ISSN 2178 9665

PURIFICAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM SEMENTES DE *Parkia multijuga* E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Gabriel Bezerra TEIXEIRA[1]
José Francisco de Carvalho GONÇALVES[2]
Larissa Ramos CHEVREUIL[3]

[1]Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;
[2]Orientador CDAM/INPA; [3]Colaboradora CDAM/INPA

INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é caracterizada por sua grande diversidade vegetal e, dentre as famílias botânicas mais representativas, destaca-se a Fabaceae, tanto pelo número de espécies, quanto pelo grande número de biomoléculas fornecidas por essas espécies (Morris 1999).

Fabaceae (Leguminosae) é uma família botânica amplamente distribuída com uma grande diversidade de espécies divididas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, que compreendem espécies arbóreas, alguns arbustos, ervas e cipós (Souza 2016).

Sementes de Fabaceae apresentam grande quantidade de proteínas sintetizadas e acumuladas durante o seu desenvolvimento. Algumas dessas proteínas têm a função de reserva de aminoácidos, enquanto outras exercem um papel na defesa da semente contra microrganismos (Brito *et al.* 2016).

As proteínas de defesa da semente incluem enzimas, lectinas e inibidores de proteases (PI's, do inglês *protease inhibitor*). Inibidores de proteases são grupos de moléculas capazes de formar complexo com enzimas proteolíticas, apresentando especificidade por proteases de quatro classes catalíticas: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e metalo-proteases, reduzindo ou inativando sua atividade catalítica (Van der Hoorn 2008; Volpicella *et al.* 2011).

Muitos estudos são destinados à atividade antimicrobiana de proteínas purificadas de sementes, porém a grande maioria desses estudos envolve herbáceas ou arbustos do clima temperado, com poucas espécies arbóreas com significativa presença na composição florística da Amazônia (Chevreuil *et al.* 2009;Kim *et al.* 2009; Cândido *et al.* 2011; Souza 2012; Costa *et al.* 2014).

Tendo em vista o número reduzido de estudos sobre inibidores de proteases de sementes de espécies arbóreas da Amazônia associado com a potencialidade dessa proteína, essa pesquisa tem como objetivo melhor entender as aplicações dessa molécula, além de promover um uso mais adequado de espécies da flora Amazônica e servir de base para instalação de indústrias com viés biotecnológico, pois é o primeiro passo para o que pode se tornar na produção de biofungicidas. Entretanto, essa possibilidade relacionada às novas abordagens da bioindústria somente será efetivamente aplicada quando as matérias-primas forem convertidas em produtos. No caso das proteínas, não há como confirmar a função/aplicação biotecnológica sem antes caracterizar adequadamente a molécula e, para tanto, a purificação é uma condição indispensável.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

As sementes de *P. multijuga* foram adquiridas da empresa Connarus Ambiental LTDA, coletadas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Uatumã/AM. No Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal- INPA,

ISSN 2178 9665

as sementes foram trituradas e submetidas à extração proteica em NaCl 0,15 M (10% p/v) sob homogeneização durante 2 horas à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) . Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 11.000 g, durante 20 minutos, 10°C e, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 72 horas, sendo realizadas 3 trocas diárias e liofilizado, resultando no extrato proteico.
A concentração de proteínas solúveis foi estimada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). O teor de proteína foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas a 595 nm (UV / Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences, utilizando concentrações de albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Ensaios de inibição da tripsina

A inibição da tripsina foi determinada por meio de uma análise contendo 390 µL de tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, 10 µL de solução de tripsina e 100 µL de amostra. A mistura foi pré-incubada (30 minutos, 37 ºC) e, em seguida, foi acrescentado 200 µL do substrato 1,25 mM BAPNA (Sigma), prosseguindo a incubação durante 30 minutos à 37 ºC. Posteriormente, a reação foi paralisada pela adição de ácido acético 30%, sendo realizadas leituras espectrofotométricas a 405 nm (UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Armesham Biosciences). Uma unidade de inibição (UI) é definida como a quantidade de inibidor que decresce a absorbância em 0.01 unidades nas condições do ensaio.

Purificação de Inibidores de Tripsina

O extrato proteico foi aplicado em coluna de tripsina–Sepharose 4B (6,0 cm x 1,5 cm) equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Frações de 2 mL foram coletadas por meio de coletor de frações a um fluxo de 30 mL h^{-1}. As frações correspondentes ao pico retido foram eluídas com HCl 5 mM, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

SDS-PAGE

As frações provenientes das etapas cromatográficas foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% m/v de SDS, 10% m/v de glicerol e 1% m/v de ß-mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE, 20%) seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). Para estimativa das massas moleculares das proteínas utiliza-se marcadores da Promega (10 kDa-200 kDa). Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1% v/v, etanol e água destilada 1:4:5 v/v/v durante 2 horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v).

Testes antifúngicos

As atividades antifúngicas foram testadas contra *Aspergilus niger, Alternaria sp., Penicilium chysogenum* e *Fusarium oxysporum*, obtidos da micoteca mantida pelo LFBV/INPA. Os ensaios de inibição do crescimento fúngico foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990), com algumas adaptações. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm. A inibição fúngica, expressa em percentagem, é determinada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição fúngica (\%)} = 100 - \left(\frac{AT \times 100}{AC}\right)$$

onde:
AT = absorbância do tratamento
AC = absorbância do controle negativo

ISSN 2178 9665

O delineamento experimental utilizado para os bioensaios foi o inteiramente casualizado, consistindo em quatro tratamentos (fungos), com 10 repetições. As análises estatísticas foram feitas a partir de ANOVA e as médias compradas pelo Teste de Tukey (nível de 5% de probabilidade). O programa estatístico utilizado será o Statistica 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações cromatográficas provenientes da coluna de afinidade tripsina-Sepharose foram resultados da purificação parcial de inibidores de tripsina, onde foi possível observar um expressivo aumento na atividade específica inibitória contra a tripsina (Tabela 1). É importante ressaltar que, a partir desta etapa cromatográfica obteve-se fator de purificação elevado de, aproximadamente, 7 vezes e alto rendimento (Tabela 1).

Tabela 1. Purificação e rendimento em diferentes etapas de purificação de inibidores de tripsina de sementes de *Parkia multijuga*.

Etapa da purificação	Proteína total (mg mL^{-1})	Atividade total (UI)	Atividade específica (UI mg^{-1})	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
Extrato total	3,5	22,70	6,49	100	1
Tripsina-Sepharose	0,5	21,78	44,60	95,94	6,9

Proteínas podem ser purificadas por cromatografias líquidas (dentre as quais estão as de exclusão molecular, afinidade, troca iônica, entre outras), e um número menor dessas etapas pode significar uma eficiência maior deste processo de purificação, por haver uma menor perda de material biológico. Inibidores de tripsina foram isolados de sementes de *Hymenaea courbaril* L., *Butea monosperma*, *Inga vera* e *Adenanthera pavonina* L. com a associação de processos como precipitação, aquecimento e etapas cromatográficas em série em DE52-cellulose, Sephadex G-75, DEAE-Sepharose e DEAE-Sephadex G-50 (Jamal *et al.* 2015; Brito *et al.* 2016; Bezerra *et al.* 2016; Souza *et al.* 2016). Assim, inibidores de tripsina isolados de sementes de *Parkia multijuga* necessitam de um menor número de cromatografias para um elevado nível de purificação e rendimento.

Os perfis proteicos em SDS-PAGE provenientes das frações da cromatografia em coluna tripsina-Sepharose confirmaram a eficiência na purificação dos inibidores de tripsina, o qual apresentou banda única com massa molecular aparente de aproximadamente 9 kDa (Figura 1).

ISSN 2178 9665

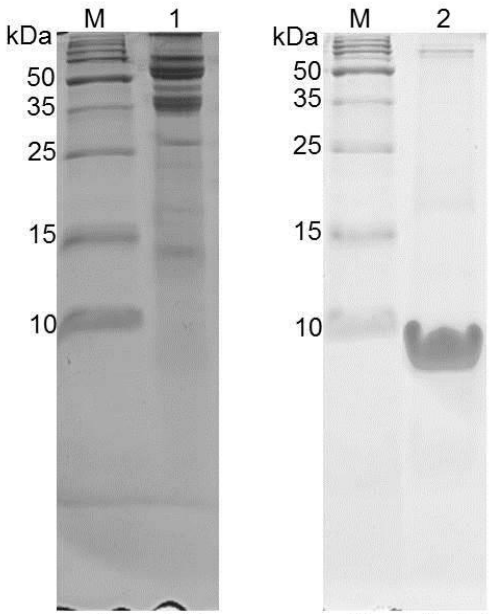

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (20%) em condições redutoras. M: Marcador de massa molecular (Promega). 1: Extrato total. 2: PmTI (*Parkia multijuga* Tripsin Inhibitor, fração proveniente da cromatografia em tripsina-Sepharose).

No que diz respeito à atividade biológica contra fungos fitopatogênicos, estudos preliminares com o extrato proteico não apresentaram inibição dos fungos testados, exceto para *Alternaria sp.*, onde o extrato aquecido apresentou maior inibição fúngica, fato que pode estar associado à concentração de compostos termoestáveis com possível ação antifúngica (Tabela 2).

Tabela 2. Inibição do crescimento fúngico do extrato proteico proveniente de sementes de *P. multijuga*. Ni: Não inibiu o crescimento.

Fungo	Inibição do crescimento fúngico (%)	
	Extrato não aquecido	Extrato aquecido
Aspergilus flavus	Ni	Ni
Alternaria sp.	13,4 ± 7,0	23,3 ± 8,0
Fusarium oxysporum	Ni	Ni
Penicilium chysogenum	Ni	Ni

Inibidores de tripsina isolados de sementes de *Abelmoschus moschatus*, uma espécie pertencente à família botânica Malvaceae, apresentaram forte inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *A. flavus*, contudo, não apresentaram algum efeito sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternate, Mucor indicus* e *Penicillium chrysogenum* (Dokka *et al.* 2015). Ao passo que, inibidores de tripsina de *Dolichos biflorus* inibiram os fungos *A. alternata, A. niger* e *F. oxysporum* (Kuhar *et al.* 2015).

O fato de o extrato proteico, proveniente de sementes de *P. multijuga,* não apresentou atividade antifúngica pode estar associado à presença de outros compostos, como por exemplo, carboidratos, que podem favorecer o crescimento fúngico.

ISSN 2178 9665

As frações provenientes das cromatografias de afinidade em tripsina-Sepharose foram testadas sobre os fungos *Aspergilus flavus, Alternaria sp., Fusarium oxysporum* e *Penicilium chysogenum*, entretanto, não houve a inibição do crescimento fúngico. Esse resultado pode estar associado a uma possível contaminação da amostra nos procedimentos que antecedem o ensaio de inibição fúngica ou a possibilidade do inibidor de tripsina (que apresentou atividade sobre o fungo *Alternaria sp.*) ter ficado no pico não retido da cromatografia. Entretanto, podem-se fazer testes em outras espécies de fungos e em outros microrganismos no intuito de explorar a atividade desta biomolécula.

CONCLUSÃO

Inibidores de tripsina podem ser purificados de sementes de *Parkia multijuga* com alto rendimento e atividade específica, porém, essas proteínas não inibiram o crescimento das espécies de fungos testadas.

Neste estudo confirma-se em um dos primeiros relatos relacionando a purificação de inibidores de tripsina em sementes de *Parkia multijuga*, e fornece informações importantes para o uso potencial dessa espécie no que diz respeito à obtenção de moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS

Bezerra, C.S.; Oliveira, C.F.R.; Machado, O.L.T.; Mello, G.S.V.; Pitta, M.G.R.; Rêgo, M.J.B.M.; Napoleão, T.H.; Paiva, P.M.G.; Ribeiro, S.F.F.; Gomes, V.M.; Silva, O.N.; Maria-Neto, M.; Franco, O.L.; Macedo, M.L.R. 2016. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. *Process Biochemistry*, 51: 792- 803.

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.

Brito, M.S.; Melo, M.B.; Alves, J.P.A.; Fontenelle, R.O.S.; Mata, M.F.; Andrade, L.B.S. 2016. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril L.* seeds and antibacterial effect of protein fractions. *Hoehnea*, 43(1): 11-18.

Broekaert, W.F.; Allen, A.K.; Peumans, W.J.1990. Separation and partial characterization of isolectins with different subunit compositions from *Datura stramonium* seeds. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 116-120.

Cândido, E.S.; Pinto, M.F.S.; Pelegrini, P.B.; Lima, T.B.; Silva, O.N.; Pogue, R.; Grossi-de-Sá, M.F.; Franco, L.O. 2011. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*, 25: 3290-3305.

Chevreuil, L.R.; Gonçalves, J.F.C.; Calderon, L.A.;Souza, L.A.G.; Pando, S.C.; Borges, E.E.L. 2014. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (Fabaceae). *Hoehnea*, 41(2): 181-186.

Costa, H.P.S.; Oliveira, J.T.A.; Sousa, D.O.B.; Morais, J.K.S.; Moreno, F.B.; Monteiro-Moreira, A.C.O.; Viegas, R.A.; Vasconcelos, I.M. 2014. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1-12.

Dokka, M.K.; Seva, L.; Davuluri, S.P. 2015. Isolation and purification of trypsin inhibitors from the seeds of *Abelmoschus moschatus* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 3750-3762.

Jamal, F.; Pandey, P.K.; Singh, D.; Ahmed, W. 2015. A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of .*Process Biochemistry*, 50: 311-316.

ISSN 2178 9665

Kim, J.Y.; Park, S.C.; Hwang, I.; Cheong, H.; Nah, J.W.; Cheong, H.; Nah, J.W.; Hahm, K.S.; Park, Y. 2009. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Science*, 10: 2860-2872.

Kuhar, K. ; Kansal, R.; Subrahmanyam, B.; Koundal, K.R.; Miglani, K.; Gupta, K.V. 2015. A Bowman–Birk protease inhibitor with antifeedant and antifungal activity from *Dolichos biflorus. Acta Physiol Plant*, 35: 1887–1903.

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

Morris, J.B. 1999. Legume genetic resources with novel "value added" industrial and pharmaceutical use. p. 196–201. *In*: J. Janick (ed.). *Perspectives on new crops and new uses.* ASHS Press, Alexandria, VA.

Souza, D.D. 2016. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenanthera pavonina L.* seeds. *South African Journal of Botany*, 104: 30-34.

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

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

Volpicella, M.; Leoni, C.; Costanza, A.; De Leo, F.; Gallerani, R.; Ceci, L.R. 2011. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 12: 386-398.