significativa na literatura sobre inibidores naturais de proteinases aspárticas (PAs), com muito poucos inibidores descritos. Essa raridade na natureza, comparativamente a IPs de outras classes, pode ser justificada pelo facto de a grande maioria das PAs ser sintetizada já numa forma inactiva (zimogénio) por si só, que posteriormente é clivada e activada.

Uma das estratégias de defesa inata mais importante das plantas envolve IPs que são particularmente eficazes contro insectos fitófagos e microrganismos. Temos então que as capacidades defensivas dos IPs de plantas baseiam-se, principalmente, na inibição de proteinases presentes nas entranhas de insectos ou secretadas por microrganismos. Consequentemente, essa inibição causa uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento dos organismos invasores/patogénicos. (Lawrence & Koundal, 2002).

Assim sendo, a compreensão da base bioquímica das actividades antiproteolítica e antimicrobiana dos IPs e a elucidação da relação estrutura-função para a sua actividade são essenciais para o estudo mecânico da acção bifuncional destas moléculas.

1.1. Proteases

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas específicas em proteínas alvo (Habib & Fazili, 2007). Encontram-se amplamente

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

distribuídas em praticamente todas os animais, plantas e microrganismos, sendo que nos organismos superiores cerca de 2% do código genético codifica este tipo de enzimas (Barrett *et al.*, 2001).

Vários termos são comumente utilizados para designar este grupo de enzimas proteolíticas: peptidases, hidrolases peptídicas, proteases e proteinases (Barrett *et al.*, 1998), os quais originalmente tinham significados ligeiramente diferentes e hoje em dia são praticamente sinónimos (Barrett, 1999). O Comité de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 1992) recomendou o termo peptidase como termo geral para todas as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. As peptidases podem ainda subdividir-se em exopeptidases, que clivam um ou mais aminoácidos do N- ou C-terminal da proteína, e endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas dos polipeptídeos. Para ser consistente com o uso comum na literatura de temas relacionados, utiliza-se a nomenclatura sugerida por Barrett (Barrett, 1986): o termo protease abrange tanto exo- como endopeptidases; o termo proteinase abrange só endopeptidases. Na Tabela 1 encontram-se listadas as principais classes de proteases definidas pelo NC-IUBMB, sendo que a classificação das exopeptidases é baseada nas suas acções nos substratos, enquanto a classificação das proteinases (endopeptídases) é baseada nos seus centros activos (Fan & Wu, 2005).

Tabela 1 – Principais classes de proteases definidas pelo NC-IUBMB e respectivos números EC (*Enzyme Commission numbers*) (Fan & Wu, 2005).

Proteases (EC 3.4)	
Exopeptidases	Proteinases (Endopeptidases)
<ul style="list-style-type: none">• Aminopeptidases (EC 3.4.11)• Dipeptidases (EC 3.4.13)• Dipeptidil peptidases (EC 3.4.14)• Peptidil Dipeptidases (EC 3.4.15)• Carboxipeptidases Serínicas (EC 3.4.16)• Metalocarboxipeptidases (EC 3.4.17)• Carboxipeptidases Cisteínicas (EC 3.4.18)• Peptidases Omega (EC 3.4.19)	<ul style="list-style-type: none">• Proteinases Serínicas (EC 3.4.21)• Proteinases Cisteínicas (EC 3.4.22)• Proteinases Aspárticas (EC 3.4.23)• Metaloproteinases (EC 3.4.24)• Proteinases de mecanismo catalítico desconhecido (EC 3.4.99)

Sendo indispensáveis à manutenção e sobrevivência do organismo hospedeiro, as proteases têm papéis chave em vários processos biológicos. Os eventos proteolíticos catalisados por este tipo de enzimas servem como mediadores da iniciação, transmissão e terminação do sinal em vários eventos celulares como a inflamação, apoptose, coagulação sanguínea e processamento hormonal. No entanto, quando sobre-expressas e presentes em elevadas concentrações, estas enzimas podem ser potencialmente perigosas; por isso, as suas actividades devem ser estritamente reguladas e controladas (Habib & Fazili, 2007).

Assim sendo, as proteases não estão sempre activas no seu ambiente fisiológico, sendo sintetizadas na forma de zimogénios (precursores inactivos), os quais requerem, geralmente, uma proteólise limitada para serem activados. Alguns zimogénios apresentam o centro activo formado mas estéricamente bloqueado por um pró-peptídeo, como acontece com as proteases cisteínicas do tipo papaína e várias proteases aspárticas e metaloproteases; outros zimogénios não apresentam o centro activo formado e necessitam de um rearranjo conformacional para o formar, como acontece com as proteases serínicas do tipo quimiotripsina (Khan *et al.*, 1999).

1.1.1. Proteinases Aspárticas

As proteinases aspárticas (PAs) constituem uma classe de endopeptidases amplamente distribuída na natureza, nomeadamente em vertebrados, plantas, leveduras, parasitas, bactérias, fungos e vírus. Na Tabela 2 estão descritos alguns exemplos conhecidos de PAs, respectivas funções biológicas e conseqüentes condições patológicas em que estão envolvidas ou são responsáveis.

As PAs caracterizam-se por terem um pH óptimo ácido e clivarem, preferencialmente, ligações peptídicas entre resíduos hidrofóbicos e com cadeia lateral volumosa (Timotijevic *et al.*, 2003). Partilham também várias características ao nível da sequência primária, estrutura tridimensional e mecanismo catalítico.

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

Tabela 2 – Exemplos de PAs, respectivas funções biológicas e consequentes condições patológicas em que estão envolvidas ou são responsáveis (Tang & Wong, 1987; Davies, 1990; Dash *et al.*, 2003; Menon & Rao, 2012).

PA	Origem	Função Biológica	Condições/ Patologias
Pepsina	Vertebrados	Degradação de proteínas da dieta	Acidez
Quimosina		Clivagem de κ -caseína, levando à coagulação do leite	Desconhecido
Catepsina D e E		Degradação lisossomal de proteínas	Cancro
Renina	Humana	Processamento do precursor angiotensinogénio em angiotensina I	Hipertensão
Protease VIH-1		Processamento de poliproteínas em componentes proteicos maduros dos viriões HIV infecciosos	SIDA
BACE 1		Processamento da proteína precursora amiloide em peptídeos β -amiloides	Doença de Alzheimer
Cardosinas A e B	Vegetal	Desconhecida	Desconhecido
Proteinase A Vacuolar	Levedura	Processamento de precursores proteicos vacuolares	Infecções por leveduras
PAs secretadas	Levedura	Degradação de proteínas	Candidíase
Plasmepsinas	Parasita	Degradação de hemoglobina	Malária
Penicilopepsina	Fúngica	Degradação de proteínas	Desconhecido

Estudos de cristalografia revelaram que as PAs são moléculas bilobulares com o local activo localizado entre os dois lobos homólogos. Cada lobo contribui com 1 resíduo de aspartato para a díade cataliticamente activa, sendo que os 2 aspartatos se encontram muito próximos geometricamente na molécula activa (um é ionizado e o outro é desionizado numa gama de pH óptimo entre 2 a 3). Apenas as PAs retrovirais

são monoméricas, ou seja, apresentam apenas 1 aspartato catalítico, pelo que é necessário ocorrer dimerização para se formar a enzima activa (Fan & Wu, 2005). Os resíduos Asp catalíticos das PAs estão contidos numa sequência altamente conservada Asp-Thr-Gly em ambos os lobos da enzima (Davies, 1990). As PAs de plantas apresentam a sequência Asp-Ser-Gly num dos lobos. As PAs retrovirais também apresentam esta sequência Asp-Thr/Ser-Gly, na qual Toh e seus colaboradores se basearam para propôr que estas proteinases pertenciam à superfamília das PAs (Toh *et al.*, 1985). As PAs de plantas apresentam ainda outra característica que as distingue das outras: uma sequência extra de cerca de 100 aminoácidos que separa as sequências aspárticas homólogas em duas regiões (Veríssimo *et al.*, 1996; Simões & Faro, 2004).

Em termos de mecanismo catalítico, o ataque nucleofílico é conseguido por duas transferências protónicas simultâneas: uma de uma molécula de água, que está ligada entre os 2 resíduos catalíticos de aspartato, para a díade de 2 grupos carboxílicos; e a outra da díade para o oxigénio carbonilo do substrato com concomitante clivagem da ligação CO-NH. Temos então que a molécula de água actua como um nucleófilo que ataca o grupo carbonilo da ligação peptídica para ser quebrado. Esta catálise ácido-base, também designada de mecanismo *push-pull*, leva à formação de um intermediário tetraédrico neutro não-covalente (Figura 1) (Polgár, 1987).

Em termos de inibição, quase todas as PAs são inibidas pela Pepstatina A, um hexapeptídeo isolado de bactérias filamentosas *Actinomyces* (Umezawa *et al.*, 1970). Este hexapeptídeo apresenta a sequência Grupo Isovaleril-Val-Val-Sta-Ala-Sta (Morishima *et al.*, 1970), sendo que os resíduos de Sta, um aminoácido incomum, são os principais responsáveis pela actividade inibitória da molécula. A Sta é um análogo do intermediário tetraédrico formado durante a catálise ácido-base característica das PAs (Figura 1), o que justifica a elevada especificidade deste inibidor por estas proteinases, cujos mecanismos catalíticos são muito semelhantes (Marciniszyn *et al.*, 1976).

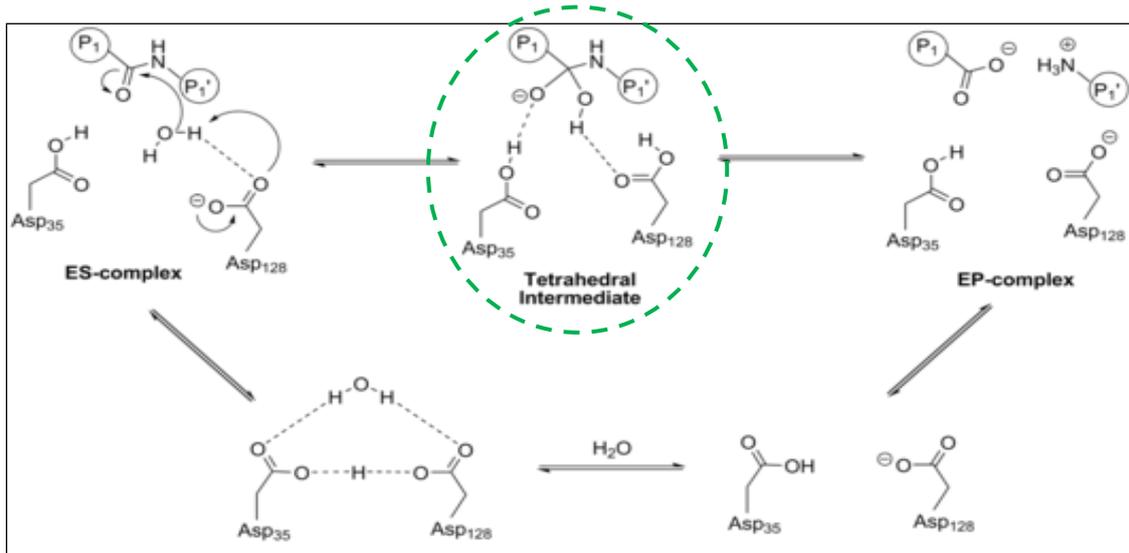


Figura 1 - Mecanismo catalítico geral ácido-base das PAs (a numeração dos Asp no local activo é relativa à pepsina de suíno) (adaptado de www.uib.no)

A maior parte das PAs é sintetizada na forma de zimogénios inactivos, contendo um segmento N-terminal adicional de cerca de 45 resíduos aminoácidos que é clivado e separado após a activação (Davies, 1990). Temos como exemplo o pepsinogénio, precursor inactivo da pepsina, que apresenta uma sequência adicional de 44 resíduos aminoácidos no N-terminal (Figura 2). A libertação deste pró-peptídeo, que activa o zimogénio, ocorre a baixo pH e por um processo autocatalítico que envolve a formação de intermediários (Herriott, 1939). James e Sielecki mostraram que este pró-peptídeo dobra-se num domínio compacto que ocupa o local activo da pepsina, sugerindo que a inibição ocorre devido aos resíduos Ser-11 a Leu-44 bloquearem o acesso aos aspartatos catalíticos no local activo da enzima. Em particular, o grupo amina da Lys-36 encontra-se localizado perto dos 2 grupos carboxilo destes aspartatos, a 0,5 Å de uma molécula de água ligada observada na maioria das estruturas cristalinas de enzimas activas. O pró-peptídeo estabelece um número de interações electrostáticas com a estrutura enzimática, sendo que 6 das cadeias laterais de aminoácidos básicos pró-peptídeo do pepsinogénio formam pares iónicos com cadeias laterais carboxiladas da pepsina. A diminuição do pH possivelmente protona esses grupos carboxilados, causando a ruptura do complexo seguida da clivagem da ligação entre a Leu-16 e a Ile-17, com a posterior proteólise a levar à formação da enzima activa (James & Sielecki, 1986).



Figura 2 – Sequência de 44 aminoácidos do pró-peptídeo do pepsinogénio bovino. Entre as barras laranja encontram-se os resíduos aminoácidos (Ser-11 a Leu-44) que, presumivelmente, bloqueiam o acesso aos aspartatos catalíticos no local activo da pepsina; a azul encontram-se os resíduos aminoácidos (Leu 16-Ile17) cuja ligação peptídica é clivada por diminuição do pH; a verde encontra-se o resíduo aminoácido (Lys-36) cujo grupo amina está localizado perto dos 2 grupos carboxilo dos aspartatos catalíticos (adaptado de Davies, 1990).

1.2. Inibidores de Proteínases

Os IPs encontram-se ubícuamente distribuídos em tubérculos e sementes de plantas, funcionando como proteínas de armazenamento (fontes de azoto) e como mecanismo de defesa dos organismos onde de encontram (Habib & Fazili, 2007), sendo produzidos em resposta a várias condições de stress, como ataque por insectos ou fitopatogénios, injúria e condições de stress ambiental, como excesso de sal (Koiwa *et al.*, 1997).

São geralmente pequenas proteínas que variam entre os 4 e os 85 kDa, sendo que a maioria encontra-se na gama de 8 a 20 kDa (Hung *et al.*, 2003), e são ricas em resíduos de cisteína (Richardson, 1991) que formam pontes dissulfeto (Greenblatt *et al.*, 1989; Hung *et al.*, 2003), o que confere termoestabilidade à estrutura. Normalmente os IPs interagem com as suas proteínases alvo por contacto com o local activo catalítico das mesmas, o que resulta na formação de um complexo proteínase-inibidor estável que é incapaz de exercer actividade enzimática (Norton, 1991; Fan & Wu, 2005).

Devido à sua capacidade para interagir e inibir proteínases, os IPs presentes em organismos podem actuar reduzindo a capacidade de organismos invasores para usar as enzimas líticas necessárias à patogenicidade (ex.: fungos), completar os ciclos de replicação (ex.: vírus) ou obter nutrientes através da digestão das proteínas hospedeiras (ex.: nemátodes e insectos) (Sels *et al.*, 2008). Os IPs actuam também como proteínas antimetabólicas, inibindo as proteínases presentes nas entranhas dos

insectos ou secretadas por microorganismos, o que causa uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento desses organismos (Habib & Fazili, 2007). A ideia de uma função defensiva dos IPs de plantas surgiu inicialmente de estudos em que insectos foram postos a crescer em dietas artificiais contendo IPs e de ensaios de inibição *in vitro* de proteinases de entranhas de insectos com IPs purificados de várias plantas. Os resultados destes estudos levaram à conclusão de que há uma interferência significativa dos IPs de plantas no crescimento e desenvolvimento dos insectos. Algumas evidências surgiram mais tarde que comprovaram que as plantas sintetizam polipeptídeos inibitórios que podem suprimir actividades enzimáticas em resposta ao ataque por proteinases produzidas por microorganismos fitopatogénicos: em tomates infectados com *Phytophthora infestans*, elevados níveis de inibidores de tripsina e quimotripsina foram correlacionados com a resistência das plantas ao patogénio (Woloshuk *et al.*, 1991); tubérculos de batata também infectados com *Phytophthora infestans* acumularam inibidores proteicos de 20 a 24 kDa de proteinases serínicas em resposta a injúria mecânica (Valueva *et al.*, 1998; 2003).

1.2.1. Classificação dos Inibidores de Proteinases

Os IPs têm sido agrupados em famílias e subfamílias e em diferentes clãs, com base na homologia de sequências e na relação dos *folds* proteicos dos seus domínios.

Com base nas homologias de sequências dos domínios inibitórios, já foram classificadas 48 famílias de IPs (Rawlings *et al.*, 2004b). Proteínas contendo uma única unidade inibidora são designadas inibidores simples; proteínas que contêm múltiplas unidades inibidoras são designadas inibidores complexos. Um total de 11 famílias de IPs pertence a esta última categoria e contém entre 2 a 15 domínios inibidores, sendo que a maioria são homotípicos, apresentando unidades inibidoras de uma única família; outros são heterotípicos, contendo unidades inibidoras de diferentes famílias (Richardson *et al.*, 2001; Trexler *et al.*, 2001; 2002). Com base na estrutura terciária, 31 de 48 famílias de IPs foram atribuídas a 26 clãs, o que indica que uma grande parte das

famílias não apresenta relações nas suas estruturas tridimensionais (Habib & Fazili, 2007).

Apesar das proteinases estarem classificadas com base nos seus centros activos, as famílias de IPs não podem ser agrupadas somente com base no tipo catalítico de enzimas que inibem, uma vez que várias famílias contêm inibidores de várias classes de proteinases (Rawlings *et al.*, 2004b). Temos como exemplo a família 13 do tipo Kunitz, que contém maioritariamente inibidores de proteinases serínicas, mas também inibidores de proteinases cisteínicas e aspárticas (Heibges *et al.*, 2003).

A base de dados MEROPS (www.merops.sanger.ac.uk) inclui todos os IPs naturais que foram isolados e purificados de diferentes fontes, os quais podem ser procurados por nome, identificador MEROPS ou organismo fonte. Para além de toda a informação descritiva sobre os IPs, esta base de dados providencia também alinhamentos de sequências e literatura sobre os mesmos (Rawlings *et al.*, 2012).

1.2.2. Inibidores naturais de proteinases aspárticas

Ao contrário da ampla distribuição de PAs e de inibidores das outras classes de proteinases, os inibidores naturais de proteinases aspárticas estão muito pouco estudados devido à sua raridade na natureza. Essa escassez pode ser justificada pelo facto de a grande maioria das PAs ser sintetizada já numa forma inactiva (zimogénio) por si só, que posteriormente é clivada e activada.

Assim sendo, apenas alguns inibidores naturais de PAs se encontram caracterizados.

- **PI-3**

Em 1974, Abu-Erreish & Peanasky isolaram o inibidor-3 da pepsina (PI-3 – *Pepsin Inhibitor-3*) do nemátode *Ascaris lumbricoides*, que possui um peso molecular de 17 kDa (Abu-Erreish & Peanasky, 1974). A determinação da estrutura tridimensional do PI-3 em solução e do complexo PI-3-pepsina permitiu determinar o mecanismo de inibição deste inibidor: o PI-3 apresenta um *fold* que consiste em dois domínios, cada

um contendo uma folha β antiparalela flanqueada por uma hélice α ; no complexo PI-3-pepsina, as margens N-terminal das folhas β emparelham com uma margem do local activo da pepsina, formando assim uma folha β de oito fitas que abrange as duas proteínas. Temos então que o PI-3 usa os seus resíduos aminoácidos do N-terminal para ocupar e bloquear os primeiros três locais de ligação do substrato à pepsina, impedindo a actividade proteolítica desta.

- **IA₃**

Também em 1974, Saheki e seus colaboradores isolaram, purificaram e caracterizaram um inibidor endógeno (IA₃ – *Inhibitor A₃*) da proteinase A vacuolar (YprA – *Yeast proteinase A*) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Saheki *et al.*, 1974). Este inibidor apresenta cerca de 8 kDa e é altamente específico e potente contra a proteinase mencionada, de tal modo que a pH 3,1 não há inibição completa da YprA pelo inibidor IA₃, mas a pH 5 e a pH 7 já ocorre inibição completa, o que transmite a ideia de uma importância biológica deste inibidor na regulação da actividade da YprA, uma vez que o valor de pH intracelular de células de levedura ronda os 6,5 (Saheki *et al.*, 1974).

Li e seus colaboradores demonstraram que, apesar do IA₃ apresentar 68 resíduos aminoácidos, a sua actividade inibitória contra a YprA é devida à metade N-terminal da molécula, ou seja, aos resíduos 2-34; para além disso, esta sequência não foi clivada pela YprA mas sim por outras proteinases, como a pepsina humana. Assim sendo, temos que a extensão contígua de resíduos 2-34 do IA₃ não só actua como inibidor eficaz da YprA, não sofrendo clivagem pela mesma, como também consegue actuar como substrato para outras proteinases (Li *et al.*, 2000). Os mesmos investigadores efectuaram medições de dicroísmo circular nas formas proteica (*wild type*) e peptídica (resíduos 2-34) do IA₃ livre em solução, sendo que o espectro obtido revelou estruturas ao acaso. Por outro lado, os espectros obtidos para a YprA livre em solução ou complexada com o IA₃ mostraram uma mistura de diferentes elementos com estrutura secundária (Li *et al.*, 2000). A determinação da estrutura tridimensional, por cristalografia de raios-X, do complexo IA₃-YprA (Figura 3A) revelou que os resíduos

aminoácidos 2-32 do IA₃ organizam-se e formam uma hélice α anfipática quase perfeita, enquanto os restantes 36 resíduos permanecem destrutturados (Figura 3B) (Li *et al.*, 2000). Essa hélice α é constituída principalmente por resíduos hidrofóbicos no exterior da hélice, e grupos polares ou carregados no interior da hélice. Assim sendo, não é surpreendente que a IA₃ não consiga formar uma hélice estável como monómero em solução aquosa. Para além disso, a adição de 2,2,2-trifluoroetanol, um composto orgânico miscível com água, ao solvente induziu uma conformação helical estável no IA₃ (Green *et al.*, 2004).

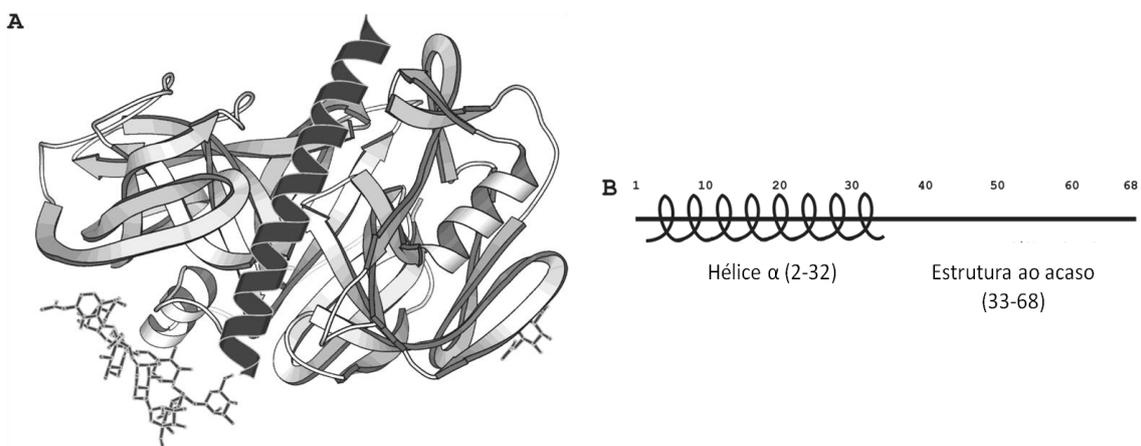


Figura 3 – Representações do IA₃. (A) Estrutura tridimensional, por cristalografia de raios-X, do complexo IA₃-YprA. Os resíduos 2-32 do IA₃ são a hélice preta, ao longo do centro da YprA, que está representada a cinzento claro. (B) Representação esquemática da estrutura secundária do IA₃ ligado à YprA (adaptado de Green *et al.*, 2004).

Embora os resíduos 2-32 do IA₃ formem uma hélice intacta quando em complexo com a YprA, esta sequência é clivada por outras proteinases, como a pepsina (Li *et al.*, 2000). É largamente aceite que as proteinases podem atacar apenas extensões de polipeptídeos com uma conformação estendida e acessível (Wu *et al.*, 1999). Para as PAs em geral, e para a pepsina em particular, peptidomiméticos quimicamente sintetizados adoptam uma conformação de cadeia β no local activo destas enzimas (Cooper *et al.*, 1989). Assim sendo, parece que a IA₃ liga-se à pepsina como cadeia β e é, consequentemente, clivado; enquanto que quando interage com a YprA, o IA₃ sofre uma transição de estrutura ao acaso para hélice α , o que poupa o IA₃ da degradação e ao mesmo tempo assegura que ele fica alojado como uma longa hélice no local activo

da enzima. Este arranjo garante que nenhuma ligação peptídica no corpo do IA₃ fica posicionada suficientemente perto dos resíduos aspartato catalíticos para sofrer clivagem. Temos então que, ao assegurar que o seu corpo se mantém afastado da maquinaria catalítica da enzima, o IA₃ inibe a YprA (Li *et al.*, 2000).

A grande selectividade do IA₃ sugere que interações com a YprA *in loci* distintos do local activo podem ter um significado importante. Assim sendo, inibidores peptídicos que têm um comprimento suficiente apenas para permitir interações dentro da fenda catalítica podem não ser capazes de atingir a especificidade absoluta demonstrada pelo inibidor IA₃ (Dreyer *et al.*, 1985).

Uma análise das interações entre a YprA e o IA₃ revelou vários resíduos importantes no inibidor que formam interações específicas com os resíduos aspartato catalíticos. Alguns desses resíduos são a Ala 23, Val 25, Val 26 e Phe 30, que estão localizados no lado hidrofóbico da hélice α anfipática e estão envolvidos em extensas interações hidrofóbicas com resíduos ao longo da extensão do local activo da YprA (Li *et al.*, 2000). A importância das interações hidrofóbicas para a actividade do inibidor foi corroborada quando o resíduo Leu 19 da sequência peptídica da IA₃ (resíduos 2-34) foi substituído por outro resíduo, sendo que o peptídeo resultante não inibiu a YprA a pH 3,1. Assim sendo, a deleção da metade isopropil terminal da cadeia lateral da Leu 19 converteu um polipeptídeo inibidor altamente potente num polipeptídeo sem capacidade inibidora, por diminuição da afinidade da enzima alvo e, provavelmente, por redução da estabilidade interna da hélice α (Phylip *et al.*, 2001).

- **PDI**

Em 1975, Keilová e Tomásek descobriram e caracterizaram um inibidor da catepsina D isolado de tubérculos de batata (PDI - *Potato Cathepsin D Inhibitor*). Este inibidor, para além de inibir a proteinase aspártica mencionada, inibe também as proteinases serínicas tripsina e quimiotripsina; no entanto, não inibe as proteinases aspárticas pepsina, catepsina E e renina. O inibidor em questão é uma proteína de 188 resíduos aminoácidos e peso molecular de 27 kDa; bifuncional e estável numa gama de pH 2 – 10,5 contra a digestão por pepsina, sendo que a sua actividade inibitória

permanece inalterada após 30 minutos a 60°C (Keilová & Tomásek, 1976). Em termos de sequência, partilha uma homologia considerável com o inibidor de tripsina isolado de soja (STI – *Soybean Trypsin Inhibitor*) da família Kunitz (Mares *et al.*, 1989).

- **SQAPI**

Em 1998, Christeller e seus colaboradores purificaram e caracterizaram um inibidor de proteinases aspárticas isolado de exsudados de floema da abóbora *Curcubita maxima* (SQAPI – *Squash Aspartic Proteinase Inhibitor*). O SQAPI apresenta 96 resíduos aminoácidos e, na sua forma nativa, existe como um dímero de 21 kDa, constituído por 2 monómeros de cerca de 10,5 kDa cada um. Este inibidor, que é estável numa gama de pH ácido a neutro, inibe fortemente a pepsina ($K_i = 3$ nM) e uma proteinase aspártica secretada pela levedura *Candida albicans* ($K_i = 3$ nM) e, com menor força, uma proteinase aspártica secretada pelo fungo *Glomerella cingulata* ($K_i = 20$ nM) (Christeller *et al.*, 1998; Farley *et al.*, 2002). Estudos cinéticos demonstraram que o SQAPI é um inibidor eficaz e forte da pepsina e da proteinase secretada por *C. albicans* devido ao facto de, apesar das constantes de associação serem baixas, o complexo SQAPI-enzima ser muito estável e a sua dissociação ser lenta, principalmente a baixos valores de pH (Farley *et al.*, 2002).

Em termos de sequência de aminoácidos, o SQAPI apresenta cerca de 23-33% de identidade e 45%-54% de similaridade com a família das cistatinas, as quais são inibidores de proteinases cisteínicas que se encontram amplamente distribuídos por todo o reino eucariota. No entanto, o SQAPI apenas foi encontrado em Cucurbitales (ordem de plantas angiospérmicas), o que indica a sua recente origem. Assim sendo, o SQAPI pode ter evoluído de uma fitocistatina numa fase tardia da evolução angiospérmica (Christeller *et al.*, 2006).

A hipervariabilidade está bem documentada em várias famílias de IPs como a selecção Darwiniana positiva nas regiões das moléculas onde ocorre a interação com proteinases (resíduos de contacto) (Creighton & Darby, 1989; Christeller, 2005). Para além disso, foi demonstrado que regiões de hipervariabilidade dentro de um PI indicam a presença de *loops* externos que estão envolvidos na ligação à proteinase (Hill & Hastie, 1987; Laskowski *et al.*, 1987). As cistatinas apresentam 3 pontos de

contacto com a papaína, a sua proteinase alvo modelo (Turk & Bode, 1991), e esses mesmos pontos foram identificados na sequência do SQAPI e examinados para variabilidade comparado com outras secções do inibidor, tendo-se demonstrado efectivamente a existência de hipervariabilidade nas regiões de contacto putativas, o que levou à hipótese de que o inibidor SQAPI não só evoluiu da família das cistatinas, como também adoptou o seu mecanismo inibitório contra as proteinases alvo. O mecanismo de inibição pelas cistatinas consiste no impedimento estérico por inserção dos resíduos de contacto no local activo da proteinase cisteínica, não havendo interação directa com o grupo sulfidril nucleofílico da mesma (Christeller *et al.*, 2006).

Estudos posteriores, usando técnicas de espectroscopia, confirmaram que o SQAPI assume uma estrutura semelhante à cistatina, com 4 folhas β antiparalelas retorcidas que agarram uma hélice α de forma semelhante a como os dedos de uma mão agarram uma raqueta de ténis (Headey *et al.*, 2010). Com excepção dos primeiros 10 resíduos aminoácidos, que se encontram relativamente desordenados, a estrutura em solução do SQAPI é bem definida (Figura 4C): uma volta bem definida da Gly 11 até à hélice α , a qual se estende da Pro 17 à Gln 29; uma segunda volta estruturada liga a hélice α à primeira cadeia β (Ile 36-Ile 46); um primeiro *loop* (Lys 47-Asn 54) liga esta primeira cadeia à segunda cadeia β (Tyr 55-Lys 63); no outro extremo da molécula, outra volta estruturada (His 60-Ser 70) liga a segunda cadeia à terceira cadeia β (Lys 71-Lys 80); por fim, um segundo *loop* (Ala 81-Asn 84) liga a terceira cadeia à quarta cadeia β (Ser 85-Phe 95), que se estende até ao C-terminal (Headey *et al.*, 2010). A partir de ferramentas informáticas, foi criado um modelo de inibição da pepsina pelo SQAPI, assumindo que este último é um inibidor do local activo da pepsina e não um inibidor alostérico. O modelo resultante suportou a hipótese de que o mecanismo de inibição do SQAPI é semelhante ao das cistatinas, com a cadeia N-terminal a ligar ao lado S' do local activo e o primeiro *loop* a ligar ao lado S (Figura 4A e 4B). O corpo do SQAPI não interage com a díade catalítica, evitando assim a sua própria inactivação por clivagem, e a maioria dos contactos intermoleculares é de natureza hidrofóbica (Headey *et al.*, 2010).

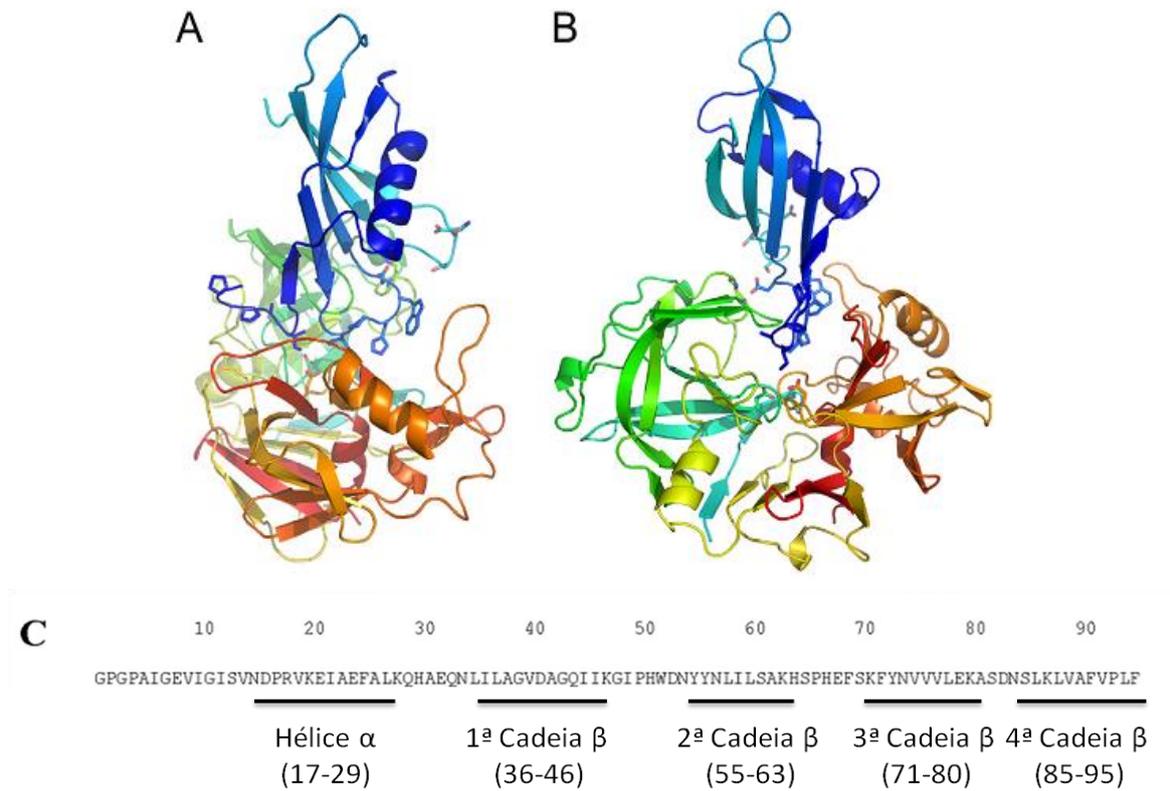


Figura 4 – Modelo do complexo SQAPI-pepsina e sequência de aminoácidos do SQAPI. A e B – Estrutura do SQAPI (azul) alojada no local activo da pepsina de suíno (domínio N-terminal – verde para amarelo; domínio C-terminal – laranja para vermelho). C – Sequência de aminoácidos do SQAPI com indicação dos resíduos que formam elementos de estrutura secundária em solução aquosa (Headey *et al.*, 2010).

Embora o alvo fisiológico do SQAPI nos exsudados de floema de abóbora não seja conhecido, o grande espectro de IPs presente neste exudado sugere uma função de protecção da planta do ataque de patogénicos ou insectos (Ryan, 1978). Os insectos que sugam o floema derivam o nitrogénio necessário dos aminoácidos e não apresentam níveis significativos de proteinases (Rahbe *et al.*, 1995), pelo que à partida não serão muito afectados pelos IPs. No entanto, insectos que mastigam o floema devem necessitar de proteinases digestivas para degradar proteínas e, provavelmente, ingerem IPs de exsudados de floema suficientes para interferir com esta digestão, especialmente porque os exsudados acumulam-se em locais da planta que tenham sofrido injúrias (Christeller *et al.*, 1998).

1.2.3. Inibidores sintéticos de proteinases aspárticas

As PAs têm recebido, nos últimos anos, uma atenção especial na área terapêutica devido ao seu envolvimento em doenças humanas, nomeadamente da renina na hipertensão, da catepsina D em metástases de cancro da mama, da protease VIH-1 na SIDA e da BACE 1 na doença de Alzheimer (Dash *et al.*, 2003). Por esta razão, a compreensão da estrutura e relações funcionais destas enzimas tem um impacto directo no desenho de inibidores sintéticos de PAs. De seguida, encontram-se descritas, de uma forma sucinta, algumas características de alguns inibidores sintéticos de PAs.

- **Inibidores da protease VIH-1**

Hoje em dia vários inibidores de baixo PM da protease VIH-1 são usados terapêuticamente em humanos, incluindo o saquinavir, o ritonavir, o indinavir, o nelfinavir e o amprenavir. Praticamente todos os inibidores desta PA desenvolvidos até hoje têm como alvo o sítio de ligação do substrato no local activo da enzima homodimérica, uma longa cavidade cilíndrica que liga seis a sete aminoácidos por interações iónicas, de van der Waals e de ligações de hidrogénio (Kempf & Sham, 1996). Há cerca de uma década, começaram a surgir alguns estudos com inibidores não-peptídicos que têm como alvo a dimerização da protease VIH-1, em vez do seu local activo (Song *et al.*, 2001).

- **Inibidores de renina**

Devido à função biológica da renina, que é a o processamento hidrolítico do angiotensinogénio α_2 -globulina no peptídeo angiotensina I, inibidores desta enzima têm sido utilizados como agentes antihipertensivos. Temos como exemplo o Zankiren (A-72517), um inibidor potente da renina do plasma humano que apresenta uma elevada absorção oral (Kleinert *et al.*, 1992). Quase todos os inibidores desta enzima descritos até à data têm sido desenvolvidos por modificação de fragmentos do local de

clivagem do angiotensinogénio (Rosenberg, 1995). No entanto, o progresso clínico deste tipo de inibidores tem sido prejudicado devido ao carácter peptídico dos mesmos, que confere baixa estabilidade e uma pobre biodisponibilidade oral em humanos.

Geralmente, os inibidores de renina necessitam de interagir com cinco sublocais da enzima, de forma a estabelecerem uma ligação forte e selectiva com a mesma. Consequentemente, estes inibidores têm uma tendência para ter maior peso molecular e maior número de centros estéreos, o que os torna mais dispendiosos de manufacturar (Dask *et al.*, 2003).

1.3. Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são armas antigas evolucionárias no combate a patogénios invasores, sendo que a ampla distribuição pelos reinos animal e vegetal sugere um papel fundamental destes peptídeos no sucesso da evolução de organismos multicelulares complexos (Zasloff, 2002). A rápida emergência de patogénios microbianos resistentes aos antibióticos actualmente disponíveis levou a um grande interesse no isolamento de peptídeos e proteínas antimicrobianas e na caracterização dos seus mecanismos de acção.

Já foram isolados de uma grande variedade de organismos, incluindo animais, bactérias, insectos e plantas, peptídeos e proteínas que inibem o crescimento de patogénios agronomicamente importantes: quitinases e β -1,3-glucanases, tioninas, defensinas, proteínas de transferência lipídica, proteínas do tipo ribonuclease, peptídeos ricos em cisteínas e inibidores de proteinases, entre outros (Kim *et al.*, 2009). Relativamente às plantas, estas produzem compostos que actuam como defesas naturais contra pragas e patogénios, pelo que os peptídeos antimicrobianos providenciam a primeira linha de defesa contra fitopatogénios: são constituídos normalmente por 15 a 40 aminoácidos, a maior parte dos quais são hidrofóbicos e cationicos, e conferem protecção contra bactérias, fungos e vírus, actuando na membrana celular dos mesmos (Zasloff, 2002).

Várias hipóteses foram apresentadas ao longo do tempo para os processos responsáveis pela morte de microrganismos mediada por peptídeos, nomeadamente: despolarização fatal da membrana do organismo (Westerhoff *et al.*, 1989); criação de “buracos físicos” na membrana celular que levam à saída dos conteúdos celulares (Yang *et al.*, 2000); activação de processos mortíferos, como a indução de hidrolases que degradam a parede celular (Bierbaum & Sahl, 1985); desorganização da distribuição normal dos lípidos membranares entre os folhetos da bicamada lipídica, que resulta no distúrbio das funções membranares (Matsuzaki, 1999); e dano de alvos intracelulares críticos após internalização dos peptídeos (Kragol *et al.*, 2001).

1.3.1. Inibidores de proteinases com actividade antimicrobiana

Alguns exemplos de peptídeos com actividade inibidora de proteinases e actividade anti-microbiana já se encontram descritos na literatura.

- **Potídeo-G**

O Potídeo-G é um peptídeo termoestável de 5,6 kDa, isolado de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley), que suprime quase na totalidade a actividade proteolítica das enzimas tripsina, quimotripsina e papaína (Kim *et al.*, 2006), não tendo actividade hemolítica. Em termos de actividade antimicrobiana, inibe potentemente o crescimento de várias bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Clavibacter michiganense* subsp. Michiganinse, da levedura *Candida albicans* e do fungo *Rhizoctonia solani* (Kim *et al.*, 2006).

- **Potamina-1**

A Potamina-1, isolada de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L. cv Gogu), é um inibidor termoestável das proteinases tripsina e quimotripsina, com actividade antimicrobiana potente contra estirpes patogénicas, como a bactéria *Clavibacter*

michiganense subsp. *michiganinse*, a levedura *Candida albicans* e o fungo *Rhizoctonia solani*, não apresentando actividade hemolítica. Este peptídeo é composto por cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, sendo que a Potamina-1 reduzida perde quase na totalidade a sua actividade contra proteinases e micróbios, o que indica que as pontes dissulfeto são essenciais para a sua função de inibidor de proteinase e actividade antimicrobiana (Kim *et al.*, 2005).

- **Polipeptídeo do tipo Napina**

O polipeptídeo do tipo Napina, isolado de sementes de couve branca chinesa (*Brassica rapa* subsp. *chinensis* cv *dwarf*), é um heterodímero de 11 kDa (uma subunidade menor de 4 kDa e uma subunidade maior de 7 kDa) que tem actividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* (Ngai & Ng, 2004).

Temos então que existem inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas com actividade antimicrobiana comprovada; no entanto, existe muito pouca ou nenhuma informação sobre inibidores de proteinases aspárticas também com essas propriedades. Dada a importância destas na natureza e as suas funções biológicas, nomeadamente com implicações em patologias como a SIDA e a doença de Alzheimer, é então de extrema importância a descoberta de inibidores naturais de proteinases aspárticas, de preferência com actividade antimicrobiana, que possam ter aplicações biológicas úteis.

1.4. Aplicações Biológicas

No campo da agricultura, os insectos e microorganismos fitopatogénicos são a principal causa de doenças em plantas e perda de colheitas. Na última década, os IPs de plantas têm sido extensivamente usados em várias tentativas de criação de um programa de controlo de pragas, sendo que o resultado foi um aumento na produção

de colheitas transgênicas. No entanto dois problemas permanecem: o desenvolvimento de resistência adaptativa pelos insectos e a aceitação do público. Considerando a elevada complexidade das interações proteinase-inibidor nos sistemas de pragas hospedeiros e a diversidade de enzimas proteolíticas usadas pelos mesmos para hidrolizar as proteínas da dieta ou ligações peptídicas em processos mais específicos, a escolha de um PI apropriado ou um conjunto deles representa um determinante principal no sucesso ou falha de qualquer estratégia de controlo de pragas que se baseie na inibição de proteinases. Por outro lado, foi descrito em diversos estudos que a presença de grandes quantidades de inibidores na dieta de várias pragas fitopatogénias faz com que os insectos se adaptem a essa dieta e produzam proteases insensíveis à acção dos IPs nas plantas. Consequentemente, o controlo de pragas usando IPs em plantas transgênicas requer o isolamento ou a síntese, por engenharia e biotecnologia de DNA recombinante, de inibidores que sejam também activos contra essas proteases insensíveis (Lawrence & Koundal, 2002). Temos então que a transformação do genoma de plantas com clones de cDNA codificante de IPs pode ser uma ferramenta atractiva não só para o controlo de ataques de pragas e patogénios mas também como meio para produzir IPs e proteínas heterólogas (Sardana *et al.*, 1998).

No campo da medicina, vários estudos têm sido efectuados com vista às aplicações terapêuticas dos IPs de plantas numa variada gama de desordens humanas, como pancreatite, choque, alergia e inflamação associadas a aumentos de actividades proteolíticas. Estudos epidemiológicos em que se observou uma diminuição da ocorrência de cancro da mama, cólon e próstata em populações vegetarianas sugere um papel dos IPs de plantas na prevenção deste tipo de cancros (Birk, 1993; Birk, 2003). Esta observação levou então a um estudo extensivo dos IPs de plantas como agentes quimopreventivos de cancro (Troll & Kennedy, 1993), mas não só: IPs de plantas activos contra proteases que regulem processos fisiológicos humanos como sinalização, migração, digestão, fertilização, crescimento, diferenciação, defesa imunológica, recuperação de injúrias e apoptose celular têm grande potencial para aplicação terapêutica (Abdel-Meguid *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000).

1.5. *Cynara cardunculus* L.

C. cardunculus L., comumente designado cardo, é uma espécie de plantas angiospérmicas eudicotiledóneas que crescem selvagens (Figura 5A) em regiões áridas com elevada temperatura e salinidade, ficando secas no Verão (Falleh *et al.*, 2008). Em Portugal, podem ser encontradas em zonas do sul e na ilha da Madeira.

Caracterizam-se por serem plantas pereniais com estames erectos e folhas espinhosas, agregadas na base de cada segmento (Pissara *et al.*, 2007). A florescência ocorre no segundo ano do ciclo de vida da planta e as inflorescências estão organizadas em capítulos compactas (Figura 5B), que consistem em numerosas flores hermafroditas individuais (Sampaio, 1947; Tutin *et al.*, 1976).

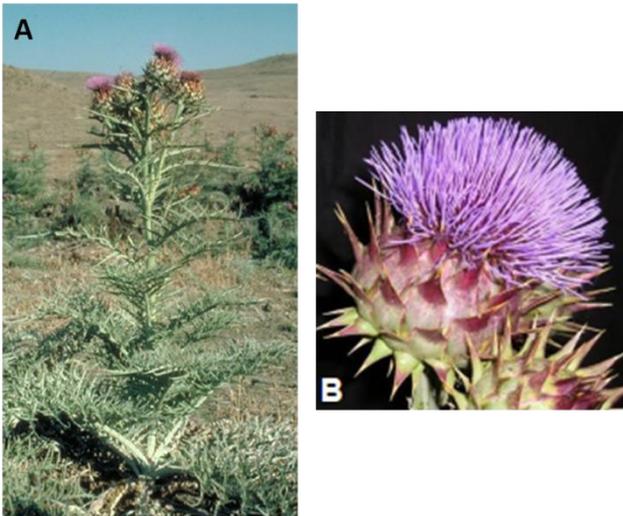


Figura 5 – Planta de *C. cardunculus* L. **A** – Planta a crescer selvagem no seu ambiente natural. **B** – Detalhe de uma inflorescência (Pissara *et al.*, 2007).

As sementes de *C. cardunculus* L. encontram-se no interior das inflorescências, e caracterizam-se por terem um revestimento espesso e impermeável e um reduzido endosperma (uma ou duas camadas celulares) (Pissara *et al.*, 2007). Estas sementes apresentam PAs, nomeadamente cardosina A e cardosina B, o que faz delas um material biológico interessante para a pesquisa de inibidores de PAs.

1.6. Objectivos do trabalho

As PAs são uma classe de proteinases que se encontra amplamente distribuída na natureza e tem sido implicada em vários processos fisiológicos e patogénicos. Exemplos incluem a pepsina, uma enzima gástrica bem descrita e PA modelo; a renina, envolvida na regulação da pressão sanguínea; a BACE, enzima envolvida na doença de Alzheimer; a protease VIH-1, um alvo terapêutico da SIDA; e cardosinas, as enzimas coaguladoras de leite das flores de cardo. Contrariamente, os inibidores naturais de PAs são raros, encontrando-se pouco descritos na literatura.

As sementes e órgãos de reserva das plantas são as fontes naturais mais ricas em IPs, tendo sido descrito que o elevado conteúdo de IPs em sementes não germinadas pode ser um dos responsáveis pela manutenção da dormência das mesmas (Kulkarni & Rao, 2009).

Os IPs têm um papel importante na defesa inata de plantas contra insectos fitófagos e microrganismos, inibindo proteinases presentes nas entranhas de insectos ou secretadas pelos microrganismos. Temos então que estes IPs podem ser utilizados em estratégias agronómicas de controlo de pragas, como por exemplo na produção de colheitas transgénicas. Para além disso, visto que as PAs apresentam uma importância fisiológica significativa, IPs desta classe enzimática podem ter um grande potencial para aplicação terapêutica.

Assim sendo, este projecto tem dois objectivos principais. O primeiro consiste na identificação, purificação e caracterização de inibidores de PAs em extractos de sementes dormentes de *C. cardunculus* L. O segundo objectivo consiste na avaliação da capacidade antimicrobiana de fracções antiproteolíticas desses extractos.

Capítulo 2

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

Neste trabalho foram utilizadas sementes da espécie *C. cardunculus* L. Os cardos foram colhidos secos na natureza, na zona de São Brás de Alportel, Algarve, tendo sido mantidos à temperatura ambiente até à sua utilização.

2.2. Preparação do extracto total de sementes de *C. cardunculus* L.

O extracto de sementes de *C. cardunculus* L. foi obtido por trituração das sementes num moinho mecânico *Retsch MM 301* durante 15 minutos à frequência de 30 s^{-1} e posterior homogeneização em tampão 50 mM cetato de sódio pH 4,5, 200 mM cloreto de sódio, numa proporção de 111 mg de sementes/mL de tampão. De seguida o homogeneizado foi centrifugado a 2000 g, durante 10 minutos à temperatura ambiente, e o sobrenadante recolhido, o qual foi designado de extracto total.

2.3. Tratamento térmico do extracto total de sementes de *C. cardunculus* L.

Alíquotas de 2 mL do extracto total foram aquecidas a 94°C durante 15 minutos e de seguida colocadas em gelo durante 15 minutos. Posteriormente centrifugaram-se essas alíquotas a 18000 g, durante 10 minutos à temperatura ambiente, e recolheram-se os sobrenadantes, os quais foram filtrados com membranas de 0,45 µm para eliminar vestígios de sedimentos. Esta amostra designou-se de extracto desnaturado.

2.4. Análise do conteúdo proteico

2.4.1. Quantificação de proteína

A quantificação proteica das amostras de interesse foi realizada pelo *Bio-Rad Protein Assay*, baseado no método de Bradford. Foi seguido o protocolo do fornecedor (Bio-Rad) para *microassay* em placas *microtiter*, usando a albumina sérica bovina como padrão proteico.

2.4.2. Electroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes

De modo a avaliar o perfil proteico das diferentes amostras de interesse, estas foram separadas por dois métodos diferentes de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes, presença de SDS: SDS-PAGE e Tricina-SDS-PAGE.

Os géis de SDS-PAGE foram feitos em 15% poliacrilamida de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970); os géis de Tricina-SDS-PAGE foram feitos em 16% poliacrilamida de acordo com o procedimento descrito por Schagger (Schagger, 2006). Antes de serem aplicadas nos géis de SDS-PAGE, as amostras foram desnaturadas com solução desnaturante concentrada 2x (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM Glicina; 40% (v/v) Glicerol; 4% (m/v) SDS; 200 mM DTT; 0,001% (m/v) Azul de Bromofenol) ou 6x (500 mM Tris-HCl/SDS pH 6,8; 30% (v/v) Glicerol; 10% (m/v) SDS; 600 mM DTT; 0,012% Azul de Bromofenol) de acordo com o seguinte: 10 minutos à temperatura ambiente, 25 minutos a 80°C e 10 minutos novamente à temperatura ambiente. Para os géis de Tricina-SDS-PAGE, as amostras foram desnaturadas com solução desnaturante concentrada 2x (0,1 M Tris-HCl pH 8,45; 24% (m/v) Glicerol; 8% (m/v) SDS; 200 mM DTT; 0,02% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) durante 50 minutos a 40°C. Para além das amostras, foi também aplicado a todos os géis um padrão de proteínas pré-coradas com massas moleculares conhecidas entre 18,5 e 96 kDa (*Low Molecular Weight Protein Marker* da NZYtech).

A corrida dos géis de SDS-PAGE foi efectuada em tampão de electroforese 100 mM Tris/Bicina com 0,1% (m/v) SDS, num sistema *Mini Protean II* (BioRad), a 120 V durante 1h. A corrida dos géis de Tricina-SDS-PAGE foi efectuada num sistema tampão de Tris-Tricina (tampão do ânodo: 0,2 M Tris pH 8,9; tampão do cátodo: 0,1 M Tris pH 8,2; 0,1 M Tricina; 0,1% SDS) num sistema *Mini Protean II* (BioRad), a 40 V durante 1h seguido de 120 V durante 2 a 3h.

2.4.2.1. Revelação com Coomassie Brilliant Blue R-250

De modo a fixar e corar os péptidos e proteínas separadas por electroforese, os géis foram incubados com uma solução de 0,25% (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, durante 20 minutos. A descoloração foi feita por lavagens sucessivas com uma solução de 25% (v/v) metanol e 5% (v/v) ácido acético.

2.4.2.2. Revelação com Nitrato de Prata

Dependendo da quantidade de material proteico presente nos géis, por vezes a técnica de revelação com Coomassie Brilliant Blue R-250 não é suficientemente sensível para detectar bandas, pelo que se procede à coloração dos géis com nitrato de prata (O'Connel & Stults, 1997).

Primeiramente fixou-se as proteínas dos géis, durante 30 minutos, com solução descorante 25% (v/v) metanol e 5% (v/v) ácido acético. De seguida efectuaram-se duas lavagens sucessivas, de 10 minutos cada, com 50% e 30% etanol, respectivamente. Os géis foram sensibilizados por incubação em 0,02% (m/v) tiosulfato de sódio durante 1 minuto e, posteriormente, realizaram-se duas lavagens sucessivas, de 20 minutos cada, com água destilada. Para corar, incubaram-se os géis em 0,2% (m/v) nitrato de prata, durante 20 minutos, e revelaram-se os mesmos numa solução 0,025% (v/v) formaldeído, 3% (m/v) carbonato de sódio anidro e 0,001% (m/v) tiosulfato de sódio. Assim que se obteve a coloração pretendida, parou-se a revelação com 0,4 M Tris

contendo 2,5% (v/v) ácido acético. Os géis foram guardados em água destilada à temperatura ambiente.

2.5. Análise da actividade proteolítica

2.5.1. Zimografia

A actividade proteolítica dos extractos de sementes de *C. cardunculus* L. foi avaliada pela técnica de zimografia.

Os zimogramas foram preparados usando gelatina (1mg/ml) co-polimerizada em géis de 10% poliacrilamida. As amostras foram aplicadas nos géis sem sofrerem desnaturação por aquecimento ou redução, sendo apenas incubadas com tampão de carregamento de zimografia concentrado 2x (125mM Tris-HCl pH 6.8; 4% (v/v) SDS; 20% (v/v) glicerol; 0,1% (m/v) azul de bromofenol), durante 10 minutos à temperatura ambiente, antes da aplicação nos géis.

A electroforese realizou-se num sistema *Mini Protean II* (BioRad), em tampão de electroforese (descrito em 2.4.1), a 4°C e 120 V. Após a electroforese, incubaram-se os géis em tampão de renaturação (50 mM acetato de sódio pH 4,5 contendo 0,25% (v/v) Triton X-100), durante 30 minutos à temperatura ambiente e com agitação moderada, para remover o SDS. De seguida, os géis foram incubados com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, durante a noite à temperatura ambiente, de modo a potenciar a actividade proteolítica. Finalmente, após duas lavagens sucessivas com água destilada, a actividade proteolítica foi detectada por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250, conforme descrito na secção 2.4.2.1.

2.5.2. Zimografia reversa

A actividade inibitória por parte das amostras de interesse contra a proteinase aspártica pepsina (de mucosa gástrica suína, Sigma) foi testada através da técnica de

zimografia reversa. Na secção de Resultados e Discussão não são apresentados os resultados obtidos com esta metodologia,

Os zimogramas foram preparados usando gelatina 0,1% (m/v) co-polimerizada em géis 15% poliacrilamida de acordo com o procedimento descrito por Le (Le & Katunuma, 2004). Antes de serem aplicadas nos mesmos, as amostras foram incubadas com tampão de carregamento de zimografia concentrado 2x (descrito na secção 2.5.1.).

A electroforese realizou-se num sistema *Mini Protean II* (BioRad), em sistema tampão de Tris-Tricina (descrito em 2.4.1.), a 4°C e 120 V. Após a electroforese, incubaram-se os géis numa solução de 50 mM acetato de sódio pH 4,5 contendo 2,5% (v/v) de Triton X-100, durante 45 minutos à temperatura ambiente e com agitação moderada. De seguida, os mesmos foram lavados várias vezes com água destilada e incubados em soluções de 50 mM acetato de sódio pH 4,5 contendo diferentes intervalos de quantidade de pepsina, durante diferentes intervalos de tempo à temperatura ambiente. Após a proteólise por incubação na solução contendo a enzima alvo, os géis foram fixados e corados com Coomassie Brilliant Blue R-250, conforme descrito na secção 2.4.2.1.

2.5.3. Ensaio enzimáticos

A actividade proteolítica dos extractos de sementes de *C. cardunculus* L. foi determinada através de ensaios enzimáticos.

O substrato usado para estes ensaios foi o péptido com sequência (MOCA-Lys)Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu(Lys-DNP) (Genosphere Biotechnologies). A actividade proteolítica dos extractos foi então determinada através do aumento da fluorescência, como consequência da hidrólise do substrato (é clivada a ligação –Phe-Phe–) e concomitante afastamento do grupo fluorogénico MOCA (7-*methoxycoumaryl-4-yl-acetyl*, $\text{Exc}_{328\text{nm}}$, $\text{Em}_{393\text{nm}}$) do grupo *quencher* DNP (2,4-*dinitrophenyl*), o que permite ao primeiro fluorescer. A fluorescência foi lida num fluorímetro *SpectraMax Gemini EM* (Molecular Devices), em placas *microtiter* de 96 poços (Corning Life Sciences), em leituras contínuas de 10 minutos, à temperatura ambiente. Todos os

ensaios foram realizados num volume final de 202 μL em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5.

A quantidade de extracto aplicada no ensaio foi 19,7 μg (extracto total) e 14,3 μg (extracto desnaturado), sendo que a concentração final do substrato no ensaio foi 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.5.4. Ensaio de inibição enzimática

A actividade inibitória por parte das amostras de interesse contra as proteinases aspárticas pepsina (de mucosa gástrica suína, Sigma), quimosina (de estômago de vitelo, Sigma) e cardosina A (purificada de extractos de flores de cardo) foi determinada através de ensaios de inibição enzimática.

O substrato usado para estes ensaios foi o mesmo descrito na secção 2.5.3.

Todos os ensaios foram realizados num volume final de 202 μL em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5.

Para o controlo positivo da actividade proteolítica das proteinases, pré-incubaram-se as mesmas em tampão do ensaio durante 10 minutos à temperatura ambiente e com agitação moderada. De seguida, adicionou-se o substrato e mediu-se a fluorescência conforme descrito. As amostras de interesse foram pré-incubadas com as proteinases mencionadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e com agitação moderada. De seguida, adicionou-se o substrato e mediu-se a fluorescência conforme descrito.

As concentrações finais das proteinases nos ensaios foram: 1,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 9,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepsina, 19,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quimosina e 9,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cardosina A. As concentrações finais do substrato nos ensaios foram; 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 19,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a pepsina, 19,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a quimosina e 24,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a cardosina A.

2.6. Purificação e caracterização do extracto desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L.

2.6.1. Cromatografia de Exclusão Molecular

De modo a efectuar uma separação do conteúdo do extracto desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L., procedeu-se a uma cromatografia de exclusão molecular (CEM) na matriz Sephadex G-50 Superfina (Pharmacia Fine Chemicals) em sistema FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatograph*) AKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech).

A matriz Sephadex G-50 é constituída por dextrano cruzado com epíclorohidrina. A designação de superfina refere-se ao tamanho das esferas, que são macroscópicas e sinteticamente derivadas do polissacárido dextrano, e que se comportam como estruturas rígidas que obedecem à Lei de Darcy (www.gelifesciences.com). O tamanho pequeno destas esferas é ideal para distâncias de difusão mais curtas, o que confere maior eficácia e resolução à separação. As cadeias orgânicas encontram-se cruzadas de modo a formar uma rede tridimensional com os grupos iónicos funcionais ligados por ligações éter a unidades de glucose das cadeias polissacáridas. A gama de fracionamento desta matriz é de 1,5 – 30 kDa (proteínas) e uma das suas características é ter muito poucas interacções não-específicas (www.gelifesciences.com).

Primeiramente procedeu-se ao empacamento da matriz Sephadex G-50 numa coluna de dimensões 300 x 26 mm (Pharmacia Fine Chemicals). Para isso hidrataram-se 10 g de matriz em água Milli-Q durante 24h; posteriormente, a matriz hidratada foi empacada até ao topo da coluna com a ajuda de uma bomba peristáltica P-1 (Amersham Biosciences) e ao fluxo de 1,0 mL/min. Finalmente, a coluna foi ligada ao sistema FPLC mencionado.

Um volume de 2,5 mL do extracto desnaturado foi aplicado à coluna Sephadex G-50, a qual foi previamente equilibrada com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5 a um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição do conteúdo do extracto foi feita com o mesmo tampão e ao mesmo fluxo do equilíbrio da coluna, durante 120 minutos, tendo-se

recolhido fracções de 1,5 mL. A absorvância foi monitorizada ao comprimento de onda 280 nm e registada continuamente num computador.

As fracções de interesse foram liofilizadas até à secura num liofilizador *EZ-Dry* (Kinetics).

2.6.2. Cromatografia de fase reversa

De modo a efectuar uma separação mais profunda do conteúdo das amostras de interesse, procedeu-se a uma cromatografia de fase reversa (CFR) na coluna C18 Bio-Sil 318-10 (BioRad) em sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Este sistema consistiu num termostato L-5025, num detector UV L-4000, numa bomba inteligente L-6200A e num registador de cromatogramas D2500 (Merck-Hitachi).

A coluna Bio-Sil 318-10, de dimensões 250 x 4,6 mm, é constituída por partículas de sílica microporosa com grupos octadecil (C18) ligados covalentemente; temos então que os grupos funcionais octadecil ligados à fase sólida vão estabelecer interacções hidrofóbicas mais fracas ou mais fortes com os compostos da amostra, dependendo da sua natureza.

Antes de serem aplicadas na coluna, todas as amostras analisadas foram centrifugadas a 13000 g, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Volumes de 20 µL das amostras de interesse foram aplicados à coluna, a qual foi previamente equilibrada com um gradiente linear de 0-70% (v/v) acetonitrilo em água, a um fluxo de 1,5 mL/min. A eluição do conteúdo das amostras foi feita com o mesmo gradiente e ao mesmo fluxo do equilíbrio da coluna, durante 40 minutos, tendo-se recolhido manualmente as fracções de interesse. A absorvância foi monitorizada ao comprimento de onda 215 nm e registada continuamente num registador.

As fracções de interesse foram liofilizadas até à secura num liofilizador *EZ-Dry* (Kinetics).

2.6.3. Cromatografia bidimensional de camada fina

Para caracterizar amostras de interesse, procedeu-se a uma cromatografia bidimensional de camada fina (TLC – *Thin-Layer Chromatography*) em placas de vidro revestidas com uma fina camada de sílica gel 60 (Merck No 5626).

As placas tinham uma dimensão de 100 x 100 mm e 0,25 mm de espessura, sendo que a sílica gel que revestia a placa constituía o material adsorvente, ou seja, a fase estacionária.

As amostras de interesse foram previamente liofilizadas até à secura e, posteriormente, ressuspensas em 100 µL de clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Volumes de 30 µL das amostras foram aplicados em cada placa, num ponto situado no canto inferior direito da mesma, à distância de 1 cm tanto do bordo inferior como do bordo direito (o volume aplicado foi suficiente para saturar a sílica). As placas foram colocadas numa tina de 1ª dimensão previamente saturada com um sistema de solventes composto por clorofórmio/metanol/água (65:25:4, v/v/v), de modo a que o ponto de aplicação da amostra ficasse situado no canto inferior direito da placa. Quando a frente do solvente atingiu o topo das placas, as mesmas foram retiradas da tina e deixou-se evaporar completamente o solvente das placas, sendo que o processo foi acelerado com um secador de ar frio. De seguida, as placas foram colocadas numa tina de 2ª dimensão previamente saturada com um sistema de solventes composto por clorofórmio/ácido acético/metanol/água (80:15:12:4 v/v/v/v), de modo a que, desta vez, o ponto de aplicação da amostra ficasse situado no canto inferior esquerdo da placa. Novamente, quando a frente do solvente atingiu o topo das placas, as mesmas foram retiradas da tina e deixou-se evaporar completamente o solvente das placas, sendo que o processo foi acelerado com um secador de ar frio. Posteriormente, revelaram-se os lípidos polares das placas com corantes específicos para diferentes tipos de lípidos, nomeadamente aminolípidos, glicolípidos, fosfolípidos e lípidos totais.

2.6.3.1. Revelação dos cromatogramas

a) Fosfolípidos

Os fosfolípidos foram revelados por pulverização das placas de sílica com o reagente azul de molibdénio-ácido sulfúrico (Dittmer & Lester, 1964). Em caso positivo, os fosfolípidos aparecem como manchas azuis sobre o fundo branco da sílica.

b) Aminolípidos

Os lípidos com grupos amina livres foram revelados nas placas de sílica com o reagente ninidrina, após aquecimento das placas numa estufa a 120°C durante 5 minutos. Em caso positivo, os aminolípidos aparecem como manchas vermelho-lilás sobre o fundo branco da sílica.

c) Glicolípidos

Os glicolípidos foram revelados nas placas utilizadas anteriormente para revelação dos aminolípidos, com o reagente α -naftol- H_2SO_4 (Jacin & Mishkin, 1965), após aquecimento das placas numa estufa a 120°C durante 5 minutos. Em caso positivo, os glicolípidos aparecem como manchas púrpuro-acastanhadas sobre um fundo rosado.

d) Lípidos Totais

Os lípidos polares totais foram revelados na placa de sílica com uma solução aquosa de ácido molibdofosfórico a 5% (v/v) em etanol absoluto, após aquecimento das placas numa estufa a 160°C durante 20 minutos. Em caso positivo, os lípidos polares totais aparecem como manchas pretas sobre um fundo amarelo; quando

necessário, removeu-se a cor amarela de fundo colocando a placa sob uma atmosfera de amónia num exsiccador.

2.6.3.2. Extracção de fracções lipídicas

Apenas foram extraídos as fracções lipídicas polares reveladas na placa dos aminolípidos e dos glicolípidos.

Assim sendo, a sílica de cada mancha vermelho-lilás das respectivas placas foi raspada cuidadosamente com uma espátula e recolhida para tubos de centrífuga de vidro de 30 mL de volume (um tubo por mancha). Os aminolípidos foram extraídos da sílica por adição de 15 mL de uma solução de clorofórmio/metanol/água (45:45:10, v/v/v), sendo que a mistura foi agitada num agitador magnético a 500 rpm, durante 10 minutos, e centrifugada a 2000 g, durante 2 minutos, para sedimentação da sílica. Recolheu-se o sobrenadante para um tubo de vidro de 30 mL de volume com tampa de rosca e vedante de teflon e procedeu-se, mais uma vez, à extracção do sedimento de sílica com 10 mL da solução usada anteriormente. Ao sobrenadante total, adicionaram-se 5 mL de solução KCl 0,5 M e, após agitação manual vigorosa, centrifugou-se esta emulsão a 2000 g, durante 5 minutos, de modo a obter uma completa separação de fases. Finalmente, a fase aquosa foi removida e a fase orgânica foi evaporada até à secura num evaporador rotativo *Heidolph VV2000* (Heidolph).

2.7. Ensaio Antimicrobianos

Para determinar se as amostras de interesse tinham actividade antimicrobiana, foram realizados ensaios de inibição do crescimento de uma gama de bactérias e leveduras patogénicas. Esses ensaios foram realizados por difusão em discos (Ngai & Ng, 2004; Kim *et al.*, 2005; Wesierska *et al.*, 2005; Satheesh & Murugan, 2011).

As bactérias utilizadas foram *Escherichia coli* (DH5- α), e *Staphylococcus aureus* (subsp. *anaerobius* ATCC 35844), ambas fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto do Mar de Coimbra. As leveduras utilizadas foram *Candida albicans*

(YP0037) e *Saccharomyces cerevisiae* (YP0907), ambas da Coleção de Leveduras Patogénicas da Universidade de Coimbra. Dois dias antes de serem efectuados os ensaios, as bactérias foram crescidas em placas de NA estéril (Nutrient Agar – 0,3% NaCl pH 6; 0,5% peptona; 0,5% extracto de levedura; 1,5% agar) a 37°C *overnight*; as leveduras foram crescidas em placas de agar YPD estéril (Yeast Peptone Dextrose – 0,5% extracto de levedura; 1% bacto-peptona; 2% glucose; 2% agar) a 30°C *overnight*.

Os ensaios com as bactérias foram realizados à chama, na bancada, em placas de Petri estéreis (90 mm x 15 mm) com meio NA estéril. Foi efectuada uma suspensão das bactérias em 0,9% NaCl estéril ($DO_{600\text{ nm}} = 0,4$) e cada placa foi espalhada com 100 µL dessa suspensão. De seguida, foram aplicados discos de filtros brancos estéreis (0,62 cm de diâmetro) no agar, aos quais se aplicaram diferentes volumes das amostras de interesse. Foram também efectuados dois discos controlos em cada placa: um disco sem nada e um disco apenas com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h.

Os ensaios com as leveduras foram realizados à chama, na câmara de fluxo, em placas de Petri estéreis (90 mm x 15 mm) com meio agar YNB estéril (BD Difco™ Yeast Nitrogen Base). Foi efectuada uma suspensão das leveduras em 0,9% NaCl estéril ($DO_{600\text{ nm}} = 0,2$) e cada placa foi espalhada com 100 µL dessa suspensão. De seguida, foram aplicados discos de filtros brancos estéreis (0,62 cm de diâmetro) no agar, aos quais se aplicaram diferentes volumes das amostras de interesse. Foram também efectuados dois discos controlos em cada placa, iguais aos descritos para os ensaios com as bactérias. As placas foram incubadas a 30°C durante 48h.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

3.1. Extracção da actividade inibitória de sementes de *C. cardunculus* L.

Os inibidores de proteinases em plantas encontram-se em grandes quantidades nos órgãos de reserva das mesmas, como as sementes (De Leo *et al.*, 2002). As suas funções nesses órgãos prendem-se com a regulação de proteinases endógenas e com a protecção contra insectos e agentes fitopatogénicos (Habib & Fazili, 2007).

Visto que o objectivo principal deste trabalho é a identificação e caracterização de inibidores de proteinases aspárticas em sementes de *C. cardunculus* L., pelo que é essencial que o processo de extracção seja eficiente na libertação de todas as moléculas.

Inicialmente foram testadas diferentes abordagens de extracção, nomeadamente:

- trituração manual (com azoto líquido) VS. trituração mecânica das sementes;
- tampão de extracção 100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl VS. 50 mM acetato de sódio pH 4,5, 200 mM NaCl;
- tratamento do extracto total com carvão activado, para remoção dos pigmentos (Kumar & Parrack, 2003);
- adição de polivinilpirrolidona (PVP) ao extracto total, para captação de fenóis contaminantes (Loomis & Battaile, 1966; Andersen & Somers, 1968);
- desnaturação térmica do extracto total a diferentes temperaturas e durante diferentes tempos.

Todas as variações de extracto foram analisadas por SDS-PAGE 15%, Tricina-SDS-PAGE 16% e ensaios de inibição enzimática, e também quantificadas pelo método *BioRad Protein Assay*. Na Figura 6 estão representados os resultados do SDS-PAGE 15% e dos ensaios de inibição enzimática para o extracto obtido por trituração manual das sementes e homogeneização em tampão 100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl.

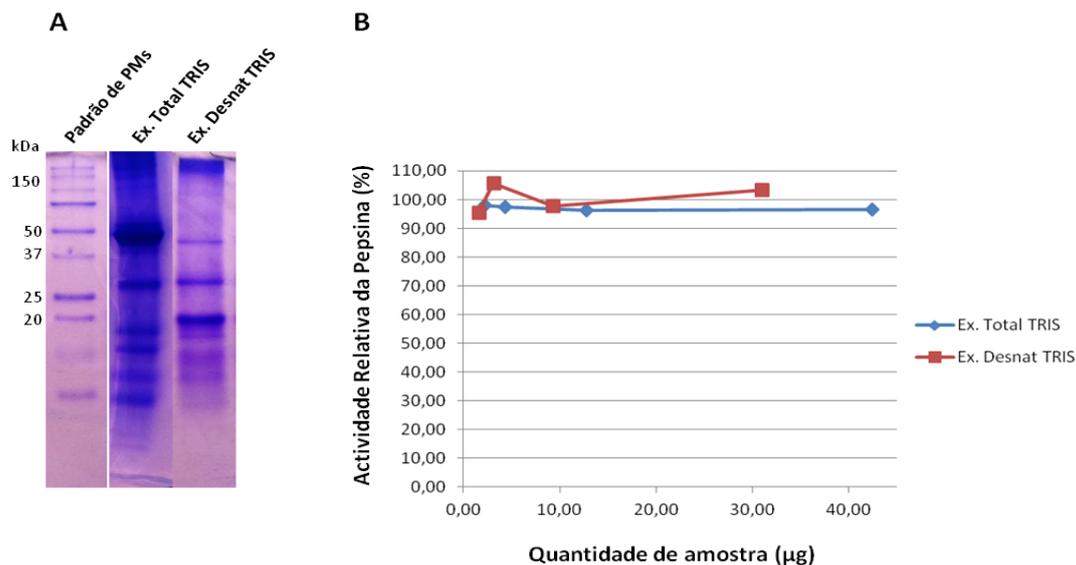


Figura 6 - A – Perfil proteico em SDS-PAGE 15% dos extractos total (8,48 µg) e desnaturado (6,2 µg), de sementes de *C. cardunculus* L. trituradas manualmente com posterior homogeneização em tampão 100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl. Os géis foram revelados com Coomassie Brilliant Blue R-250. B - Actividade proteolítica relativa da pepsina (%) contra o substrato peptídico na presença de diferentes quantidades dos extractos total e desnaturado. O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica da pepsina contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.4 dos Materiais e Métodos.

Como se pode observar pela Figura X, os extractos de sementes com tampão 100 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl apresentam um perfil proteico com várias bandas de diferentes pesos moleculares. No entanto, estes extractos não apresentam qualquer actividade inibitória contra a PA pepsina. Assim sendo, a extracção do conteúdo das sementes com este tampão foi descartada.

Apesar de não serem apresentados os resultados para as restantes abordagens de extracção, esses resultados não foram os desejáveis em termos de inibição da actividade proteolítica da pepsina.

Assim sendo, com base em toda a optimização prévia efectuada e respectivos resultados, chegou-se à abordagem final de extracção. Assim sendo, a trituração das sementes foi efectuada num moinho mecânico, para se obter um rebenamento o mais eficaz possível do tecido de revestimento, de forma a libertar todo o conteúdo presente. As sementes foram utilizadas secas e desidratadas para se extrair o seu conteúdo na fase de dormência e não na fase de germinação. Posteriormente, a massa de sementes obtida por trituração foi homogeneizada em tampão 50 mM acetato de

sódio pH 4,5, 200 mM cloreto de sódio, obtendo-se o extracto total. A escolha deste tampão prendeu-se com não só com o facto de queremos extrair inibidores de proteinases aspárticas, as quais estão activas a pH ácido, mas também com os ensaios de inibição enzimática obtidos para os extractos com este tampão. Uma vez que os inibidores de proteinases descritos na literatura são termoestáveis (Kim *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2012), procedeu-se a uma primeira separação por desnaturação térmica do extracto total, obtendo-se o extracto desnaturado.

3.2. Análise do conteúdo proteico dos extractos de sementes

Após a obtenção dos extractos de sementes de *C. cardunculus* L., estes foram analisados em termos de conteúdo proteico através de um gel SDS-PAGE 15% (Figura 7A) e de um gel Tricina-SDS-PAGE 16% (Figura 7B). A técnica de Tricina-SDS-PAGE é comumente utilizada para separar péptidos ou proteínas inferiores a 30 kDa, uma vez que a separação destas moléculas pelo método de SDS-PAGE tradicional não apresenta uma grande resolução de separação de pequenos péptidos e proteínas (Schagger, 2006). Assim sendo, optou-se por correr os dois tipos de géis para cobrir uma gama de pesos moleculares (PMs) dos mais elevados aos mais baixos.

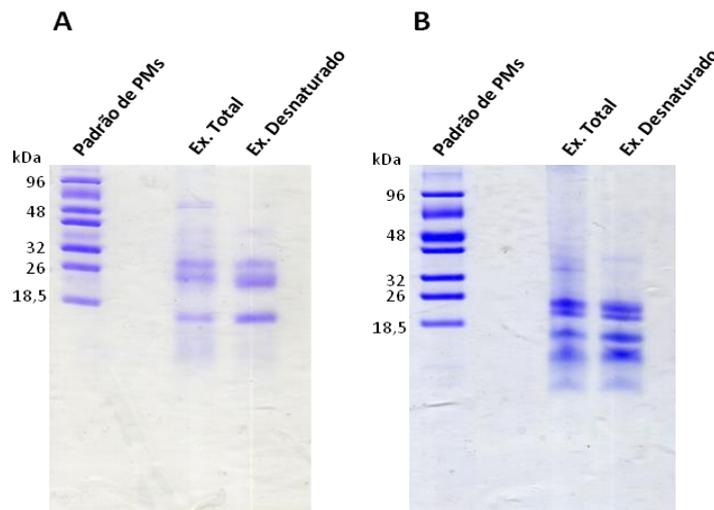


Figura 7 – Perfil proteico em SDS-PAGE 15% (A) e Tricina-SDS-PAGE 16% (B) dos extractos total e desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L. Poço 1 – Padrão de pesos moleculares em kDa (NZYtech); Poço 2 – Extracto total (3,95 µg); Poço 3 – Extracto desnaturado (2,86 µg). Os géis foram revelados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Como se pode observar pela Figura 7, o extracto total apresenta bandas proteicas definidas maioritariamente de baixo PM (abaixo de 30 kDa) e uma banda mais difusa de cerca de 60 kDa, sendo que, após tratamento térmico desse extracto para obtenção do extracto desnaturado, a maior parte das bandas de baixo PM mantém-se mas a banda de 60 kDa desaparece. No gel de Tricina-SDS-PAGE é possível visualizar algumas bandas adicionais abaixo de 18,5 kDa, tanto no extracto total como no desnaturado, que não são visíveis no gel de SDS-PAGE, devido à maior definição de separação de pequenas proteínas pelo primeiro gel.

Também se pode observar que, à primeira vista, o extracto de sementes de *C. cardunculus* L. apresenta pouca quantidade de proteína, o que foi confirmado na quantificação proteica pelo método *Bio-Rad Protein Assay*. Esta pouca quantidade pode ser devido ao facto de estarmos a extrair o material das sementes a pH ácido, o que confere alguma instabilidade à maior parte das moléculas proteicas. Assim sendo, só o material mais estável a pH 4,5 é que vai prevalecer em solução.

3.3. Análise da actividade proteolítica dos extractos de sementes

O passo seguinte deste projecto consistiu na avaliação da actividade proteolítica presente nos extractos total e desnaturado. Para isso, primeiramente foi efectuada uma zimografia (Figura 8), a qual se baseia num gel de poliacrilamida com SDS no qual está co-polimerizado um substrato de enzimas, neste caso gelatina, que é degradado, durante o tempo de incubação, pelas enzimas presentes na amostra aplicada. Após a remoção do SDS as proteases deixam de estar inactivadas no gel, pelo que conseguem exercer actividade proteolítica no substrato co-polimerizado. A coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250 revela os locais de proteólise como bandas brancas sobre um fundo azul-escuro.

Esta técnica é rápida e simples, o que nos permite ter uma primeira impressão sobre a presença de proteases numa amostra. O substrato co-polimerizado no gel foi a gelatina, pelo que, apesar de qualquer protease poder clivar esse substrato, esta

técnica com este substrato tem maior afinidade por metaloproteinases (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005).

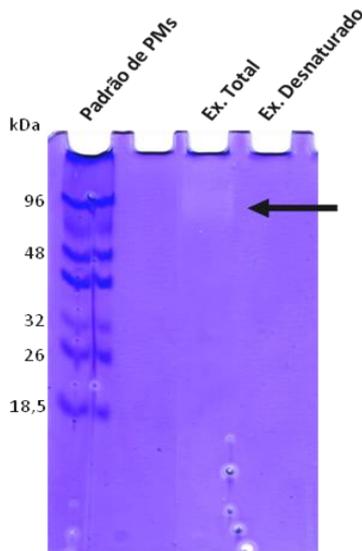


Figura 8 – Actividade proteolítica em zimografia dos extractos total e desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L. Poço 1 – Padrão de pesos moleculares em kDa (NZYtech); Poço 2 – Extracto total (10 μ L); Poço 3 – Extracto desnaturado (10 μ L). As bandas de proteólise foram reveladas por coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Como se pode observar pela Figura 8, o extracto total apresenta uma banda branca (seta preta) de cerca de 90 kDa, o que indica a presença de uma protease com este peso molecular no extracto total. Já no extracto desnaturado esta banda não está presente, o que indica que a protease ou é perdida ou perde actividade no passo de tratamento térmico do extracto total. Esta banda de cerca de 90 kDa não aparece no SDS-PAGE em 3.1.

Foram também realizados ensaios enzimáticos dos extractos total e desnaturado. Esses ensaios tiveram dois objectivos: avaliar a actividade proteolítica intrínseca dos extractos e avaliar a actividade inibitória dos mesmos contra a pepsina, a PA modelo. O substrato utilizado foi o péptido (MOCA-Lys)Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu(Lys-DNP), um substrato específico e sintético de PAs, pelo que temos uma metodologia mais específica para PAs do que a zimografia. Todos os ensaios foram realizados em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, pois as PAs são activas a pH ácido. A actividade enzimática foi medida conforme descrito nas secções 2.5.3 e 2.5.4 de Material e Métodos.

Os ensaios de actividade proteolítica foram realizados com os extractos na presença do substrato peptídico, de modo a averiguar se os mesmos contêm PAs que clivam o substrato. Os ensaios de inibição da actividade proteolítica foram realizados

com os extractos na presença da pepsina e do substrato peptídico, de modo a averiguar se a enzima é inibida pelos extractos (Figura 9).

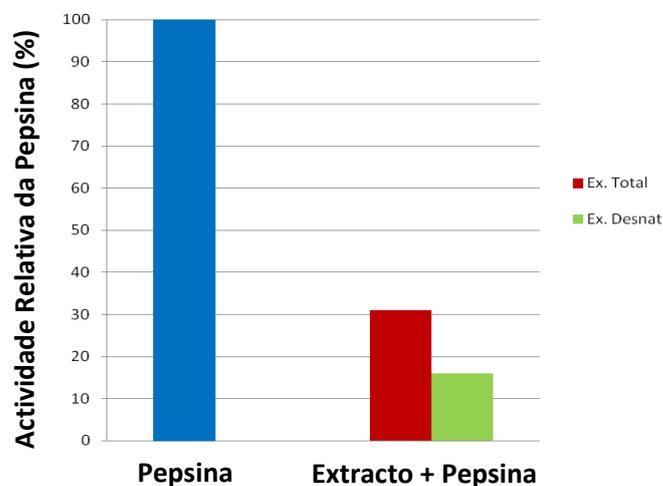


Figura 9 – Actividade proteolítica relativa da pepsina (%) contra o substrato peptídico na presença dos extractos total e desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L. O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica da pepsina contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios consistiram na pepsina na presença dos extractos total (19,7 µg) e desnaturado (14,3 µg), com posterior adição do substrato. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.4 dos Materiais e Métodos (n=3).

Em termos de actividade proteolítica intrínseca, apenas o extracto total demonstrou ter alguma actividade, mas menor que a pepsina, o que indica a presença de PAs que degradam o substrato peptídico. Este resultado está de acordo com a literatura que descreve a presença das PAs cardosinas em sementes de *C. cardunculus* (Pissara *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). O facto de o extracto desnaturado não apresentar actividade proteolítica indica que o mesmo não contém PAs ou que as mesmas foram inactivadas pelo passo de tratamento térmico do extracto total.

Em termos de actividade inibitória (Figura 9), os extractos inibem significativamente a actividade proteolítica da pepsina, com o extracto desnaturado a apresentar uma inibição maior que o total. Este resultado pode indicar a presença de inibidores de PAs nos extractos de sementes de *C. cardunculus* L.

Com o objectivo de avaliar a extensão da inibição dos extractos contra a pepsina, procedeu-se a ensaios de inibição enzimática com diferentes quantidades de

amostra, a fim de contruir uma curva dose-resposta (Figura 10). A actividade enzimática foi medida conforme descrito na secção 2.5.4 de Materiais e Métodos.

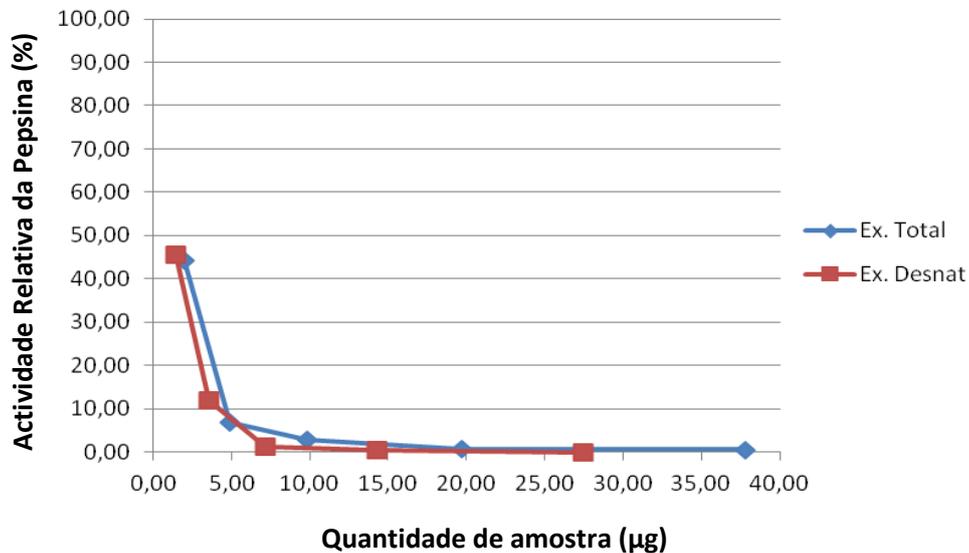


Figura 10 – Actividade proteolítica relativa da pepsina (%) contra o substrato peptídico na presença de diferentes quantidades dos extractos total e desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L. O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica da pepsina contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios consistiram na pepsina na presença de diferentes quantidades dos extractos total e desnaturado, com posterior adição do substrato. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.3 dos Materiais e Métodos (n=2).

Os resultados apresentados na Figura 10 mostram que à medida que aumentamos a quantidade de extracto no ensaio, tanto total como desnaturado, menor é a actividade relativa da pepsina contra o substrato peptídico. De notar que, com menos de 2 µg de extractos, obteve-se uma inibição de cerca de 55%.

Assim sendo, tudo indica que, efectivamente, existem inibidores de PAs nos extractos de sementes de *C. cardunculus* L. Para além disso, esses inibidores são termoestáveis, pois a diferença de actividade relativa da pepsina entre o extracto total e o desnaturado não é significativa.

De modo a detectar a presença de inibidores proteicos de PAs nos extractos total e desnaturado, procedeu-se à técnica de zimografia reversa (resultado não apresentado). Esta técnica é uma maneira rápida e simples de identificar inibidores proteicos contra uma protease alvo. Primeiramente ocorre a separação das amostras proteicas num gel de poliacrilamida com SDS no qual está co-polimerizado um

substrato de enzimas, neste caso gelatina; após a electroforese, a lavagem e incubação do gel com uma solução da protease alvo, neste caso pepsina, permite que a gelatina co-polimerizada no gel seja digerida. O substrato não digerido permanece nos locais onde os IPs estão presentes, locais esses que aparecem como bandas azuis-escuras sobre um fundo mais claro (Le & Katunuma, 2004). A corrida electroforética do gel efectua-se num sistema tampão de Tris-Tricina pois este sistema permite uma melhor separação e resolução de péptidos e proteínas de baixos PMs (Schagger & Jagow, 1987).

As zimografias reversas efectuadas com os extractos total (1,97 µg) e desnaturado (1,43 µg) e incubadas com diferentes concentrações de pepsina não revelaram qualquer tipo de banda. Este resultado pode ter vários significados: ou os IPs proteicos estão presentes em muito pouca quantidade nos extractos, não sendo detectados por esta metodologia; ou esses inibidores são péptidos demasiado pequenos para serem separados e detectados por este método; ou os inibidores não são de natureza proteica, pelo que não os vamos observar no gel.

3.4. Purificação das fracções inibitórias do extracto de sementes

Uma vez que o extracto de sementes de *C. cardunculus* L. apresenta capacidade inibitória de PAs, procedeu-se a uma separação do conteúdo do extracto desnaturado por CEM numa coluna Sephadex G-50 (300 x 26 mm), em sistema FPLC (Figura 11). A eluição do conteúdo do extracto foi realizada conforme descrito na secção 2.6.1 de Material e Métodos.

Como se pode observar pela Figura 11, obteve-se uma pobre separação com co-eluição de fracções à absorvância de 280 nm. Verificaram-se três picos de absorvância (A a C), com o pico maioritário (B) a apresentar uma ligeira lomba na zona descendente.

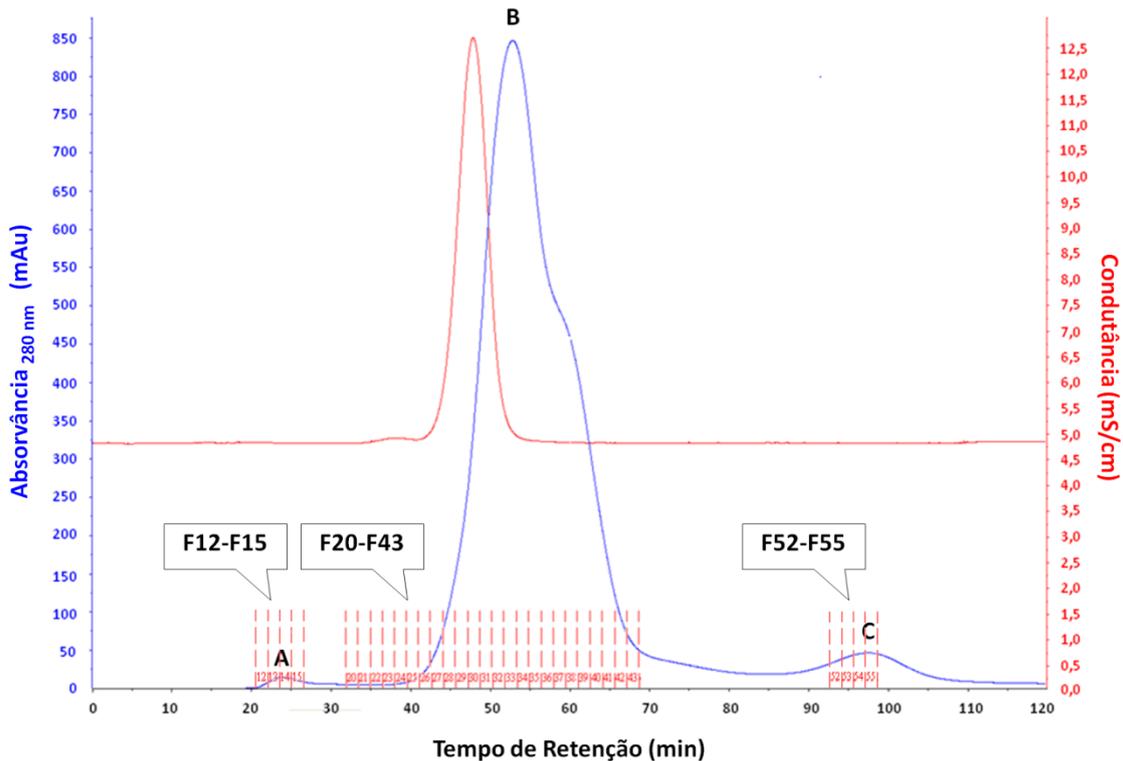


Figura 11 – Cromatograma da CEM, em sistema FPLC, do extracto desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L. Um volume de 2,5 mL do extracto desnaturado foi aplicado à coluna Sephadex G-50 (300 x 26 mm), a qual foi previamente equilibrada com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5 a um fluxo de 1,0 mL/min. A eluição do conteúdo do extracto desnaturado foi feita com o mesmo tampão e ao mesmo fluxo do equilíbrio da coluna, durante 120 minutos, tendo-se recolhido fracções (F) de 1,5 mL cada.

Todas as fracções recolhidas ao longo dos 120 minutos da cromatografia foram analisadas para actividade inibitória contra a pepsina através de ensaios de inibição enzimática, conforme descrito na secção 2.5.4 de Material e Métodos.

Na Figura 12 estão representados os resultados desses ensaios para as fracções 12 a 15 (Pico A), 20 a 43 (Pico B) e 52 a 55 (Pico C). Como se pode observar, apenas as fracções 20 a 43 (Pico B) apresentaram uma inibição significativa da actividade proteolítica da pepsina. Dentro dessas, as fracções 30 a 34 foram as que apresentaram maior taxa de inibição, cerca de 60 a 70%.

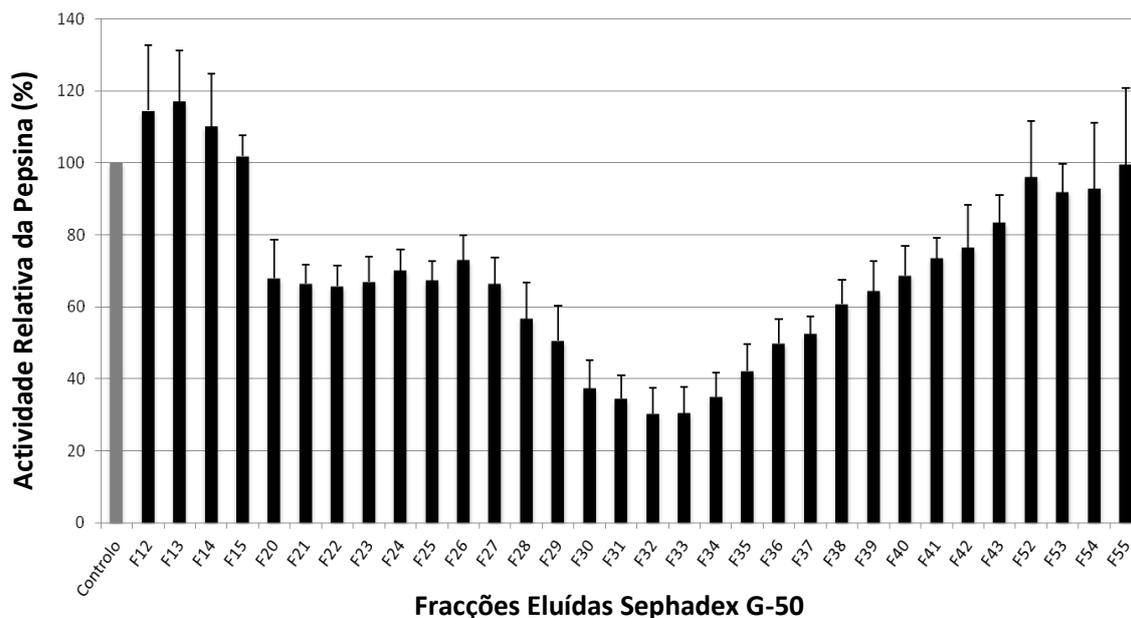


Figura 12 – Actividade proteolítica relativa da pepsina (%) contra o substrato peptídico na presença das fracções eluídas da CEM em Sephadex G-50 (300 x 26 mm). O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica da pepsina contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios consistiram na pepsina na presença das diferentes fracções eluídas da CEM, com posterior adição do substrato. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.3 dos Materiais e Métodos (n=10).

Foi também analisado o perfil proteico das fracções eluídas na CEM, por SDS-PAGE 15% e por Tricina-SDS-PAGE 16%, sendo que apenas são mostrados os resultados para as fracções 27 à 35 (Figura 13).

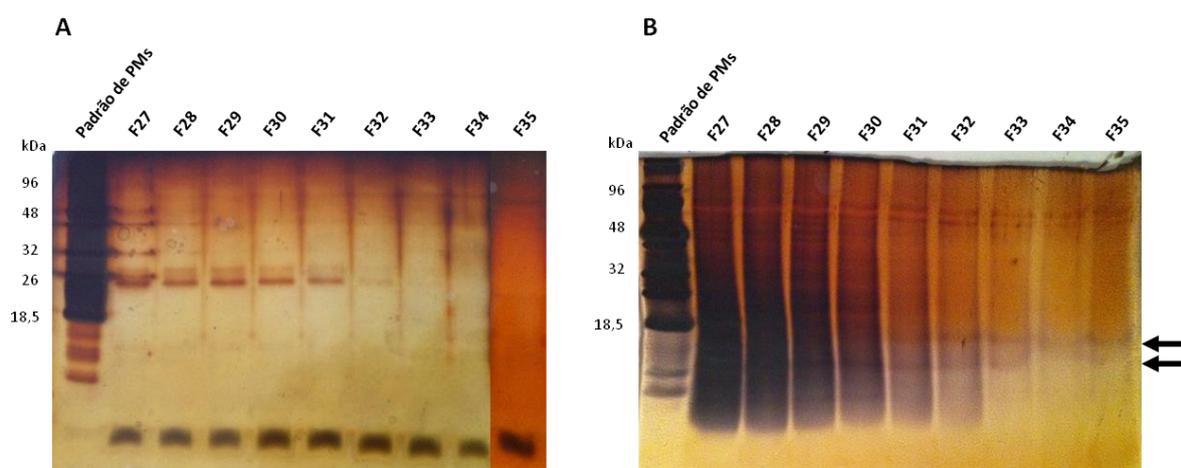


Figura 13 - Perfil proteico em SDS-PAGE 15% (A) e Tricina-SDS-PAGE 16% (B) das fracções 27 à 35 eluídas da CEM em Sephadex G-50. Poço 1 – Padrão de pesos moleculares em kDa (NZYtech); Poço 2-18 – Fracções 27 a 35 (20 µL) eluídas da CEM. Os géis foram revelados com Nitrato de Prata.

No gel de SDS-PAGE (Figura 13A) podemos observar uma única banda de cerca de 26 kDa que, à medida que avançamos na eluição da coluna de CEM, torna-se cada vez menos intensa, de tal maneira que a partir da fracção 32 já não é visível. No gel de Tricina-SDS-PAGE (Figura 13B), apesar de as fracções 27 a 29 estarem de tal forma coradas que praticamente não é possível distinguir bandas nítidas, nota-se a perda, ao longo da eluição, de duas bandas abaixo dos 18,5 kDa (setas pretas). Temos então uma correlação inversamente proporcional entre a actividade inibitória das fracções eluídas da CEM e a presença de bandas no seu perfil proteico, pois as fracções 30 a 34 são as que apresentam maior actividade inibitória contra pepsina e menor presença detectável de proteínas. Este resultado é corroborado pela quantificação de proteína total das fracções 30 a 34, que apresentaram uma quantidade praticamente nula de proteína pelo método *BioRad Protein Assay*.

Assim sendo, duas são as hipóteses principais para a natureza das moléculas responsáveis pela inibição da pepsina, por parte das fracções 30 a 34. A primeira hipótese é que essas moléculas inibitórias são péptidos extremamente pequenos, constituídos maioritariamente por resíduos aromáticos, devido à elevada absorvância a 280 nm. A segunda hipótese é que as moléculas inibitórias não são de natureza proteica, o que será discutido mais à frente neste trabalho. Ambas as hipóteses justificam o porquê de não haver detecção pelas técnicas de PAGE e pelo método de quantificação proteica utilizados.

Relativamente à primeira hipótese, vários são os estudos, embora não sejam recentes, onde é detectada a presença de di- e tripéptidos de γ -glutamil em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (Zacharius *et al.*, 1959), *Allium cepa* (Virtanen & Matikkala, 1960), *Glycine max* L. (Morris & Thompson, 1962), *Cucumis sativus* L. (Dunnill & Fowden, 1962), *Phaseolus aureus* L./ *Vigna radiata* L. (Carnegie, 1963/ Kasai *et al.*, 1985) e *Fagus sylvatica* L. (Kristensen & Larsen, 1974). Nos dipéptidos de γ -glutamil, este encontra-se normalmente ligado a resíduos de Phe, Val, Leu, Ile, Met ou Cys (Virtanen & Matikkala, 1961).

Apesar de, até à data, estes péptidos presentes em sementes não terem sido associados a uma actividade inibitória de proteinases, é possível que os mesmos consigam inibir este tipo de enzimas. Esta hipótese é baseada na literatura descrita

para pequenos péptidos sintéticos como inibidores de proteinases. Nomeadamente, aldeídos tripeptídicos como o D-Phe-Pro-Arg-H são inibidores altamente selectivos da proteinase serínica trombina (Bajusz *et al.*, 1990). Outros aldeídos peptídicos, como o Ac-Leu-Leu-Arg-H, o Ac-Phe-Gly-H e o Ac-Pro-Ala-Pro-Ala-H, inibem as proteinases serínicas plasmina e elastase e a proteinase cisteínica papaína (Aoyagi *et al.*, 1969).

Assim sendo, é possível que as moléculas inibitórias das fracções do extracto de sementes de *C. cardunculus* L. sejam pequenos péptidos que, à semelhança do que acontece para aldeídos peptídicos sintéticos, actuam como inibidores de proteinases, neste caso aspárticas. Outra hipótese é que podemos estar na presença de pequenos péptidos com um mecanismo de inibição semelhante à Pepstatina A, que é um análogo do intermediário tetraédrico de transição na catálise ácido-base utilizada pelas PAs (secção 1.1 de Introdução).

Na tentativa de purificar as moléculas responsáveis pela inibição da actividade proteolítica da pepsina, submeteram-se as fracções 30 a 34 eluídas da CEM a uma CFR numa coluna C18 Bio-Sil 318-10 (250 x 4,6 mm), em sistema HPLC (Figura 14). De forma a concentrar essas fracções, as mesmas foram liofilizadas até à secura e ressuspensas em volume adequado de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. A eluição das amostras foi realizada conforme descrito na secção 2.6.2 de Material e Métodos.

Como se pode observar pela Figura 14, existem seis picos (A-F) comuns a todas as fracções inibitórias mas com proporções distintas, de tal modo que:

- o pico A aumenta ao longo das fracções, só começando a ser visível a partir da F32;
- o pico B diminui ao longo das fracções;
- o pico C também diminui ao longo das fracções, deixando de ser visível na F34;
- os picos D e E são os que apresentam maior intensidade ao longo de todas as fracções;
- o pico F aumenta ao longo das fracções, só começando a ser visível a partir da F32.

Temos então que as fracções inibitórias 30 a 34 eluídas da CEM são maioritariamente ricas nos picos D e E e, em menor intensidade, nos picos A e F.

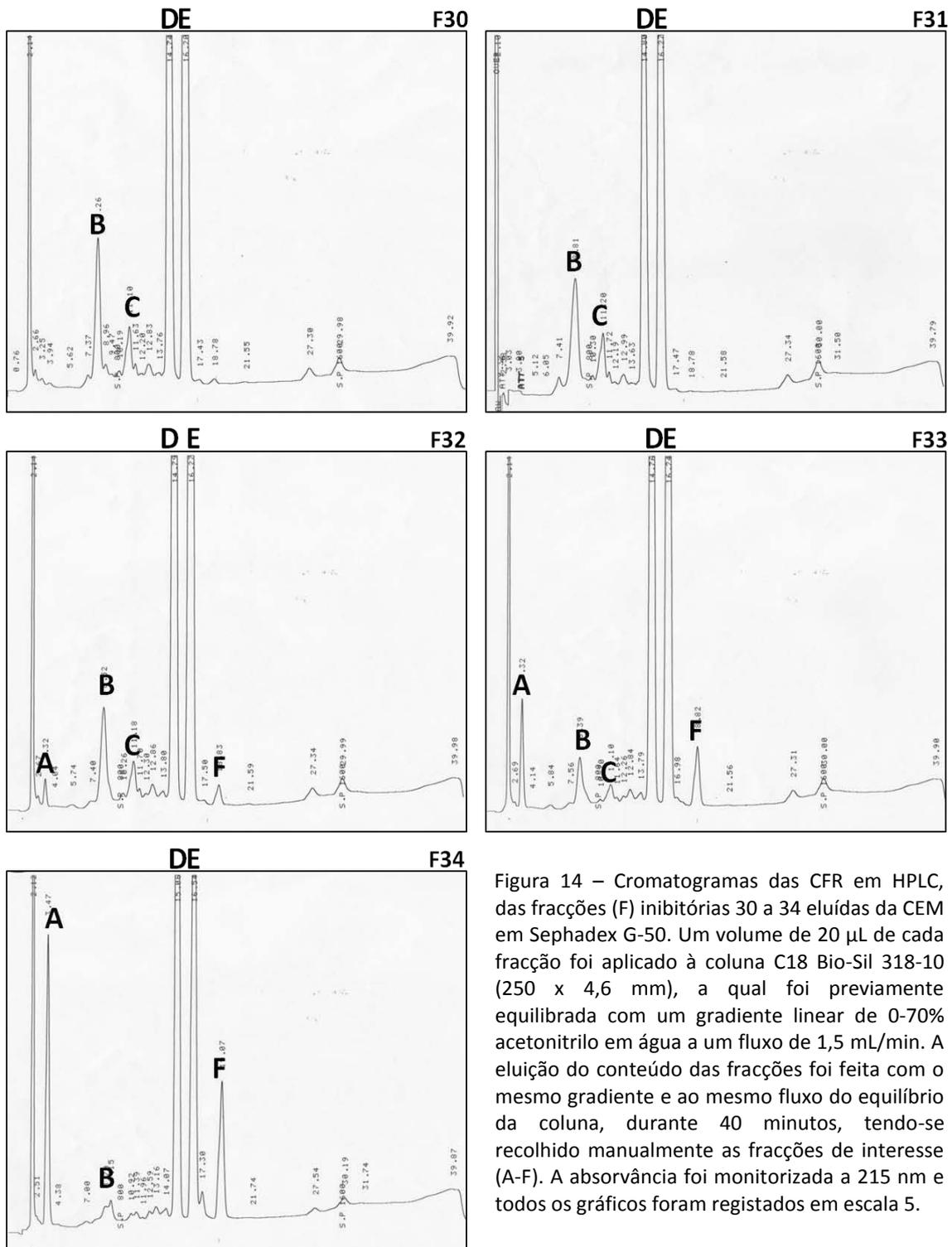


Figura 14 – Cromatogramas das CFR em HPLC, das fracções (F) inibitórias 30 a 34 eluídas da CEM em Sephadex G-50. Um volume de 20 µL de cada fracção foi aplicado à coluna C18 Bio-Sil 318-10 (250 x 4,6 mm), a qual foi previamente equilibrada com um gradiente linear de 0-70% acetonitrilo em água a um fluxo de 1,5 mL/min. A eluição do conteúdo das fracções foi feita com o mesmo gradiente e ao mesmo fluxo do equilíbrio da coluna, durante 40 minutos, tendo-se recolhido manualmente as fracções de interesse (A-F). A absorvância foi monitorizada a 215 nm e todos os gráficos foram registados em escala 5.

Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o acetonitrilo é um solvente orgânico que interfere com os ensaios enzimáticos, as fracções recolhidas na CFR foram liofilizadas até à secura e ressuspensas em volume adequado de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Estas amostras foram então quantificadas, analisadas por Tricina-SDS-PAGE 16% e avaliadas para inibição da actividade proteolítica da pepsina. A quantificação das fracções revelou, mais uma vez, uma quantidade praticamente nula de proteína total, o que é concordante com os géis de Tricina-SDS-PAGE não terem revelado qualquer fracção proteica (resultado não apresentado). Por sua vez, os ensaios enzimáticos não mostraram inibição da actividade da pepsina (Figura 15).

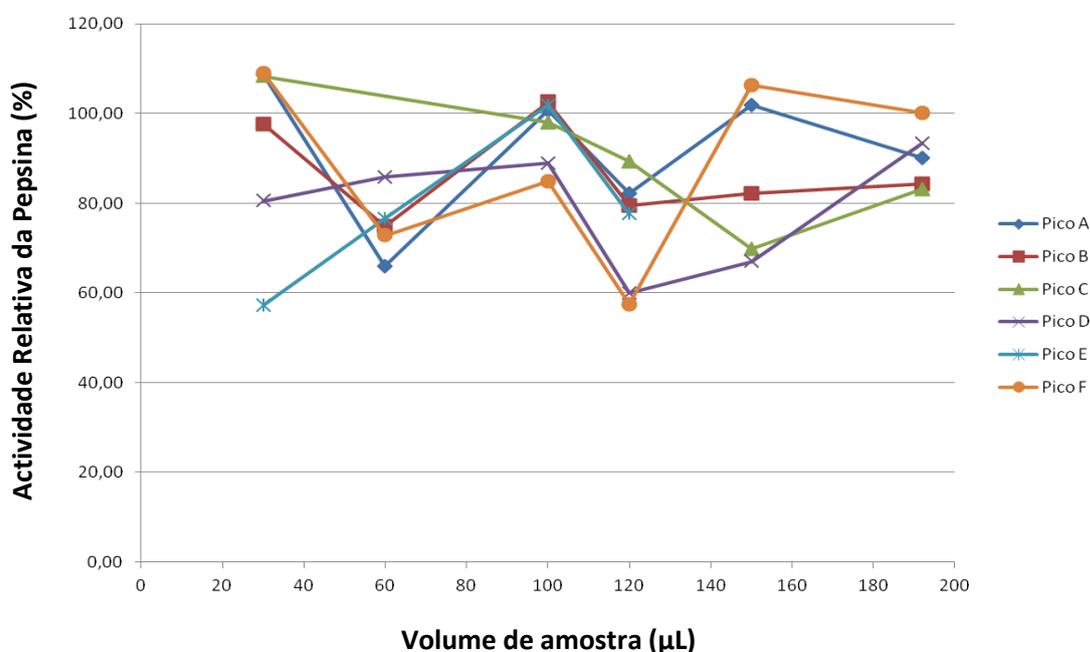


Figura 15 - Actividade proteolítica relativa da pepsina (%) contra o substrato peptídico na presença de diferentes volumes das fracções eluídas da CFR em C18BioSil 318-10 (250 x 4,6 mm). O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica da pepsina contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios consistiram na pepsina na presença de diferentes volumes das fracções eluídas da CFR, com posterior adição do substrato. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.3 dos Materiais e Métodos (n=3).

Antes de serem separadas por CFR, as fracções 30 a 34 apresentavam actividade inibitória significativa contra pepsina. No entanto, as fracções recolhidas (A-F) na CFR não apresentaram qualquer actividade inibitória, pelo que podemos ter duas explicações mais plausíveis.

No caso de as moléculas responsáveis pela inibição serem péptidos, pode ter ocorrido uma alteração conformacional dessas moléculas durante a eluição, levando à perda de actividade inibitória. Encontram-se descritos na literatura casos em que ocorre uma alteração conformacional crítica para a actividade de um inibidor, como é o caso do inibidor proteico IA₃ da proteinase aspártica YprA, conforme se encontra descrito na secção 1.2.2 de Introdução. Assumindo que as moléculas inibitórias são péptidos e que a perda de actividade inibitória ocorre devido a uma alteração conformacional crítica, então estamos a falar de péptidos com um tamanho suficiente para ter uma conformação tridimensional, mas ao mesmo tempo com um tamanho insuficiente para serem detectados pelas técnicas de PAGE e de quantificação proteica. Para além disso, estudos efectuados por Katzenstein e seus colaboradores mostraram que podem ocorrer alterações conformacionais, durante o processo de eluição, na superfície da matriz em CFR-HPLC; os mesmos investigadores chegaram ainda à conclusão que o acetonitrilo é um dos solventes que induz esse tipo de alterações (Katzenstein *et al.*, 1986).

Por outro lado, a perda de actividade das fracções inibitórias pode ter uma justificação mais simples, que é a separação do seu conteúdo. Ou seja, podemos estar a analisar componentes dessas fracções inibitórias (fracções recolhidas durante a CFR) que, por si só, não inibem as PAs mas que, quando juntos em solução, actuam de forma a inibir essas enzimas.

3.5. Caracterização das fracções inibitórias do extracto de sementes

Como já foi mencionado anteriormente, não se visualizaram bandas proteicas nos géis de Tricina-SDS-PAGE, nem para as fracções 30 a 34 eluídas da CEM, nem para as fracções recolhidas na CFR. Assim sendo, de modo a averiguar se parte do conteúdo das fracções 30 a 34 eluídas da CEM poderia ser de natureza lipídica polar, essas fracções foram sujeitas a uma TLC. A amostra aplicada nesta cromatografia consistiu então numa *pool* das fracções inibitórias 30 a 34 liofilizadas e ressuspensas em clorofórmio/metanol. Depois de corridos os cromatogramas, estes foram corados para

detectar a presença de aminolípidos, glicolípidos, fosfolípidos e lípidos totais (Figura 16).

A *pool* inibitória apresenta conteúdo de natureza lipídica, nomeadamente aminolípidos, glicolípidos e fosfolípidos. A placa dos aminolípidos corou um pequeno ponto rosa mais definido e intenso (A1), quase a meio da placa, e uma mancha rosa mais difusa (A2), perto do local de aplicação da amostra (P.A). Esta placa foi posteriormente corada para glicolípidos, tendo-se obtido um ponto roxo definido mas pouco intenso (G1), quase a meio da placa, e uma mancha roxa mais intensa (G2), perto do P.A. Os pontos A1 e G1 não estão sobrepostos na placa, estando o ponto G1 situado ligeiramente mais acima do ponto A1, pelo que temos moléculas diferentes. Já as manchas A2 e G2 estão sobrepostas na placa, o que indica uma mistura de aminolípidos e de glicolípidos. Esta sobreposição pode ter sido devido à saturação da placa, o que leva a uma migração deficiente incapaz de separar os dois tipos de moléculas. Quanto aos fosfolípidos, estes revelaram-se como duas manchas azuis pouco intensas (F1 e F2), perto do canto superior esquerdo.

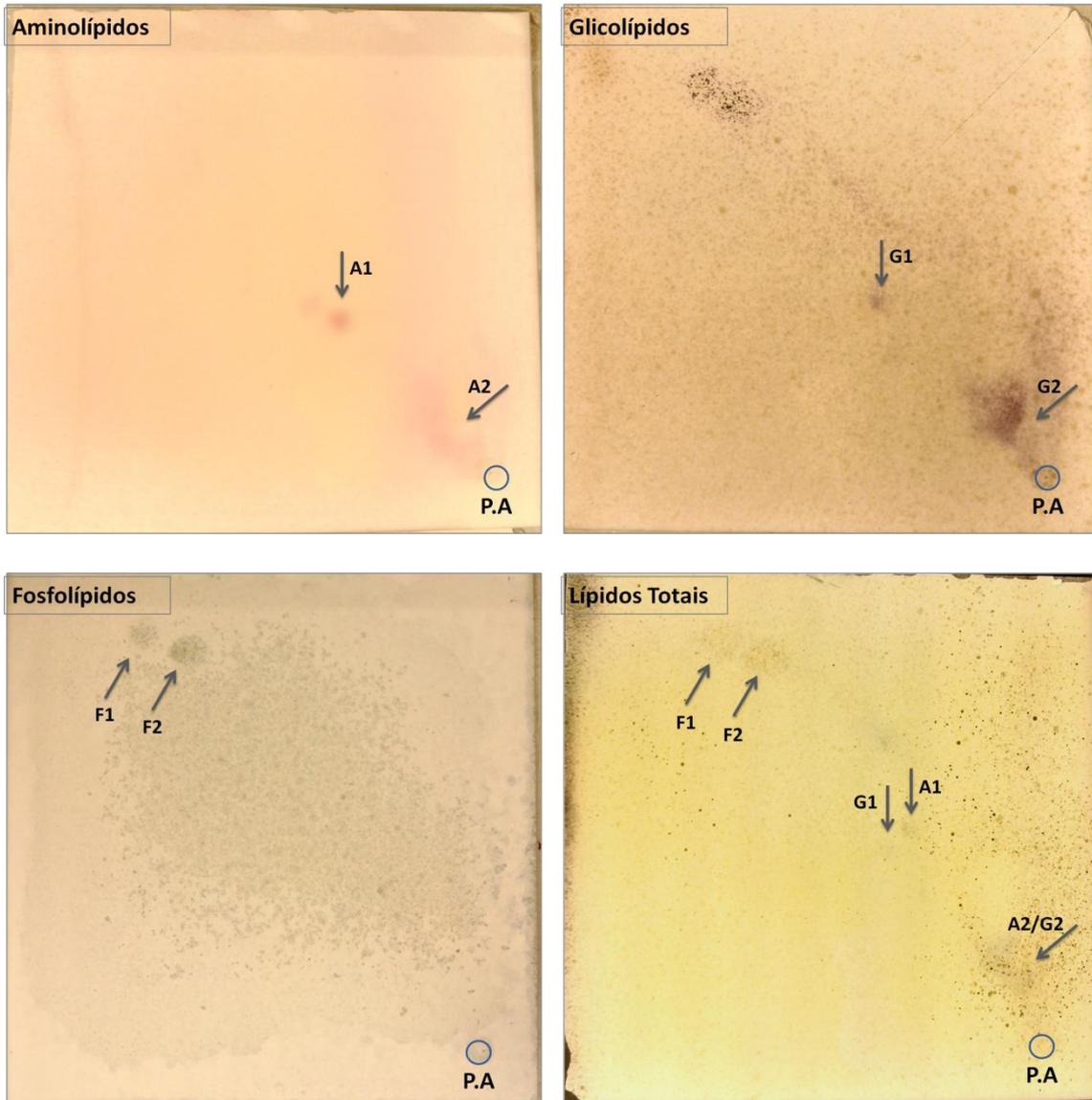


Figura 16 – Cromatogramas da TLC da *pool* inibitória F30-F34. Foram utilizadas 3 placas revestidas com sílica, tendo sido aplicados 30 μ L de amostra/placa, num ponto situado no canto inferior direito da mesma (P.A). As placas foram coradas para aminolípidos (A1 e A2), glicolípidos (G1 e G2), fosfolípidos (F1 e F2) e lípidos totais, sendo que os dois primeiros foram corados na mesma placa. As cromatografias foram efectuadas conforme descrito na secção 2.6.3 dos Materiais e Métodos (n=5).

Para posterior análise por CFR em HPLC, foram extraídas as fracções lipídicas A1 e G2 da sílica das placas, conforme descrito na secção 2.6.3.2 dos Materiais e Métodos. O material seco foi solubilizado em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, no entanto, verificou-se que nem todo o material solubilizou neste tampão, pelo que foi utilizado o solvente orgânico metanol.

Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram então sujeitas a CFR numa coluna C18 Bio-Sil 318-10 (250 x 4,6 mm) em HPLC (Figura 17). A eluição das amostras foi realizada durante 40 minutos por um gradiente linear de 0-70% acetonitrilo em água. As fracções recolhidas nesta cromatografia foram congeladas a -80°C para estudos posteriores, que já não estarão descritos neste documento.

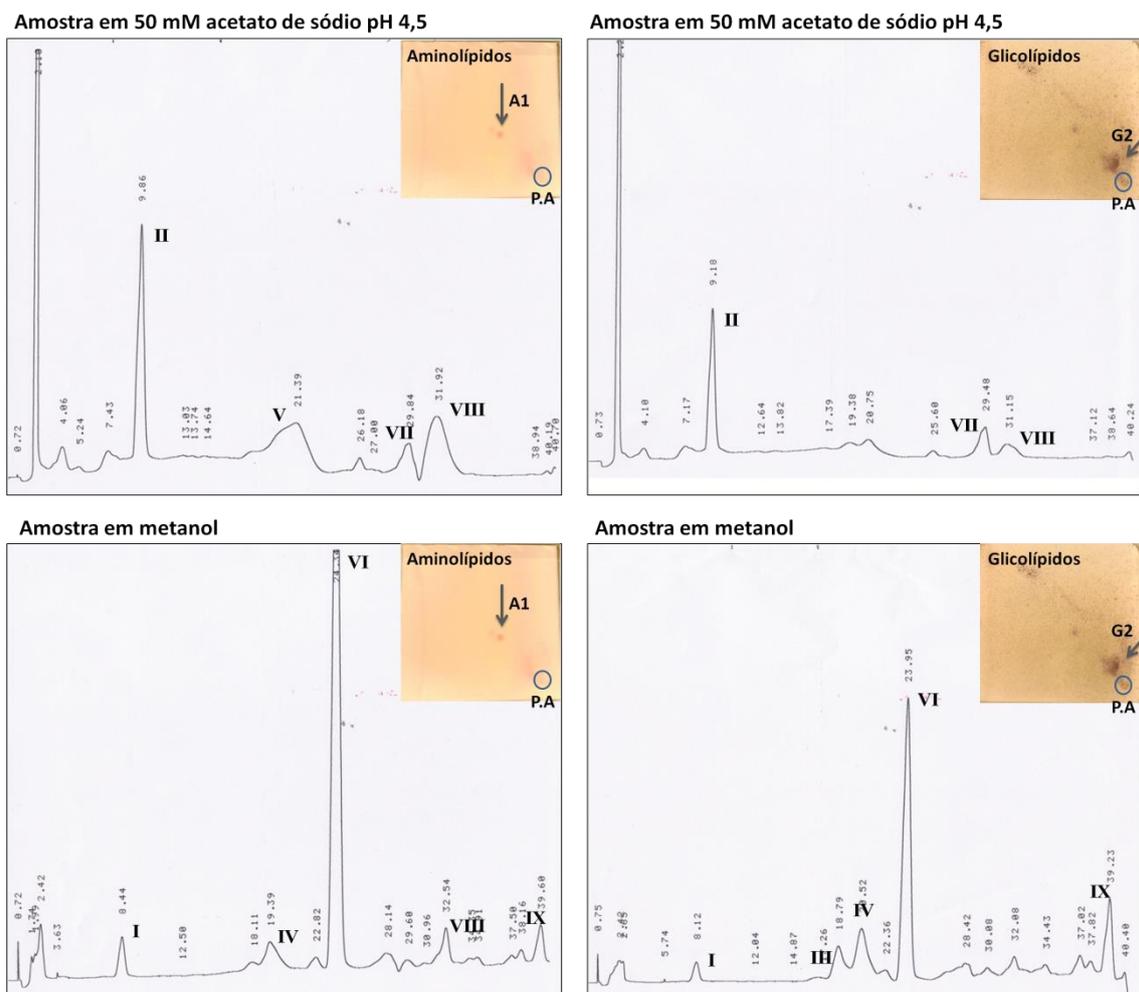


Figura 17 – Cromatogramas das CFR em HPLC das fracções aminolípídica (A1) e glicolípídica (G2) da *pool* inibitória, em solvente aquoso 50 mM acetato de sódio pH 4,5 e em solvente orgânico metanol. Um volume de 20 µL de cada fracção lipídica foi aplicado à coluna C18 Bio-Sil 318-10 (250 x 4,6 mm), a qual foi previamente equilibrada com um gradiente linear de 70% acetonitrilo em água a um fluxo de 1,5 mL/min. A eluição do conteúdo das fracções foi feita com o mesmo gradiente e ao mesmo fluxo do equilíbrio da coluna, durante 40 minutos, tendo-se recolhido manualmente as fracções de interesse (I a IX). A absorvância foi monitorizada a 215 nm e todos os gráficos foram registados em escala 4 (n=2).

Como se pode observar pela Figura 17, existe uma diferença significativa entre o perfil cromatográfico da mesma fracção lipídica nos dois solventes. Já o perfil das duas

fracções lipídicas no mesmo solvente não difere muito, apresentando picos comuns mas com intensidades distintas.

A fracção A1 em solvente aquoso apresenta o pico I como pico maioritário bem definido, e três picos menores V, VII e VIII. A fracção G2 em solvente aquoso apresenta os mesmos picos que a fracção A1, apenas com menor intensidade.

A fracção A1 em solvente orgânico apresenta uma troca de pico maioritário para o pico VI, bem definido e muito intenso, e uma série de picos menores em que se destacam o I, IV, VIII e IX. A fracção G2 também em solvente orgânico apresenta um perfil semelhante à fracção A1, com o mesmo pico maioritário VI e os picos menores I, III, IV e IX.

Vimos anteriormente que os cromatogramas da CFR efectuada para as fracções inibitórias 30 a 34 eluídas da CEM apresentaram, entre outros, os picos B e F (Figura 14). Nos cromatogramas da CFR das fracções lipídicas nos dois solventes, o pico I é o equivalente do pico B; no solvente orgânico, o pico IV é o equivalente do pico F. Temos então que uma parte do conteúdo das fracções inibitórias contra pepsina é de natureza lipídica.

O pico VI presente nas fracções lipídicas em metanol apresenta uma elevada intensidade de absorvância, principalmente na fracção A1. É possível que este pico possa corresponder aos picos D e F dos cromatogramas da CFR efectuada para as fracções inibitórias eluídas da CEM (Figura 14). Uma vez que os solventes orgânicos tornam a amostra mais hidrofóbica, pode ser necessário uma fase móvel mais hidrofóbica para conseguir eluir as moléculas que estão mais fortemente ligadas à coluna, daí o maior tempo de retenção na mesma.

Na secção 3.4 foram mencionadas duas hipóteses principais para a natureza das moléculas responsáveis pela inibição da pepsina, por parte das fracções 30 a 34. A primeira hipótese diz que as moléculas inibitórias são péptidos extremamente pequenos, constituídos maioritariamente por resíduos aromáticos, e já foi discutida na secção mencionada. A segunda hipótese diz que as moléculas inibitórias não são de natureza proteica. Com esta hipótese em vista, procedeu-se a uma TLC da *pool* inibitória de fracções 30 a 34, o qual revelou a presença de lípidos polares na amostra, nomeadamente aminolípidos, glicolípidos e fosfolípidos.

Vários são os estudos referentes à composição lipídica de sementes, visto que os lípidos são um dos tipos de moléculas mais abundante nas mesmas. Dentro dos lípidos polares temos os glicolípidos, que podem ser divididos em várias subclasses, sendo as principais: monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), cerebrosídeo (CER), esteril-glucosídeo (SG), esteril-glucosídeo acilado (ASG) e sulfoquinovosildiacilglicerol (SQD). Ramadan e Morsel identificaram por HPLC seis subclasses de glicolípidos em óleos de sementes de *Nigella sativa* L., *Coriandrum sativum* L. e *Guizotia abyssinica* Cass. Em *N. sativa* L. foram detectadas todas as 6 subclasses mencionadas anteriormente; em *C. sativum* L. e *G. abyssinica* Cass foram detectadas as subclasses ASG, SG e CER (Ramadan & Morsel, 2002). Imbs e Pham determinaram a composição lipídica de sementes de *Cassia tora* L. e *P. vulgaris* L., sendo que 21% e 63% do conteúdo lipídico total de *C. tora* L. e *P. vulgaris* L., respectivamente, correspondia a lípidos polares (Imbs & Pham, 1995). Sugawara e Miyazawa separaram e determinaram quais os glicolípidos presentes em extractos de partes comestíveis de tomate e de abóbora. Ambos os extractos revelaram a presença dos glicolípidos MGDG, DGDG, SG e ASG, sendo que o extracto de tomate era mais rico em ASG e o de abóbora em MGDG e DGDG (Sugawara e Miyazawa, 1999). Outra classe lipídica polar são os aminolípidos, que consistem em lípidos com grupos amina livres. Embora a literatura sobre este tipo de lípidos em sementes seja muito escassa, foi descrito em bactérias que alguns glicerofosfolípidos aniônicos podem sofrer modificações estruturais e incorporar resíduos aminoácidos, tornando-se moléculas aminolípicas. Nomeadamente, já foram descritas moléculas de fosfatidilglicerol com resíduos de Lys, Ala, Arg e Gly, e moléculas de cardiolipina com resíduos de Lys e Ala (Geiger *et al.*, 2010). Também em algumas bactérias estão descritos lípidos derivados de diacilglicerol modificados com resíduos de Lys e homo-Ser (Geiger *et al.*, 2010).

Assim sendo, é possível, mas um tanto ambicioso, que as fracções lipídicas obtidas na TLC da *pool* inibitória sejam constituídas maioritariamente por moléculas de natureza tanto amino- como glicolípica, mais propriamente por moléculas glicolípicas incorporadas com resíduos aminoácidos. Temos então que os picos registados na CFR podem corresponder a subclasses de glicolípidos como MGDG, DGDG, CER, SG, ASG e SQD. No entanto, como ainda não foram feitos ensaios de inibição enzimática com as fracções recolhidas, não podemos afirmar que essas

moléculas lipídicas são responsáveis pela inibição da actividade proteolítica da pepsina. Em caso afirmativo de inibição enzimática, o próximo passo seria uma análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) de cada uma das fracções recolhidas na TLC, de modo a identificar as moléculas presentes. Em caso negativo de inibição enzimática, não podemos descartar totalmente as fracções lipídicas como moléculas inibitórias, uma vez que pode ter ocorrido uma alteração conformacional durante a eluição das amostras na CFR ou uma separação física dos componentes necessários à inibição, como já foi mencionado na secção 3.4 para a CFR das fracções 30 a 34 eluídas da CEM.

Com o objectivo de avaliar a capacidade das fracções inibitórias 30 a 34 eluídas da CEM para inibir outras PAs, para além da pepsina, efectuaram-se ensaios de inibição enzimática contra quimosina e cardosina A (Figura 18). A amostra utilizada consistiu então na *pool* das fracções inibitórias 30 a 34 liofilizadas e ressuspensas em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Diferentes volumes da *pool* inibitória foram pré-incubados com as respectivas PAs e, posteriormente, foi adicionado o substrato peptídico. A actividade enzimática foi medida conforme descrito na secção 2.5.4 de Material e Métodos. Os resultados obtidos permitiram a construção de uma curva dose-resposta para cada PA.

Como se pode observar pela Figura 18, a *pool* inibidora conseguiu inibir fortemente as PAs quimosina e cardosina A, para além da pepsina como já tínhamos visto anteriormente. Devido às moléculas responsáveis pela inibição não serem proteicas ou serem péptidos extremamente pequenos, que não são quantificáveis pelo método de quantificação utilizado, não possuímos a concentração da amostra. Assim sendo, não é possível calcular valores de cinética enzimática, como a constante de inibição. No entanto, a inibição conseguida pela *pool* inibidora é bastante significativa, sendo necessários apenas 15, 17 e 20 μL de amostra para inibir 50% da actividade proteolítica da quimosina, cardosina A e pepsina, respectivamente (nas condições em que foram efectuados os ensaios).

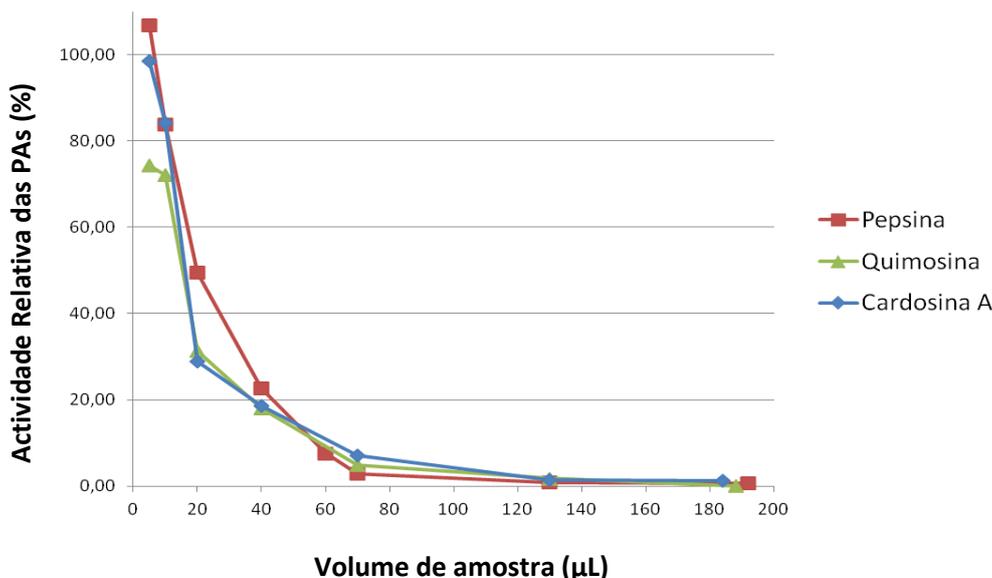


Figura 18 – Actividade proteolítica relativa das PAs pepsina, quimosina e cardosina A contra o substrato peptídico na presença de diferentes volumes da *pool* inibidora. O controlo consistiu no 100% de actividade proteolítica de cada uma das PAs contra o substrato em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Os ensaios consistiram nas PAs na presença de diferentes volumes da *pool* inibitória, com posterior adição do substrato. Os ensaios foram realizados conforme descrito na secção 2.5.3 dos Materiais e Métodos (n=2).

Temos então que as fracções 30 a 34 eluídas da CEM, do extracto desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L., apresentam actividade inibitória contra, pelo menos, três PAs.

3.6. Avaliação da actividade antimicrobiana das fracções inibitórias do extracto de sementes

Para determinar, numa primeira análise, se a *pool* inibitória utilizada anteriormente tinha actividade antimicrobiana, foram realizados ensaios de inibição do crescimento de algumas bactérias e leveduras, por difusão em discos estéreis. As bactérias utilizadas foram *E. coli* e *S. aureus*, as leveduras utilizadas foram *C. albicans* e *S. cerevisiae*. A escolha destes microrganismos baseou-se não só em vários estudos prévios de actividade antimicrobiana de inibidores de proteases (Ngai & Ng, 2004; Kim *et al.*, 2005; Wesierska *et al.*, 2005; Satheesh & Murugan, 2011), como também na importância biológica desses microrganismos.

Foram aplicados discos de filtros brancos estéreis (0,62 cm de diâmetro) no agar, aos quais se aplicaram diferentes volumes da *pool* inibitória das fracções 30 a 34 liofilizadas e ressuspensas em tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5. Foram também efectuados discos controlos em cada placa: um disco sem nada e um disco apenas com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5 (Figura 19). As placas das bactérias foram incubadas a 37°C durante 24h, enquanto as das leveduras foram incubadas a 30°C durante 48h.

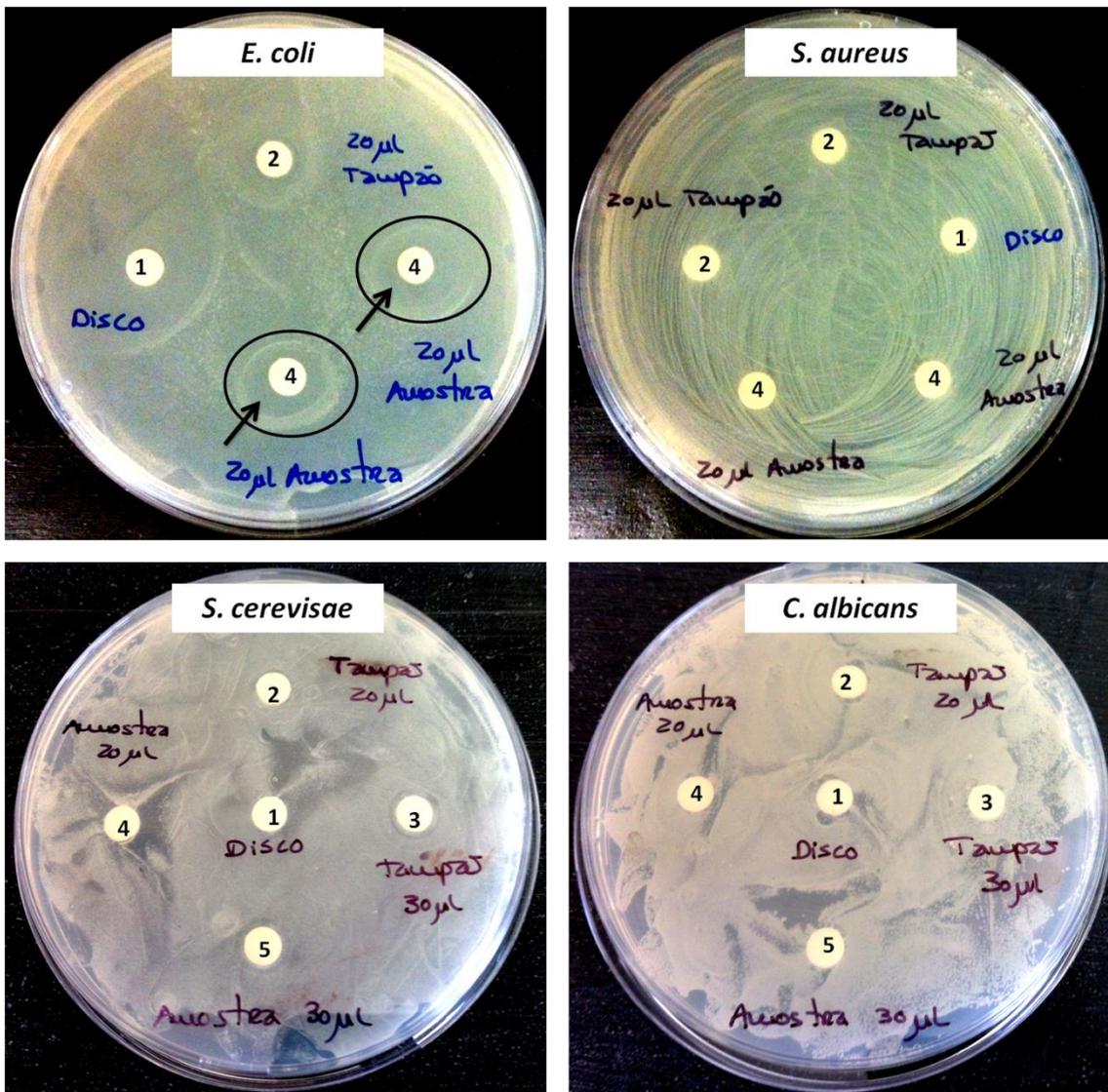


Figura 19 – Actividade antimicrobiana das fracções inibitórias da CEM contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. 1 – Disco controlo sem amostra; 2 e 3 – Discos controlo com tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5 (20 e 30 µL); 4 e 5 – Discos com a *pool* de fracções inibitórias (20 e 30 µL). n=3

Como é possível observar pela Figura 19, a *pool* inibitória apresentou actividade antibacteriana contra *E.coli*. Apesar de o controlo com tampão apresentar um ligeiro halo, os dois discos com amostra apresentam um halo muito maior (círculos com setas) e com menor crescimento bacteriano. Relativamente aos ensaios com *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*, estes não revelaram inibição do crescimento pelas fracções inibidoras.

O plaqueamento das leveduras nas placas de Petri foi feito por espalhamento de suspensões, o que não é a técnica mais indicada para leveduras. Para além disso, as suspensões foram feitas por medição da DO. quando o mais correcto é a medição pelos padrões de McFarland. Por tudo isto, os ensaios com as leveduras poderão não ter dado um resultado positivo para actividade antimicrobiana da *pool* inibitória devido às condições do próprio ensaio. São então necessários mais estudos com as espécies utilizadas, de modo a otimizar as condições do ensaio.

A actividade antimicrobiana contra *E.coli* pela *pool* inibitória é inequívoca. No entanto, não sabemos se essa inibição do crescimento é causada pela inibição de proteases endógenas. Assim sendo, seria interessante investigar no futuro se a *pool* de fracções 30 a 34 consegue inibir a actividade proteolítica de sobrenadantes de culturas de microrganismos, utilizando substratos específicos para diferentes classes de proteinases (Wesierska *et al.*, 2005).

Os ensaios realizados por difusão em discos foram uma primeira abordagem para averiguar a actividade antimicrobiana das fracções inibitórias do extracto de sementes de *C. cardunculus* L. O objectivo futuro neste campo passa por realizar outro tipo de testes, como a monitorização do crescimento microbiano, na presença das moléculas inibitórias, por densidade óptica a 620 nm (Kim *et al.*, 2005; Wesierska *et al.*, 2005; Kanokwiroon *et al.*, 2008).

Capítulo 4

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

O trabalho desenvolvido durante este projecto permitiu algumas conclusões interessantes e possibilidade de estudos futuros.

Primeiramente, confirmou-se a existência de fracções inibitórias termoestáveis em extractos de sementes de *C. cardunculus* L., as quais inibem eficazmente, pelo menos, três PAs, nomeadamente a pepsina, a quimosina e a cardosina A. Chegou-se também à conclusão de que as moléculas responsáveis pela actividade inibitória das fracções contra PAs podem ser de duas naturezas distintas: ou péptidos extremamente pequenos, que não são detectados nem pelas técnicas de PAGE, nem pelo método de quantificação proteica usado; ou moléculas de natureza não proteica, nomeadamente lípidos. Por fim, concluiu-se que as fracções inibitórias contra PAs extraídas das sementes têm actividade antimicrobiana contra *E.coli*.

Assim sendo, surgem algumas propostas quanto a estudos futuros.

Em primeiro lugar, seria interessante averiguar se as fracções inibitórias contra as três PAs analisadas também inibem PAs de origem humana, nomeadamente renina e BACE-1.

Como foi mencionado ao longo de várias secções de Resultados e Discussão, a quantificação proteica obtida pelo método *Bio-Rad Protein Assay* foi praticamente nula para as fracções inibitórias. Isto deve-se às fracções em questão serem maioritariamente constituídas por pequenos péptidos ou moléculas de natureza não proteica, nomeadamente lípidos. Assim, torna-se necessário arranjar alternativas de quantificação para as amostras mencionadas.

Uma dessas alternativas é o método da ninidrina, onde os péptidos são hidrolisados a aminoácidos, com ácido sulfúrico a 100°C. Os hidrolisados são depois neutralizados com a ninidrina e os aminoácidos quantificados por espectrofotometria a 570 nm (Friedman, 2004; Sun *et al.*, 2006). Esta técnica resultaria tanto para péptidos como para moléculas com natureza aminolipídica.

Outra alternativa é fazer uma avaliação semiquantitativa por leitura da absorvância normalizada das fracções a 280 nm (Layne, 1957; Stoschek, 1990).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Para tentar identificar a composição das fracções inibitórias, sugiro também que as fracções recolhidas nas duas experiências de HPLC sejam analisadas por LC-MS. Depois de identificado a que molécula corresponde cada pico, poderão ser desenhados outros tipos de ensaios para essas fracções.

Em termos de actividade antimicrobiana, existe ainda uma variedade de microrganismos com importância biológica que pode ser testada com as fracções inibitórias (REFS), no entanto cada um desses ensaios deve ser realizado nas condições ideais de crescimento (meio, temperatura, tempo de incubação, especificações de plaquamento) de cada microrganismo, de modo a diminuirmos a interferência externa nos resultados obtidos.

Estudos prévios demonstraram que diferentes extractos de folhas de *C. cardunculus* apresentavam actividade antimicrobiana contra uma série de microrganismos patogénicos, nomeadamente *E.coli*, *S.aureus*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* (Kukic *et al.*, 2008). Assim sendo, seria também interessante realizar estes ensaios não só com as fracções inibitórias, mas também com o próprio extracto total e desnaturado de sementes de *C. cardunculus* L.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Meguid, M., von der Helm, K., Korant, B.D., Cheronis, J.C. (2000)**, Proteases as Targets for Therapy. *Springer-Verlag* (Berlin)
- Abu-Erreish, G.M. & Peanasky, R.J. (1974)**, Pepsin Inhibitors from *Ascaris lumbricoides* - Pepsin-inhibitor complex: Stoichiometry of formation, dissociation and stability of the complex, *J. Biol. Chem.* 249, 1566-1571
- Andersen, R. A. & Sowers, J.A. (1968)**. Optimum conditions for bonding of plant Phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone, *Phytochemistry* 7, 293-301
- Aoyagi, T.; Takeuchi, T.; Matsuzaki, A.; Kawamura, K.; Kondo, S.; Hamada, M.; Maeda, K.; Umezawa, H. J.(1969)**, *Antibiotics* (Tokyo) 22, 283-286.
- Bajusz, S., Szell, F., Bagdy, D., Barabas, E., Horvath, G., Dioszegi, M., Fittler, Z., Szabo, G., Juhasz, A., Tomori, E., Szilagyi, G. (1990)**. Highly Active and Selective Anticoagulants: D-Phe-Pro-Arg-H, a Free Tripeptide Aldehyde Prone to Spontaneous Inactivation, and Its Stable N-Methyl Derivative, D-MePhe-Pro-A rg-H, *J. Med. Chem.* 33: 1729-1735
- Barrett, A.J. (1986)**. The classes of proteolytic enzymes. In M.J. DaUing (ed.), *Plant Proteolytic Enzymes*. Boca Raton, CRC Press, pp. 1-16
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (1998)**. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. New York: Academic Press.
- Barrett, A.J. (1999)**. Peptidases: a view of classification and nomenclature. In V. Turk (ed.), *Proteases: New Perspectives*. Switzerland: Birkhauser Verlag Basel, pp. 1-12
- Barrett A.J., Rawlings N.D., Brien, E.A. (2001)**.The MEROPS database as a protease information system, *J. Struct. Biol.*, 14: 95-102.
- Bierbaum, G. & Sahl, H.G. (1985)**. Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes, *Arch Microbiol* 141, 249-254
- Birk, Y. (1993)**. Protease inhibitors of plant origin and role of protease inhibitors in human nutrition: overview. In W. Troll and A.R. Kennedy (eds.), *In Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*. New York: Plenum Press, pp. 97-106.
- Birk, Y. (2003)**. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering, *Springer Berlin*, pp. 170
- Carnegie, P.R. (1963)**. Structure and properties of a homologue of glutathione. *Biochem. J.* 89: 471-478.
- Christeller, J.T., Farley, P.C., Ramsay, R.J., Sullivan, P.A., Laing, W.A. (1998)**. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate, *Eur. J. Biochem.* 254: 1602167
- Christeller, J.T. (2005)**. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J* 272: 5710-5722

- Christeller, J.T., Farley, P.C., Marshall, R.K., Anadan, A., Wright, M.M., Newcomb, R.D., Laing, W.A. (2006).** The Squash Aspartic Proteinase Inhibitor SQAPI Is Widely Present in the Cucurbitales, Comprises a Small Multigene Family, and Is a Member of the Phytocystatin Family, *J Mol Evol* 63:747–757
- Cooper, J., Foundling, S., Blundell, T., Boger, J., Jupp, R., Kay, J., (1989).** X-ray studies of aspartic proteinase-statine inhibitor complexes, *Biochemistry* 28: 8596–8603
- Creighton, T.E., Darby, N.J. (1989).** Functional evolutionary divergence of proteolytic enzymes and their inhibitors, *Trends Biochem Sci* 14: 319–324
- Dash, C., Kulkarni, A., Dunn, B., Rao, M. (2003),** Aspartic Peptidase Inhibitors: Implications in Drug Development, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38(2): 89-119
- Davies, D.R. (1990).** The structure and function of the aspartic proteinases, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19: 189-215
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, L.R. (2002).** PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes, *Nucleic Acids Research*, Vol. 30, No.1
- Dittmer, J.C. & Lester, R.L., (1964).** A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid. Res.* 5: 126-127
- Dreyer, T., Valler, M. J., Kay, J., Charlton, P., Dunn, B. M. (1985).**The selectivity of action of the aspartic-proteinase inhibitor IA₃ from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 231: 777-779
- Dunnill, P. & Fowden, L. (1963).** γ -l-Glutamyl- β -pyrazol-1-yl-l-alanine, a peptide from cucumber seeds, *Biochem J.* 86(3): 388–391
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies* 331: 372–379
- Fan, S-G., Wu, G-J. (2005).** Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 273-292
- Farley, P.C., Christeller, J.T., Sullivan, M.E., Sullivan, P.A., Laing, W.A. (2002).** Analysis of the interaction between the aspartic peptidase inhibitor SQAPI and aspartic peptidases using surface plasmon resonance, *J. Mol. Recognit.* 15: 135–144
- Friedman, M. (2004)** Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences, *J. Agric. Food Chem.* 52 (3): 385–406
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I.M., Sohlenkamp, C. (2010).** Amino acid-containing membrane lipids in bacteria, *Progress in Lipid Research* 49: 46–60
- Green, T.B., Ganesh, O., Perry, P., Smith, L., Phylip, L.H., Logan, T.M., Hagen, S.J., Dunn, B.M., Edison, A.S. (2004).** IA₃, an Aspartic Proteinase Inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*, Is Intrinsically Unstructured in Solution, *Biochemistry* 43: 4071-4081

- Greenblatt, H.M., Ryan C.A., James, M.N.G. (1989).** Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-I from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 205, 201-228
- Habib, H., Fazili, K. (2007).** Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants, *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2 (3): 068-085
- Headey, S.J., MacAskill, U.K., Wright, M.A., Claridge, J.K., Edwards, P.J.B., Farley, P.C., Christeller, J.T., Laing, W.A., Pascal, S.M. (2010),** Solution Structure of the Squash Aspartic Acid Proteinase Inhibitor (SQAPI) and Mutational Analysis of Pepsin Inhibition, *J. Biol. Chem.* 285: 27019-27025
- Heibges, A., Salamini, F., Gebhardt, C. (2003).** Functional comparison of homologous membranes of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L). *Mol. Genet. Genomics* 269: 535-541
- Herriott, R.M. (1939).** Kinetics of the formation of pepsin from swine pepsinogen and identification of an intermediate compound. *J Gen Physiol.* 22(1): 65-78
- Hill, R.E., Hastie, N.D. (1987).** Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature* 326: 96–99
- Hung, C.H., Huang C.C., Tsai, W.S., Wang, H.L., Chen, Y.L., (2003).** Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from Brassica campestris Seeds. *J. Yuanpei Univ. Sci.Tech.* 10: 13-22
- Imbs, A.B., Pham, L.Q. (1995)** Lipid Composition of Ten Edible Seed Species from North Vietnam, *JAACS* 72, 957-961
- Jacin, H. & Mishkin, A.R. (1965).** Separation of carbohydrates on borate-impregnated silica gel G plates. *J.Chromatog.* 18: 170-173
- James, M., Sielecki, A. (1986).** Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution, *Nature* 319, 33-38
- Kanokwiroon, K., Teanpaisan, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A.B., Wititsuwannakul, R. (2008).** Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of Hevea brasiliensis on oral microorganisms, *Mycoses* 51(4): 301–307
- Kasai, T., Shiroshita, Y., Sakamura, S. (1986).** γ-Glutamyl peptides of Vigna radiata seeds, *Phytochemistry* 25(3): 679–682
- Keilová, H., Tomásek, V. (1976).** Isolation and some properties of cathepsin D inhibitor from potatoes, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 41: 489–497
- Kempf, D., Marsh, K., Kumar, G., Rodrigues, A., Denissen, J., McDonald, E., Kukulka, M., Hsu, A., Granneman, G., Baroldi, P., Sun, E., Pizzuti, D., Plattner, J., Norbeck, D., Leonard, J. (1997).** Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob. Agents Chemother* 41(3): 654–660

- Khan, A.R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E.M., James, M.N. (1999).** Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10968–10975
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Kim, M.H., Lim, H.T., Park, Y., Hahm, K.S. (2005).** Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem Biophys Res Commun* 330(3): 921-7
- Kim, M.H., Park, S.C., Kim, J.Y., Lee, S.Y., Lim, H.T., Cheong, H., Hahm, K.S., Park, Y. (2006).** Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". *Biochem Biophys Res Commun.* 346(3): 681-6.
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.-W., Hahm, K.-S., Park, Y. (2009).** Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity, *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2860-2872
- Kleinert, H., Stein, H., Boyd, S., Fung, A., Baker, W., Verburg, K., Polakowski, J., Kovar, P., Barlow, J. (1992).** Discovery of a well-absorbed, efficacious renin inhibitor, A-74273, *Hypertension (Dallas)* 20(6): 768–75
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1997).** Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 379-384
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R., Otvos, Jr. (2001),** The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40: 3016-3026
- Kristensen, I.B. & Larsen, P.O. (1974).** γ -glutamylwillardiine and γ -glutamylphenylalanylwillardiine from seeds of fagus sili/atica, *Phytochemistry* 13: 2199-2802
- Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji, P., Ciric, A., Stojkovic, D., Sokovic, M. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activity of Cynara cardunculus extracts. *Food Chemistry* 107: 861-868
- Kulkarni, A. & Rao, M. (2009),** Differential elicitation of an aspartic protease inhibitor: Regulation of endogenous protease and initial events in germination in seeds of *Vigna radiate*, *Peptides* 30(12): 2118–2126
- Kumar, C.G. & Parrack, P. (2003).** Activated charcoal: a versatile decolorization agent for the recovery and purification of alkaline protease, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(3): 243-246
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laskowski, M. J., Kato, I., Kohr, W.J., Park, S.J., Tashiro, M., Whatley, H.E. (1987).** Positive darwinian selection in evolution of protein inhibitors of serine proteinases. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 52: 545–553
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. (2002).** Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.* 5(1): 93-109

- Layne, E. (1957).** Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology* 3: 447-455
- Le, Q.T. & Katunuma, N. (2004).** Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris(hydroxymethyl)aminomethane-Tricine buffer system, *Analytical Biochemistry* 324: 237-240
- Leung, D., Abbenante, G., Fairlie, D.P. (2000).** Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 43: 305-341
- Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., and Gustchina, A. (2000).** The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix, *Nat. Struct. Biol.* 7: 113-117
- Loomis, W.D. & Baitaile, J. (1966).** Plant phenolic compounds and the isolation of plant's enzymes, *Phytochemistry* 5: 423-438
- Marciniszyn, Jr., Hartsuck, J. A., Tang, J. (1976).** Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *The Journal of Biological Chemistry* 251(22): 7088–7094
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V., Baudys, M. (1989).** Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Letters* 251: 94-98
- Matsuzaki, K. (1999).** Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1–10
- Menon, V. & Rao, M. (2012).** Protease Inhibitors: Emphasizing Functional Aspects of Aspartic Protease Inhibitors, *Invited Review*
- Morishima, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T., Umezawa, H. (1970).** The structure of pepstatin, *J Antibiot (Tokyo)* 23(5): 263-5
- Morris, C.J. & Thompson, J.F. (1962).** The Isolation and Characterization of γ -L-Glutamyl-L-Tyrosine and γ -L-Glutamyl-L-Phenylalanine from Soybeans, *Biochemistry* 1(4): 706–709
- Mutlu, A. & Gal, S. (1999).** Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function, *Physiol Plant* 105: 569–76
- Ngai, P.H., Ng, T.B. (2004).** A napin-like polypeptide with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, antiproliferative and antibacterial activities from kale seeds. *J Pept Res.* 64(5): 202-208
- Norton, G. (1991).** Proteinase Inhibitors. In J.P.F. D’Mello, C.M. Duffus, and J.H. Duffus (eds.), *Toxic Substances in Crop Plants*, The Royal Society of Chemistry, 68-106
- O’Connell, K.L. & Stults, J.T. (1997).** Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis* 18(3-4):349-359.

- Pereira, C.S., Soares da Costa, D., Pereira, S., Moura Nogueira, F., Albuquerque, P.M., Teixeira, J., Faro, C., Pissarra, J. (2008). Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases, *Protoplasma* 232(3-4): 203-213
- Phylip, L. H., Lees, W. E., Brownsey, B. G., Bur, D., Dunn, B. M., Winther, J. R., Gustchina, A., Li, M., Copeland, T., Wlodawer, A., Kay, J. (2001). The potency and specificity of the interaction between the IA3 inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 276: 2023-2030.
- Pissarra, J., Pereira, C., Soares da Costa, D., Figueiredo, R., Duarte, P., Teixeira, J., Pereira, S. (2007). From Flower to Seed Germination in *Cynara cardunculus*: A Role for Aspartic Proteinases, *International Journal of Plant Developmental Biology* 1(2): 274-281
- Polgár, L. (1987). The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis, *FEBS Letters* 219(1): 1-4
- Rahbe, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans, W. J., Gatehouse, A.M.R. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, *Entomologia Exper: appl.* 76: 143-155
- Ramadan, M.F. & Morsel, J-T. (2003). Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds, *Food Chemistry* 80: 197-204
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors, *J. Biochem.* 378: 705-716
- Rawlings, N.D., Narrett, A.J., Bateman, A. (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Research* 40, Database issue D343-D350
- Ribeiro, S.F., Fernandes, K.V., Santos, I.S., Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Lopes, J.L., Beltramini, L.M., Rodrigues, R., Vasconcelos, I.M., Da Cunha, M., Souza-Filho, G.A., Gomes, V.M. (2012). New small proteinase inhibitors from *Capsicum annum* seeds: Characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning, *Biopolymers*. 100(2): 132-140
- Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: The Enzyme inhibitors. In L.J. Rogers (ed.), *Methods in Plant Biochemistry* 5, *Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids* New York: Academic Press, 259-305
- Rosenberg, S. H. (1995). Renin inhibitors. In *Progress in Medicinal Chemistry*, Ellis, G. P. and Loscombe, D. K., Eds., Elsevier Science, New York, 32: 37-115
- Ryan, C. A. (1978). Proteinase inhibitors in plant leaves: a biochemical model for pest-induced natural plant protection, *Trends Biochem. Sci.* 3, 148-215
- Saheki, T., Matsuda, Y., Holzer, H. (1974), Purification and Characterization of Macromolecular Inhibitors of Proteinase A from Yeast, *Eur. J. Biochem.* 47: 325-332
- Sampaio, G. (1947). *Flora Portuguesa*, Instituto de Alta Cultura, Lisboa, 607 pp

- Sardana, R.K., Ganz, P.R., Dudani, A.K., Tackaberry, E.S., Cheng, X., Altosaar, I. (1998).** Synthesis of recombinant human cytokine GMCSF in the seeds of transgenic tobacco plants. In: Cunningham, C. and Porter A.J.R., eds. *Recombinant proteins from plants. Production and isolation of clinically useful compounds*. Totowa NJ, Humana Press, 77-87
- Satheesh, L.S. & Murugan, K. (2011),** Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Cocinia grandis* (L.) Voigt, *Indian Journal of Experimental Biology* 49: 366-374
- Schägger, H., Aquila, H., Von Jagow, G. (1988).** Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem.* 173(1): 201-205
- Schagger, H. (2006).** Protocol of Tricine-SDS-PAGE, *Nature Protocols* 1(1)
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C. (2008).** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides, *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941–950
- Simões, I. & Faro, C. (2004).** Structure and function of plant aspartic proteinases, *Eur. J. Biochem.* 271: 2067–2075
- Snoek-van Beurden, P.A. & Von den Hoff, J.W. (2005).** Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Biotechniques* 38: 73-83
- Song, M., Rajesh, S., Hayashi, Y., Kiso, Y. (2001).** Design and synthesis of new inhibitors of HIV-1 protease dimerization with conformationally constrained templates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2465–2468
- Stoscheck, C.M. (1990).** Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69
- Sugawara, T. & Miyazawa, T. (1999).** Separation and Determination of Glycolipids from Edible Plant Sources by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Detection, *Lipids* 34, 1231–1237
- Sun, S-W., Lin, Y-C., Weng, Y-M., Chen, M-J. (2006).** Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *J. Food Composition and Analysis* 19(2-3): 112-117
- Tang, J. & Wong, R.N.S. (1987).** Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J. Cellular Biochemistry* 33: 53-63
- Timotijevic, G.S., Radovic, S.R., Maksimovic, V.R. (2003).** Characterization of an Aspartic Proteinase Activity in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds. *J.Agric. Food. Chem.* 51: 2100-2104
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K., Miyata, T. (1985).** Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty 1, *Nature* 315, 691
- Trexler, M., Banyai, L., Patthy, L. (2001).** A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 3705-3709.

- Trexler, M., Banyai, L., Patthy, L. (2002).** Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules, *Biol. Chem.* 383: 223-228
- Troll, W. & Kennedy, A.R. (1993).** Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. *New York: Plenum Press.*
- Turk, V. & Bode, W. (1991).** The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters* 285: 213–219
- Tutin, T., Heywood, V., Burges, N., Moore, D., Valentine, D., Walters, S., Weeb, D. (1976).** *Flora Europaea* (Vol 4), Cambridge University Press, Cambridge, 248
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. (1970).** Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *The Journal of antibiotics* 23(5): 259–262.
- Valueva, T.A., Revina, T.A., Kladnitskaya, G.V., Mosolov, V.V. (1998).** Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tuber. *FEBS Letters* 426, 131-134
- Valueva, T.A., Revina, T.A., Gvozdeva, E.L., Gerasimova, N.G., Ozeretskovskaya, O.L. (2003).** Role of proteinase inhibitors in potato protection. *Bioorg. Khim.* 29, 499-504
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A.J.G., Lin, Y., Tang, J., Pires, E. (1996).** Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L., *Eur. J. Biochem.* 235: 762-768
- Virtanen, A. & Matikkala, E. (1960).** New gamma-glutamyl peptides in the onion (*Allium cepa*), *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 322: 8-20.
- Wesierska, E., Saleh, Y., Trziszka, T., Kopec, W., Siewinski, M., Kamila, K. (2005).** Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 59-64
- Westerhoff, H. V., Juretic, D., Hendler, R. W. & Zasloff, M. (1989).** Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 6597-6601
- Woloshuk, C.P., Meulenhoff, J.S., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P.J., Cornelissen, B.J. (1991).** Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 3: 619-628
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I., Huang, H. W. (2000).** Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79: 2002–2009
- Zacharius, R.M., Morris, C.J., Thompson, J.F. (1959).** The isolation and characterization of γ -l-glutamyl-S-methyl-L-cysteine from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), *Archives of Biochemistry and Biophysics* 80(1): 199–209
- Zasloff, M. (2002).** Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415(24)

Websites

www.merops.sanger.ac.uk

www.uib.no