

Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina

Lúcio Garcia de Oliveira; Andrezza Justino Gozzo; Viviane Abreu Nunes; Ilana Cruz Silva; Misako Uemura Sampaio; Claudio Augusto Machado Sampaio; Mariana da Silva Araújo*

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de Maio, 100, 04044-020, São Paulo, SP, Brasil
mariana.bioq@epm.br

Resumo

Caesalpinia echinata, o pau-brasil, é uma árvore pertencente à família das Leguminosas, sub-família Caesalpinioideae. Como já foram encontrados inibidores de proteases em sementes de outras Leguminosas, o objetivo do trabalho é purificar e caracterizar o inibidor de tripsina extraído das sementes de *C. echinata*. Após extração salina e precipitação por acetona, os inibidores foram purificados por cromatografia de troca iônica e filtração em gel, apresentando massas moleculares de 19,5 e 10 kDa e constante de inibição da ordem de nM.

C. echinata, o pau-brasil, é uma árvore pertencente à família das Leguminosas, sub-família Caesalpinioideae. Embora pouco se saiba da composição das sementes das Caesalpinias, vários inibidores de proteases foram encontrados em sementes de outras Leguminosas^{1,2}. Os inibidores de proteases são um importante tópico de trabalho³, pois permitem conhecer melhor as enzimas e desenvolver novos instrumentos para seu controle tanto bioquímico como, eventualmente, terapêutico. Enzimas proteolíticas estão presentes em todos os organismos e suas funções vão desde a digestão de proteínas até o controle de processos como fertilização⁴, coagulação do sangue⁵, apoptose⁶ e infecção por parasitas⁷; sabe-se também que todos os processos de disseminação extracelular, como a infecção ou proliferação de tumores envolvem proteólise⁸. Assim, o objetivo desse trabalho é identificar inibidores de serinoproteases em sementes de *C. echinata*, enfatizando a purificação e caracterização do inibidor de tripsina.

Observou-se que a tripsina foi totalmente inibida pelo precipitado cetônico dissolvido em água, enquanto que a calicreína plasmática humana e a quimotripsina foram em 84% e 87%, respectivamente e não se obteve alteração das atividades da trombina, da elastase ou das calicreínas teciduais.

O inibidor de tripsina eluído da cromatografia de troca iônica em NaCl 0,1M foi filtrado em coluna de TSK-GEL (sistema

HPLC); dos quatro picos proteicos obtidos, apenas os dois primeiros apresentaram atividade inibitória sobre tripsina; esses picos, repassados na mesma coluna sob as mesmas condições, foram completamente separados apresentando massas moleculares de 19,5 e 10,0 kDa (Figura 1).

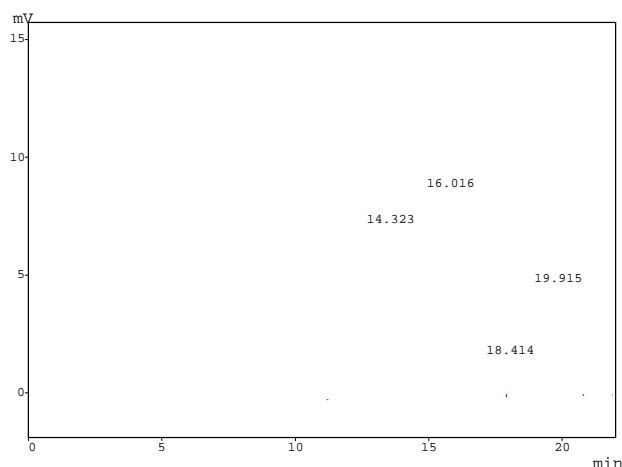


Figura 1. Filtração em gel do inibidor de tripsina. A coluna TSK-GEL (sistema HPLC) foi equilibrada em tampão acetato de amônio 0,1M pH 8,5. A eluição das proteínas foi feita isocraticamente, com o tampão de equilíbrio, em fluxo constante de 0,5ml/min. As massas moleculares dos picos 1 (19,5 kDa) e 2 (10,0 kDa) foram estimadas por comparação com uma filtração em gel de padrões moleculares nas mesmas condições e confirmadas por SDS-PAGE.

O pico 1 apresentou uma constante de inibição (K_i) de 14,5 μ M e concentração de 7,3 μ M; para o pico 2 o K_i foi de 5,9 μ M e a concentração foi de 8,8 μ M (Figura 2).

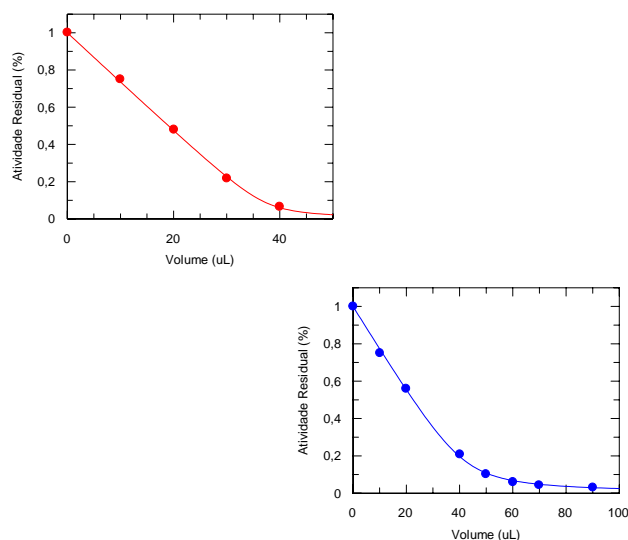


Figura 2. Os picos 1 e 2 da filtração em gel foram pré-incubados com tripsina em tampão Tris 0,1M pH 8,3, CaCl₂ 20mM, durante 10 min. a 37 °C; após esse período, foi adicionada a p-nitroanilida da N- α -benzoi-DL-arginina, cuja hidrólise foi acompanhada por leitura fotométrica em 405 nm. A concentração do inibidor e a constante de inibição foram calculadas segundo o modelo de

Morrison¹¹.

A retenção do inibidor na cromatografia de afinidade (Tripsina-Sepharose) e sua eluição por KCl/HCl confirmaram sua especificidade por tripsina.

Conclui-se, então, que as sementes de *C. echinata* apresentam, pelo menos, dois inibidores de tripsina com massas moleculares de 19,5 e 10 kDa.

Material e Métodos

Extração salina: As sementes sem casca foram inicialmente trituradas e submetidas a uma extração em NaCl 0,9% na proporção de 1:20 (g/ml)¹; após uma centrifugação por 10 min, em 5000 rpm, a 4 °C, o sobrenadante foi tratado com acetona (concentração final de 80%), a 4 °C para a precipitação de algumas proteínas; seguiu-se nova centrifugação por 20 min, a 5000 rpm, a 4 °C e o precipitado foi dissolvido em água destilada para os ensaios de inibição. Para a determinação da concentração proteica do extrato salino e do precipitado cetônico, foi empregado o método de Bradford⁹. Foram feitos ensaios de inibição de calicreína plasmática humana, calicreínas teciduais, trombina, elastase, tripsina e quimotripsina, usando-se substratos cromogênicos na forma de p-nitroanilidas, específicos para cada protease, acompanhando-se a liberação da p-nitroanilina em 405 nm.

Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex: O material resultante da precipitação cetônica, após diluição em água, foi aplicado a uma coluna DEAE-Sephadex A-50 (2,3 x 8,6 cm), equilibrada em tampão acetato de amônio 0,1M, pH 8,7, NaCl 0,03M. A resina foi lavada com o tampão de equilíbrio e as proteínas adsorvidas foram eluídas em concentrações crescentes de NaCl (0,1 a 0,5M), sob fluxo constante de 15 ml/h; a eluição das proteínas foi seguida por leitura fotométrica em 280 nm.

Filtração em gel: O pico proteico de maior atividade inibitória sobre tripsina, obtido da cromatografia de troca iônica, foi aplicado em coluna TSK-GEL (sistema HPLC), equilibrada em tampão acetato de amônio 0,1M, pH 8,5. A eluição das proteínas foi feita isocraticamente, com o tampão de equilíbrio, em fluxo constante de 0,5ml/min. Os picos proteicos resultantes dessa passagem foram separados e reaplicados à coluna, sob as mesmas condições.

Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sephadex: Alternativamente, foi realizada a purificação de pequena amostra do material resultante da precipitação cetônica através de cromatografia de afinidade¹⁰, em coluna de Tripsina-Sepharose (1,4 x 6,3 cm), equilibrada com o tampão Tris 50 mM pH 8,0, sob fluxo constante de 6 ml/h; a eluição do inibidor foi feita por acidificação com KCl 0,5M/HCl 0,01M e acompanhada por leitura fotométrica em 280 nm.

Dosagem da atividade inibitória: Para as dosagens de inibição, as amostras, em diferentes concentrações, foram pré-incubadas com tripsina padrão (125 nM), em tampão Tris 0,1M pH 8,3, CaCl₂ 20mM, durante 10 min a 37 °C; após esse período, foi adicionado o substrato p-nitroanilida da N- α -benzoyl-DL-

arginina (1,25mM), num volume final de 800 ml. A hidrólise do substrato foi acompanhada por leitura fotométrica em 405 nm, durante 7 min a 37 °C. A inibição da tripsina na hidrólise do substrato cromogênico, pelo inibidor presente nas amostras, foi medida pela atividade residual da enzima e expressa em relação à hidrólise promovida na ausência do inibidor. A concentração do inibidor e a constante de inibição foram calculadas, assumindo-se um mecanismo do tipo "slow tight-binding" e a formação de um complexo estequiométrico 1:1 entre enzima e inibidor, segundo o modelo de Morrison¹¹.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): A purificação do inibidor foi acompanhada por SDS-PAGE¹². O gel de corrida foi preparado na concentração de 10% e o gel superior na de 5%. As amostras foram preparadas em solução de tampão Tris 1,2 mM pH 7,0, SDS 1%, glicerina 5%, uréia 5% e azul de bromofenol 0,25% e β -mercaptoetanol 3% foi usado para preparar as amostras reduzidas; todas elas foram aquecidas em banho de areia por 7 min. a 100 °C. A eletroforese ocorreu sob uma corrente de 30 mA. A revelação das proteínas foi feita por reagente de Coomassie e, como descorante, foi usada uma solução de etanol, ácido acético e água (43,5:46,5:10, V/V).

Agradecimentos

FAPESP, CNPq e FADA-UNIFESP/EPM.

Referências

- ¹ Oliva MLV, Souza-Pinto JC, Batista IFC, Araújo MS, Silveira VF, Auerswald EA, Mentele R, Eckerskorn C, Sampaio UM, Sampaio CAM. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1477: 64-74
- ² Batista IFC, Araújo MS, Sampaio MU, Richardson M, Fritz H, Sampaio CAM. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Action on blood clotting phase enzymes. *Phytochemistry*. 1996; 41: 1017-22
- ³ Karlin S, Zuker M, Brocchieri L. Measuring residue associations in protein structures; possible implications for protein folding. *Journal of Molecular Biology* 1994; 239: 227-48
- ⁴ Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology International*. 1996; 20 (1): 33-9
- ⁵ Schmaier AH. Contact activation: a revision. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78 (1): 101-7
- ⁶ Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*. 1997; 326: 1-16
- ⁷ Rafati S, Bara AA, Bakhshayeh M, Vafa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clinical and Experimental Immunology*. 2000; 120 (1): 134-8
- ⁸ DeClerk YA, Imren S. Proteases inhibitors: role and potential

therapeutic use in human cancer. *European Journal of Cancer* 1994; 30A: 2170-80

⁹ Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 263 (32): 16626-30

¹⁰ Oliva MLV, Sampaio UM, Sampaio CAM. Serine and SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contortisiliquum* beans. Purification and preliminary characterization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1988; 20: 767-70

¹¹ Morrison JF. The slow binding and slow tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends in Biochemical Sciences*. 1982; March:102-5

¹² Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (259): 680-685

Bioactive derivatives obtained from lecanoric acid, a constituent of the lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale (Parmeliaceae)

Alcir Teixeira Gomes¹; Neli K. Honda^{1*}; Fernanda Mesquita Roese¹; Rozanna M. Muzzi¹; Maria Rita Marques²

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, MS

² Departamento de Morfofisiologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil
nkhonda@nin.ufms.br

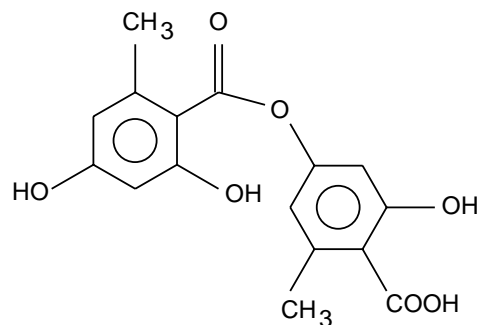
Abstract

With the aim of obtaining new compounds with potential antifungal activity, lecanoric acid, a chemical constituent of the lichen *Parmotrema tinctorum* and its derivatives prepared from structural modification were tested against the fungus *Cladosporium sphaerospermum*, by employing the bioautographic method. Activity of the derivatives ranged from 10- to 1- μ g concentrations. Results demonstrated this series of compounds to have potent fungitoxic activity.

The search for new substances with antifungal activity has received increased attention over the past years, since few antifungal agents, and of limited action, are available for the treatment of systemic mycoses.¹

Many compounds isolated from lichens have been effective in inhibiting growth of fungi and bacteria.²

In order to obtain compounds with potential activity against fungi, some derivatives of lecanoric acid (1), the main component of the lichen *Parmotrema tinctorum*, were prepared.



(1) Lecanoric acid

Alcoholysis of the acid led to the synthesis of the following derivatives: methyl (I), ethyl (II), *n*-propyl (III), *n*-butyl (IV), *n*-pentyl (V), *iso*-propyl (VI), *s*-butyl (VII), and *t*-butyl (VIII) orsellinates (2). Their structures were confirmed by ¹H