

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA SEMELHANTE A TRIPSINA DA SEMENTE da *Chamaecrista nictitans*

Monizy da Costa Silva^{1*}, Claudio Wilian Victor dos Santos², Ricardo Bezerra Costa³, Cledson Barros de Souza³, Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos³, Hugo Juarez Vieira Pereira⁴

1*. Mestranda em Química e Biotecnologia- PPGQB/UFAL

2. Doutorando em Química e Biotecnologia- PPGQB/UFAL

3. Doutorando em Bioquímica e Biologia Molecular- PMBqBM/ UFAL

4. IQB-UFAL/ Orientador

Resumo:

Os organismos vivos realizam reações metabólicas mediadas por enzimas. Uma das proteases mais comercializadas é a tripsina, responsável por clivar ligações peptídicas nas regiões carboxílicas de resíduos de Arg e Lys. Para este estudo foi utilizado a espécie *Chamaecrista nictitans*, planta invasora e de fácil adaptação a terrenos arenosos. Para essa planta são escassas as descrições bioquímicas, no entanto podemos destacar seu potencial antiviral (HERRERO URIBE et al., 2004). Este estudo tem como objetivo determinar a produção de atividades semelhante a tripsina na *C. nictitans* e realizar o seu isolamento. Para tanto, foi realizado fracionamento salino com o extrato bruto. A fração F3 apresentou maior atividade enzimática (0, 2074), e foi submetida ao processo cromatográfico. A eletroforese mostrou um dubleto de bandas. A presença de tripsinas vegetais é uma descoberta nova, com isso tais resultados podem ser alvo de pesquisas que visem conhecer a estrutura e função dessas proteínas.

Autorização legal: Não se aplica

Palavras-chave: Enzima, Endopeptidase, planta.

Apoio financeiro: CAPES

Introdução:

Os organismos vivos realizam a todo o momento incontáveis reações metabólicas mediadas por enzimas. Estas biomoléculas catalisam estes processos por apresentarem alta especificidade pelos substratos, possibilitando, com isso, aumentar a eficiência e rapidez das reações (SANTOS, 2016).

Estas macromoléculas se classificam de acordo com o tipo de reação que catalisam. As hidrolases são responsáveis pela hidrólise de ligações covalentes através da adição de água. Dentre estas se destacam as proteases devido a sua ampla utilização, podendo atuar em várias reações biológicas, tais como a digestão de proteínas oriundas da dieta e a proteólise de proteínas endógenas (SOUZA et al., 2007). Também apresentam grande utilização nas indústrias de alimentos, têxtil, couro, farmacêutica, cosmético, bem como na formulação de detergente e nos processos de biorremediação (DE SOUZA, 2016).

Uma das proteases mais comercializadas é a tripsina, uma serino protease sintetizada pelo pâncreas ou estruturas análogas (JONSDOTTIR et al., 2004). Estas enzimas são capazes de clivar ligações peptídicas de proteínas, nas regiões carboxílicas de resíduos de arginina e lisina. São encontradas em organismos eucariotos, procariotos e em vírus (BOUGATEF, 2013). Pouco se sabe sobre a produção e as características de tripsinas símiles produzidas por vegetais. Sua presença em sementes pode está relacionada com a degradação protéica durante o processo germinativo (WAGNER et al., 2000).

Para este estudo foi utilizada a espécie vegetal *Chamaecrista nictitans*, originária do continente americano, sendo também encontrada, em menor concentração, no continente africano e asiático. É classificada como uma planta invasora, devido a sua fácil adaptação a terrenos arenosos, agredindo severamente pastagens, pomares, beira de estradas e terrenos baldios. No entanto, estudos descrevem sobre seu alto potencial de atividade antiviral (HERRERO URIBE et al., 2004), tornando interessante o reconhecimento das biomoléculas presentes na espécie e suas características bioquímicas proteolíticas, uma vez que ainda não se tem registros na literatura.

A utilização de enzimas nos diversos setores, principalmente terapêuticos e farmacêuticos, é datada de muitos anos e os avanços observados na atualidade são decorrentes das contribuições das diversas áreas, tais como a genômica, metabolômica e proteômica (FORTES, 2013). Em decorrência da sua importância para os setores industriais e tecnológicos, este estudo tem como objetivo determinar a produção de atividades semelhantes à tripsina em *C. nictitans* e realizar o seu isolamento.

Metodologia:

As sementes da planta foram coletadas no município de Marechal Deodoro- AL, e foram estocadas em

embalagens plásticas e conduzidas ao Laboratório de Análises Metabólica e Proteômica- LAMP, da Universidade Federal de Alagoas.

Após serem secas a temperatura ambiente, as sementes foram pesadas e trituradas com o auxílio de gral e pistilo, em seguida foi adicionado tampão de extração (Tris-HCl 50mM, pH 8,1) e a solução foi mantida sobre agitação durante doze horas. Decorrido o tempo, a solução foi filtrada e centrifugada a 15.000g, durante 15 min, a 4°C, utilizando centrífuga refrigerada (HERMLE- Z236K). O sobrenadante (extrato bruto) foi recolhido e acondicionado em tubo falcon e mantido na geladeira. Após a extração foi realizado o ensaio de atividade enzimática do extrato a fim de analisar a possibilidade de conter tripsina.

Realizou-se precipitação salina das proteínas por meio da utilização de sal sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, separando os contaminantes da proteína desejada a partir do grau de saturação de sal no extrato. O fracionamento ocorreu em cinco faixas: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%. Ao final da precipitação, as frações foram submetidas a ensaios enzimáticos, em presença do substrato N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BapNa), específico para tripsina.

A fração que apresentou maior atividade enzimática foi submetida a uma cromatografia por exclusão molecular, utilizando coluna de (1x 60 cm), contendo resina Sephacril S-100, sendo eluída a uma taxa de 0,1 mL/min, e monitorada em tempo real num comprimento de onda de 280 nm para a aferição de proteínas, para a possível purificação da enzima estudada. Em seguida foi realizado o ensaio enzimático para determinar as frações cromatográficas que apresentaram atividade semelhante a tripsina.

Objetivando avaliar a eficiência do método cromatográfico e observar o grau de pureza e peso aproximado das proteínas, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), em condições desnaturantes, utilizando Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e agentes redutores (2-mercapto-etanol). Para tanto, as amostras foram aplicadas individualmente nas canaletas do gel e após a corrida, o mesmo foi corado com *comassie blue*, que permitiu visualizar o perfil de isolamento da proteína.

Resultados e Discussão:

Inicialmente o extrato bruto das sementes foi submetido a precipitação salina com sulfato de amônio. Ao término da precipitação, foi realizado o ensaio enzimático frente ao substrato BapNa e os valores foram medidos em um comprimento de onda de 410 nm, revelando os valores de absorvância para cada fração. As frações mostraram valores iguais a F1 (0-20% da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,0068; F2 (20-40% da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,02915; F3 (40- 60% da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,2074; F4 (60-80% da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,03695; e, por fim, a fração F5 (80-100% da solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), correspondente ao sobrenadante final, mostrou 0,0192. A fração F3 apresentou uma recuperação de 114,52%. Essa recuperação é justificada devido a presença de inibidor no extrato bruto que foi retido nas frações anteriores a F3. Wagner et (2000) e Shamsi et al (2017), também realizaram precipitação com sulfato de amônio para reduzir a quantidade de contaminantes e concentrar enzimas similares a tripsina presente nas espécies *Canavalia ensiformis* e *Cicerariantum Green*, respectivamente.

A fração que demonstrou maior atividade enzimática 40-60% (F3), foi submetida ao processo cromatográfico, para tanto, foi utilizado uma coluna de exclusão molecular, Sephacryl S100 (1x60 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,1. Foram observados quatro picos de proteínas e a absorvância foi medida em 280 nm, o que mostra a eficiência do processo de precipitação da amostra. Em contraste, a maior parte da atividade enzimática da tripsina foi eluída em um único pico de corrida cromatográfica (tubos 14 e 15), o processo cromatográfico apresentou uma recuperação de 100,23%, sendo um resultado muito significativo. Para avaliar a eficiência do método de purificação, bem como determinar a massa aproximada da proteína, realizamos a eletroforese SDS-PAGE e observamos que, após ambas as etapas de isolamento, foi obtido um isolamento parcial, sendo constatada a presença de duas bandas corresponde ao pico de atividade da tripsina.

Pode-se afirmar que a presença de enzimas digestivas em vegetais é uma descoberta nova e por esse motivo suas funções são poucas conhecidas, diferente do que se sabe sobre as funções e características desempenhadas pelas tripsinas animais. Todavia, estudos sugerem que estas biomoléculas podem estar relacionadas com a degradação de proteínas durante o processo de germinação (WAGNER et al., 2000).

Conclusões:

Com o desenvolvimento do trabalho foi possível observar a presença de um extrato rico em metabólitos primários, tais como enzimas e possíveis inibidores, notou-se também que a concentração de biomoléculas diminuiu significativamente durante a precipitação, concentrando-as em uma única fração. Foi observada a purificação parcial de uma enzima semelhante a tripsina presente nas sementes da espécie *Chamaecrista nictitans*, utilizando duas etapas de purificação: precipitação salina e cromatografia líquida, utilizando coluna de exclusão molecular (Gel filtração). A presença de tripsina em vegetais é uma descoberta nova e que exige maiores investigações, sendo assim tais resultados podem corroborar para novas pesquisas que visem conhecer de forma detalhada a estrutura e função dessas proteínas, através do isolamento total dessa serino protease e sua caracterização bioquímica e físico-química.

Referências bibliográficas

- BOUGATEF, Ali. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications—comprehensive review. **Journal of cleaner production**, v. 57, p. 257-265, 2013.
- DE SOUZA, D. D. et al. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenantherapavonina L. seeds*. **South African Journal of Botany**, v. 104, p. 30-34, 2016.
- FORTES, Kleber Portela. Purificação e Caracterização Parcial de uma Serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). **Belo Horizonte**, 2013.
- HERRERO URIBE, Libia; CHAVES OLARTE, Esteban; TAMAYO CASTILLO, Giselle. In vitro antiviral activity of *Chamaecristanictitans* (Fabaceae) against herpes simplex virus: biological characterization of mechanisms of action. **Revista de biología tropical**, v. 52, n. 3, p. 807-816, 2004.
- JÓNSDÓTTIR, Gudrún; BJARNASON, JónBragi; GUDMUNDSDÓTTIR, Ágústa. Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod—expression, purification, and identification. **Protein expression and purification**, v. 33, n. 1, p. 110-122, 2004.
- SHAMSI, ToobaNaz et al. Purification and characterization of a novel trypsin-like protease from green-seeded chickpea (*Cicer arietinum*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 513-519, 2017.
- SANTOS, C.W.V. Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco pilórico do Pacamã (*L. alexandri*). Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Maceió. AL. 2016.
- SOUZA, Ana AG et al. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1429-1434, 2007.
- WAGNER, Carolina Berni; RAMOS, R. C.; CARLINI, Celia Regina Ribeiro da Silva. Uma enzima tipo-tripsina proveniente de *Canavalia ensiformis*. **Salão de Iniciação Científica (12.: 2000: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS**, 2000.