

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDORES DE SERINOPROTEINASES EM SEMENTES DE *Parkia multijuga* Benth

Rafaela Oliveira da SILVA¹; José Francisco de Carvalho GONÇALVES²; Larissa Ramos CHEVREUIL³.

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador INPA/CDAM; ³Co-orientadora INPA/CDAM

1.Introdução

A família Fabaceae, antiga Leguminosae, consiste na terceira maior família entre as angiospermas, onde a maioria das espécies arbóreas apresenta alto valor econômico madeirável, com pouco ou nulo aproveitamento de suas potencialidades não madeiráveis, como as sementes, que são consideradas como a principal fonte de proteína vegetal (Caramori *et al.*, 2008).

Dentre os grupos funcionais de proteínas presentes em sementes, encontram-se os inibidores de proteinases, onde seu conteúdo pode variar de 1 a 15% do total de proteínas nos tecidos de estocagem. Essas proteínas são caracterizadas por formar complexos com enzimas proteolíticas (proteinases ou proteases), bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica. (Macedo *et al.*, 2011). Nos vegetais, são metabolicamente importantes pois além de regularem a atividade de proteinases durante a germinação e servirem como fonte de reserva, podem atuar na defesa vegetal contra o ataque de patógenos, inibindo enzimas digestivas em insetos, e enzimas proteolíticas extracelulares em microrganismos, importantes para a entrada do organismo na célula vegetal (Magni *et al.*, 2012).

Considerando a importância nos vegetais e seu alto conteúdo nos tecidos de estocagem, estudos de purificação e caracterização de inibidores de proteinases presente em sementes de leguminosas, confirma importante etapa para o conhecimento das espécies vegetais. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a atividade de inibidores de tripsina (inibidores de proteinases) presentes em sementes de *Parkia multijuga*.

2.Material e Métodos

Sementes de *P. multijuga* foram adquiridas da empresa Connarus Ambiental LTDA, coletadas da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã/AM.

Para extração de proteínas, sementes inteiras foram trituradas em moinho analítico e, submetidas a extração em NaCl 0,15 M (10% p/v). O sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 48 horas, e liofilizado, resultando no extrato proteico. A quantificação de proteínas nos extratos protéicos e nas frações obtidas após cromatografia foi realizada pelo método de (Bradford, 1976).

Para cromatografia de afinidade em tripsina – Sepharose 4B, foi uma coluna de polietileno, preenchida com 6 mL de resina CNBr- Sepharose 4B e tripsina bovina (Sigma) acoplada, equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM e eluída com tampão HCl 5mM. O extrato protéico (100 mg) foi aplicado na coluna e coletadas frações de 2 mL em fluxo de 20 mL/h. O acompanhamento do perfil cromatográfico foi realizado a partir de leituras espectrofotométricas a $\lambda=280$ nm (Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences).

No extrato bruto e nas frações obtidas a partir da cromatografia foram testadas a presença de inibidores de tripsina, quimotripsina e papaína.

Para o ensaio de inibição da tripsina, foi realizada uma pré-incubação constituída de 290 μ L de tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5; 10 μ L de solução de tripsina (0,1 mg/mL de tampão) e 200 μ L da amostra, durante 30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, foi adicionado 200 μ L do substrato BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida, Sigma) 1,25 mM, prosseguindo a incubação durante 30 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 150 μ L de ácido acético 30%, e a hidrólise do substrato pela enzima monitorada em leituras espectrofotométricas $\lambda=405$ nm em espectrofotômetro (UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences).

Para inibição da quimotripsina foi realizada uma pré-incubação contendo 50 μ L de quimotripsina (0,2 mg/mL de tampão) e amostras (200 μ L). O tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 completou o volume final de 500 μ L e a solução foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 200 μ L de Azocaseína 1% foi adicionada a esta solução e, incubadas a 37°C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de TCA 20 % (ácido tricloroacético, Sigma). Os resultados dessa reação foram centrifugadas a 3250 x g, durante 20 minutos, e 400 μ L do sobrenadante obtido foram alcalinizados com 400 μ L de NaOH 2 N. As leituras espectrofotométricas dos produtos da reação foram realizadas a $\lambda=420$ nm em espectrofotômetro UV/ Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences.

A inibição da papaína foi estimada, por meio de ensaio enzimático contendo 240 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0; 20 μ L de papaína e 40 μ L de DTT (Ditiotreitol) 3 mM e EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético) 2 mM. A mistura foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente (26 \pm 3°C). Posteriormente, acrescentou-se 200 μ L das amostras, prosseguindo a incubação durante 30 minutos a 37°C. Após esse período, foi adicionado o substrato BANA (N- alfa Benzoil-DL-Arginina B naftilamida, Sigma) 1 mM, incubando-se por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de HCl 2% em etanol e, para conferir cor à reação foi adicionado 500 μ L de DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído, Sigma) 0,06%.. Após 40 minutos em repouso, foram realizadas leituras espectrofotométricas a $\lambda=540$ nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences).

Os inibidores purificados tiveram a sua atividade caracterizada quanto à concentração mínima capaz de inibir a atividade da tripsina, realizando-se uma curva de inibição da tripsina, com variações no volume de fração ensaiada (2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μ L) no teste de inibição da tripsina e, quanto à estabilidade térmica da atividade dos inibidores, onde as frações, inicialmente, foram submetidas à incubações em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) durante 30 minutos.

O perfil eletroforético segundo o método de (Laemmli, 1970). Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 a 225 kDa).

3. Resultados e Discussão

No extrato protéico, proveniente das sementes de *P. multijuga*, a atividade inibitória sobre a tripsina e a papaína foi, aproximadamente, três vezes maior comparada à inibição da quimotripsina, confirmando a presença de inibidores de serino (inibidores de tripsina e quimotripsina) e cisteinoproteínases (inibidores de papaína) (Figura 1).

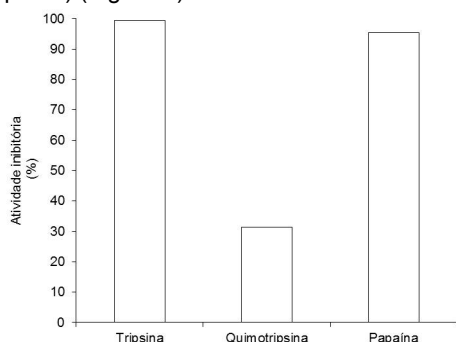


Figura 1. Atividades inibitórias do extrato protéico proveniente de sementes de *P. multijuga*.

Resultados similares a respeito da atividade inibitória sobre a tripsina e quimotripsina foram observados em extratos protéicos de nove leguminosas pertencentes à flora Amazônica, onde *Cassia basselari*, *C. occindetalis*, *Dialium guianenses*, *Inga rubiginosa*, *I. umbratica* e *I. velutina* apresentaram inibição para ambas as enzimas, sendo a inibição da tripsina superior à da quimotripsina. Ao passo que, *Cassia grandis*, *Inga fogifolia* e *Mimosa gullandinae* foram específicas para a tripsina (Calderon *et al.*, 2001).

O perfil protéico do extrato e das frações obtidas após cromatografia em tripsina-Sepharose 4B, (PmTI), confirma a purificação parcial dos inibidores, com a predominância de duas bandas protéicas principais, de 9 e 16 kDa (Figura 2).

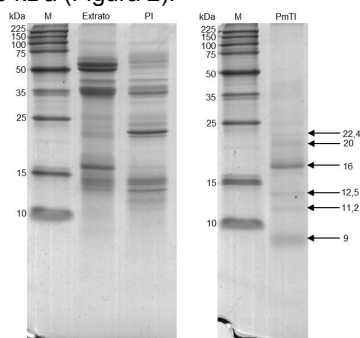


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (20%), sob condições redutoras. Extrato: Extrato protéico de *P. multijuga*. PI: Frações não retidas em coluna tripsina-Sepharose 4B. PmTI: Inibidores de tripsina de *P. multijuga*.

De modo geral, essa faixa de massa molecular obtida para PmTI corresponde às principais famílias de inibidores de serinoproteínases estudadas em sementes de leguminosas, que são os inibidores do tipo Kunitz e Bowman – Birk, cuja literatura científica relata massas moleculares de 8-10 kDa e 15 – 20 kDa, respectivamente (Klomklao *et al.*, 2011).

Os inibidores de tripsina parcialmente purificados (PmTI), apresentaram especificidade de inibição contra a tripsina e a quimotripsina, sendo a atividade inibitória da tripsina 10 vezes maior comparada à quimotripsina, ao passo que a inibição da papaína não foi observada (Figura 3).

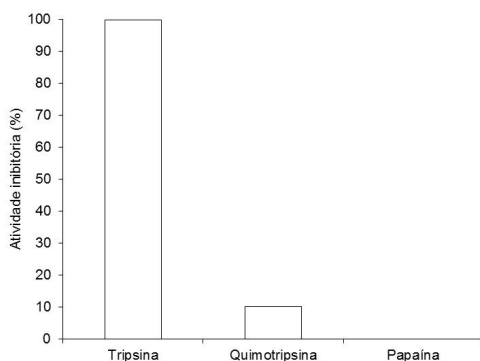


Figura 3. Especificidade de inibição de PmTI.

Os inibidores de serinoproteinases, de fato, apresentam variação quanto à inibição de diferentes proteinases, destacando-se os inibidores do tipo Kunitz, que são potentes inibidores da tripsina e poucos específicos para a quimotripsina, enquanto os inibidores tipo Bowman-Birk inibem tanto a tripsina quanto a quimotripsina (Macedo *et al.*, 2007; Jamal *et al.*, 2012).

A partir de uma curva de inibição da atividade da tripsina observou-se alta atividade inibitória por PmTI, onde na presença de 0,2 µg de proteína, a inibição da tripsina atingiu valor mínimo de, aproximadamente, 63% (Figura 4 A).

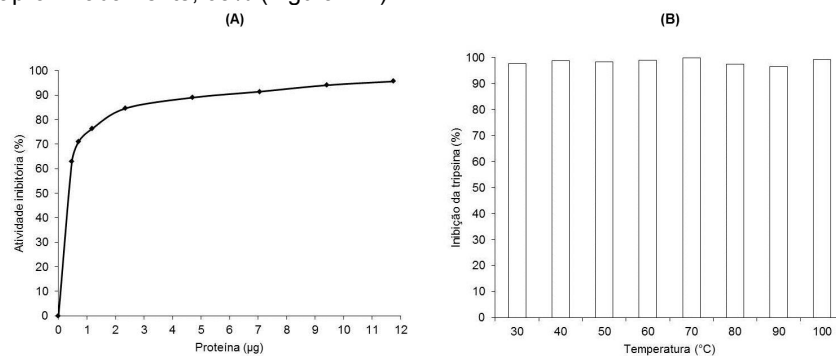


Figura 4. Caracterização da atividade de PmTI. (A) Curva de inibição da tripsina por PmTI. (B) Estabilidade térmica de PmTI.

A análise da curva de inibição é um dado importante, pois permite avaliar qual a concentração mínima de proteína necessária para que ocorra interação entre enzima e inibidor. Nesse sentido, é válido destacar que o complexo enzima – inibidor é semelhante ao complexo enzima-substrato. Assim, a especificidade de cada inibidor pela enzima alvo é resultante do tipo de inibição exercida e da conformação e estrutura do sítio reativo (Haq *et al.*, 2004; Sabotic e Kos, 2012).

Os inibidores PmTI, apresentaram alta estabilidade térmica, apresentando inibição da tripsina em 99%, quando incubados a 100°C durante 30 minutos (Figura 4B).

Um inibidor purificado de semente de *Vigna radiata*, apresentou estabilidade até 50°C quando incubado durante 20 minutos, ao passo que os inibidores isolados de *Entada acaciifolia* e *Plathymenia foliolosa*, apresentaram estabilidade até temperaturas de 50 e 70°C, quando submetidos a 30 minutos de incubação. Contudo, o inibidor isolado de *Archidendron ellipticum*, manteve a estabilidade térmica entre 25 e 55 °C, após 1 hora de incubação (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Kansal *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2012).

Essa alta estabilidade térmica pode ser justificada uma vez que, pontes dissulfeto intramoleculares, são responsáveis pela estabilidade de inibidores, frente a condições desnaturantes físicas e químicas, como temperatura e pH. Adicionalmente, tais fatores como a disposição dessas pontes dissulfeto (posição interna, em vez de exposta na superfície), contribuem para a estabilidade global do inibidor (Bhattacharyya e Babu, 2009; Macedo *et al.*, 2011).

4. Conclusão

Inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína estão presentes nos extratos protéicos provenientes de sementes de *P. multijuga*. Contudo, a técnica cromatográfica em tripsina-Sepharose permite purificar parcialmente inibidores de tripsina.

Os inibidores de tripsina (PmTI) são moléculas termoestáveis, com alta especificidade para a tripsina e, apresentam massas moleculares variando de 9 a 23 kDa, sugerindo-se que pertençam às famílias Bowman-Birk e Kunitz.

5.Referências Bibliográficas

- Bhattacharyya, A.; Babu, C. 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, 70: 703–712.
- Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S.; Babu, C. 2006. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry*, 67: 232–241.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Calderon, L.A.; Teles, R.C.L.; Leite, J.R.S.A.; Bloch C.Jr.; Astolfi-Filho, S.; Freitas, S.M. 2001. Serine protease inhibitors from amazon leguminosae seeds: Purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein and peptide letters*, 8: 458-493.
- Caramori, S.S.; Souza, A.A.; Fernandes, K.F. 2008. Caracterização bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae). *Revista Saúde e Ambiente*, 9: 16-23.
- Haq,S; Atif,S; Khan, R. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431:145–159.
- Jamal, F; Pandey, P; Singh, D; Khan, M. 2012. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem. R.*, in press.
- Kansal, R; Gupta, R; Koundal, K; Kuhar, K; Gupta, V. 2008. Purification, characterization and evaluation of insecticidal potential of trypsin inhibitor from mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seeds. *Acta Physiol Plant*, 30:761–768.
- Klomkiao, S.; Benjakul, S.; Kishimura,H.; Chaijan, M. 2011. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Food Chemistry*, 129:1348–1354.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Franco, O.L.; Migliolo, L.; Oliveira, C.F.R. 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 158: 164–172.
- Macedo, M.L.; Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Richardson, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104–1111.
- Magni, C.; Sessa, F.; Tedeschi, G.; Negri, A.; Scarafoni, A.; Consonni, A.; Duranti, M. 2012. Identification in lupin seed of a serine-endopeptidase activity cleaving between twin arginine pairs and causing limited proteolysis of seed storage proteins. *Molecular Plant.*, 4:1-9.
- Oliveira, C.F.R.; Vasconcelos, I.M.; Aparicio, R.; Freire, M.G.; Baldasso, P.; Marangoni, S.; Macedo, M. 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochemistry*, 47:929-935.
- Ramos, V.; Silva, G.; Freire, M.; Machado, O.; Parra, M.; Macedo, M. 2008. Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Plathymania foliolosa* Seeds. *J. Agric. Food Chem*, 56: 11348–11355.
- Sabotic, J.; Kos, J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1351–1375.