



Scientific Research and Reviews (DOI:10.28933/SRR)



PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Aesculus hippocastanum* (CASTANHA DA ÍNDIA)

Farias M.F.A.M.S1; Patriota L.L.S2; Procópio T.F2; Paiva P.M.G3; Santos N.D.L4; Napoleão T.H3

1Estudante do Curso de Biomedicina – UFPE, 2Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia; 3Docente do Departamento de Bioquímica da UFPE. 4Pesquisadora do Departamento de Bioquímica da UFPE.

ABSTRACT

A espécie *Aesculus hippocastanum*, popularmente conhecida como castanha da Índia, é uma árvore grande, frondosa, com fruto em cápsula verde espiculada e sementes brancas com tegumento vermelho, sendo esta espécie adaptada a qualquer tipo de solo e clima. Sua composição química é diversa, contendo saponinas, flavonoides, taninos e outros elementos 1. Partes dessa planta são utilizadas para produção de fitoterápicos, dentre elas sementes, casca e folhas. Suas sementes possuem várias propriedades biológicas dentre elas ação anti-inflamatória, vasoprotetora, anti-exsudativa, antiedematosa, antioxidante, analgésica, e antiviral 2, 3. As plantas possuem vários mecanismos de defesa contra fitopatógenos, sendo um deles a produção de proteínas de defesa, tais como a produção de inibidores de proteases. Esses inibidores podem inibir a atividade de enzimas essenciais ao patógeno provocando debilidade e/ou morte 4. Os inibidores de proteases apresentam ainda outras funções como: proteínas de reserva, agente regulador de proteases endógenas, bem como proteção de fluidos e tecidos da degradação pela atividade proteolítica 5. Os inibidores de tripsina são proteínas que interagem específica e reversivelmente com essa enzima promovendo sua inibição por meio da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima ou por ligação a outro sítio causando alteração da conformação. Essas proteínas são encontradas em diferentes tecidos vegetais. Inibidores de tripsina de plantas têm sido descritos como agentes inseticidas, e antimicrobianos 6. Dado o potencial dos inibidores de proteases e levando em consideração a eficiência dos fitoterápicos frente às terapias convencionais, muitos estudos têm colocado em perspectiva a análise do potencial biotecnológica dessas proteínas. O presente trabalho tem como objetivo identificar e purificar parcialmente o inibidor de tripsina proveniente de sementes da castanha da Índia, para posterior caracterização e avaliação de suas atividades biológicas.

*Correspondence to Author:

Farias M.F.A.M.S

Estudante do Curso de Biomedicina – UFPE

How to cite this article:

Farias M.F.A.M.S1; Patriota L.L.S; Procópio T.F; Paiva P.M.G; Santos N.D.L; Napoleão T.H. PURIFICAÇÃO PARCIAL DE INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Aesculus hippocastanum* (CASTANHA DA ÍNDIA). Scientific Research and Reviews, 2018, 5:52

 eSciPub
eSciPub LLC, Houston, TX USA.
Website: <http://escipub.com/>

O objetivo deste trabalho foi detectar e purificar parcialmente inibidor de tripsina de sementes de *Aesculus hippocastanum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração de proteínas

Farinha de sementes de *A. hippocastanum* foram obtidas com o auxílio de um martelo. A farinha (10 g) foi suspensa em 100 mL de NaCl 0,15 M, seguida de homogeneização por 16 h a 28 °C em agitador magnético. Depois desse processo, o extrato bruto foi obtido após filtração em gaze e centrifugação a 9000 g por 15 min. A concentração de proteínas do extrato foi determinada através do método de Lowry *et al*⁷ usando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL).

Isolamento de inibidor de tripsina de *A. hippocastanum*

O extrato de sementes de *A. hippocastanum* (1,0 mL) foi aplicado em uma coluna cromatográfica de troca iônica (DEAE-Sephadex) (Sigma-Aldrich, EUA) equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1 M em fluxo de 20 mL/h. Após lavagem para remoção das proteínas não adsorvidas, coluna foi eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 1,0 M. Os picos foram separados e analisados quanto à absorbância a 280 nm. Os picos eluídos foram dialisados contra água destilada por 3 h e o material foi concentrado por liofilização. Após a liofilização os picos foram avaliados quanto a dosagem de proteínas e atividade inibidora de tripsina.

O pool de proteínas obtidos na etapa cromatográfica foi avaliado em eletroforeses em gel de poliacrilamida em condições nativas básica⁸ e ácida⁹. Os géis da eletroforese ácida foram corados com corante Azul de Coomassie G durante 24 h e o gel da eletroforese básica com o corante Negro de Amido.

Atividade inibidora de tripsina

Ensaio de inibição da atividade hidrolítica da tripsina foi realizado em placa de microtitulação¹⁰. Alíquota da enzima (5 µL a 0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo CaCl₂ 0,02 M) foi adicionada a poço da microplaca

contendo 5 µL do substrato N-α-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) e diferentes volumes da amostra (20, 30 e 50 µL). O volume de cada poço foi ajustado para 200 µL com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e Triton X-100. Foram realizados controles do substrato (ausência da enzima, extrato e amostra), da amostra (1: ausência da enzima; 2: ausência da enzima e substrato) e enzima 100% (ausência da amostra). A absorbância a 405 nm foi determinada antes e após incubação do teste a 37 °C por 30 min. A inibição foi medida pela atividade residual da enzima e expressa em relação à hidrólise do substrato promovida na ausência das amostras avaliadas. Uma unidade de atividade inibidora de protease foi definida como a quantidade de inibidor que reduz a absorbância a 405 nm em 0,01 durante 30 min. Atividade específica foi definida pela razão entre o número de unidades e a quantidade de proteínas (mg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato salino de sementes de *A. hippocastanum* apresentou elevada concentração de proteínas (4 mg/mL). O ensaio de atividade de tripsina evidenciou a presença de inibidor de tripsina no extrato (*Tabela 1*). *Fracionamento proteico com sulfato de amônio foi realizado, mas não foi efetivo em aumentar a atividade específica, sendo essa etapa então descartada.*

Extrato salino foi então utilizado para a etapa cromatográfica, sendo aplicado em cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephadex. As proteínas não adsorvidas e adsorvidas à matriz DEAE-Sephadex foram coletadas, sendo obtidos dois picos (Figura 1).

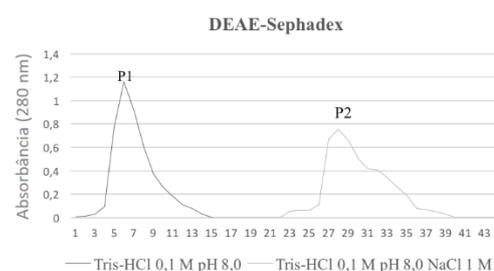


Figura 1. Cromatografia de troca iônica em matriz DEAE-Sephadex

Somente o pico de proteínas adsorvidas (P2) apresentou atividade inibidora de tripsina (1280,31 U/mg). A Tabela 1 sumariza o processo de purificação parcial de inibidor de tripsina.

Tabela 1. Purificação de inibidor de tripsina de sementes de *A. hippocastanum*.

Amostra	Dosagem proteica (mg/mL)	AIT	AITE	Purificação (vezes)
Extrato	4	14,957	149,57	1
P2	0,00357	4,57	1280,31	8,5

AIT= Atividade Inibidora de Tripsina; AITE= Atividade Inibidora de Tripsina Específica. P2: pico de proteínas adsorvidas à matriz DEAE-Sephadex.

Eletroforese em condições nativas (para proteínas ácidas e básicas) e desnaturantes foram realizadas a fim de avaliar a homogeneidade do inibidor. Foi observada a presença de duas bandas polipeptídicas em eletroforese nativa para proteínas ácidas (Figura 2), enquanto nenhuma banda foi observada em gel para proteínas básicas. Esse resultado demonstra a natureza aniônica das proteínas presentes em P2, o que está de acordo com a adsorção em matriz de carga positiva (DEAE-Sephadex). Ambas as proteínas detectadas podem ser inibidores de tripsina ou uma delas pode ser uma proteína contaminante.

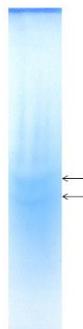


Figura 2. Eletroforese em condições nativas para proteínas ácidas do pico de proteínas do extrato de sementes de *A. hippocastanum* que adsorveram em matriz DEAE-Sephadex (P2).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a presença de inibidor de tripsina em sementes de *Aesculus hippocastanum*, o qual foi parcialmente purificado por cromatografia de

troca iônica.

REFERÊNCIAS

- MOREIRA *et al.* Plant lectins. *Proceeding of the first Brazilian congress on proteins – COBRAP*, v. 90, p.73-96, 1990.
- FELIPE, M. B. M.C. *et al.* Evaluation of genotoxic and antioxidant activity of an *Aesculus hippocastanum* L. (Sapindaceae) phytotherapeutic agent. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v.3, p. 261-266, 2013.
- KEDZIERSKI, B. *et al.* Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, v. 86, p. 68-72, 2016.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
- RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, v. 28, p. 425-449, 1990.
- RAWLINGS *et al.* Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, v. 378, p. 705-716, 2004.
- LOWRY *et al.* Mensuração de proteínas usando o reagente folin fenol. *J. Biol.Chem.* v. 193, p. 265–275, 1951.
- Reisfeld, R.A. *et al.* Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels, *Nature*, v. 195, p. 281–283, 1962. [SEPP]
- Davis, B.J. Disc Electrophoresis –II Method and application to human serum proteins, *Clin. Appl.*, p. 404–427, 1962.

10. PONTUAL *et al.* Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria in habitat of larvae mid gut. *Parasitol. Res.* v. 113, p. 727–733, 2014.

