

## **INIBIDORES DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Parkia discolor*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA**

Lourayne Chazan Oliveira MENDES<sup>1</sup>, Larissa Ramos CHEVREUIL<sup>2</sup>,  
José Francisco de Carvalho GONÇALVES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Coorientadora INPA/bolsista PCI; <sup>3</sup>Orientador INPA/pesquisador

### **1. Introdução**

A fixação de nitrogênio confere as leguminosas o “status” de espécies concentradoras de proteínas. Por sua vez, as sementes, devido suas características de tecido de estocagem, são importantes fontes dos metabólitos primários com ênfase para as reservas energéticas e de compostos nitrogenados, incluindo a classe de inibidores de proteinases (Richardson, 1991). Do ponto de vista funcional, estas proteínas participam como reservas de nitrogênio e de enxofre, além de atuarem na defesa contra o ataque de fitopatógenos, pragas e de diferentes estresses abióticos (Mosolov e Valueva, 2005; Marra *et al.*, 2009). Assim, o potencial para identificação de novos produtos em “novas plantas” insere a flora amazônica em posição de destaque no cenário biotecnológico global, uma vez que, somente na Amazônia há registro de, aproximadamente, 19.325 espécies (Lewis *et al.*, 2005). Desta forma, o objetivo desse estudo foi isolar inibidores de tripsina presentes em sementes de *Parkia discolor* e caracterizar sua atividade visando contribuir para o entendimento da interação entre inibidores e suas enzimas proteolíticas.

### **2. Material e Métodos**

Sementes de *Parkia discolor*, coletadas em Santa Isabel do Rio Negro – AM, foram trituradas até a obtenção de material finamente pulverizado, sendo este, submetido à extração salina, que consistiu na homogeneização em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v). A suspensão foi mantida sob leve agitação durante 2 horas, centrifugada a 5.000 x g, durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada, durante 48 horas, para a retirada do sal e, posteriormente, liofilizado, resultando no extrato protéico. As proteínas provenientes do extrato protéico e das frações obtidas nas etapas cromatográficas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para a detecção da atividade inibitória da tripsina bovina, 20 µL de solução de tripsina 1% (em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5), foram adicionados às amostras (200 µL), com o tampão de diluição citado completando o volume final de 500 µL, e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, 200 µL de BAPNA 1,25 mM foram adicionados e incubados a 37°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 150 µL de ácido acético a 30%. A leitura espectrofotométrica foi realizada a  $\lambda = 405$  nm. Para a purificação dos inibidores de tripsina, o extrato protéico foi submetido à cromatografia de troca iônica (DEAE- Sepharose e CM- Sepharose) e de exclusão molecular (PD-10 Desalting). Após as etapas cromatográficas, as frações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli 1970).

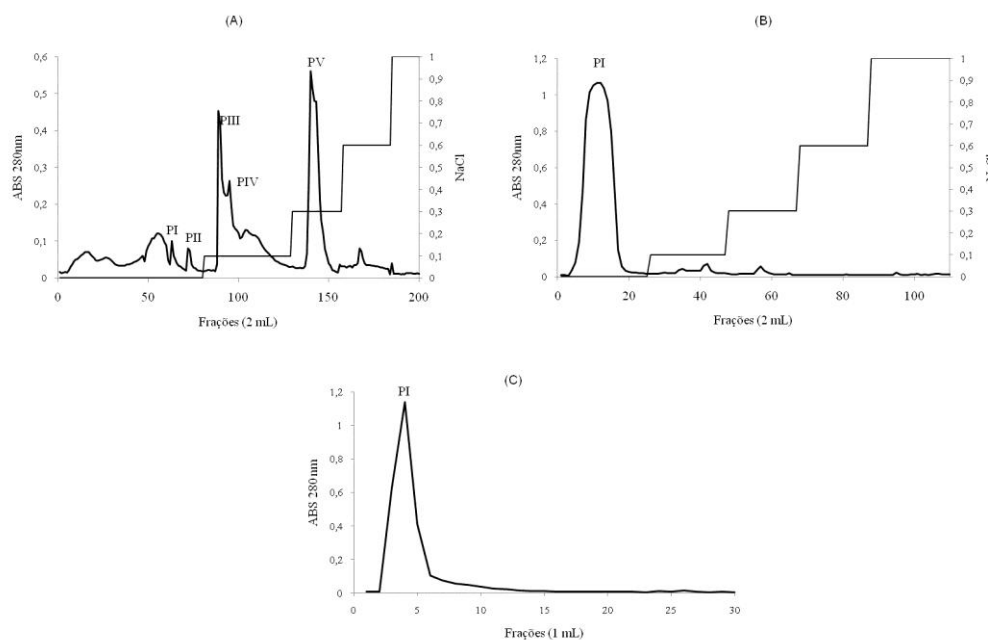
### **3. Resultados e discussão**

O perfil cromatográfico do extrato protéico de *P. discolor*, aplicado em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose) apresenta cinco picos distintos (PI, PII, PIII, PIV e PV), indicando a separação diferenciada de moléculas, com diferente afinidade de interação com o grupo trocador de íon da resina (dietilaminoetil) (Figura 1A). Ao passo que o perfil cromatográfico, obtido após a aplicação da amostra em CM-Sepharose, uma resina trocadora catiônica, exibiu um único pico, sem aplicação de gradiente salino, demonstrando que, de modo geral, as diferentes moléculas, presentes no extrato protéico, não interagem com o grupamento químico carboximetil que compõe a resina cromatográfica (Figura 1B).

A cromatografia em PD-10 Desalting, resultou em um único pico (PI) (Figura 1C). Esta coluna cromatográfica é caracterizada pela separação das amostras de acordo com seu tamanho relativo, separando proteínas com massa molecular entre 1 a 5 kDa. Nesse sentido, o extrato protéico apresenta predominância de moléculas com massas moleculares acima de 5 kDa.

Estudos envolvendo a purificação de inibidores de tripsina de sementes de leguminosas têm utilizado diferentes técnicas de cromatografia líquida, incluindo troca iônica, exclusão molecular, afinidade e fase reversa (Belitz e Weder, 1990; Calderon *et al.*, 2010).

Inibidores de tripsina de sementes de *Cassia obtusifolia* e *Albizzia kalkora* foram isolados por meio das técnicas cromatográfica de afinidade em tripsina-Sepharose e de exclusão molecular em Sephadex G-75 (Liao *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008). Ao passo que, para a purificação total do inibidor de tripsina de sementes de *Poecilanthus parviflora* fez-se necessário a utilização, além da cromatografia em Sephadex G-100, a cromatografia de fase reversa em coluna  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> (Garcia *et al.*, 2004).



**Figura 1** - Purificação de inibidores de tripsina de sementes de *P. discolor*. (A) Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose. (B) Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose. (C) Cromatografia de exclusão molecular em PD-10 Desalting.

O teor de proteínas no extrato protéico e nos picos, provenientes das cromatografias em DEAE-Sepharose, CM-Sepharose e PD-10, variou de 0,21 a 6,72%, sendo o maior percentual encontrado no extrato protéico, demonstrando, desta forma, a diminuição do rendimento protéico após as etapas cromatográficas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Teor de proteínas e inibição da atividade da tripsina bovina no extrato protéico e nas frações de *P. discolor*, provenientes das cromatografias de troca iônica (DEAE-Sepharose e CM-sepharose) e de exclusão molecular (PD-10).

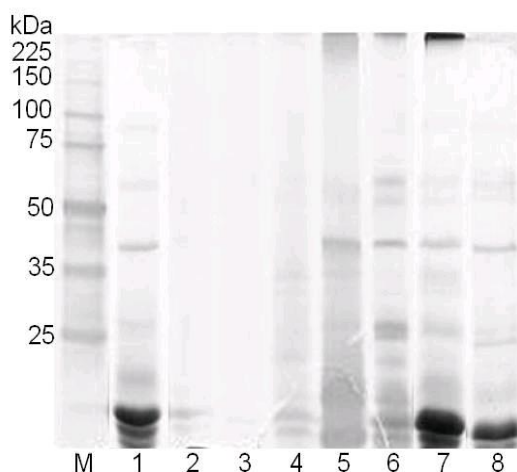
	Proteína (%)	Inibição da tripsina (%)
EP	6,72	84
PI (DEAE)	0,21	45
PII (DEAE)	0,06	59
PIII (DEAE)	0,51	0
PIV (DEAE)	1,32	76
PV (DEAE)	0,51	72
PI (CM)	5,90	32
PI (PD - 10)	4,40	36

No que diz respeito à inibição da atividade da tripsina, o extrato protéico apresentou o maior percentual antitriptico, seguido das frações PIV e PV, provenientes da DEAE. Ao passo que os percentuais inibitórios dos picos da CM-Sepharose e PD-10 Desalting foram reduzidos, aproximadamente, 2 vezes quando comparados a inibição do extrato protéico (Tabela 1). Esses resultados divergem dos encontrados na literatura científica, como por exemplo, para os inibidores isolados de *Pithecelobium dumosum*, *Crotalaria pallida* e *Vigna angularis*, em

que a atividade específica dos inibidores aumentou após as etapas de purificação (Gomes *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007; Klomklao *et al.*, 2010).

O perfil eletroforético das amostras, de modo geral, revelou a distribuição de bandas protéicas com massas moleculares abaixo de 25 kDa até a faixa de 75 kDa, exceto para PI e PII proveniente da DEAE, onde observou-se a presença de apenas duas bandas nítidas abaixo de 25 kDa (Figura 2). Enquanto, os picos PIV e PV da DEAE-Sepharose e, PI da CM-Sepharose e PD-10 Desalting apresentaram uma banda nítida na faixa de 25 kDa, podendo ser um indicativo da presença de inibidores de tripsina, visto que a literatura científica relata que essas proteínas apresentam massa molecular entre 8 e 25 kDa (Tremacoldi e Pascholati, 2004).

Inibidores de tripsina isolados de sementes de *Entada scandens* apresentou massa molecular de, aproximadamente, 20 kDa (Lingaraju *et al.* 2008). Resultados similares foram reportados em inibidores tipo Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis*, *Archidendron ellipticum*, *Inga laurina* e *Caesalpinia bonduc*, todas pertencentes à subfamília Mimosoideae (Macedo *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2007; Bhattacharyya *et al.*, 2007).



**Figura 2** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo SDS. M: marcador de massa molecular, Promega; 1: Extrato protéico; 2: PI (DEAE); 3: PII (DEAE); 4: PIII (DEAE); 5: PIV (DEAE); 6: PV (DEAE); 7: PI (CM) e 8: PI (PD-10).

#### 4. Conclusão

Inibidores de tripsina estão presentes em sementes de *P. discolor*. Contudo, para a purificação total desta molécula, faz-se necessário o uso de metodologias envolvendo diferentes técnicas cromatográficas (exclusão molecular, troca iônica, afinidade e fase reversa) e/ou tratamento da amostra (precipitação por sulfato de amônio ou cetônica).

Após as etapas cromatográficas, houve perda da atividade antitriptica, indicando a necessidade de ajustes nas metodologias utilizadas neste estudo (uso de diferentes tampões e faixas de pH).

O perfil eletroforético dos picos PIV e PV da DEAE-Sepharose e, PI da CM-Sepharose e PD-10 Desalting exibe uma banda nítida na faixa de 25 kDa, podendo ser um indicativo da presença de inibidores de tripsina.

#### 5. Referências

Belitz, H. D.; Weder, J. K. P. 1990. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International*, 6(2): 151-211.

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

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

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

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

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

Klomklao, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H.; Osako, K.; Tanaka, M. 2010. A heat stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 163-169.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lewis, G.; Schire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. 2005. *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew, 577p.

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

Lingaraju, M.H.; Gowda, L.R. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 850-855.

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

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

Marra, B.M.; Souza, D.S.L.; Aguiar, J.N.; Firmino, A.A.P.; Sarto, R.P.D.; Silva, F.B.; Almeida, C.D.S.; Cares, J.E.; Continho, M.V.; Martins-de-Sá, C.; Franco, O.L.; Grossi-de-Sá, M.F. 2009. Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots. *Peptides*, 30: 825-831.

Mello, G.C.; Oliva, M.L.V.; Sumikawa, J.T.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. 2002. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 20 (8): 625-632.

Mosolov, V.V.; Valueva, T. A. 2005. Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41 (3): 227-246.

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

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

Tremacoldi, C.R.; Pascholati, S. F. 2004. Inibidor de Tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (2):135-140.

Zhou, J.Y.; Liao, H.; Z. N.H.; Tang, L.; Xu, Y.; Chen, F. 2008. Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizzia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. *Biotecnol Lett*, 30: 1495-1499.