



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM INIBIDOR DE  
PEPTIDASE DE SEMENTES DE *Platypodium elegans* Vogel (FABACEAE) E O SEU  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

**Aluna:** Suellen Rodrigues Ramalho

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Campo Grande - MS  
2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

---

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM INIBIDOR DE  
PEPTIDASE DE SEMENTES DE *Platypodium elegans* Vogel (FABACEAE) E O SEU  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Campo Grande - MS  
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

Suellen Rodrigues Ramalho

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM INIBIDOR DE  
PEPTIDASE DE SEMENTES DE *Platypodium elegans* Vogel (FABACEAE) E O SEU  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Campo Grande - MS

2016

*Dedico este trabalho à minha família, e aos meus pais pelo amor e carinho incondicional durante todo esse período de aprendizado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e por nunca me desamparar em todo o período de estudo e por essa grande oportunidade na minha vida.

À minha família por todo o incentivo e apoio, razão maior de toda a minha determinação. A minha mãe Glaucia sempre presente. A minha irmã Gabriela. Amo vocês.

Eternamente grata a minha orientadora Maria Lígia por confiar na minha competência durante os dois anos de mestrado, por me acolher em seu laboratório e por estar sempre disposta a auxiliar nas discussões.

Aos meus amigos que mesmo de longe apoiaram nessa caminhada e me incentivaram a seguir em frente por mais que os dias estivessem difíceis.

A minha querida Turma de Mestrado 2014, por todos os ensinamentos compartilhados, apoio e troca de experiências. Jamais me esquecerei dos botânicos e agrônomos que fizeram parte da minha vida.

Aos companheiros de laboratório do LPPFB, muito obrigada pelas orientações, e paciência em ensinar, sei que o tempo é precioso e tentei ao máximo absorver o conhecimento de cada um de vocês.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, por colaborarem com meu crescimento profissional e intelectual.

Aos membros da banca de qualificação e examinadores da dissertação.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a execução desse trabalho! Meu muito Obrigada!!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
I. INTRODUÇÃO .....	12
1. Considerações gerais .....	12
2. Características gerais dos inibidores de peptidases em vegetais .....	14
3. Classificação dos Inibidores de Peptidases em Plantas .....	14
4. Inibidores de serinopeptidases .....	16
5. Papel biológico dos inibidores de peptidases de plantas .....	16
6. Inibidores de peptidases como agentes antimicrobianos (AMPs) .....	17
7. Peptídeos antimicrobianos .....	18
8. Inibidores de peptidases com atividade antimicrobiana .....	19
9. <i>Platypodium elegans</i> Vogel .....	20
II. OBJETIVOS .....	22
1. Objetivo Geral .....	22
2. Objetivos Específicos .....	22
III. MATERIAIS .....	23
1. Espécie vegetal .....	23
1.2 Enzimas .....	23
1.3 Substratos .....	24
1.4 Resinas .....	24
IV. MÉTODOS .....	24
1. Isolamento e purificação do inibidor de <i>Platypodium elegans</i> .....	24
1.1 Obtenção da farinha das sementes de <i>P. elegans</i> .....	24
1.2 Obtenção do Extrato Bruto .....	24
1.3 Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose .....	25
1.4 Cromatografia de Afinidade Sepharose-Tripsina .....	25

1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	25
2. Quantificação de Proteína.....	26
3. Eletrofore em gel de poliacrilamida contendo SDS .....	26
4. Caracterização do Inibidor PeTI.....	27
4.1 Determinações da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF .....	27
4.2 Atividade Inibitória para tripsina bovina .....	27
4.3 Atividade Inibitória para quimotripsina bovina .....	28
4.4 Estequiometria de Inibição.....	28
4.5 Determinação da constante de inibição (K <sub>i</sub> ) .....	28
5. Estudo de estabilidade de PeTI.....	29
5.1 Estabilidade Térmica.....	29
5.2 Estabilidade a variação de pH .....	29
5.3 Estabilidade ao agente redutor Ditioneitol (DTT).....	29
6. Efeito da atividade antimicrobiana de PeTI .....	30
6.1 Microrganismos.....	30
6.2 Estocagem e manutenção das cepas bacterianas .....	30
6.3 Atividade Antimicrobiana .....	30
7. Análise estatística .....	31
IV. RESULTADOS.....	32
1. Purificação de PeTI .....	32
1.1 Cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose.....	32
1.2 Cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-Tripsina .....	33
1.3 CLAE em C-18.....	33
1.4 Tabela de purificação do inibidor.....	34
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS .....	35
3. Caracterização do Inibidor PeTI.....	36
3.1 Determinações da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF .....	36

3.2 Atividade Inibitória para tripsina e quimotripsina bovina .....	37
3.3 Estequiometria de inibição .....	38
3.4 Determinação da constante de inibição (K <sub>i</sub> ) .....	39
4. Estudos de Estabilidade de PeTI .....	40
4.1 Estabilidade Térmica.....	40
4.2 Estabilidade a variação de pH .....	41
4.3 Estabilidade ao agente redutor DTT.....	42
5. Estudo da atividade antimicrobiana de PeTI .....	44
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do inibidor PeTI.....	44
V. DISCUSSÃO.....	48
VI. CONCLUSÃO .....	53
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## ABREVIATURAS

**PeTI:** Inibidor de Tripsina de *Platypodium elegans*

**IP:** Inibidores de peptidases

**pH:** Potencial hidrogenônico

**DTT:** Ditioneitol

**HPLC:** Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (High Performance Liquid Chromatography)

**BAPNA:** N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

**Suc-AAPF-pNA:** N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

**CMH:** Caldo Mueller Hinton

**EB:** Extrato bruto

**KDa:** Kilo Daltons

**BSA:** Albumina de Soro Bovina

**TFA:** Ácido Trifluoracético

**ACN:** Acetonitrila

**UFC:** Unidade Formadora de Colônia

## RESUMO

Os inibidores de peptidase de plantas (IPs) desempenham um importante papel no desenvolvimento vegetal através da regulação das atividades de peptidases envolvidas em processos fisiológicos. Além disso, os IPs são associados ao mecanismo de defesa natural das plantas contra insetos, fungos e bactérias, despertando um iminente interesse biotecnológico. Neste estudo objetivou-se isolar e purificar um inibidor de tripsina presente nas sementes de *Platypodium elegans* (Fabaceae), denominado PeTI (inibidor de tripsina de *Platypodium elegans*) e avaliar seu potencial biológico antimicrobiano contra cepas bacterianas. O PeTI foi purificado em duas etapas cromatográficas. Quando submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18, PeTI apresentou sete picos, possivelmente indicando a presença de isoformas. A PAGE-SDS revelou que PeTI é constituído por uma única cadeia polipeptídica, apresentando uma massa molecular aparente de 19 kDa, sob condições reduzidas e não-reduzidas. Além disso, PeTI apresentou uma razão de inibição de 1:1 para tripsina bovina. Características similares (estequiometria 1:1, constante de inibição (ki) temperatura, pH e DTT) são comumente observados para IPs da família Kunitz. Assim sugerimos que PeTI possa pertencer a mesma família. O estudo de estabilidade indicou que o inibidor manteve-se estável entre uma ampla variação de temperatura (37–80°C) e pH. Entretanto, o PeTI apresentou uma redução em sua atividade inibitória após incubado com ditioneitol (DTT) a 10 e 100 mM, após 15 minutos de incubação. O PeTI apresentou atividade inibitória *in vitro* contra as cepas bacterianas gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e gram-negativas: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*. A atividade biológica reforça a participação do inibidor na defesa vegetal e demonstra o potencial biotecnológico de PeTI, que deve ser futuramente investigado como uma ferramenta de controle de patógenos.

**Palavras-chave:** *Platypodium elegans*, defesa vegetal, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Plant peptidase inhibitors (PIs) play an essential role in plant development regulation due to peptidase activities that are involved in physiological processes of the plant. Furthermore, the IPs are also associated with defense mechanism. Thus, the plant peptidase inhibitors have some characteristics of biotechnological interest to be related to the plant defense against insects, fungi and bacteria and they are often found in leguminous seeds. This study, we isolated and purified an inhibitor from *Platypodium elegans* (Fabaceae) seeds, named PeTI (*Platypodium elegans* trypsin inhibitor) and its biological potential was evaluated. The PeTI was purified by ion exchange column, followed by affinity column. When subjected to high-performance liquid chromatography on C-18 column, PeTI presented seven peaks, possibly indicating the presence of isoforms. SDS-PAGE revealed that PeTI consists of a single polypeptide chain, having an apparent molecular mass of 19 kDa under reducing and non-reducing conditions. Moreover, PeTI showed inhibitory activity against trypsin and bovine chymotrypsin, and showed an inhibition ratio of 1: 1, inhibition constant (K<sub>i</sub>) to bovine trypsin. Stability studies indicated that PeTI was stable between a wide range of temperature (37-80°C) and pH. However, PeTI had a decrease in its inhibitory activity when incubated with diitretitol (DTT) to 10 and 100 mM after 15 minutes. PeTI had inhibitory activity in vitro against the gram-positive bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and gram-negative: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*. Biological activity increases the participation of the inhibitor in plant defense and has the potential to PeTI being investigated as a biotechnological tool for the control of pathogens.

**Key Words:** *Platypodium elegans*, plant defense, antimicrobial activity.

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Considerações gerais

As plantas produzem moléculas de defesa contra insetos e patógenos ou até mesmo por estímulo a fatores ambientais e genéticos. (Singh et al. 2003). As plantas apresentam grau de resistência em resposta aos danos provocados pelos agressores, dessa forma desenvolveu em aspectos evolutivos, mecanismos bioquímicos e morfológicos em sua defesa. Essas estratégias de defesas são capazes de impedir mais ataques dos herbívoros, embora haja um número reduzido de insetos capazes de se adaptar às espécies de plantas específicas (Mello & Silva-Filho 2002).

No mecanismo bioquímico ocorrem dois grupos distintos: como defesas constitutivas para repelir herbívoros através toxicidade direta ou através da redução da digestibilidade dos tecidos vegetais, barreiras químicas e físicas. E defesas induzidas de substâncias sintetizadas em resposta ao dano provocado no tecido pelos herbívoros (Richardson 1991). As respostas desse tipo de defesa incluem aumento ou síntese de proteínas vegetais, que possuam a capacidade de impedir esses ataques nas plantas. As mais estudadas são as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos, canatoxinas, inibidores de  $\alpha$ -amilase, inibidores de enzimas proteolíticas e a síntese de vários AMPs (pequenos peptídeos ou proteínas antimicrobianos) (Carlini & Grossi de Sá 2002, Dang & Van Damme 2015).

Dentre as macromoléculas produzidas pelas plantas, destacam-se os inibidores de peptidases (IPs). Estão amplamente distribuídos em diversas famílias de plantas, sendo que os IPs da família Fabaceae são os mais estudados e caracterizados (Islam et al. 2015). Em plantas, relacionam-se com o armazenamento de proteínas e/ou mecanismos de defesa vegetal (Macedo et al. 2007, Torres-Castillo et al. 2009). Além da resposta local, sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema, acarretando aumento nos níveis de IPs por toda planta (Jongsma & Bolter 1997).

Estas moléculas são proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica (Jamal et al. 2013). Além disso, eles são encontrados em órgãos de reserva (sementes, raízes e tubérculos), vegetativos (folhas e caules) e reprodutivos (flores e frutos) ( Mello & Silva-Filho 2002, Xavier-Filho 1992, Gomes et al. 2005).

Os IPs têm sido investigados pelas suas funções em diversos processos biológicos, como por exemplo, para diagnósticos clínicos, na caracterização das superfícies celulares; na elucidação da estrutura de proteínas e carboidratos e em estudos da sua toxicidade sobre a capacidade de controle

de espécies de bactérias e fungos fitopatogênicos (Kennedy et al. 1995, Haq et al. 2004, Rawlings et al. 2004, Sharon 2007).

Diversos termos são freqüentemente utilizados para designar este grupo de enzimas proteolíticas: peptidases, hidrolases peptídicas, proteases e proteinases (Barrett *et al.*, 1998), os quais originalmente tinham significados ligeiramente diferentes e hoje em dia são praticamente sinônimos (Barrett, 1999). O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 1992) recomendou o termo peptidase como termo geral para todas as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas.

## **2. Características gerais dos inibidores de peptidases em vegetais**

As informações científicas sobre a composição química das sementes são úteis para a compreensão de sua fisiologia e obtenção de novos produtos a partir de reservas estocadas, como as proteínas, que correspondem em média, de 20 a 30% do peso seco das sementes de leguminosas, embora existam exceções como as sementes de soja que podem chegar a 40% Vitale & Bollini (1995).

As várias classes funcionais das moléculas de proteínas, encontradas nas sementes de leguminosas, de (2 a 15% do peso seco total) considerados metabólitos importantes. Elas podem atuar no mecanismo de defesa contra insetos e patógenos, como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteinases endógenas e como sinais de respostas às condições ambientais (Bhattacharyya et al. 2006, Rameshwaram & Nadimpalli 2008, Wititsuwannakul et al. 2008, Konarev et al. 2008).

Os inibidores de peptidases são proteínas que interagem de forma específica com diferentes enzimas proteolíticas, promovendo sua inibição por meio da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima (Richardson 1991, Laskowski Jr. & Qasim 2000, Lingaraju & Gowda 2008). Esses inibidores são considerados moléculas estáveis, podendo suportar variações de temperatura, pH, agentes desnaturantes. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes (Joshi et al. 2013).

O crescente interesse pelo isolamento, caracterização estrutural e funcional dessas proteínas é a busca por moléculas com potencial biotecnológico, objetivando o controle e aplicação da prospecção de novos agentes antimicrobianos.

## **3. Classificação dos Inibidores de Peptidases em Plantas**

Os IPs são classificados de acordo com a classe de enzima proteolítica que inibem em inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metalopeptidases (tabela 1) (Haq et al. 2004, Dang & Van Damme 2015). Esses inibidores da peptidase agem semelhantes aos inibidores competitivos, os quais se ligam ao sítio reativo da enzima para formar um complexo com uma constante de dissociação baixa. O inibidor compete diretamente com o substrato da enzima e assim forma um complexo inibidor – enzima que não pode ser dissociado pelo mecanismo normal da enzima. Consequentemente bloqueia o sítio reativo e a atividade da peptidase da enzima (Lawrence e Koundal 2002).

**Tabela 1.** Tabela descritiva da famílias de peptidases. Fonte: Adaptada de Neurath 1986, Trecamoldi 2009.

<b>Famílias</b>	<b>Peptidases Representativas</b>	<b>Sítios Reativos</b>
	Tripsina	
<b>Serinopeptidases</b>	Quimotripsina	Asp, His, Ser
	Elastase	
	Papaína	
<b>Cisteínopeptidases</b>	Actinidina	Cis, His, Asp
	Catepsina	
	Penicilopepsina	
<b>Asparticopeptidases</b>	Renina	Asp
	Carboxipeptidase A	Zn, Glu, Try
<b>Metalopeptidases</b>	Termilisina	Zn, Glu, His

Os inibidores cisteínopeptidases atuam contra enzimas que possuem em seu sítio ativo o resíduo de cisteína ou histidina como aminoácido catalítico. As principais fontes desses inibidores são: feijão (Fernandes et al. 1993), batata (Waldron et al. 1993), trigo (Kuroda et al. 2001), milho (Abe et al. 1995), soja (Misaka et al. 1996) entre outros descritos na literatura.

Inibidores asparticopeptidases atuam contra enzimas digestivas como a pepsina e quimosina, catepsina D, enzimas de processamento e algumas peptidases de fungos. Estas enzimas são compostas por moléculas que possuem um resíduo de ácido aspártico (Neurath 1990, Embrapa 2009).

Inibidores de metalopeptidases em plantas são representados pela família de inibidores metalo-carboxipeptidases em tomate (Fan & Wu 2005) e batata (Graham & Ryan 1981, Fan & Wu 2005). A atividade destas enzimas é dependente da ligação de um metal, geralmente zinco. Estudos cristalográficos indicam que o zinco é ligado por duas histidinas e um ácido glutâmico (Neurath 1990).

Os inibidores de serinopeptidases possuem a capacidade de inibir as enzimas tripsina, quimotripsina e elastase, as quais apresentam em seu sítios ativos a tríade catalítica asparagina (Asp), histidina (His) e serina (Ser). Dentre os papéis fisiológicos incluem a regulação de peptidases

endógenas durante a dormência das sementes, mobilização de proteínas de reserva e proteção contra enzimas proteolíticas de parasitas e insetos (Haq et al. 2004).

#### **4. Inibidores de serinopeptidases**

Os inibidores de serinopeptidases são os mais estudados e melhor caracterizados (Jamal et al. 2013). Tradicionalmente, os inibidores têm sido agrupados em famílias conhecidas como Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, Abobora, Cevada, Cistatinas, Thaumatin-like e Ragi A1 (RICHARDSON, 1991; BIRK, 2003; OLIVA et al., 2010). Além disso, são divididos em duas famílias, Bowman-Birk e Kunitz, estruturalmente distintas baseada nas seqüências de aminoácidos, massa molecular, estrutura tridimensional e a estabilidade a diferentes agentes (Oliva et al. 2011).

A maioria dos inibidores do tipo Kunitz são proteínas de aproximadamente 18-22 kDa que contêm quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto e possuem um único sítio reativo. Em contrapartida, os inibidores do tipo Bowman Birk, possuem massa molecular menor em torno de 8-11 kDa, alto teor de cisteína e dois sítios reativos (Birk 2003, Oliva et al. 2011, Rao & Suresh 2007).

#### **5. Papel biológico dos inibidores de peptidases de plantas**

Os IPs participam de atividades biológicas na planta relacionadas a regulação dos processos fisiológicos e no mecanismo de defesa (Dang & Van Damme 2015). Atividade de enzimas são processos essenciais para o bom metabolismo e da vida de qualquer organismo vivo. A função e a remoção de proteínas adequada, bem como a remobilização dos aminoácidos durante toda a vida da planta são dependentes de proteólise. As proteases não são unicamente uma parte integrante do aparelho de remoção de degradativa, indesejada, superabundante, e danificado das proteínas, mas também atuam como componentes essenciais na ativação e maturação de proteínas-alvo chave através clivagem proteolítica específica (Pesquet 2012).

Os IPs formam um grupo importante de proteínas de defesa nas plantas, pois podem atuar como agentes antimicrobianos. Peptídeos ou proteínas antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são pequenas proteínas, menos de 100 resíduos de aminoácidos, com carga líquida positiva em pH fisiológico, são anfipáticos e possuem um amplo espectro de atividade contra microrganismos, sendo conservados durante a evolução (Gennaro e Zanetti, 2000; Hancock e Scott, 2000; Mitta et al., 2000; Boman, 2003; Marshall e Arenas, 2003; Peschel et al., 2006).

Nas plantas, os AMPs desempenham o papel de defesa frente à invasão de um microrganismo, ou ataque de um inseto, ou até mesmo um estresse ambiental. Estes peptídeos foram denominados antimicrobianos, devido ao seu amplo espectro microbicida, especialmente sobre fungos, leveduras, vírus envelopados, bactérias e parasitas (Thevissen et al., 2004; Leonard et al., 2011).

## **6. Inibidores de peptidases como agentes antimicrobianos (AMPs)**

Dentre esses inibidores que atuam como agentes antimicrobianos encontram-se as plantas que apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais (Bresolin & Cechinel Filho 2010). Podemos citar os inibidores de peptidases que podem atuar no combate a esses microrganismos. Ampliando a possibilidade de investigação em laboratórios de todo o mundo. A escolha destes microrganismos baseou-se não só em vários estudos prévios de atividade antimicrobiana de inibidores de peptidases reportados na literatura (Feng et al. 2003). Durante as últimas décadas, os inibidores da peptidases de plantas ganharam muita atenção devido ao seu papel na defesa e possíveis aplicações para a melhoria da resistência das plantas a patógenos (Kim et al. 2009, Valueva & Mosolov 2004).

Os AMPs podem ser classificados tanto como peptídeos ou proteínas são moléculas que geralmente apresentam um baixo peso molecular podendo variar de 3 a 10 kDa. Possuem carga líquida positiva em pH fisiológico, dobram-se em moléculas anfipáticas, apresentando uma face hidrofóbica e outra face carregada, facilitando a interação com a membrana da célula alvo (Lay e Gallo, 2009; Baumann et al., 2010). AMPs são ricos em cisteína, podendo variar entre 4, 6 ou 8 de acordo com a família, sendo as cisteínas pareadas formando pontes dissulfeto (2, 3 ou 4), conferindo à molécula uma alta estabilidade. Os AMPs apresentam, ainda, uma estrutura tridimensional globular comum, de acordo com a família em que se encontram (Broekaert et al., 1997). Durante várias décadas, a resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. Os resultados da resistência causa a redução efetiva de medicamentos antibacterianos, antiparasitários, anti-virais e anti-fúngicos, tornando o tratamento mais difícil. O impacto em pacientes particularmente vulneráveis é mais óbvio (Who 2014).

A resistência a patógenos é um desafio complexo da saúde pública mundial, e nenhuma estratégia única ou simples pode conter totalmente o surgimento e propagação de organismos

infecciosos que tornam-se resistentes aos antimicrobianos disponíveis. O desenvolvimento contínuo é um fenômeno natural em microorganismos. Acelerada pela seletiva pressão exercida pelo uso abusivo de agentes antimicrobianos em seres humanos e animais. Consequentemente, drogas antibacterianas tornam-se menos efetivas, resultando em uma aceleração da emergência de segurança da saúde global que ultrapassa rapidamente as opções de tratamento disponíveis (Who, 2014). Devido a emergência de patógenos microbianos e a capacidade quase que imediata de replicação e sua resistência aos antibióticos disponíveis levou a um grande interesse no isolamento de moléculas com potencial antimicrobiano como os inibidores de peptidases.

### 7. Peptídeos antimicrobianos

Em plantas, os AMP podem ser agrupados em diferentes classes, incluindo ciclotides, tioninas, as defensinas, as proteínas de transferência de lípidos, snakinas, peptídeos heveína-like, peptídeos do tipo knotinas e vicilina-like (Tabela 2). Os resíduos carregados positivamente pode também interagir com lípidos da membrana através de receptores específicos na superfície da célula (Sitaram & Nagaraj 1999). Por conseguinte, a ligação do peptídeo a membrana pode ativar vários caminhos que causarão a morte celular.

Em geral, os peptídeos podem atuar na formação de poros da membrana, resultando em vazamento de íons e metabólitos, despolarização e a interrupção do processo de respiração, biopolímero a síntese e a morte das células (Yeaman & Yount 2003).

**Tabela 2.** Peptídeos antimicrobianos em plantas. Fonte: adaptado de García-Olmedo et al. 2001.

<b>Família</b>	<b>Número de resíduos</b>	<b>Ligações dissulfeto</b>	<b>Tipos de subfamílias</b>	<b>Atividade inibitória</b>
<b>LTPs</b>	90-95 ou 70-75	3-4	I-II	Bactérias Gram (+) e fungos
<b>Snakinas</b>	61-70	6	I-III	Bactérias e fungos
<b>Defensinas</b>	45-54	4	I-IV	Bactérias Gram (+) e fungos
<b>Tioninas</b>	45-47	3-4	I-IV	Bactérias e fungos
<b>Heveínas-like</b>	43	4	I	Bactérias Gram(+) e fungos

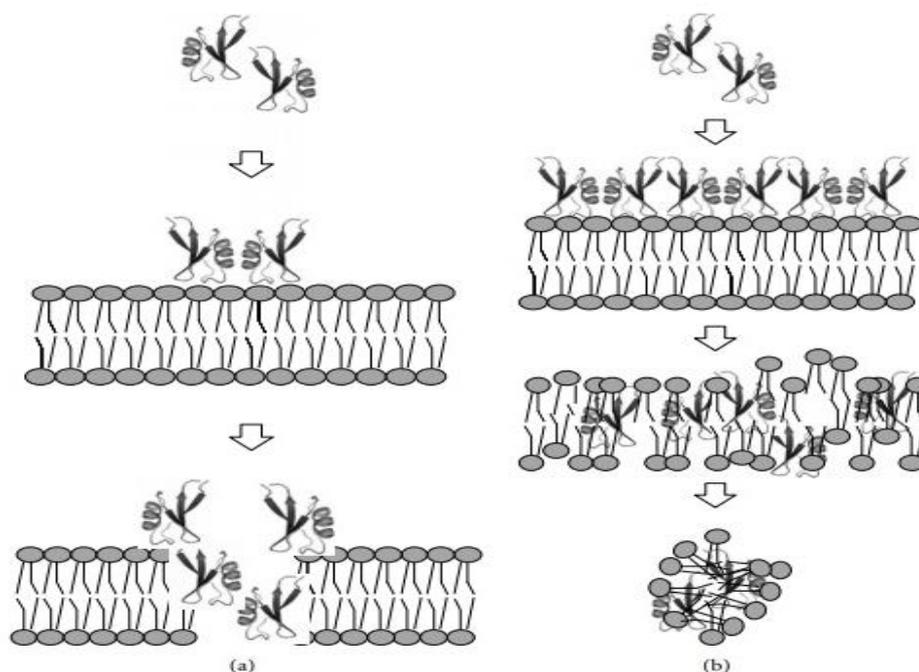
## 8. Inibidores de peptidases com atividade antimicrobiana

Alguns estudos já foram descritos na literatura com inibidores de plantas com ação antimicrobiana encontradas nas sementes de *Leonurus japonicus* Houtt (Yang et al. 2006), Fistulin um inibidor de peptidase extraído das folhas de *Cassia fistula*, foi ativo contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Arulpani & Sangeetha 2012). De acordo com Rakashanda et al. 2012 os inibidores das sementes de *Lavatera cashmeriana* possui atividade antimicrobiana contra as seguintes cepas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Um grande número de inibidores de peptidases já foram isolados de diversos organismos, animais, plantas, insetos entre outros e que inibem o crescimento de patógenos infecciosos. Estas moléculas têm algumas características importantes responsáveis por sua atividade antimicrobiana, incluindo as suas estruturas anfipáticas e sua carga catiônica em pH fisiológico. Uma das hipóteses sugeridas para o mecanismo de ação é que provavelmente essas moléculas possuam a capacidade de causar um colapso sobre a superfície das membranas das células bacterianas. Segundo esta hipótese, os peptídeos catiônicos carregados eletrostaticamente são atraídos para as moléculas carregadas negativamente tais como fosfolípidos aniônicos, lipopolissacáridos (LPS) gram-negativa e ácido teicóico gram-positiva, onde estão localizados assimetricamente na arquitetura da membrana (Epanand & Vogel, 1999, Yeaman & Yount, 2003).

Esses inibidores tem se mostrado eficazes, no entanto, pouco explorados em relação ao seu potencial biotecnológicos como agentes antimicrobianos. Dessa forma é interessante investigar os mecanismos de ação e descobrir novas biomoléculas com atividade biocida.

Sua flexibilidade conformacional dobrável, uma carga global positiva e sua natureza anfipática são essenciais para atividade antibacteriana e sua interação com as membranas das bactérias (Jenssem et al. 2006). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que peptídeos antimicrobianos de plantas podem agir em alvos intracelulares (Aerts et al. 2008).



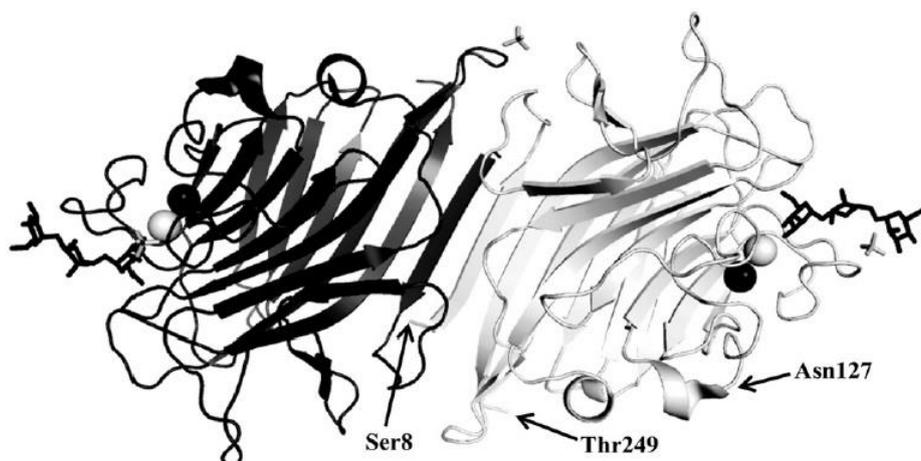
**Figura 1:** Mecanismo de ação de peptídeos antibacterianos, a) modelo barreira e b) modelo tapete. (Adaptado: Shai 2002, Pelegrini et al. 2011). No modelo de formato circular, a diferença principal é o tipo de poros formados, em que os peptídeos e lipídeos são sobrepostos. (b) modelo do tapete; (I) os peptídeos em monômeros ou oligômeros perto da membrana-alvo; (II) peptídeos de regiões hidrófilas estão expostos a solvente e regiões hidrofóbicas de membrana; (III) com a concentração de limiar peptídeos, a permeabilidade da membrana aumenta o que facilita a formação de poros conseqüentemente ocorre a desintegração da membrana (Adaptado: Shai 2002, Pelegrini et al. 2011). Conforme observado na figura 1 o esquema do mecanismo de ação de peptídeos antibacterianos (Figura 1), interação membrana-agente antimicrobiano (a) modelo barreira-aduela; (I) peptídeos em forma de monômero ou oligômero perto da membrana-alvo; (II) os resíduos carregados positivamente a partir dos peptídeos interagem com o grupo de cabeça de fosfolipídios da membrana; (III) a uma concentração-limiar de peptídeos, os poros são formados.

## 9. *Platypodium elegans* Vogel

*Platypodium elegans* Vogel (Fabaceae-Caesalpinioideae), (Figura 3) conhecido popularmente como uruvalheira, jacarandá-canzil ou amendoim do campo, é uma espécie de ocorrência natural no Cerrado e em zonas de transição Cerrado-Floresta Estacional; encontrada em terrenos bem drenados (Lorenzi 1998). Sua madeira é empregada na carpintaria e marcenaria; além disso, esta espécie apresenta potencial ornamental e, para a recomposição de áreas degradadas, o plantio em grandes áreas verdes e em sistemas agroflorestais (Schorr et al. 2004).

Além disso, é uma espécie semidecídua e heliófita. Os indivíduos adultos medem de 8 a 15 m de altura e possuem troncos com 40-50 cm de diâmetro. Apresenta dispersão uniforme e geralmente em alta frequência, com período de florescência a partir de meados de setembro até novembro (Almeida et al. 1998). O fruto de *P. elegans* é do tipo sâmara, apresenta um núcleo seminífero envolto por pericarpo bastante rígido e contornado por alas coriáceas vascularizadas (Barroso et al. 1999); é praticamente impossível separar a semente do fruto (Lorenzi, 1998).

Segundo Benevides (2006), as sementes de *Platypodium elegans* possuem pelo menos uma lectina específica por manose/glicose e seus derivados, capaz de aglutinar hemácias de coelho, mas que não aglutina hemácias do tipo ABO. A lectina descrita neste trabalho mantém sua atividade termicida em 50% até 60°C. Benevides (2008) relatou ainda com a mesma lectina isolada da atividade inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger* com 100% de mortalidade nas concentrações de 1,0 e 0,8 mg além do potencial contra os seguintes fungos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium lateritium* com (20 µg da fração purificada). Estrutura cristalina da molécula de *P.elegans* denominada PELa (Figura 2) em complexo com o heptassacarídeo simétrico (Benevides et al. 2012).



**Figura 2:** Cadeia peptídica-visão geral da estrutura dimérica de PELa em complexo com o heptassacarídeo simétrico, formada pelos monômeros em preto e cinza. Presença esférica dos metais de cálcio e manganês em preto e branco.

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo Geral**

Isolar, purificar e caracterizar e analisar o potencial biotecnológico de um inibidor de tripsina de sementes de *Platypodium elegans* (PeTI) em relação a suas atividades inibitórias e antibacteriana.

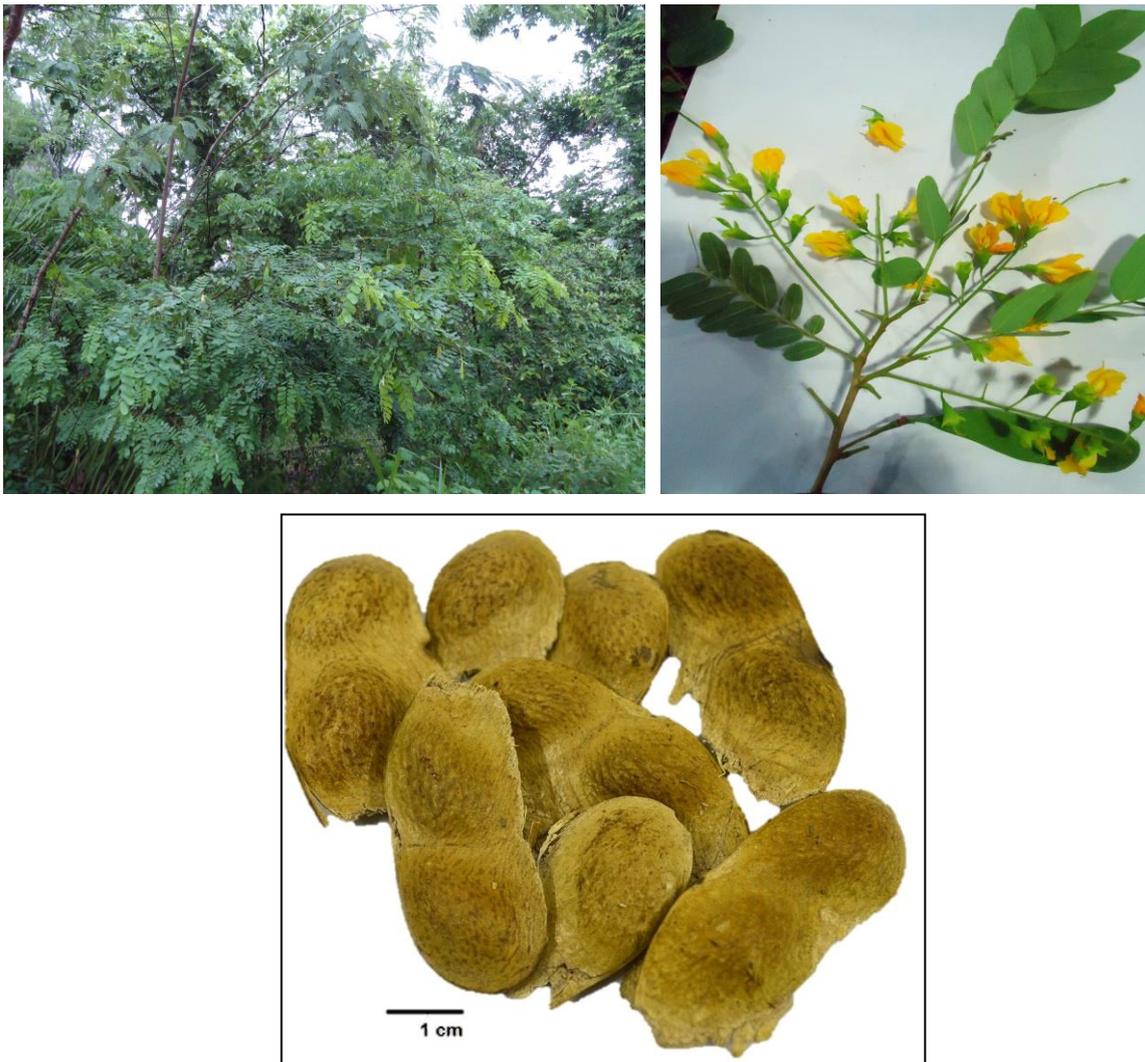
### **2. Objetivos Específicos**

- Realizar a purificação e caracterização físico-química do inibidor PeTI através de técnicas cromatográficas, eletroforéticas e seqüenciamento N-Terminal;
- Avaliar a atividade inibitória frente à tripsina e quimotripsina bovina;
- Analisar a estabilidade do inibidor sob condições variadas de pH e temperatura, bem como diferentes concentrações do agente redutor ditioneitol (DTT);
- Determinar a estequiometria de inibição assim como a constante de inibição ( $K_i$ ) e o tipo de inibição de PeTI frente a tripsina bovina;
- Verificar sua capacidade inibitória em relação ao desenvolvimento de diferentes cepas de bactérias patogênicas à humanos.

### III. MATERIAIS

#### 1. Espécie vegetal

As sementes de *Platypodium elegans* (Fabaceae-Caesalpinioideae) foram obtidas no banco de sementes do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. O material vegetal registrado foi obtido da empresa ArboCenter (inscrição no IBAMA-2082600). As sementes foram acondicionadas em freezer a -20°C. Material incluído em Herbário CGMS número do coletor SRR Ramalho



**Figura 3:** *Platypodium elegans* Vogel: A) árvore, B) flores e C) frutos. Fonte: Ramalho, S.R.

#### 1.2 Enzimas

Tripsina e quimotripsina bovina foram adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Company.

### **1.3 Substratos**

Os substratos colorimétricos sintéticos BApNA (Benzoil-L-arginina-p-nitroanilida), SAAPFpNA (N-Succinil-Alanina-Alanina-Prolina-Phenilalanina-p-nitroanilida) com atividade específica para tripsina e quimotripsina, respectivamente, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company.

### **1.4 Resinas**

A resina de troca iônica DEAE-Sepharose foi adquirida da GE Healthcare (Uppsala, Suíça) e afinidade Sepharose-tripsina de Sigma-Aldrich Chemical Company.

## **IV. MÉTODOS**

### **1. Isolamento e purificação do inibidor de *Platypodium elegans***

#### **1.1 Obtenção da farinha das sementes de *P. elegans***

Os tegumentos das sementes foram retiradas manualmente, cotilédones e embrião foram trituradas em moinho elétrico a 27.000 x g. A farinha obtida foi submetida ao processo de delipidação com hexano, esta etapa auxilia na retirada de lipídeo da amostra. Ao final da delipidação, a farinha foi depositada em uma bandeja revestida com papel filtro para a volatilização do solvente em capela de exaustão.

#### **1.2 Obtenção do Extrato Bruto**

A farinha delipidada foi submetida à extração protéica com o tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, sob agitação constante *overnight* a 4°C. O material foi centrifugado a 12.500 x g durante 30 minutos para a separação em duas fases: sobrenadante e precipitado. A fração sobrenadante foi dialisada por 24 horas contra água destilada em membranas de diálise de celulose regenerada (cut-off (corte) da membrana MWCO– Marca da membrana) para que houvesse a retirada de NaCl contida na amostra, e após esse processo o material foi liofilizado e denominado EB (Extrato Bruto) pronto para ser utilizado nas etapas de purificação.

### **1.3 Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose**

Amostra de EB (150 mg) foi dissolvida em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, sonicada por 10 minutos e centrifugada a 13.5000 x g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose FastFlow (3 x 12cm). Um gradiente salino de NaCl (0,25-0,6M) foi utilizado para eluir as proteínas adsorvidas na resina. Foram coletadas frações de 3,0 mL num fluxo de 40 ml/h. A detecção de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm. As frações foram submetidas ao ensaio de atividade inibitória à tripsina. A hidrólise do substrato cromogênico BAPNA foi medida fotometricamente com a absorbância de 410 nm. As frações que apresentaram atividade foram reunidas dialisadas e liofilizadas. A atividade inibitória do material foi monitorado em todas as etapas cromatográficas.

### **1.4 Cromatografia de Afinidade Sepharose-Tripsina**

O primeiro pico eluído pelo gradiente salino, proveniente da coluna DEAE-Sepharose foi dialisado em membranas de diálise de celulose regenerada (cut-off (corte) da membrana MWCO– Marca da membrana), liofilizado e aplicado (10 mg) em coluna de afinidade Sepharose-tripsina (5 x 9,1cm). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6 e 0,3 M de NaCl. A eluição do material retido na coluna foi feita com HCl 0,01M num fluxo de 30ml/h, e frações de 1,5 ml foram coletadas. A detecção das proteínas foi feita a 280 nm e as frações com atividade anti-trípica foram reunidas, dialisada e liofilizada.

### **1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência**

O material proveniente da cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina (S-II), foi submetido a uma cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18, sistema HPLC modelo PDA/991-Waters equipado com duas bombas Waters modelo 510, um injetor automático de amostra modelo U6K e uma coluna  $\mu$ -Bondapack C-18 (3,9 x 300 mm). Uma solução contendo ácido trifluoracético TFA 0,1% (Tampão A) foi utilizada para equilibrar a coluna. As proteínas foram eluídas com gradiente de TFA 0,1% em acetonitrila (Tampão B), conforme a tabela 3. O

PeTI (1 mg) foi dissolvido em 200  $\mu$ l de água milli-Q, sonicado por 5 minutos e posteriormente foi centrifugada a 12.500 x g durante 3 minutos. O sobrenadante foi injetado na coluna, em condições isocráticas (1 mL/min), a absorvância foi acompanhada em 280 nm. As frações obtidas foram imediatamente submetidas ao ensaio da atividade inibitória de tripsina. O material coletado foi liofilizado e armazenado em freezer.

**Tabela 3.** Porcentagem de gradiente (solvente A) e (solvente B), utilizado na cromatografia em coluna C-18  $\mu$ -Bondpack (3,9 x 300 mm).

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
5	95	0
6	95	0
16	95	0
17	60	40
57	60	40
58	40	60
63	5	95

## 2. Quantificação de Proteína

Todas as etapas e frações obtidas no processo de purificação tiveram seu conteúdo protéico quantificado conforme o método desenvolvido por BRADFORD (1976), utilizando BSA como diluição seriada a partir de 0,5 mg/mL.

## 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). O gel de poliacrilamida foi feito de modo

descontínuo: um gel superior de 5% para aplicação das amostras foi preparado com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8, e um gel de corrida de 12,5% de poliacrilamida foi feito com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, ambos utilizando uma solução de acrilamida 30%. Também foram acrescentados aos géis 0,1 % (v/v) de SDS 20 %. A PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 MightySmall II (Hoefer Scientific Instruments).

As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,001 % de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas comomarcadores de peso molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67kDa), ovalbumina (43 kDa), anidras e carbonica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante (40 mA) e voltagem livre. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05 % a 37°C overnight e o excesso de corante removido em acido acético 7%.

#### **4. Caracterização do Inibidor PeTI**

##### **4.1 Determinações da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF**

A massa molecular acurada do inibidor de tripsina (PeTI) obtido do material cromatografado em coluna C-18 foi analisado por Espectrometria de Massa utilizando um aparelho Bruker (Daltonics modelo Autoflex). Uma alíquota de 1  $\mu$ L de amostra foi dissolvida em TFA 0,1 % e misturada a 2  $\mu$ L da matriz. A matriz foi preparada com acido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxy-cinnamico (Sigma), acetonitrila 60 % (v/v) e TFA 0,1 % (v/v).

##### **4.2 Atividade Inibitória para tripsina bovina**

A atividade inibitória para a tripsina bovina foi determinada pela medida da atividade hidrolítica residual da tripsina para o substrato (BApNA), seguindo a metodologia desenvolvida por Erlanger *et al.* (1961). Um volume variável de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 foi adicionado em cada poço, seguido de 4  $\mu$ l de tripsina (0,125 mg/mL) e diferentes concentrações do inibidor (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4  $\mu$ g). Após 10 minutos de incubação a 30°C, 200  $\mu$ l de BApNA a 1 mM foi adicionado, completando um volume final de 270  $\mu$ l/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 minutos. Todos os

ensaios foram realizados em triplicata. A hidrólise do substrato foi acompanhada a 410 nm no leitor automático de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO).

### **4.3 Atividade Inibitória para quimotripsina bovina**

Para a atividade inibitória de quimotripsina bovina foi utilizado o substrato SAAPFpNA, segundo DELMAR *et al* (1979) Alíquotas de 10 µl de quimotripsina (1 mg/ml) foram incubadas com diferentes concentrações do inibidor (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4) em volumes variáveis de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Após 15 minutos de incubação a 30°C, foi adicionado 20 µL de SAAPFpNA a 1mM, completando um volume final de 120 µL/poço. O ensaio foi conduzido por um período total de 5 minutos. As mudanças na absorbância a 410 nm foram detectadas no leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO).

### **4.4 Estequiometria de Inibição**

Com o intuito de verificar a formação do complexo estequiométrico de enzima:inibidor, foram incubadas por 10 minutos a 30 °C concentrações fixas da tripsina (0,447 nM) com concentrações crescentes do inibidor. Decorrido o tempo descrito, adicionou-se o substrato 200 µl de BAPNA a 1 mM, completando um volume final de 270 µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A hidrólise do substrato foi acompanhada a 410 nm no leitor automático de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO).

### **4.5 Determinação da constante de inibição (K<sub>i</sub>)**

A determinação da constante de inibição (K<sub>i</sub>) de PeTI foi realizada com o auxílio do programa SigmaPlot. O ensaio foi realizado utilizando BAPNA em diferentes concentrações (0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM). Foram utilizadas duas concentrações do inibidor PeTI (7,31-14,62 nM). Um ensaio comparativo foi realizado sem a adição de PeTI. O ensaio foi realizado em 4 replicatas. O programa calculou a constante de inibição de PeTI para tripsina bovina.

## **5. Estudo de estabilidade de PeTI**

### **5.1 Estabilidade Térmica**

O inibidor PeTI foi incubado em diferentes temperaturas (37 a 100°C) com o objetivo de avaliar o efeito sobre sua atividade inibitória. Após a incubação por 30 minutos em cada temperatura, as alíquotas ensaiadas foram resfriadas em banho de gelo e a sua eficiência inibitória verificada através da determinação da atividade inibitória, como descrito no item 3.5.1. Foram realizadas 6 replicatas para cada valor de temperatura, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **5.2 Estabilidade a variação de pH**

Para determinar a estabilidade a variações de pH, o PeTI foi diluído no mesmo volume de diferentes tampões de mesma concentração molar (100 mM): citrato de sódio (pH 2-4), acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6 e 7), Tris-HCl (pH 8) e bicarbonato de sódio (pH 9 e 10). Depois da incubação por 60 minutos a 37 °C, cada alíquota foi submetida ao teste de atividade inibitória, como descrito no item 3.5.1. Para cada valor de pH 6 replicatas foram preparadas, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **5.3 Estabilidade ao agente redutor Ditioneitol (DTT)**

O PeTI foi incubado com o agente redutor DTT em diferentes concentrações finais: 1, 10 e 100 mM. A reação foi interrompida pela adição de Iodoacetamida, duas vezes a concentração final de DTT. Durante a incubação a 37 °C, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos para cada concentração avaliada. Um tratamento controle sem a adição de DTT também foi preparado. Ao final do procedimento, as alíquotas foram submetidas aos ensaios de atividade inibitória, como apresentado no item 3.5.1. Os resultados foram expressos como a média de 6 replicatas  $\pm$  desvio padrão.

## **6. Efeito da atividade antimicrobiana de PeTI**

### **6.1 Microrganismos**

Foram utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana de PeTI, as seguintes cepas padrão gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* NEWP 0128 e gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603.

### **6.2 Estocagem e manutenção das cepas bacterianas**

O inóculo bacteriano foi preparado seguindo o método de suspensão direta das colônias. As colônias foram isoladas de crescimento de 18 a 24 h em ágar Mueller Hinton e colocadas em suspensão de solução de salina estéril. Para verificação visual, comparou-se o tubo que continha a suspensão bacteriana com o tubo 0.5 da escala padrão McFarland contra um cartão de fundo branco e linhas pretas, sob condições adequadas de iluminação. A suspensão foi ajustada até que se atingisse o equivalente a 0.5 da escala padrão McFarland. Realizou-se verificação visual e fotométrica da turbidez em 625 nm. A absorvância deve estar entre 0,08 a 0,13.

A suspensão foi então diluída na proporção 1:20, a fim de atingir a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) igual a  $5 \times 10^6$  UFC/mL, necessária para a realização do ensaio (NCLSI, 2012).

### **6.3 Atividade Antimicrobiana**

Realizou-se o teste de microdiluição em placa segundo a metodologia descrita no manual M7-A9 do National Control Laboratory Institute (NCLSI, 2012).

A amostra do inibidor de PeTI foi solubilizada em caldo Mueller Hinton, obtendo concentração igual a 200 ug/mL de proteína. O volume de 90 uL da solução obtida foi adicionado em poços da microplaca. Posteriormente adicionou-se também 10 uL da suspensão bacteriana padronizada. Como controle positivo utilizou-se cloranfenicol na concentração de 40 µg/ml. Solução salina (0,9%) estéril foi utilizada como controle negativo. Os testes foram realizados em triplicatas.

A microplaca foi incubada a 37° C. O crescimento bacteriano foi monitorado utilizando leitor automático de microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO). Foram realizadas leituras a 595 nm em intervalos de 30 minutos. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi determinada segundo Gudiña et al., 2010.

## **7. Análise estatística**

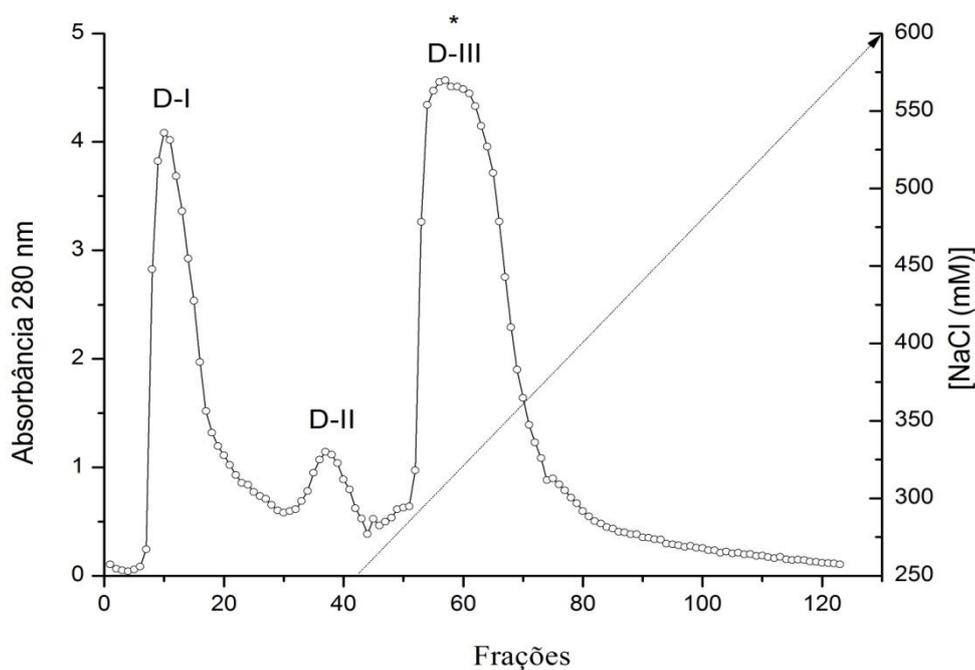
Os dados obtidos nos ensaios bioquímicos e biológicos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## IV. RESULTADOS

### 1. Purificação de PeTI

#### 1.1 Cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Sephrose

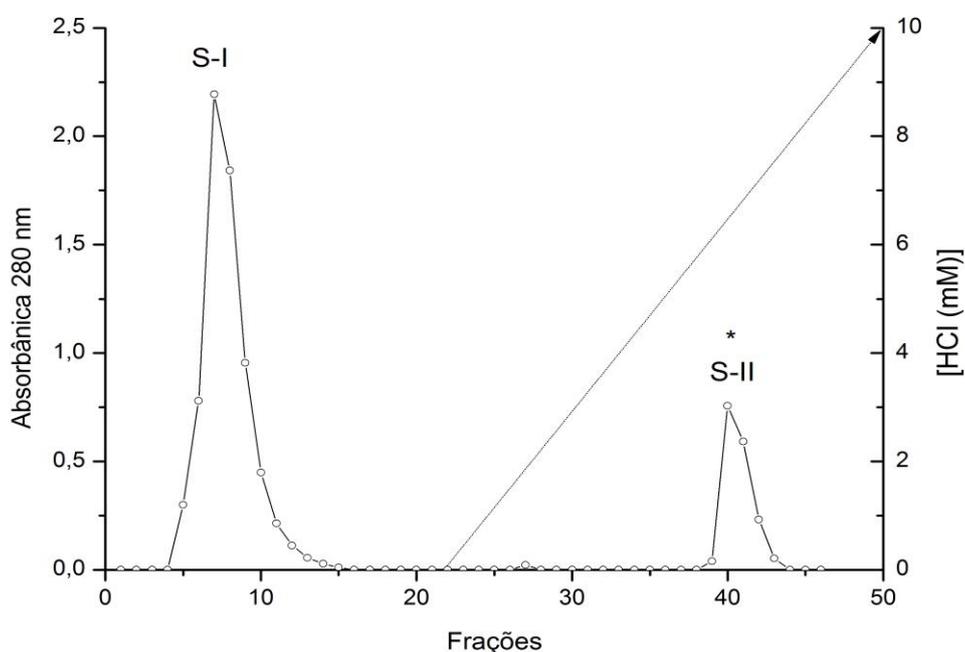
A purificação do inibidor de *Platypodium elegans* a partir do EB da farinha de sementes que apresentaram atividade inibitória contra tripsina bovina, e desta forma, foi aplicado em uma coluna de troca-iônica DEAE-sepharose, resultando em 3 picos bem definidos (Figura 4). Somente o terceiro pico (D-III, indicado pelo asterisco) eluído com o auxílio do gradiente salino de NaCl (0,25-0,6M) apresentou atividade inibitória sobre a tripsina.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico da coluna DEAE-Sephrose equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Frações de 3 mL foram coletadas num fluxo de 40 mL/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por um asterisco.

## 1.2 Cromatografia em coluna de afinidade Sepharose-Tripsina

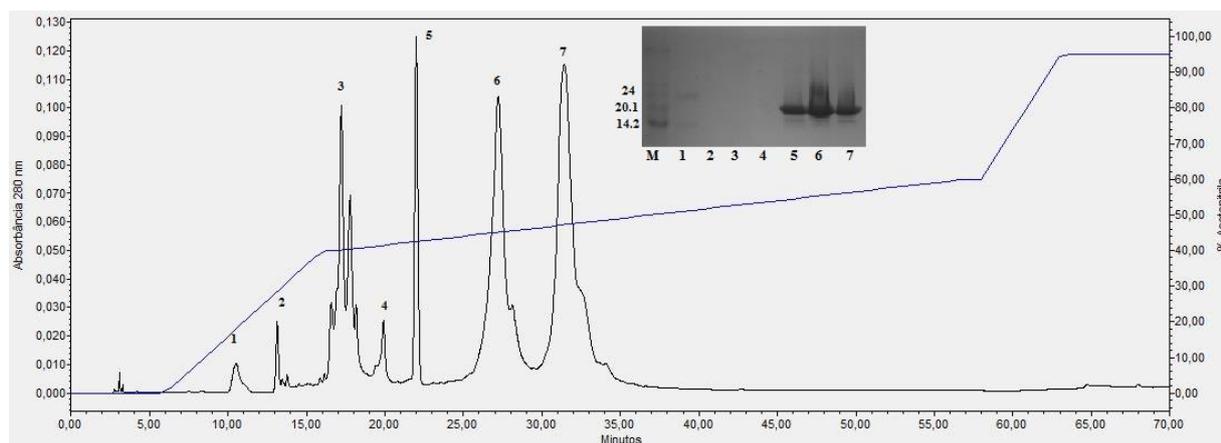
Para a próxima etapa de purificação, a fração D-III foi dialisada contra água destilada, liofilizada e aplicada (10 mg) na coluna de afinidade Sepharose-tripsina. O perfil cromatográfico obtido mostra a presença de 2 picos (Figura 5), sendo o segundo pico (S-II), chamado PeTI. Eluído com HCl 10 mM. O pico (S-II) foi chamado de PeTI. Somente o pico S-II apresentou atividade inibitória, sendo então dialisado, liofilizado e denominado PeTI, posteriormente utilizado para os demais ensaios.



**Figura 5:** Perfil cromatográfico da coluna Sepharose-tripsina, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 0,3 M de NaCl, pH 7,6. Frações de 1,5 mL foram coletadas num fluxo de 30 mL/h. A eluição das proteínas foi feita com HCl 10 mM. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm.

## 1.3 CLAE em C-18

O inibidor PeTI foi submetido a cromatografia em coluna C-18. O perfil obtido revela a presença de 7 picos eluídos em diferentes concentrações de tampão B. Os picos coletados foram submetidos ao ensaio de atividade inibitória. Os resultados indicaram atividade anti-trípica nos picos 3 e 6 (Figura 6). O perfil do cromatograma foi acompanhado através da eletroforese em gel de poliacrilamida 17% que também está na figura 6.



**Figura 6:** Perfil cromatográfico do inibidor aplicado em coluna C-18 (3,9 x 300 mm) equilibrada com tampão A . Frações foram coletadas num fluxo de 1mL/min. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. PAGE-SDS 17% dos picos obtidos. (M) Marcador de peso molecular; Picos HPLC:(1),(2),(3),(4),(5),(6) e (7).

#### 1.4 Tabela de purificação do inibidor

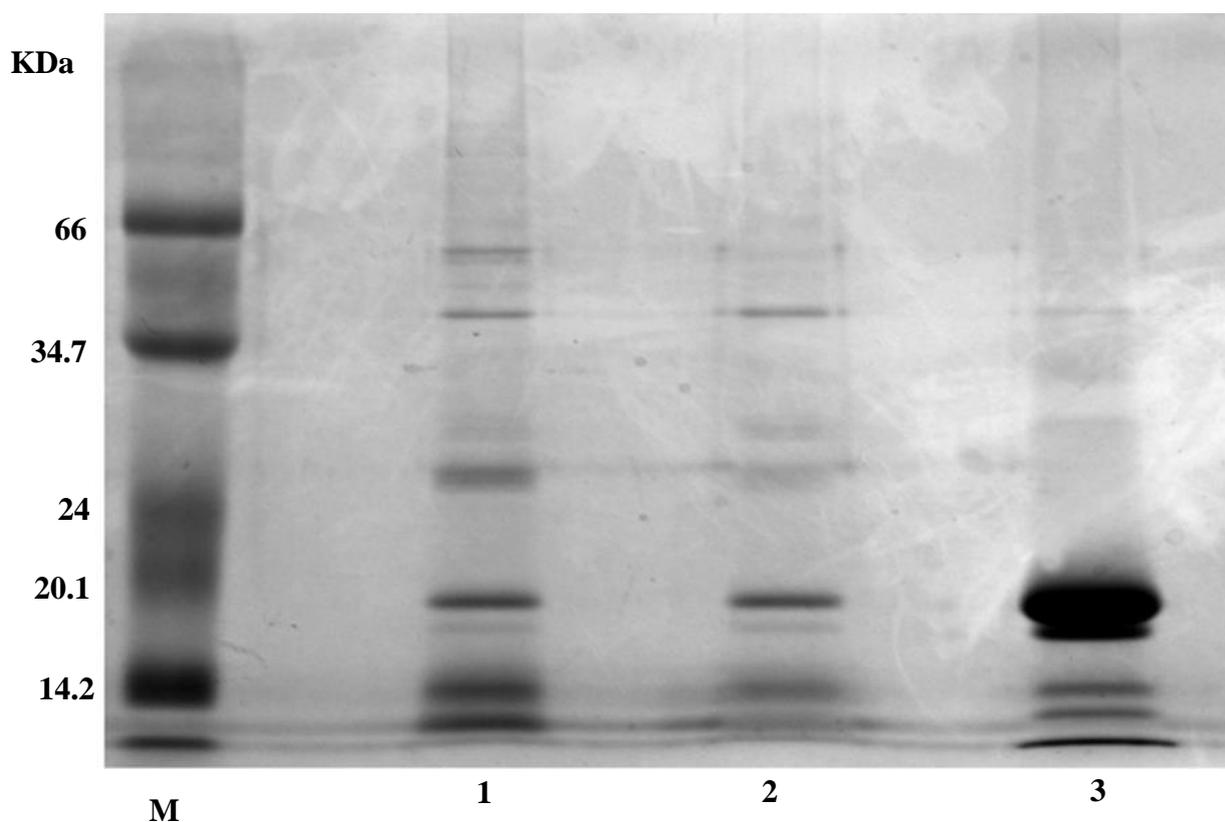
A Tabela 4 mostra os resultados obtidos na etapas de purificação do inibidor.

**Tabela 4.** Etapas de purificação do inibidor de *Platypodium elegans*

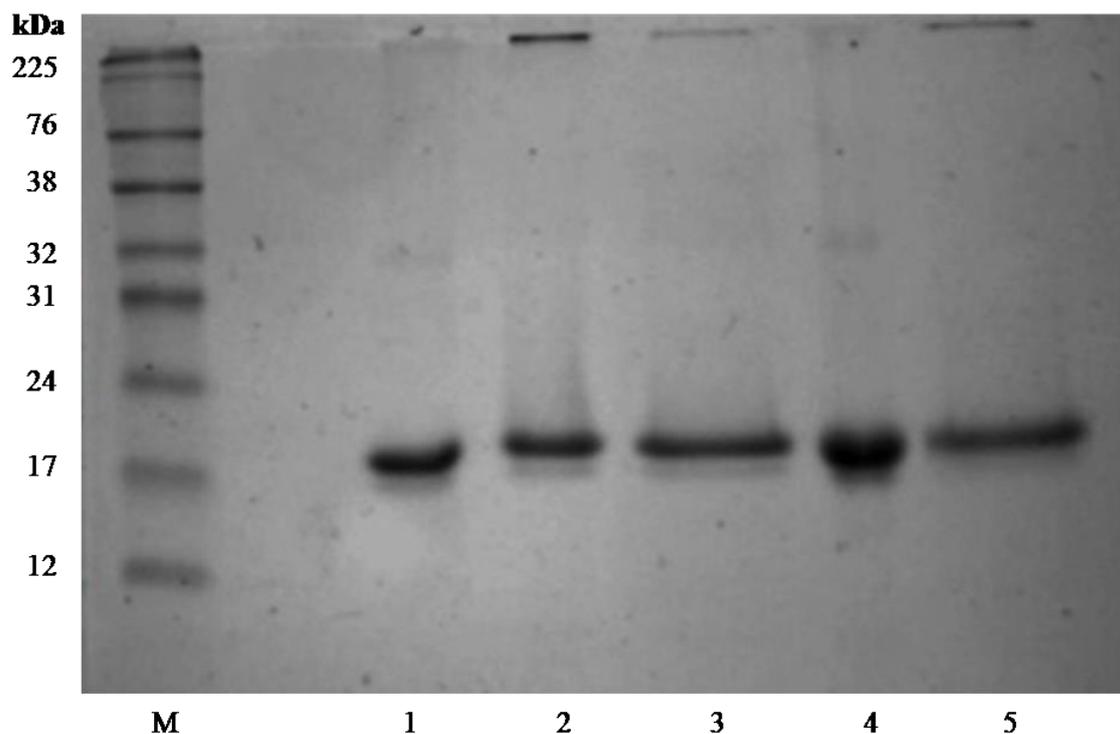
<b>Etapa</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade Inibitória (UI/mg)</b>	<b>Atividade Específica (UI/mg)</b>	<b>Purificação (Vezes)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>EB</b>	2000,00	104000000,00	52000,00	1,00	100,00
<b>DEAE-sepharose</b>	399,00	40166000,00	100666,70	1,94	38,62
<b>Sepharose-tripsina</b>	39,00	891800,00	228666,70	4,40	8,58

## 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A figura 7 mostra o perfil proteico nas diferentes etapas de purificação de PeTI através de um gel de PAGE-SDS 12,5 % . Nota-se que PeTI é uma proteína de massa molecular aparente de 19 kDa (Figura 7). Além disso, tanto na ausência quanto na presença dos agentes redutores e desnaturante observou que o inibidor é constituído por uma cadeia polipeptídica simples (Figura 8).



**Figura 7:** PAGE-SDS 12,5% das frações obtidas nas etapas de purificação do PeTI. M) Marcador de peso molecular; Extrato bruto (1), DEAE-sepharose/(P-III) (2), PeTI/(S-II) (3).

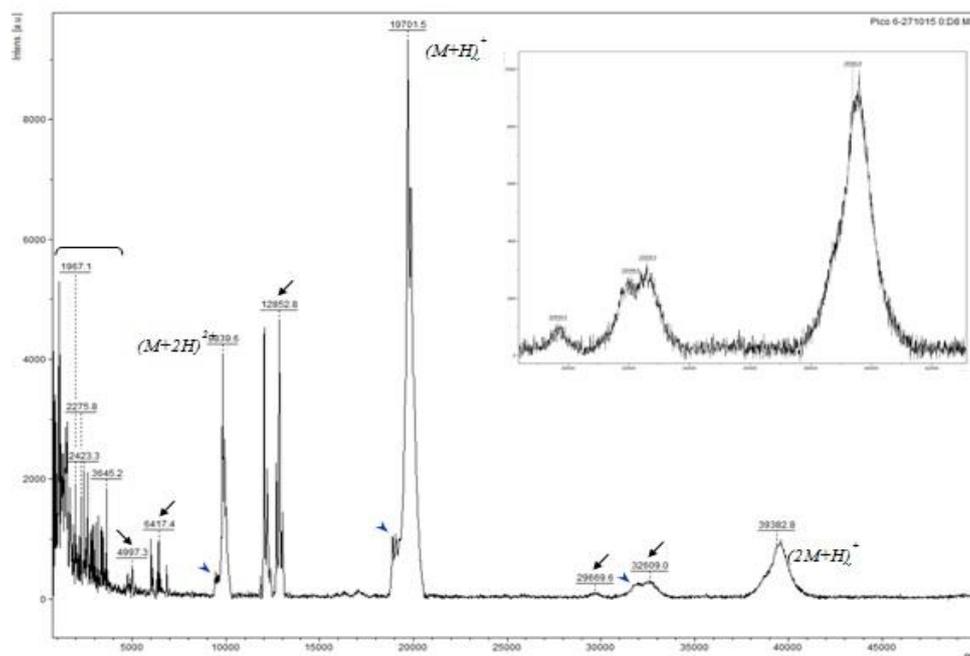


**Figura 8:** PAGE-SDS 15% da etapa de purificação de Sepharose-tripsina com diferentes agentes redutores e desnaturantes. M) Marcador de peso molecular; 1) PeTI; 2) PeTI + Diitritol (DTT) a 10 mM; 3) PeTI + 2-mercaptoetanol a 10 mM; 4) PeTI + Uréia a 8 M; 5) PeTI + 2-mercaptoetanol a 10 mM + uréia a 8 M.

### 3. Caracterização do Inibidor PeTI

#### 3.1 Determinações da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

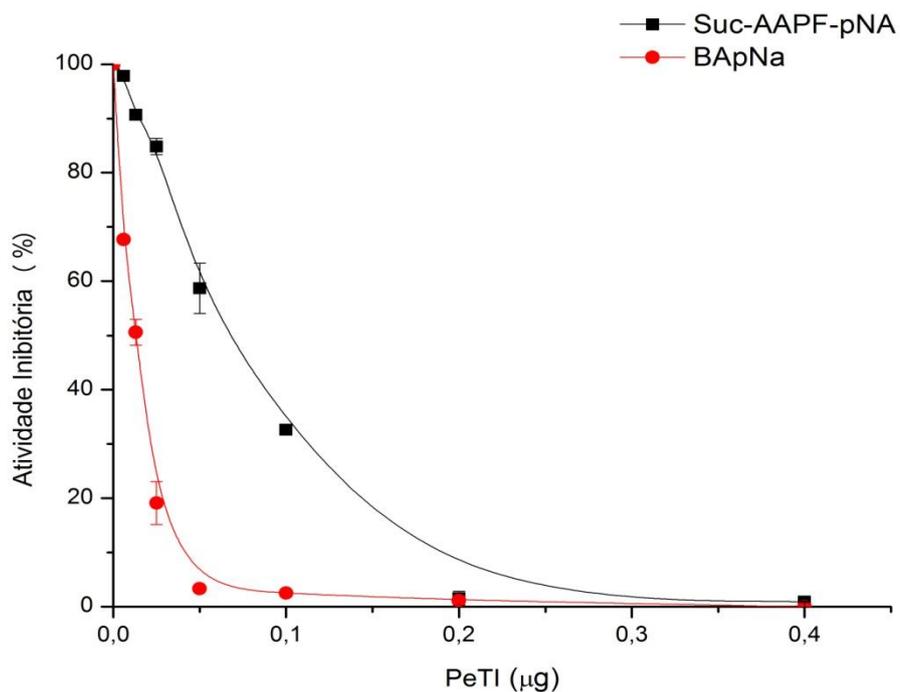
A massa molecular acurada do inibidor de tripsina PeTI obtido do material cromatografado em coluna C-18 foi analisado por Espectrometria de Massa utilizando um aparelho Bruker (Daltonics modelo Autoflex). Uma alíquota de 1  $\mu$ L de amostra foi dissolvida em TFA 0,1 % e misturada a 2  $\mu$ L da matriz. A ionização foi feita com a matriz ácido sinapínico e intensidade de laser entre 45 e 55%. Revelou a massa exata de PeTI sendo o pico marjoritário 19701.5 Daltons.



**Figura 9.** Perfil do espectro de PeTI por espectrometria MALDI-TOF

### 3.2 Atividade Inibitória para tripsina e quimotripsina bovina

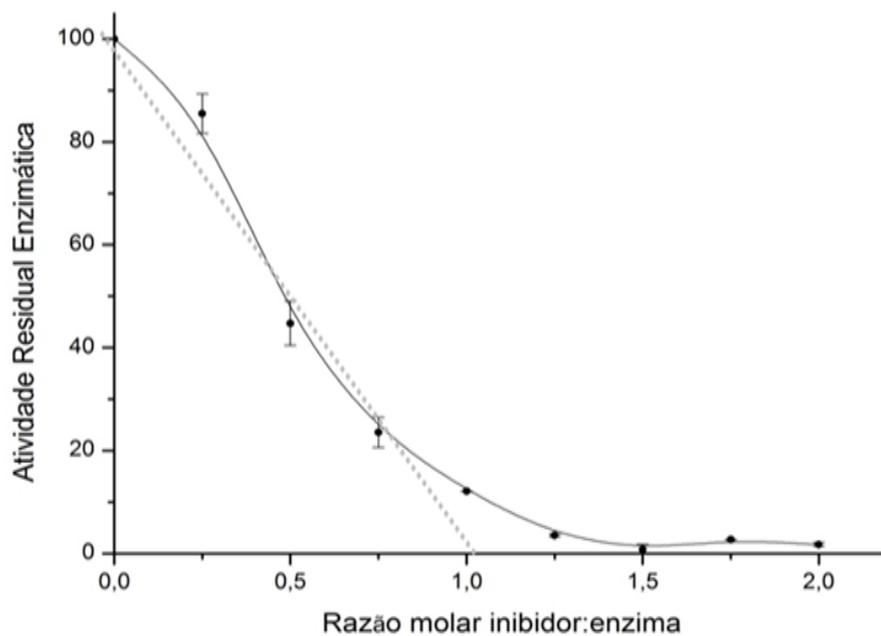
A análise da atividade inibitória foi realizada com o pico S-II (PeTI) obtido da coluna Sepharose-tripsina, contra as enzimas tripsina e quimotripsina. PeTI (0,1 $\mu$ g) inibiu 98% da tripsina e 70% da quimotripsina (Figura 10).



**Figura 10:** Atividade inibitória de PeTI contra tripsina e quimotripsina bovina. As enzimas foram separadamente pré-incubadas (10 min, 30 °C, Tris-HCl 0,05 mM pH 8) com concentrações crescentes do inibidor. A atividade residual da tripsina foi determinada com BAPNa e da quimotripsina com SAAPFpNA, sendo ambos os substratos a 1 mM.

### 3.3 Estequiometria de inibição

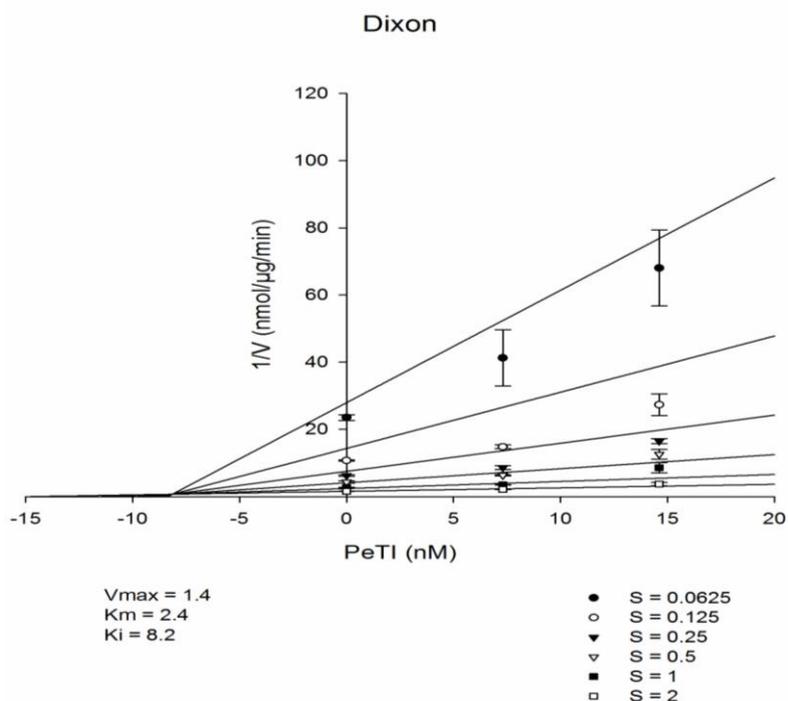
A estequiometria do inibidor PeTI em relação à tripsina bovina foi de 1:1. A taxa de inibição manteve-se linear até 85% de atividade residual. A partir de uma extrapolação deste resultado podemos observar a formação do complexo 1:1 de PeTI/Enzima (Figura 11).



**Figura 11:** Estequiometria de inibição entre tripsina e PeTI. A enzima foi pré-incubada por 10 minutos, 30°C, Tris-HCl 0,05 mM, pH 8, com contrações crescentes de inibidor. A atividade residual da tripsina foi determinada com o substrato BApNA 1 mM. A linha tracejada remete a extrapolação da curva experimental obtida.

### 3.4 Determinação da constante de inibição (K<sub>i</sub>)

O gráfico de plot DIXON de PeTI mostrou inibição do tipo não-competitiva para a tripsina (Figura 12). A constante de inibição (K<sub>i</sub>) contra tripsina, foi calculada pelo programa SigmaPlot a partir do gráfico obteve-se o valor de  $8,2 \times 10^{-10}$  M.

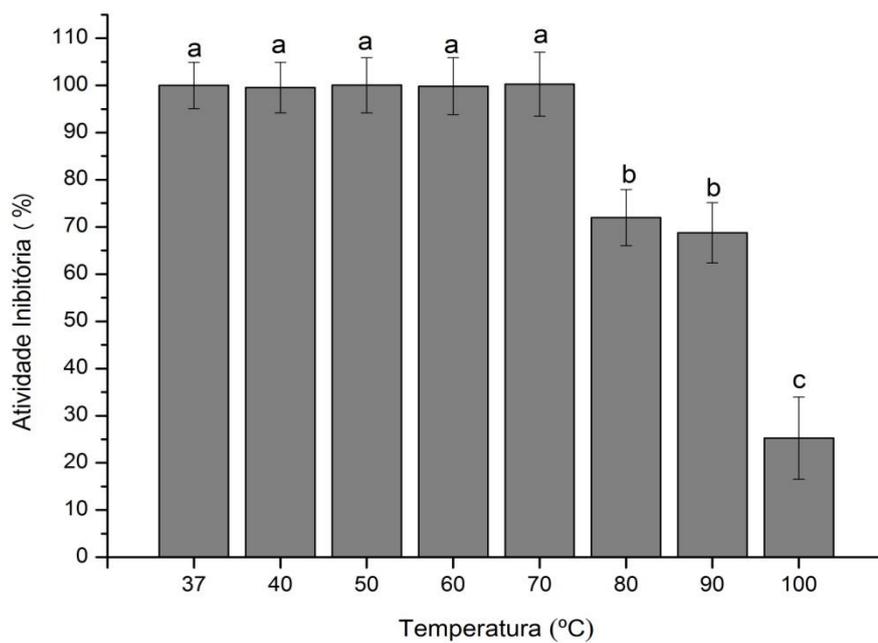


**Figura 12:** Gráfico plot DIXON para a determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) para a tripsina frente a 6 concentrações diferentes de BAPNA. As concentrações finais do substrato foram (●) 0,0625; (○) 0,125; (▼) 0,25; (▽) 0,5; (■) 1 e (□) 2 nM. O inverso da velocidade foi plotado com diferentes concentrações do inibidor.

## 4. Estudos de Estabilidade de PeTI

### 4.1 Estabilidade Térmica

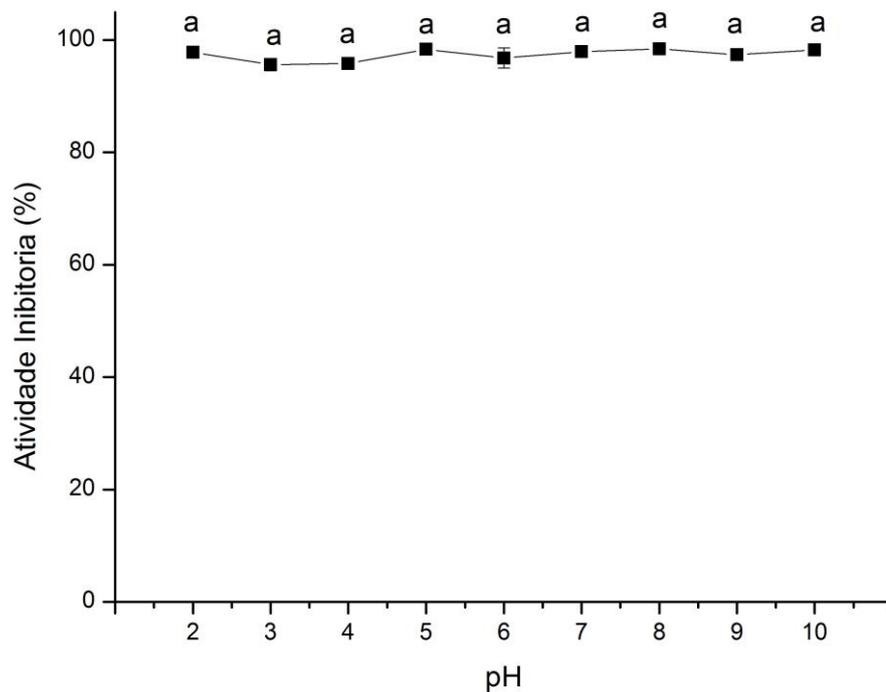
O efeito da temperatura sobre a estabilidade do PeTI, indicou que o inibidor manteve-se estável até a temperatura de 70°C, com atividade inibitória em torno de 98%. Após essa temperatura, sua atividade foi reduzida a aproximadamente a 75% em 80 e 90 °C e 25 % da atividade inibitória foi observada a 100 °C (Figura 13).



**Figura 13:** Efeito da temperatura sobre a estabilidade de PeTI para tripsina. O inibidor foi incubado em diferentes temperaturas (37 – 100 °C), por 30 min e resfriado em gelo cada ponto. Foram 6 replicatas para cada valor de temperatura. Os resultados foram representados como média e  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2 Estabilidade a variação de pH

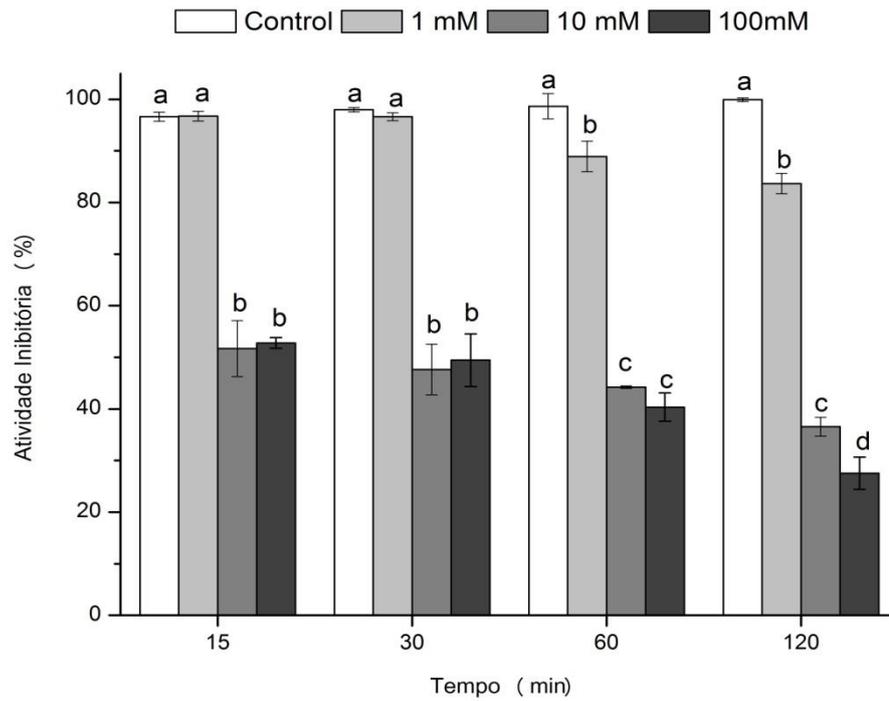
A atividade inibitória de PeTI manteve-se constante em todas as faixas de pH com valor médio de 98% (Figura 14).



**Figura 14:** Efeito da variação do pH sobre a estabilidade de PeTI. O inibidor foi incubado em diferentes tampões por 60 min à 30 °C, o pH foi ajustado e determinou-se sua atividade inibitória para tripsina. Foram realizadas 6 replicatas para cada valor de pH. Os resultados foram apresentados como média e  $\pm$  desvio padrão.

### 4.3 Estabilidade ao agente redutor DTT

O efeito da atividade inibitória de PeTI examinado com diferentes concentrações de DTT e mostrou afetar discretamente a estabilidade a 30 °C em pH 8,0 no tratamento de 1 mM. Entretanto, em períodos prolongados de incubação com o agente redutor evidenciou a perda da atividade inibitória, nas seguintes concentrações de 10 e 100 mM. A inibição da tripsina após a incubação com o DTT, respectivamente foi, de 61% e 75 % nos intervalo 120 minutos (Figura 15).



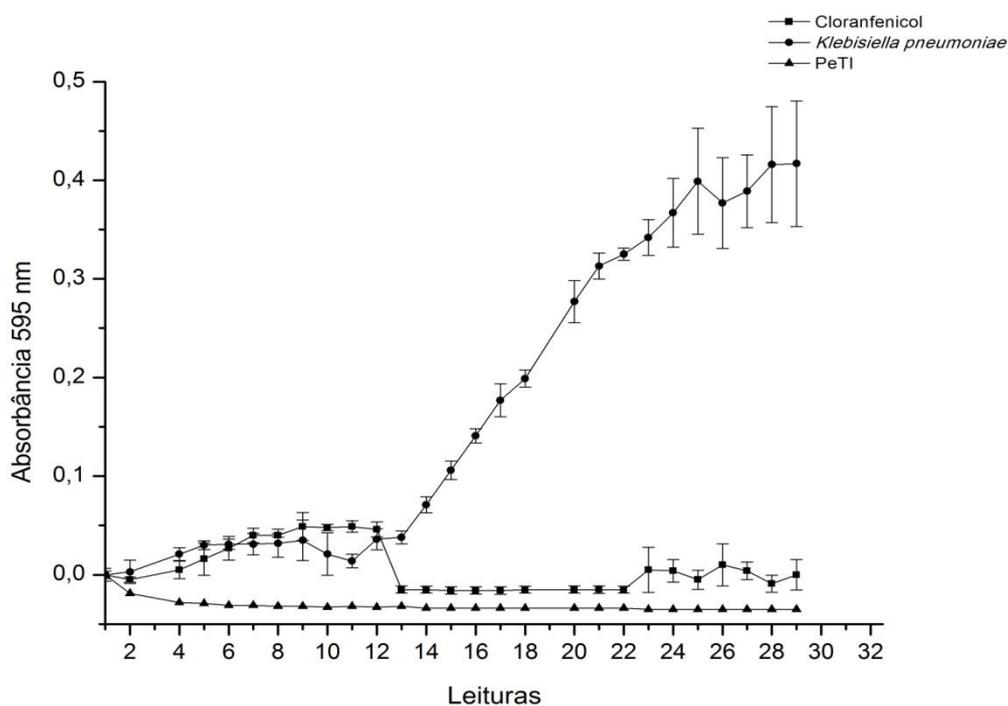
**Figura 15:** Efeito do DTT sobre a estabilidade do inibidor de PeTI para a tripsina bovina. Diferentes concentrações de DTT (1, 10 e 100 mM) foram incubados com o inibidor a 37°C em diferentes intervalos de tempo. Os resultados foram representados como média e  $\pm$  desvio padrão.

## 5. Estudo da atividade antimicrobiana de PeTI

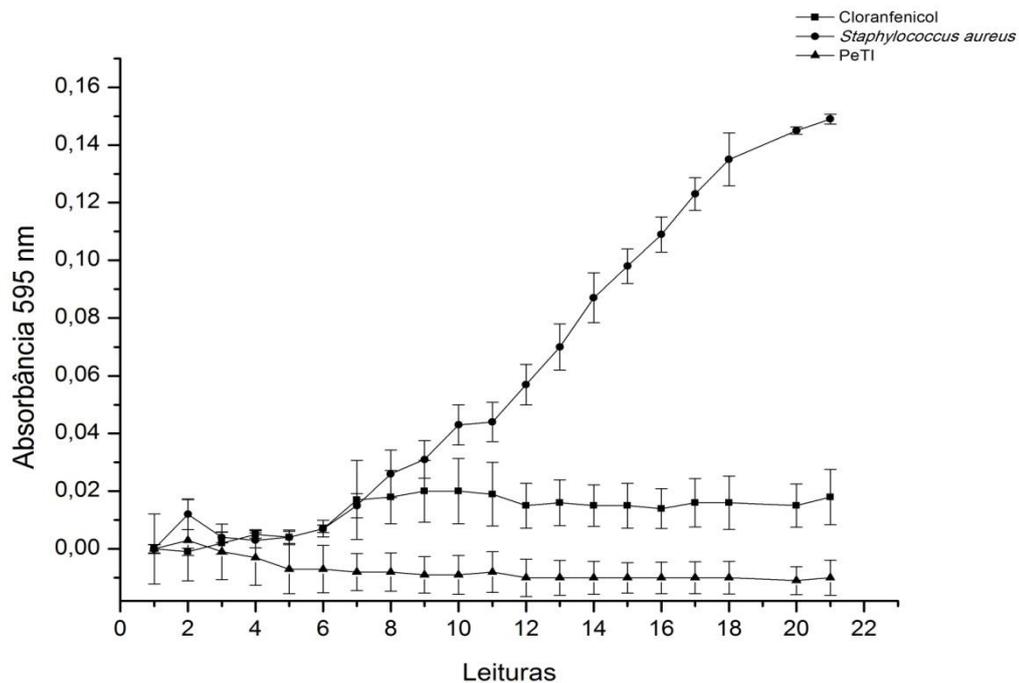
### 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do inibidor PeTI

Para determinar se o inibidor PeTI possui atividade antimicrobiana, foram realizados ensaios de inibição do crescimento sobre cinco cepas bacterianas, em microplaca. As bactérias utilizadas para avaliar a atividade antibacteriana de PeTI, foram as seguintes cepas padrão Gram-Positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* NEWP 0128 e Gram-Negativas: *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603. A escolha destes microrganismos para o estudo foi determinado pela importância biológica e patogênica de cada cepa.

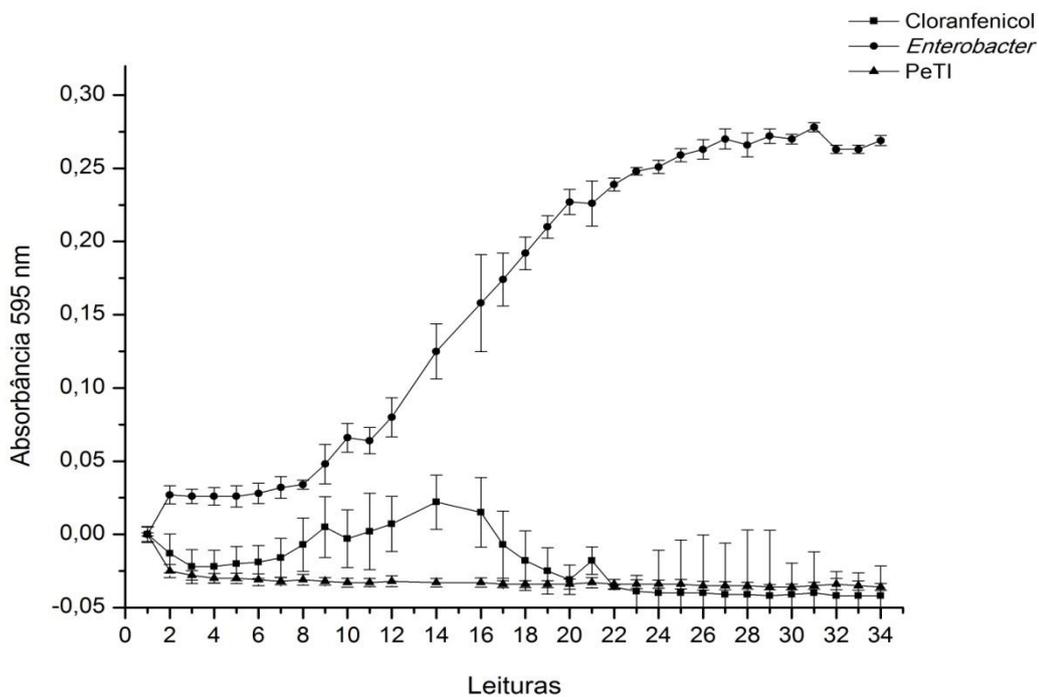
De acordo com os resultados obtidos PeTI inibiu as cepas bacterianas gram-positivas: *S. aureus* (93,28%) *S. epidermidis* (41,61%) e as gram-negativas: *K. pneumoniae* em (91,61 %), *E.coli* (92,82%), *E. aerogenes* (95%) podemos observar na tabela 5 e nas Figuras 16, 17, 18 e 19 e 20. A concentração utilizada no ensaio (20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) apresentou maior porcentagem de inibição para *E. aerogenes* e menor efeito para *S. epidermides*.



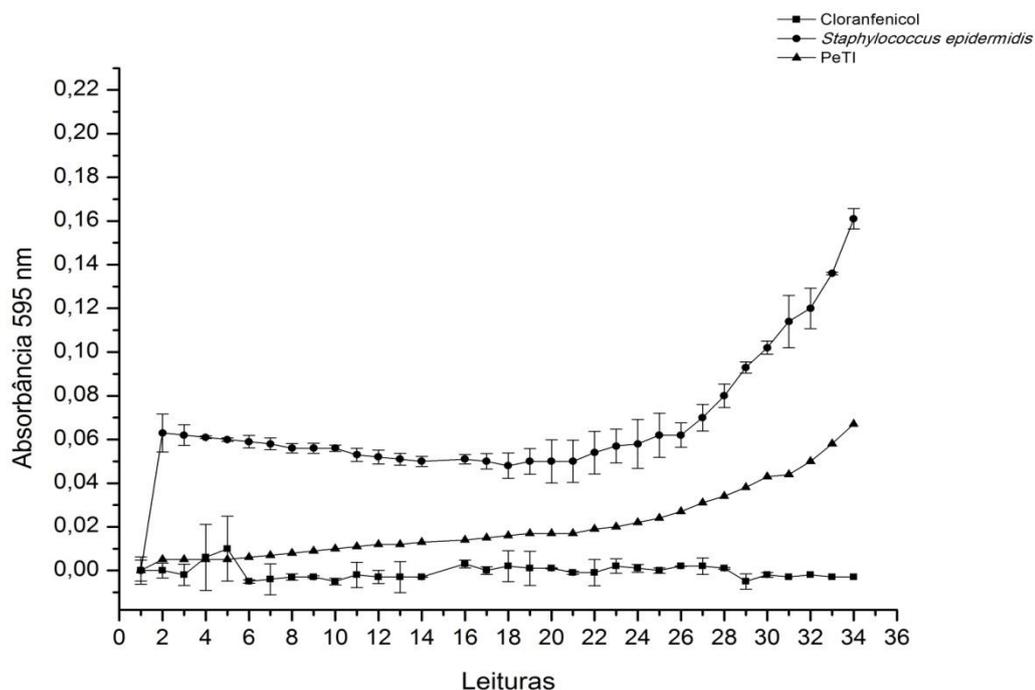
**Figura 16:** Atividade antimicrobiana do inibidor PeTI (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) frente a *K. pneumoniae* pelo ensaio em microdiluição. Controle positivo: crescimento bacteriano e controle negativo: cloranfenicol (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



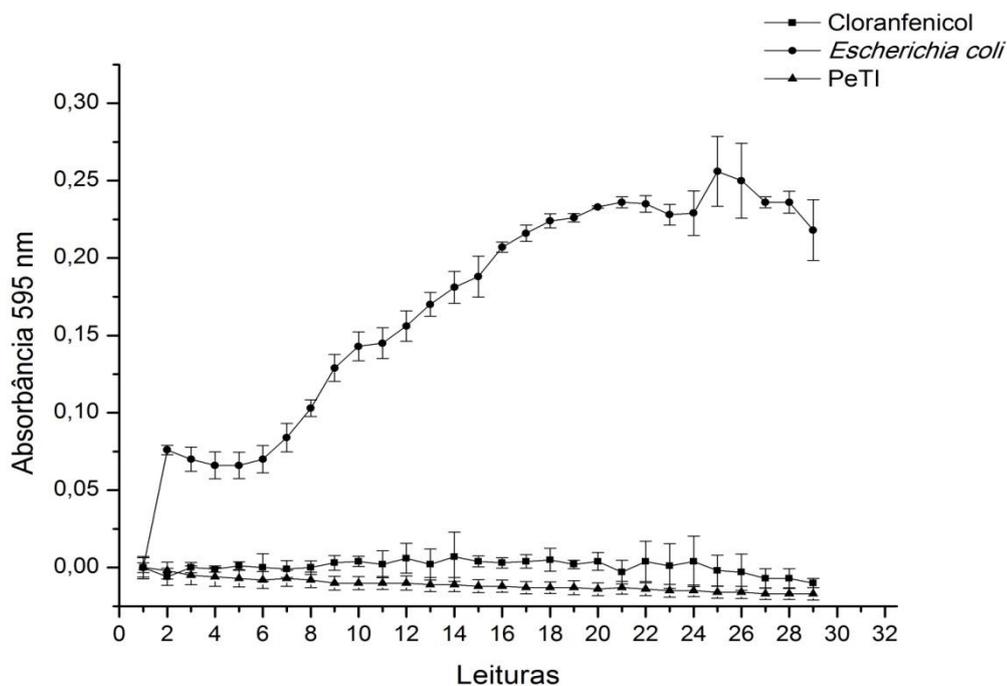
**Figura 17:** Atividade antimicrobiana do inibidor PeTI (20µg/µL) frente *S. aureus* pelo ensaio em microplaca. Controle positivo: crescimento bacteriano e controle negativo: cloranfenicol (40µg/mL).



**Figura 18:** Atividade antimicrobiana do inibidor PeTI (20µg/µL) frente *E. aerogenes* pelo ensaio em microplaca. Controle positivo: crescimento bacteriano e controle negativo: cloranfenicol (40µg/mL).



**Figura 19:** Atividade antimicrobiana do inibidor PeTI (20µg/µL) frente *S. epidermidis* pelo ensaio em microplaca. Controle positivo: crescimento bacteriano e controle negativo: cloranfenicol (40µg/mL).



**Figura 20:** Atividade antimicrobiana do inibidor PeTI (20µg/µL) frente *E. coli* pelo ensaio em microplaca. Controle positivo: crescimento bacteriano e controle negativo: cloranfenicol (40µg/mL).

**Tabela 5.** Porcentagem de Inibição de PeTI com as bactérias

	<b>\Espécie avaliada</b>	<b>Inibição (%)</b>
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	93,06
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	41,61
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	92,82
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	95,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91,61

## V. DISCUSSÃO

As sementes contêm uma grande quantidade de proteínas e algumas delas são biologicamente ativas, por exemplo, lectinas, proteínas de inativação de ribossomos, quitinases, canatoxina e os inibidores de peptidases (Carlini & Grossi-De-Sá 2002).

O inibidor PeTI foi isolado e purificado a partir do extrato bruto (EB). A purificação do PeTI a partir do material vegetal é necessária pois observa-se na tabela de purificação o aumento da eficiência (atividade) a cada etapa cromatográfica para a utilização nos passos seguintes como a caracterização e atividade biológica. Os inibidores de peptidases em plantas encontram-se em grandes quantidades nos órgãos de reserva das mesmas, como as sementes (De Leo et al. 2002). Essa capacidade de inibir a ação de enzimas proteolíticas como a tripsina tem sido reportada em diversos estudos, isso ocorre devido a presença de inibidores de peptidases em sementes (Bhattacharyya et al. 2006).

O inibidor de tripsina de sementes de *P. elegans* (PeTI) foi purificado em três etapas. A extração foi realizada em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,6) cujo sobrenadante foi dialisado e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto, o qual foi utilizado na etapa de purificação.

Para a primeira etapa de purificação do inibidor aplicamos (150mg) do EB na coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose (Fast-Flow). O perfil cromatográfico indicou a presença de três picos, sendo o D-I e D-II antes do gradiente salino, portanto, representa as proteínas que não interagem com a coluna, pois são de mesma carga iônica da coluna, no caso cargas negativas. Após o gradiente salino apresentou um pico, D-III, eluidos entre 0,2 – 0,6 M de NaCl, sendo essas proteínas de cargas positivas que sofreram dissociação da coluna devido as cargas provenientes do gradiente salino que passaram a interagir com as moléculas protéicas, diminuindo a interação com a resina. O pico DEAE-I e DEAE-II apresentou atividade inibitória, porém pelo maior rendimento do pico DEAE-III, este foi dialisado, liofilizado e utilizado na etapa seguinte de purificação.

O pico DEAE-III foi submetido à cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina, apresentando dois picos de proteínas no seu perfil cromatográfico, um anterior (ST-I) e um posterior (ST-II) a eluição da coluna com HCl 10mM (Figura 5). Apenas o pico ST-II apresentou atividade inibitória, sendo denominado PeTI.

Após a purificação em coluna de afinidade, para a verificação do grau de pureza de PeTI, a fração S-II\*, foi submetida a uma CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) em coluna C-18. O grau de pureza da fração S-II\* proveniente da Sepharose-tripsina foi verificado também nesta etapa cromatográfica, que sete picos foram obtidos, apresentando atividade inibitória no terceiro e sexto pico (Figura 6).

Quanto a pureza de PeTI e o perfil das frações protéicas obtidas das etapas de purificação foram analisados através da PAGE-SDS 12,5%. Por meio dessa técnica, evidenciou-se que em cada etapa de purificação DEAE-Sepharose; Sepharose-tripsina, houve um maior grau de pureza em relação ao EB (Figura 7). Com base nos marcadores de peso molecular, o PeTI possui uma massa relativa de 19 kDa. Além disso, mesmo quando a amostra foi reduzida pelo DTT e 2-mercaptoetanol e desnaturada pela uréia observamos que o inibidor é constituído por uma cadeia polipeptídica simples (Figura 8). Características também observadas referentes a massa e estrutura na subfamília Caesalpinoideae. A técnica de espectrometria de massas matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF) foi utilizada para determinar a massa acurada de PeTI. A massa obtida foi 19701.5 Da valores similares foi observado da família Kunitz (Figura 9).

A maioria dos IPs pertencentes à sub-famílias Papilonoideae e Caesalpinoideae apresentam uma única cadeia polipeptídica, diferindo-os da sub-família Mimosoideae que são representados por IPs possuindo duas cadeias polipeptídicas conectadas por pontes de dissulfeto (Oliva et al. 2011). O PeTI é semelhante ao inibidor presente na espécie *Derris trifoliata* (DtTCI) (Bhattacharyya & Babu 2009) e *Crotalaria paulina* (CPTI) (Pando et al. 1999), *Copaifera langsdorffi*-CTI (Krauchenco et al. 2004), *Inga laurina*-ILTI (Macedo et al. 2007) os quais pertencem a sub-família Mimosoideae e também possui apenas uma única cadeia polipeptídica assim como observado em PeTI.

De acordo com a tabela de purificação (Tabela 4) podemos avaliar a eficiência de cada etapa, para a obtenção do inibidor de PeTI. Ao longo dos três processos cromatográficos é possível observar o aumento da atividade específica. O rendimento de PeTI foi de 8,58%.

Alguns estudos mostram que a atividade inibitória dos IPs apresentam perfis diferentes de inibição contra peptidases. A maioria dos IPs são específicos para a tripsina, ILTI (inibidor de tripsina de *Inga laurina*) e EATI (inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*) (Macedo et al. 2007, Oliveira et al. 2012), mas também podem inibir apenas quimotripsina (Kouzuma et al. 1992), ou até mesmo ambas enzimas (Bhattacharyya & Babu 2009). Também há casos que IPs podem atuar em enzimas de classes distintas como uma cisteinopeptidase (papaína) e uma serinopeptidase (tripsina), como ocorre para o inibidor ApTI (inibidor de tripsina de *Adenathera pavonina*) (Migliolo et al. 2010).

No caso de PeTI houve a inibição tanto da tripsina quanto quimotripsina. Esses resultados indicam a alta afinidade do sítio catalítico do ligante (enzima) para reconhecer e se ligar ao inibidor de PeTI. A atividade da quimotripsina foi reduzida em 67%, enquanto a atividade de tripsina diminuiu 97% na concentração de 0,1 µg de proteína do PeTI (Figura 10). A partir dessa análise observamos que aproximadamente 100% da atividade enzimática de ambas as enzimas foi inibida, com maior afinidade do inibidor pela tripsina quando comparado com a interação da quimotripsina.

Para o estudo estequiométrico indicou que PeTI inibe a tripsina a uma razão molar 1:1 (inibidor/enzima). O padrão observado (Figura 11) pode deduzir a presença de um único sítio reativo para tripsina quando comparado aos inibidores isolados de sementes de *Leucaena leucocephala* (Oliva et al. 2000), *Adenanthera pavonina* (Macedo et al. 2004), *Pithecellobium dulce* (Delgado-Vargas et al. 2004), *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya et al. 2006), *Poincianella pyramidalis* (Guimarães et al. 2015).

Através do programa plot Dixon (1953) calculamos o  $K_i$  do PeTI para tripsina bovina. Sendo o valor encontrado de  $8,2 \times 10^{-9}$ , que indica uma grande afinidade do inibidor de PeTI com a enzima de tripsina (Figura 12). O gráfico de Dixon-Plot revelou uma inibição do tipo não competitiva contra a tripsina, onde as retas cruzam-se em um ponto, no eixo da abscissa e não varia em presença do inibidor. PeTI é um inibidor de tripsina não-competitivo, semelhantes ao  $K_i$  de outros inibidores do tipo Kunitz tais como AETI, ApTI e TTI das sementes de *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya et al. 2006), *Adenanthera pavonina* (Macedo et al. 2004) e *Tamarindus indica* (Araújo et al. 2005).

Os IPs são considerados moléculas extremamente estáveis, resistentes a variações de pH, temperatura, agentes desnaturantes e à proteólise por peptidases, sendo que essa estabilidade pode ser atribuída à presença das pontes dissulfeto e a outras interações não covalente (Joshi et al. 2013). Estudos cinéticos do PeTI foram realizados para verificar essas características abordadas. Os resultados da estabilidade térmica de PeTI mostraram que não houve diminuição de sua atividade inibitória até 70 °C por 30 min, mas quando aquecido a 80 °C houve uma perda em torno de 30% da sua atividade inibitória, a 100°C sua capacidade inibitória perde atividade em torno de 77% (Figura 13). Em relação ao pH, PeTI manteve-se completamente estável sua atividade inibitória após ser submetido a variações de pH (2-10) (Figura 14). Alguns Ips apresentaram características similares, tais como *Inga laurina* (Macedo et al. 2007), *Putranjiva roxburghii* (Chaudhary et al. 2008) e *D. trifoliata* (Bhattacharyya & Babu 2009).

A redução de PeTI com DTT evidenciou a perda da atividade inibitória, em todas as concentrações. A inibição da tripsina por PeTI após a incubação com o DTT, respectivamente foi, de 61% e 75 % nos intervalos 120 minutos. Resultado semelhante foi obtido por (Macedo et al.

2007) onde a incubação de ILTI com 100 mM de DTT promoveu uma redução na atividade inibitória de 56% de em 120 minutos (Figura 15). Assim como, PdTI (inibidor de tripsina de *Peltophorum dubium*) (Macedo et al. 2003) e PPTI (inibidor de tripsina de *Poecilanthus parviflora*) (Garcia et al. 2004) também tem sua atividade reduzida na concentração de DTT 100 mM. Resultados semelhantes foram reportados em sementes de *Vigna unguo* (Prasad et al. 2010). Como a concentração de DTT aumentou de 10 para 100 mM, a atividade inibitória foi perdida contra a tripsina. A perda da atividade inibidora é atribuída ao fato de que o sítio reativo do inibidor pode apresentar ligações de dissulfeto que são responsáveis por manter a atividade inibitória (QI et al. 2005). Presume-se que as pontes de dissulfeto são essenciais para a estabilidade funcional dos inibidores na presença de agentes desnaturantes (Broze et al. 1990).

De acordo com o relato de (Joshi et al. 2013) o aumento ou diminuição seletiva de ligações dissulfeto em IPs pode ser relacionado com a sua diferenciação funcional, que é susceptível de ser compensada por interações não covalentes. Assim, essas interações intermoleculares são coletivamente responsáveis pela atividade funcional de IPs através da manutenção da rigidez conformacional e complementaridades da formação do sítio reativo.

Afim de verificar o papel biológico de PeTI foram realizados ensaios de inibição do crescimento de algumas bactérias, por microdiluição em leitor microplacas. As bactérias utilizadas foram *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis* e *E. aerogenes*. O PeTI (20 µg/µL) apresentou capacidade de inibir o crescimento de quatro microrganismos avaliados, sendo que uma menor inibição ocorreu contra a cepa de *S. epidermidis* (Figuras 16, 17, 18,19 e 20).

A resistência dos microrganismos patogênicos às drogas e sua capacidade quase que imediata de replicação insere dentro do contexto de doenças causadas por esses patógenos a necessidade por novos agentes antimicrobianos. Dentre esses agentes encontram-se as plantas que apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais (Bresolin & Cechinel Filho 2010). Podemos citar os inibidores de peptidases que podem atuar no combate a esses microrganismos.

As plantas apresentam moléculas com potencial ação antimicrobiana que podem influenciar sobre a parede celular e ou membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou sínteses de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microrganismos (Rang et al. 1997; Trabulsi et al. 1999). Esses agentes podem difundir-se com mais facilidade através da parede celular das gram-positivas, porém atravessam os canais de porinas nas gram-negativas (Baron & Finegold 1990). As espécies bacterianas gram-positivas e gram-negativas podem ter diferentes sensibilidades às substâncias

contidas em extratos devido às diferenças na ultraestrutura da célula associadas à parede celular ou camadas de contorno celular (Miceli et al. 2011). Sendo PeTI capaz de inibir tanto as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A possível ação desta molécula pode estar relacionada ao tipo de mecanismo de ação do agente antimicrobiano PeTI. Podendo ser classificados em: inibidores da síntese de parede celular bacteriana (Mims et al. 1999); Inibidores da membrana citoplasmática (Guilhelmelli et al. 2013); Inibidores da Síntese de Ácidos Nucléicos (Gootz 2004).

Diversos estudos de mecanismos de ação têm sido propostos sobre o modo de interação entre os agentes antimicrobianos e bactérias patogênicas. Dessa forma diversos laboratórios buscam novas alternativas, como por exemplo, o uso de uma nova classe de moléculas, como potente agente antimicrobiano.

Vários inibidores de peptidase de Kunitz têm potencial atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Eles possuem atividade bactericida contra *Xanthosoma blandum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (Lima et al. 2011). As sementes de *Achyranthes aspera* (AATI) possui uma molécula ativa contra *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Geetha et al. 2012).

Potide- G um pequeno peptídeo antimicrobiano encontrado em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L. cv Golden Valley) apresentou atividade antibacteriana e antifúngica inibindo o crescimento de uma variedade de bactérias *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clavibacter michiganense* e *E. Coli* e contra os fungos *Cândida albicans*, *Rhizoctonia solani* (Kim et al. 2006).

Segundo Costa et al. (2014) nas sementes de *Jatropha curcas* existe uma molécula (JcTI-I) que inibe tripsina e possui atividade contra *S. aureus* e *Salmonella enterica* causando inibição de 85% e 100%, respectivamente, no desenvolvimento desses microrganismos. Resultado semelhante ao PeTI (Tabela 5) que apresentou inibição em mais de 90% para quatro cepas avaliadas.

Uma melhor compreensão do modo de ação e mecanismos de resistência é fundamental para estudos otimizados que possam ser utilizados de forma eficiente como terapêutica e inserção de novos agentes antimicrobianos.

## VI. CONCLUSÃO

Até o presente momento, foi isolado e purificado um novo inibidor de tripsina presente em sementes de *P. elegans*, denominado PeTI. O inibidor é composto por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 19 kDa capaz de inibir a tripsina bovina à uma razão estequiométrica de 1:1.

Além disso, PeTI mantém atividade inibitória estável quando submetido a diferentes temperaturas e pH. As pontes de dissulfeto desempenham um papel importante na conformação nativa de PeTI, pois a perda de sua atividade inibitória, após a redução de suas pontes de dissulfeto com DTT, sugerem um envolvimento direto destas pontes com a manutenção estrutural do sítio reativo de PeTI.

Por fim, o PeTI apresentou potencial antimicrobiano contra cinco linhagens de bactérias patogênicas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* e três fungos patogênicos *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts AM, Francois IEJA, Cammue BPA, Thevissen K. 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, n. 13, p. 2069–2079.
- Almeida SP. de, Proenca, CEB, Sano, S.M, Ribeiro, JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, DF, 1998.
- Araújo CL, Bezerra IWL, Oliveira AS, Moura FT, Macedo LLP, Gomes CEM., 2005). In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (*Tamarindus indica*). *J. Agric. Food Chem.* 53, 4381–4387.
- Baron EJ, Finegold SM. 1990. *Bailey & Scott's-Diagnostic microbiology*, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St Louis.
- Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL, Ichaso CLF. 1999. Frutos e sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 443p.
- Batra R, Boekhout T, Gueho E, Cabanes FJ, Dawson TLJr, Gupta AK. *Malassezia*
- Benevides RG, Ganne G, Simões RDC, Schubert V, Niemietz M, Unverzagt C, Chazalet V, Breton C, Varrot A, Cavada BS, Imberty AA. 2012. Lectin from *Platypodium elegans* with Unusual Specificity and Affinity for Asymmetric Complex N-Glycans. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 31, p. 26352-26364, July 27.
- Benevides RG. 2006. Isolamento e caracterização parcial de uma lectina de sementes de *Platypodium elegans* Vogel. Fortaleza: Monografia de Graduação, UFC, 71p.
- Bhattacharyya A & BABU C. 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, v. 70, n. 6, p. 703-12.
- Bhattacharyya A & Babu CR. 2006. Exploring the protease mediated conformational stability in a trypsin inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 44(11-12), p.637-644.
- Bhattacharyya A, Babu CR. 2009. Exploring the protease mediated conformational stability in a trypsin inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds. *Plant Physiology Biochemistry*, v. 44, p. 637-644.
- Bhattacharyya, A., Mazumdar, S., Leighton, S., and Babu, C. (2006). A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* 67, 232–241.
- Birk Y. 2003. *Plant protease inhibitors: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering*. Berlin: Springer- Verlag.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54.
- Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V. 2010. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. 1.ed. São Paulo: Santos, p.1-15.

- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett* 69:55–60
- Carlini CR & Grossi-De-Sá MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, n. 11, p. 1515-1539.
- Chaudhary N, Shee C, Isla A, Ahmad F, Yernool D, Kumar P, Sharma A. 2008. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. *Phytochemistry*, v. 69, n. 11, p. 2120-6.
- Costa HPS, Oliveira JTA, Sousa DOB, Morais JKS, Moreno FB, Monteiro OM, Viegas RA, Vasconcelos IM. 2014. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p.1-12.
- Dang LY, Van Damme EJM., 2015. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 117, 51-64.
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR. 2002. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, n.1.
- Delgado-Vargas F, Lopez-Valdes HE, Valdes-Rodriguez S, Blanco-Labra, A, Chagolla-LA, Lopez-Valenzuela EJ. 2004. Isolation and properties of a Kunitz-type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v.52, p. 6115-6121.
- Epand RM, Vogel HJ. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1462, n. 1-2, p. 11–28.
- estimate revisited. *Mycol Res* 2001;105:1422–32.
- Feng J, Yuan F, Gao Y, Liang C, Xu J, Zhang C, He L. 2003. A novel antimicrobial protein isolated from potato (*Solanum tuberosum*) shares homology with an acid phosphatase. *Biochemistry Journal*, v. 376, p. 481-487.
- Garcia V, FREIRE M, NOVELLO J, MARANGONI S, MACEDO M. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein Journal*, v. 23, n. 5, p. 343-50.
- Geetha K, Lavanya S, Siva Prasad D. 2012. Antimicrobial activity of prickly chaff (*Achyranthes aspera*) seed trypsin inhibitor. *International Journal Pharmaceutical. Science Research*, v.3, p. 3241-3248.
- Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. 2010. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. aracasei A20. *Letters in Applied Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 419-424.
- Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Silva-pereira I, Kyaw C. 2103. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. 2013. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1-12.
- Guimarães LC, Oliveira CF, Marangoni SF, Oliveira DG, MACEDO MLR. 2015. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth, v. 118, p. 1-9.
- Haq SK, Atif SM, Khan RH. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431, 145-159.
- Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species

- Jamal F, Pandey P, Singh D, Khan MY. 2013 Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 1, p. 1-34.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 491–511.
- Joshi RS, Mishra M, Suresh CG, Gupta VS, Giri AP. 2013. Complementation of intramolecular interactions for structural–functional stability of plant serine proteinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 11, p. 5087-5094.
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, Park Y. 2009. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2860–2872.
- Kim MH, Park SC, Kim JY, Lee SY, Lim HT, Cheong H. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety “Golden Valley”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 681–686. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.186
- Konarev, A.V.; Lovegrove, A.; Shewry, P.R. 2008. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms. *Phytochemistry*, 69 (13): 2482-2489.
- Kouzuma Y, Suetake M, Kimura M, Yamasaki N. 1992. Isolation and Primary Structure of Proteinase Inhibitors from *Erythrina variegata* (LINN.) var. *Orientalis* Seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 56, n. 11, p. 1819-1824.
- Krauchenco S, Nagem RAP, Silva JA, Marangoni S, Polikarpov I. 2004. Three dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*, *Biochimie*, v. 86, p.167-172.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of
- Lima TB, Silva ON, Migliolo L, Souza-Filho CR, Gonçalves EG, Vasconcelos IM. 2011. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity. *Journal Natural Products*, v. 74, p. 969–975.
- Lingaraju MH & Gowda, LRA. 2008. Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1784, n. 5, p. 850-855.
- Lorenzi, H. 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivode Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, Plantarum, Nova Odessa, Brazil
- Macedo M, Garcia V, Freire M, Richardson M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, v. 68, n. 8, p. 1104-11.
- Macedo ML, De Sá CM, Freire MD, Parra, J.R. 2004. A Kunitz type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal Agriculture Food Chemistry* v. 52, p. 2533-2540.
- Macedo MLR, Durigan RA, Silva DS, Marangoni S, Freire MGM, Parra JRP. 2010. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 73, n. 4, p. 213-231.
- Macedo MLR, Freire MGM, Cabrini EC, Toyama MH, Novello JC, Marangoni, AS. 2003. Trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival

- of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1621, n. 2, p. 170-182.
- Macedo, M. L., de Sá, C. M., Freire, M. D., and Parra, J. R. (2004). A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2533–2540.
- Medical microbiology. Asia: Mc Graw-Hill Education; 2002. p. 530–60.
- Mello G, Oliva M, Sumikawa J, Machado O, Marangoni S, Novello J, Macedo M. 2001. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *Journal Protein Chemistry*, v. 20, n. 8, p. 625-32.
- Mello MO & Silva-Filho MC. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v.14, n.2, p. 71-81.
- Miceli N, Trovato A, Marino A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Güvença DR, Taviano MF. 2011. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food Chemistry Toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2600 – 2608.
- Migliolo L, Oliveira AS, Santos EA, Franco, OL, Sales MP. 2010. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 29, n. 2, p. 148-156.
- Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Willians R. 1999, *Microbiologia médica*. 2 ed. Manole: São Paulo, 584 p.
- Mitchell TG. Medical mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors.
- National Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. 2012 NCLSI document M 100-S22, v. 32, n. 3.
- Neurath, H. 1990. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon RJ.; Bond JS. (Eds.). *Proteolytic enzymes - a practical approach*. Oxford: JRL Press, 1990. 259 p.
- Nielsen K, Heitman J. Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Gent*
- Oliva M, Souza-Pinto JC, Batista IF, Araujo MS, Silveir VF, Auerswald EA, Mentele R, Eckerskorn C, Sampaio UM, Sampaio CA. 2000. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1477, p. 64-74.
- Oliva MLV, Ferreira RS, Ferreira JG, De Paula CAA, Salas CE, Sampaio MU. 2011. Structural and Functional Properties of Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminosae: A Mini Review. *Current Protein and Peptide Science*, v. 12, p. 348-357.
- Oliveira CFR, Vasconcelos IM, Aparicio R, Freire MGM, Baldasso PA, Marangoni S, Macedo MLR. 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 6, p. 929-935.
- Pando LA, Ciero LD, Novello JC, Oliveira B, Weder JKP, Marangoni S. 1999. Isolation and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Crotalaria paulina* Seeds. *IUBMB Life*, v. 48, n. 5, p. 519-523, 1999.

- Park EY, Kim JA, Kim HW, Kim S, Song HK. Crystal Structure of the Bowman–Birk Inhibitor from Barley Seeds in Ternary Complex with Porcine Trypsin. *Journal of Molecular Biology*, v. 343, n. 1, p. 173-186, 2004.
- Pelegri PB, Del Sarto RP, Silva ON, Franco OL, Grossi-De-Sá MF. 2011. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*, p.1-9.
- Pesquet E. 2012. Plant proteases – from detection to function. *Physiologia Plantarum*, v. 145, n. 1, p. 1-4.
- phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.* 5, 5–6.
- Prasad ER, Merzendorfer H, Madhurarekha C, Dutta-gupta A, Padmasree K. 2010. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* seeds: purification, characterization, and insecticidal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 1520-5118, p. 2838-2847.
- Qi RF, Song ZW, Chi, CW. 2005. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biocim Biophys Sin*, v. 37, p. 283-292.
- Rameshwaram, N.R.; Nadimpalli, S.K. 2008. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. *Journal of Chromatography B*, 861: 209-217
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997, 692 p.
- Rao KN, Suresh CG. 2007. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1774, n. 10, p. 1264-1273.
- Richardson, M. Seed storage proteins: the enzymes inhibitors. *Methodol. Plant Biochem.*, 1991, 5, 259-305.
- Rufino FPS, Pedroso VMA, Araujo JN, França AFJ, Rabêlo L MA, Migliolo L, Kiyota S, Santos EA, Franco OL, Oliveira AS. 2013. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 63, n. 0, p. 70-76, 2.
- Santamaria M, Diaz-Mendoza M, Diaz I, Martinez M. 2014. Plant protein peptidase inhibitors: an evolutionary overview based on comparative genomics. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 812.
- Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, v. 66, n. 4, p. 236–248.
- Sitaram N & Nagaraj R. 1999 Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1462, n. 1-2, p. 29–54.
- Trabulsi, LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. 1999. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- Valueva TA, Mosolov VV. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69, 1305–1309.
- Vitale, A.; Bollini, R. 1995. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York. p. 73-102.
- Wititsuwannakul, R.; Pasitkul, P.; Kanokwiroon, K.; Wititsuwannakul, D. 2008. A role for a Hevea latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry*, 69: 339 – 347

World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194.

Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacology Reviews*, v. 55, p. 27–55.