



## 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*<sup>7</sup> 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 básica<sup>8</sup> e ácida<sup>9</sup>. 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

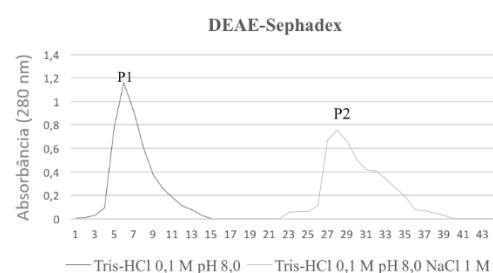
Ensaio de inibição da atividade hidrolítica da tripsina foi realizado em placa de microtitulação<sup>10</sup>. Alíquota da enzima (5 µL a 0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo CaCl<sub>2</sub> 0,02 M) foi adicionada a poço da microplaca

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

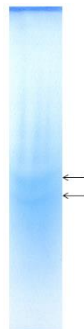
Somente o pico de proteínas adsorvidas (P2) apresentou atividade inibidora de tripsina (1280,31 U/mg). A Tabela 1 sumariza o processo de purificação parcial de inibidor de tripsina.

**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.

