

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CLAUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

**INVESTIGAÇÃO DO CAULE DO XIQUE-XIQUE (*Pilosocereus
gounellei*) COMO FONTE DE INIBIDOR DE TRIPSINA COM AÇÃO
ANTIBACTERIANA**

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**COORIENTADORES: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão**

**RECIFE
2015**

CLAUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

**INVESTIGAÇÃO DO CAULE DO XIQUE-XIQUE (*Pilosocereus gounellei*) COMO
FONTE DE INIBIDOR DE TRIPSINA COM AÇÃO ANTIBACTERIANA**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco.

ORIENTADORA: Prof^{fa}. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

COORIENTADORES: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rocha Filho, Cláudio Alberto Alves da

Investigação do caule do Xique-xique (*Pilosocereus gounellei*) como fonte de inibidor de tripsina com ação antibacteriana/ Cláudio Alberto Alves da Rocha Filho. – Recife: O Autor, 2015.

57 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadores: Emmanuel Viana Pontual e Thiago Henrique Napoleão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2015.

Inclui bibliografia

1. Matéria médica vegetal 2. Cacto 3. Proteínas I. Título.

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-97

CLAUDIO ALBERTO ALVES DA ROCHA FILHO

INVESTIGAÇÃO DO CAULE DO XIQUE-XIQUE (*Pilosocereus gounellei*)
COMO FONTE DE INIBIDOR DE TRIPSINA COM AÇÃO
ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque
Universidade Federal do Piauí

Data: 26 / 02 / 2015

***Dedico este trabalho aos familiares e amigos,
os principais incentivadores para a conclusão
de mais uma importante etapa.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar com saúde, foco, fé e força para o término de mais uma etapa acadêmica.

Aos meus pais Cláudio Alberto Alves da Rocha e Maria Veronica Borges da Rocha pelo amor, carinho e incentivo dado.

A minha irmã Maiara Borges da Rocha pelo amor e compreensão.

A minha namorada Mariana Duarte e família pelo amor, acolhimento e carinho dado desde sempre.

A Genecy Frazão e família pela amizade, amor e carinho.

A orientadora Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela supervisão e orientação.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual e Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão pelos ensinamentos de como trabalhar com pesquisa, assim como em ter seriedade e dedicação no trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório pelo auxílio na utilização de equipamentos e na pesquisa, em especial o técnico Carlos (Bob) e Dayvid.

Aos amigos de Graduação, Bernardo, João, Daniel, Anderson, Antônio, André, Thiago Deschamps, Thiago Coutinho e Diogo, que apesar da distância, nunca deixaram de incentivar a minha trajetória acadêmica.

Aos amigos de colégio Danyllo, Raíssa, Lívia, Aline, Érika, Fernanda, Geraldo, Wellington e Edwan pela fidelidade na amizade desde os tempos de colegial.

Aos colegas de bairro Noronha, João Assis, Alysson, Daniel, Johnatta, Pablo, Felipe Trancoso, Carlos, Darley, Lucas, Ninho, Edmo, Toni e Fábio pelos momentos de descontração e divertimento.

A todos que apoiaram de alguma forma a passagem de mais uma etapa da minha carreira acadêmica.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

Proteínas antimicrobianas que inibem proteases constituem antibióticos promissores e, adicionalmente, não apresentam como limitação a sensibilidade à proteólise. O xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) é um cacto que cresce nas áreas secas, sendo endêmico da região semi-árida brasileira. A presente dissertação teve como objetivo purificar um inibidor de tripsina (PgTI, do inglês *P. gounellei* trypsin inhibitor) a partir do caule de *P. gounellei* e avaliar sua atividade antibacteriana contra espécies patogênicas ao homem. O caule de *P. gounellei* foi coletado na cidade de Limoeiro (Pernambuco) e, após a remoção dos espinhos, foi cortado em pequenas peças e posto para secar por 3 dias a 28 °C. Em seguida, o material foi triturado em multiprocessador e a farinha resultante (5 g) foi homogeneizada com NaCl 0,15 M (100 mL) por 16 h a 28 °C. Após centrifugação (3.000 g, 15 min), o extrato foi coletado e cromatografado em coluna de Sephadex G-100. Fração proteica (P1) obtida nessa etapa foi então avaliada quanto à atividade inibidora de tripsina e concentração de proteínas. Em seguida, P1 foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-FF 16/10 acoplada ao sistema ÄKTAprime™ (GE Healthcare). PgTI foi eluído com NaCl 1,0 M e, após diálise, foi avaliado quanto à atividade inibidora de tripsina, ao perfil em eletroforese bidimensional e à estabilidade de sua atividade inibidora frente ao aquecimento. Os efeitos de PgTI sobre o crescimento e sobrevivência de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* foram avaliados através da determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB). O extrato do caule de xiquexique apresentou alta viscosidade, impossibilitando a avaliação da atividade inibidora de tripsina e a dosagem de proteínas. Cromatografia do extrato em coluna de gel filtração (Sephadex G-100) foi então utilizada para se obter preparação proteica (P1) livre de viscosidade, a qual apresentou atividade inibidora de tripsina de 184 U/mg. PgTI foi obtido por cromatografia de P1 em coluna de troca iônica, tendo apresentado atividade inibidora de tripsina de 373 U/mg (fator de purificação: 2,02). Eletroforese bidimensional revelou PgTI como um único spot, de 37,1 kDa e PI 5,88. PgTI apresentou K_i de 14 nM para tripsina bovina e foi estável ao aquecimento até 50 °C, mas teve sua atividade abolida quando aquecido a 60 °C. PgTI inibiu o crescimento de *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* sp., *S. aureus* e *S. saprophyticus* (CMI: 37,5, 150, 37,5, 18,7, 7,5, 7,5 e 18,7 µg/mL, respectivamente), sendo bactericida somente para *E. coli* (CMB: 75 µg/ml). Em conclusão, o caule do xiquexique contém um inibidor de tripsina (PgTI) com atividade antibacteriana contra espécies de importância médica.

Palavras-chave: *Pilosocereus gounellei*; cacto; inibidor de protease; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial proteins that inhibit proteases constitute promising antibiotics and, in addition, they do not show the sensitivity to proteolysis as limitation. The “xique-xique” (*Pilosocereus gounellei*) is a cactus which grows in dry areas, being endemic of Brazilian semi-arid region. This dissertation aimed to purify a trypsin inhibitor (PgTI, *P. gounellei* trypsin inhibitor) from *P. gounellei* stem and evaluate its antibacterial activity against human pathogenic species. The stem of *P. gounellei* was collected in Limoeiro city (Pernambuco) and, after the removal of thorns, it was cut into small pieces and put to dry for 3 days at 28 °C. Next, the material was crushed using a multiprocessor and the resulting powder (5 g) was homogenized with 0.15 M NaCl (100 mL) for 16 h at 28 °C. After centrifugation (3,000 g, 15 min), the extract was collected and chromatographed on a Sephadex G-100 column. The protein fraction (P1) obtained in this step was then investigated for trypsin inhibitory activity and protein concentration. Next, P1 was submitted to ion exchange chromatography on DEAE-FF 16/10 column coupled to the ÄKTAprime™ (GE Healthcare) system. PgTI was eluted with 1.0 M NaCl and, after dialysis, it was assessed for trypsin inhibitory activity, profile in two-dimensional electrophoresis and stability of its inhibitory activity toward heating. The effects of PgTI on the growth and survival of *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* were evaluated by determining the minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal (MBC) concentrations. The extract from “xique-xique” stem showed high viscosity, preventing the assessment of trypsin inhibitory activity and the protein measurement. Chromatography of the extract on gel-filtration column (Sephadex G-100) was then employed to obtain a protein preparation (P1) without viscosity, which showed trypsin inhibitory activity of 184 U/mg. PgTI was obtained by chromatography of P1 on ion exchange column, showing trypsin inhibitory activity of 373 U/mg (purification factor: 2.02). Two-dimensional electrophoresis revealed PgTI as a single spot, with 37.1 kDa and PI 5.88. PgTI showed K_i of 14 nM toward bovine trypsin and was stable to heating until 50 °C, but had its activity abolished when heated at 60 °C. PgTI inhibited the growth of *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* sp., *S. aureus* and *S. saprophyticus* (MIC: 37.5, 150, 37.5, 18.7, 7.5, 7.5 e 18.7 µg/mL, respectively), being bactericidal only against *E. coli* (MBC: 75 µg/ml). In conclusion, the stem of “xique-xique” contains a trypsin inhibitor (PgTI) with antibacterial activity against medically important species.

Keywords: *Pilosocereus gounellei*; cactus; protease inhibitor; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Tríade catalítica do sítio ativo da tripsina.....	16
Figure 2. Área do bioma caatinga.....	21
Figura 3. Características morfológicas do xique-xique. (A) Caule, (B) flor, (C) fruto.....	26

ARTIGO

Figure 1. Purification of the trypsin inhibitor from stem of <i>P. gounellei</i> (PgTI). (A) Gel-filtration chromatography (Sephadex G-100) of the extract from <i>P.gounellei</i> stem (2 mL) in 0.15 M NaCl (flow rate of 6.0 ml/min). (B) Ion exchange chromatography of P1 (2.0 mL; 2.0 mg of protein) on DEAE FF 16/10 column equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (flow rate of 5.0 mL/min) and eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl. The arrow indicates the addition of eluent solution.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de espécies vegetais da família Cactaceae e seu habitat.....	24
--	----

ARTIGO

Table 1. Summary of the purification of trypsin inhibitor from stem of <i>P. gounellei</i> (PgTI).....	54
Table 2. Antibacterial activity of the trypsin inhibitor from stem of <i>P. gounellei</i> (PgTI).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CFU – do inglês *colony forming unit*

CHAPS – 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato

DMSO – dimetilsulfóxido

FPLC – do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*

PgTI – do inglês *P. gounellei trypsin inhibitor*

SDS – dodecil sulfato de sódio

DL₅₀ – Dose letal mediana

DEAE – dietilaminoetanol

BAPNA – N-benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida

IPG – do inglês *immobilized pH gel*

MIC – do inglês *minimal inhibitory concentration*

MBC – do inglês *minimal bactericide concentration*

NB – do inglês *Nutrient Broth*

OD₄₉₀ – do inglês *optical density at 490 nm*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Inibidores de Proteases.....	15
2.1.1. Inibidores de tripsina.....	16
2.2. Bactérias de importância médica.....	18
2.3. Potencial biotecnológico da Caatinga.....	21
2.3.1. Cactáceas.....	23
2.3.1.1. Xique-xique.....	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. REFERÊNCIAS	29
5. ARTIGO	37
6. CONCLUSÃO.....	55

1. INTRODUÇÃO

Proteínas com ação inibidora sobre enzimas atuam reduzindo ou bloqueando a atividade catalítica e são frequentemente encontradas em plantas. Dentre as principais proteases afetadas por inibidores de origem vegetal destacam-se a tripsina e quimotripsina. Inibidores de proteases têm sido descritos como agentes antibacterianos, estando esse efeito provavelmente relacionado com a inibição de enzimas proteolíticas envolvidas em processos fisiológicos das bactérias, bem como com a alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana (KIM et al., 2005; LI et al., 2007).

A necessidade de novos agentes antimicrobianos é crescente devido ao aumento no número de populações de microorganismos resistentes aos antibióticos atualmente utilizados. (RAMOS et al., 2014). Diversos estudos têm investigado o potencial de moléculas alternativas para uso isoladamente ou em conjunto com outras drogas. Nesse contexto, as plantas medicinais têm adquirido uma importância crescente, uma vez que apresentam um papel vital na descoberta de novos agentes farmacológicos (AGRA et al., 2008).

Anteriormente pouco exploradas do ponto de vista biotecnológico, as regiões da Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro, têm recebido crescente atenção por parte dos pesquisadores, devido à diversidade de espécies vegetais e de usos medicinais atribuídos a elas pela população. A espécie *Pilosocereus gounellei* (F.A.C.Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley, conhecida popularmente como xique-xique, é uma planta cactácea que se desenvolve inclusive nas áreas mais secas da Caatinga. Estudo etnobotânico listou usos trófico (alimentação humana e animal), decorativo e medicinal do xique-xique (ALBUQUERQUE, 2002).

O presente trabalho descreve a purificação e caracterização de um inibidor de tripsina a partir do caule de xique-xique (PgTI, do inglês *P. gounellei* trypsin inhibitor) e a investigação da sua atividade antibacteriana contra espécies de importância médica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Inibidores de proteases

Inibidores de protease são proteínas que atuam inativando ou reduzindo a atividade de diversos tipos de enzimas, tais como tripsina e quimotripsina. Os inibidores de origem vegetal, particularmente os inibidores de serinoproteases, têm sido amplamente estudados devido ao seu papel na defesa das plantas contra o ataque de insetos, bem como na atuação de reguladores endógenos, proteínas de armazenamento e contra o ataque de microorganismos (CHAUDHARY et al., 2008; KIM et al., 2009; PAIVA et al., 2013). A síntese de inibidores de protease pelas plantas pode ser induzida pelo estresse hídrico, variações sazonais de temperatura e luminosidade e, especialmente, em resposta à infecção por patógenos e ao ataque de herbívoros (BRAY et al., 2000; BHATTACHARYYA et al., 2007).

Os inibidores de proteases apresentam diversas atividades biológicas, tais como atividades anticoagulante, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária. Por esse motivo, as ciências médica e farmacêutica têm explorado os inibidores de proteases quanto ao seu potencial como agentes antimicrobianos e no tratamento de doenças, entre as quais estão o câncer e o *diabetes mellitus* (KOBILINSKI et al., 2000; FEAR et al., 2007).

Os inibidores de proteases podem atuar competindo com os substratos pelo sítio ativo das proteases, com o qual estabelecem interações estáveis. Proteínas com atividade inibidora de tripsina interagem com o sítio ativo da enzima por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas ou ainda interações hidrofóbicas. A inibição enzimática competitiva acontece quando a sequência de aminoácidos presente no sítio reativo do inibidor é complementar àquela existente no sítio ativo da enzima (MAJOR e CONSTABEL, 2008). Os inibidores podem também atuar de forma não competitiva, interagindo com outras regiões da molécula

enzimática, o que pode ocasionar alterações conformacionais nas mesmas, formando complexos estáveis inativos ou com baixa atividade (BODE e HUBER, 2000; LIAO et al., 2007).

2.1.1. Inibidores de tripsina

A tripsina é uma serinoprotease que possui em seu sítio ativo uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de serina, aspartato e histidina (Figura 1). Essa conformação em tríade garante ao resíduo de serina um caráter nucleofílico, criando um ambiente eletrostático favorável à interação com resíduos de aminoácidos positivamente carregados, geralmente com especificidade maior para a arginina do que para lisina (HEDSTROM, 2002). A tripsina possui suma importância para diversos grupos taxonômicos, sendo expressa por vertebrados, invertebrados e microorganismos (BAHGAT et al., 2002; BARATA et al., 2002; BHATTACHARYYA et al., 2007) sendo, por isso, alvo em diversos estudos na busca por agentes terapêuticos, antibióticos e pesticidas (FEAR et al. 2007; PRASAD et al., 2010; MACEDO et al., 2011; PAIVA et al., 2012, 2013).

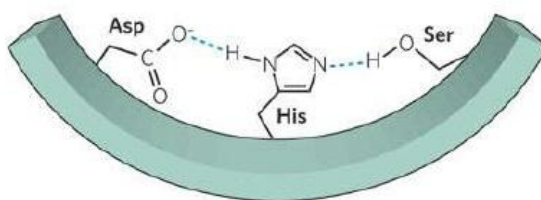


Figura 1. Tríade catalítica do sítio ativo da tripsina.

Fonte: graduacao.iqsc.usp.br

Inibidores de tripsina têm sido descritos e caracterizados quanto à estrutura tridimensional e atividade inibitória sobre várias classes de proteases, inclusive de

invertebrados e microrganismos (FRANCO et al., 2002; KRAUCHENCO et al., 2003; GARCIA et al., 2004). Inibidores da família Kunitz demonstram atividade inibitória sobre a tripsina (YANG et al., 2009; SOARES et al., 2012), quimotripsina (CHANG et al., 2001; WANG et al., 2012), ou ambas as enzimas (HE et al., 2008). Inibidores do tipo Kunitz participam de diversos processos fisiológicos, tais como bloqueio de canais iônicos, apoptose, coagulação sanguínea, inflamação, remodelamento celular, metamorfose e defesa contra organismos invasores (MILLERS et al., 2009; SOARES et al., 2012).

Diferentes atividades biológicas têm sido descritas para inibidores de tripsina isolados de plantas. Pesquisas com inibidores de proteases isolados de sementes, folhas e raízes de leguminosas descrevem a ação efetiva dessas proteínas contra diversos grupos de invertebrados, tais como insetos e nematóides, como também sobre microrganismos patogênicos e células tumorais (GOMES et al., 2014, AGRA et al., 2008, ALMEIDA et al., 2010). Um inibidor de tripsina isolado da flor *Moringa oleifera* apresentou atividade larvicida contra larvas recém eclodidas de *Aedes aegypti* (mosquito da dengue), estagnando o desenvolvimento larval (PONTUAL et al., 2014). De acordo com Oliveira et al. (2014), extratos proteicos de sementes da catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*) contendo inibidor de tripsina exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Conhecidos por sua alta especificidade e versatilidade, os inibidores de protease vêm sendo investigados pelas ciências médicas e farmacêuticas quanto a sua atuação como agentes antifúngicos, antiprotzoários, antivirais e ainda contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância médica (FEAR et al., 2007). Dessa forma, moléculas com atividade inibidora de tripsina e ação antimicrobiana constituem alternativas interessantes para a produção de novos antibióticos. Inibidores de natureza proteica podem apresentar efeito antibacteriano por inibirem a atividade de enzimas proteolíticas das bactérias, bem como alterarem a permeabilidade da célula bacteriana (KIM et al., 2005; LI et al., 2007).

2.2. Bactérias de importância médica

Bactérias são caracterizadas por serem organismos procariotos e podem ser encontradas na maioria dos ambientes naturais (MURRAY et al., 2000; SCHAECHTER et al., 2002). Algumas espécies bacterianas são responsáveis por causar infecções graves em seres humanos. A gravidade da infecção bacteriana depende de diversos fatores, incluindo a imunidade do hospedeiro, a espécie/cepa causadora e o local da infecção. As bactérias implicadas em infecções podem constituir patógenos verdadeiros (quando possuem a capacidade de invadir indivíduos normais, esquivar-se dos mecanismos de defesa inatos e/ou produzir potentes toxinas) ou podem ser patógenos oportunistas (quando correspondem a microrganismos existentes na flora bacteriana normal de um indivíduo que trazem danos à saúde do hospedeiro devido a uma diminuição das defesas orgânicas) (GOLDMAN e AUSIELLO, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; GOMES et al., 2014).

Quando o sistema imunológico do organismo não consegue combater o agente patológico causador da doença, é necessário o uso de agentes quimioterápicos, como os antibióticos. O uso destes medicamentos é indispensável para redução da taxa de mortalidade dos infectados; contudo, o uso frequente e indevido desses fármacos tem ocasionado o aumento da resistência antimicrobiana de espécies bacterianas aos antibióticos utilizados (KOH et al., 2009). Por sua vez, o crescente surgimento de cepas de microrganismos resistentes às drogas utilizadas tem estimulado a procura por novos agentes antimicrobianos.

A resistência bacteriana é uma característica genética de algumas células de uma determinada espécie, as quais portam genes que codificam mecanismos bioquímicos que impedem a atuação de antibióticos que, teoricamente, deveriam promover a morte das mesmas (RAMOS et al., 2014). Devido à pressão de seleção exercida pelo agente antibiótico,

as células que não são portadoras dos genes de resistência são eliminadas, enquanto as resistentes terminam por proliferarem dando origem a uma estirpe ou cepa resistente. Esse fenômeno é comum em ambientes hospitalares, devido ao uso excessivo e/ou exclusivo de um único antibiótico para tratar um determinado tipo de infecção. A resistência bacteriana é frequentemente originada de mutações sendo transferível para outras células, através de mecanismos de transdução, transformação e conjugação envolvendo genes situados em plasmídios e transposons (TAVARES, 2000; SILVEIRA et al., 2006).

Staphylococcus aureus é uma espécie bacteriana com ampla distribuição na natureza, de formato esférico, pertence ao grupo dos cocos gram-positivos. É frequentemente localizada na epiderme e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, é responsável por causar tanto infecções simples como intoxicação alimentar, espinhas, furúnculos quanto infecções mais graves como pneumonia, endocardite e meningite (PRETTO, 2005; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A espécie *Staphylococcus saprophyticus* tem formato esférico, do tipo cocos, sendo gram-positiva e anaeróbica facultativa. Habita a microbiota da superfície epitelial, região periuretral e mucosas das vias urinárias e genitais. Tem a capacidade de aderir às células do aparelho urinário humano, principalmente em mulheres jovens sexualmente ativas (KLINE et al., 2010).

Escherichia coli é uma espécie de forma bacilar, gram-negativa, anaeróbica facultativa e que não produz esporos. Normalmente, ocupa o lúmen intestinal de humanos como microrganismo simbiote, auxiliando na digestão. Como patógeno, a *E. coli* é responsável por causar diversas infecções, tais como apendicite, meningite, gastroenterites, etc. (KONEMAN et al., 2001; SARTORI, 2007).

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria gram-negativa, encapsulada, anaeróbica facultativa, em forma de bastão, que geralmente habita a flora gastrintestinal de

humanos e de animais. Pode causar pneumonia e doença urinária, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares, em particular, afetando pacientes imunologicamente deprimidos (HANSEN et al., 1998; SCARPATE e COSSATIS, 2009).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é caracterizada por ter formato de bastão e ser gram-negativa e aeróbica. Seu ambiente de origem é o solo, mas também habita o trato gastrointestinal humano. Infecções gerais em decorrência de processos cirúrgicos e infecção do aparelho respiratório humano são exemplos da atuação patológica dessa espécie (SCHAECHTER et al., 2002; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Micrococcus luteus está descrita como uma espécie de formato esférico, gram-positiva, sem motilidade. É encontrada frequentemente em solo, poeira, água e ar, e ainda em parte da flora normal da superfície da pele dos mamíferos. Está associada com infecções como pneumonia, artrite séptica, meningite e bacteremia. É designada como um contaminante nosocomial e, quando a espécie contamina pessoas imunodeficientes, acaba reforçando outras infecções, tais como meningite, pneumonia e infecções do trato urinário (PECES et al., 1997; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Serratia sp. é um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo. O patógeno é responsável por aproximadamente 2% das infecções nosocomiais no trato respiratório baixo, trato urinário, sangue, feridas cirúrgicas, pele e mucosas em pacientes adultos. Ainda, essa espécie pode causar endocardite e osteomielite em viciados em heroína (MENEZES et al., 2004).

Enterococcus faecalis são bactérias gram-positivas, normalmente encontradas na flora gastrointestinal de humanos e animais. Essa espécie bacteriana causa infecções potencialmente letais (endocardite e bacteremia) principalmente em pacientes imunocomprometidos. *E. faecalis* apresenta um grande risco quando afeta a saúde de pacientes em hospitais, onde coloniza cateteres urinários ou intravenosos e termômetros

retais. Quando estes instrumentos e as mãos das enfermeiras não são limpos adequadamente, o *E. faecalis* é transferido para uma superfície próxima ou para outro paciente (RINCÉ et al., 2003; KAWALEC et al., 2007).

2.3. Potencial biotecnológico da Caatinga

Estimativas indicam que o número de espécies conhecidas no Brasil é de aproximadamente 210 mil, o que equivale a 13% da biota mundial. Uma parte significativa desta diversidade está contida na Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro, encontrado na região semiárida nordestina (NASCIMENTO et al., 2011). Cerca de 80% do nordeste brasileiro é composto pela região semiárida, onde 80.000 km² de hectares correspondem a Caatinga (Figura 2). Esse bioma caatinga inclui uma série de diferentes tipos de vegetação, a depender dos períodos de chuvas, tipo do solo e altitude (ARAÚJO, et al., 2008).



Figura 2. Área do bioma Caatinga.

Fonte: www2.camara.leg.br.

O clima semiárido e quente possui escassez de precipitação chuvosa, com longos períodos de seca. A precipitação anual varia entre volumes de 600 e 750 mm de água (ASSIS,

1999). Apesar da falta de água na região, o bioma apresenta grande diversidade de espécies vegetais adaptadas aos longos períodos de seca (RODAL et al., 2002). A vegetação caducifólia espinhosa constitui a maior parte da área desse bioma (ROCHA e AGRA, 2002; ALCOFORADO-FILHO et al., 2003).

A Caatinga demonstra grande importância na vida das pessoas que habitam o nordeste do Brasil, pois diversas plantas são usadas com diversas finalidades como, por exemplo, na alimentação, principalmente os frutos (RAMOS et al., 2008a, 2008b). Adicionalmente, os vegetais da Caatinga são utilizados na construção civil (NASCIMENTO et al., 2009) e para fins medicinais. Nos últimos anos foi observado um aumento da exploração e investigação de plantas da Caatinga, com relação ao seu uso medicinal (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b; ALENCAR et al., 2009; ALENCAR et al., 2010; ALMEIDA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2008).

O aumento de ações objetivando conhecer melhor a bioquímica de plantas da Caatinga é de suma importância, visto que plantas tropicais têm sido amplamente utilizadas para produção de preparações com propriedades analgésicas, tranquilizantes, diuréticas, laxantes e antimicrobianas, assim como para obtenção de novos produtos para a indústria e agricultura (SOUZA e FELFILI, 2006). Inibidores de proteases sintetizados por plantas da Caatinga têm sido investigados quanto as suas aplicações em diversos processos biológicos. Estudo realizado por Arcoverde et al. (2014) revelou que, dentre 36 extratos salinos obtidos de diferentes partes (folhas, ramos, sementes e pericarpos) de 27 plantas da Caatinga, 63,9% apresentaram atividade inibidora de tripsina. Dentre esses extratos, 47,8% apresentaram forte efeito inibidor (redução maior que 70% na atividade da enzima). Contudo, são poucos os relatos que descrevem a purificação e avaliação do potencial biotecnológico de inibidores de protease obtidos de plantas da Caatinga.

A região semiárida do estado de Pernambuco é dotada de grande número de recursos, os quais têm sido utilizados pela população, mas pouco explorados biotecnologicamente. Dessa forma, a ampliação de ações objetivando a bioprospecção bioquímica de plantas encontradas nessa região é de extrema importância.

2.3.1. Cactáceas

A família das cactáceas compreende 125 gêneros e 1.900 espécies (ARECES, 2004), distribuídas em regiões de zonas temperadas e tropicais das Américas, ocupando uma ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas (HUNT e TAYLOR, 1990). Crescem até mesmo em solos pedregosos, formando a paisagem típica da região do semiárido nordestino (GOMES, 1977).

São predominantemente xerófilas, áfilas, com caules espinhosos e ramos suculentos, com flores solitárias e vistosas (ROCHA e AGRA, 2002). No território brasileiro, foram registradas 160 espécies vegetais pertencentes a 32 gêneros (BARROSO et al. 1978). Segundo Rizzini (1987), no Brasil, a família Cactaceae é dividida em cinco grupos de espécies, de acordo com seu habitat, como mostra a Tabela 1.

A família ainda encontra-se subdividida em três subfamílias Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (BARTHLOTT e HUNT, 1993). Em 2001, a subfamília Mahiuenioideae foi inserida, compreendendo o gênero *Mahiuenia*, antes pertencente à subfamília Pereskioideae (ANDERSON, 2001). Por ocuparem na sua maioria regiões áridas, as plantas dessa família apresentam algumas características denominadas adaptativas, o que facilita a identificação e classificação (ARRUDA et al., 2005). Estruturas como cladódios mucilaginosos, parênquima retrátil, ramos laterais reduzidos em aréolas (onde se encontram os meristemas apicais), caule fotossintetizante, ausência de folhas, presença de espinhos,

flores com estames e tépalas numerosos, bem como a produção de metabólitos secundários específicos, são adaptações relacionadas a anatomia e o metabolismo da família Cactaceae para garantir sua sobrevivência durante períodos de extrema seca (GOMES, 1977; GIBSON e NOBEL 1986; WALLACE e GIBSON 2002; ALMEIDA, 2005).

Tabela 1. Grupos de espécies vegetais da família Cactaceae e seu habitat.

Grupo vegetal	Habitat
Silvícolas	Florestas pluviais
Savanícolas	Cerrado
Campestres	Campos Rupestres
Litorâneas	Litoral Brasileiro
Xerófilas*	Bioma Caatinga

*Abrange o maior número de espécies da família Cactaceae.

Algumas espécies de cactáceas são descritas por serem utilizadas para fins medicinais. *Arrojadoa rhodantha*, popularmente conhecida como rabo de raposa é uma cactácea popularmente utilizada para tratamento de problemas no estômago e baço. O *Cereus jamacaru*, mais conhecido como mandacaru, é utilizado para tratamento de infecções nos rins e no fígado. O quipá (*Opuntia palmadora*) é utilizado para tratamento de inflamações, asma e verminoses (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007a).

Todas as espécies da família Cactaceae produzem fenóis e triterpenos, compostos químicos originados do metabolismo secundário vegetal (ALMEIDA et al., 2005; GOBBONETO e LOPES, 2007). Estudos realizados por Bruneton (1991) e Carvalho et al. (2002) confirmaram o envolvimento de fenóis e triterpenos obtidos de plantas da Caatinga, inclusive cactáceas, em atividades diversas tais como antibacteriana, antiviral, antioxidante, diurética, anti-reumática, e ainda contra doenças gástricas e problemas hepáticos.

2.3.1.1. Xique-xique

Pilosocereus gounellei (F.A.C.Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley, conhecida popularmente como xique-xique, alastrado ou sodoro, é uma planta cactácea que pode ser encontrada nas diversas áreas da Caatinga, até mesmo crescendo em cima de rochas, solos rasos e pedregosos (ARRUDA et al., 2005; BARBOSA, 1997; AGRA et al., 2008). Na família Cactaceae o xique-xique é classificado como espécie exclusiva da caatinga, com ampla distribuição geográfica no semiárido nordestino. Essa espécie desenvolve-se em áreas denominadas edafoclimáticas, ou seja, áreas de elevadas temperaturas, precipitações chuvosas irregulares e solo de baixa fertilidade (TAYLOR E ZAPPI, 2002).

O xique-xique apresenta características próprias como mostra a Figura 3. O caule é ereto com galhos ramificados, sendo ambos cobertos por espinhos (Figura 3A). Cresce primeiramente em sentido horizontal e em seguida desenvolve-se em sentido vertical. A planta pode atingir a altura de aproximadamente 3,76 m, com diâmetro de copa variando entre 1,45 m a 3,27 m. Suas flores (Figura 3B) possuem coloração branca e são protegidas por um tipo de algodão característico produzido pela planta. Os frutos (Figura 3C) são do tipo baga de tamanho mediano, verdes no exterior e vermelhos no interior, constituídos de sementes que aves e outros animais da Caatinga utilizam para alimentação (GOMES; 1977; CAVALCANTI & RESENDE, 2007).

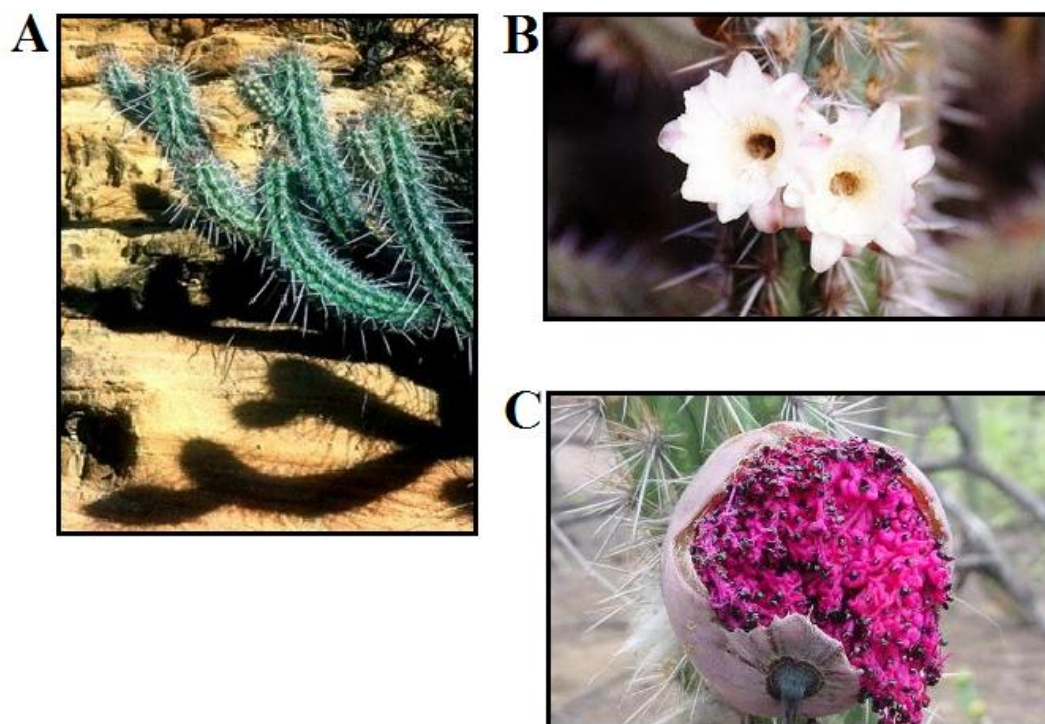


Figura 3. Características morfológicas do xique-xique. (A) Caule, (B) flor, (C) fruto.

Fonte: <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br>.

Estudo da composição química do xique-xique revelou teores de proteína bruta e minerais de 5,07% e 18%, respectivamente, com elevado teor de cálcio (1,8 a 3,1 %) e potássio (1,5 a 2,9%) (BARBOSA et al., 1996). Em adição, o xique-xique é bastante utilizado na alimentação de bovinos e caprinos, principalmente no período de seca prolongada (SILVA et al., 2005; CAVALCANTI & RESENDE, 2007). Do ponto de vista medicinal, é descrita a utilização de uma pomada produzida a partir do miolo do xique-xique macerado para tratamento de processos inflamatórios decorrentes de perfurações nos membros superiores e inferiores (OLIVEIRA, 2011).

Preparações das raízes do xique-xique são utilizadas no tratamento de inflamações prostáticas e na uretra (AGRA et al., 2008; ROQUE et al., 2010). Ainda, *P. gounellei* é popularmente utilizado para cura de infecções nos rins (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007a). Resultado de análise toxicológica de infuso etanólico do

caule de xique-xique, administrado intraperitonealmente em camundongos, indicou uma dose letal (DL_{50}) de 1.012 mg/kg, caracterizando toxicidade moderada (BARROS & DAVINO, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Purificar e caracterizar inibidor de tripsina a partir de caule de *P. gounellei* (PgTI) e avaliar sua atividade antibacteriana.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extrato salino de caule de *P. gounellei*.
- Purificar PgTI através de técnicas cromatográficas.
- Caracterizar PgTI quanto a composição em subunidades, massa molecular e ponto isoelétrico.
- Determinar a constante de inibição para tripsina (K_i) de PgTI.
- Avaliar a estabilidade da atividade inibidora de PgTI frente ao aquecimento.
- Determinar o efeito de PgTI sobre o crescimento e sobrevivência de espécies de bactérias de importância médica.

4. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 273-285, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native Caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 156–170, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007a.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIN, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76–91, 2007b.
- ALCOFORADO-FILHO, F. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RODAL, M. J. N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa arbórea em Caruaru. **Acta Botânica Brasilica**, v.17, p. 287-303, 2003.
- ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. S.; AMORIN, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Can the apparency hypothesis explain the selection of medicinal plants in an area of Caatinga vegetation? A chemical perspective. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 910–911, 2009.
- ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. S.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias — Evidence in support of the diversification hypothesis. **Economic Botany**, v. 64, p. 68–79, 2010.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674–684, 2010.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. L.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. S.; Albuquerque, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142, 2005.
- ANDERSON, E. F. **The cactus family**. Timber Press, Portland, Oxford, 2001.

- ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N.; LEAL, AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72–80, 2008.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; DIOZÍNIO, B. P.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, p. 1297-1301, 2014.
- ARECES, A. Cactaceae. In: **Flowering plants of the Neotropics**. (SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, W. D.; HEALD, E. S. V. (eds.)). Princeton and Oxford University Press, 2004, p. 73-76.
- ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 589-601, 2005.
- ASSIS, J. S. **Centro regional de estudo sobre a Caatinga: Zoneamento ambiental e plano de unidades de conservação da Caatinga no estado de Alagoas (escala 1:100000)**. Universidade Federal de Alagoas, p. 25–26, 1999.
- BAHGAT, M.; DENHOFF, M.; KIRSCHFINK, M.; RUPPEL, A. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 88, p. 489-494, 2002.
- BARATA, R. A.; ANDRADE, M. H. G.; RODRIGUES, R. D.; CASTRO, I. M. Purification and characterization of an extracellular trypsin-Like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 304-308, 2002.
- BARBOSA, H.P. **Tabela de composição de alimentos do estado da Paraíba**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1997.
- BARBOSA, M.; MAYO, S.; CASTRO, A.; FREITAS, G.; PEREIRA, M; NETO, P.; MOREIRA, H. Checklist preliminar das angiospermas. In: **Pesquisa Botânica Nordestina - Progresso e perspectivas**. (SAMPAIO, E.; MAYO, S.; BARBOSA, M. (eds.)). Pesquisa SBB, Recife, 1996, p. 253-415.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 59-70.
- BARROSO, G.; GUIMARÃES, E.; ICHASO, C.; COSTA, C.; PEIXOTO, A. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**, v. 1, LTC/ Edusp, São Paulo, 1978.
- BARTHLOTT, W.; HUNT, D. R. Cactaceae. In: **The families and genera of vascular plants** (KUBITZKI, K., ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1993, p. 161-197.

- BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 669-677, 2007.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241–252, 2000.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, L.R. (eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158-1203.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y da Farmacognosia**. Ed. Acribia, Zaragoza, 1991, p. 594.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento, fourth ed.** Editora Universitária/UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2002, p. 433–450.
- CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M. Consumo de xiquexique [*Pilosocereus gounellei*] (A. Weber ex K. Schum.) Byl. ex Rowl.] por caprinos no semiárido da Bahia. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 22-27, 2007.
- CHANG, L. S.; CHUNG, C.; HUANG, H. B.; LIN, S. R. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 862–867, 2001.
- CHAUDHARY, N. S.; SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2120-2126, 2008.
- FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, p. 354–368, 2007.
- FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; FRANCISLETE, R.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-AS, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases - structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 397-412, 2002.
- GARCIA, V. L.; FREIRE, G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilantha parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest protease. **The Protein Journal**, v. 23, p. 343-350, 2004.
- GIBSON, A.; NOBEL, P. **The cactus primer**. Havard University Press, Cambrigde, 1986.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- GOMES, F. S.; PONTUAL, E. V.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. **Advances in Research**, v. 2, p. 250-265, 2014.
- GOMES, R. P. **Forragens fartas na seca**. 4^a ed. São Paulo: Nobel, 1977, p. 233.
- HANSEN, D. S.; GOTTSCHAUF, A.; KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: A case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **Journal of Hospital Infection**, v. 38, p. 119-132, 1998.
- HE, Y. Y.; LIU, S. B.; LEE, W. H.; QIAN, J. Q.; ZHANG, Y. Isolation, expression and characterization of a novel dual serine protease inhibitor, OHTCI, from king cobra venom. **Peptides**, v. 29, p. 1692-1699, 2008.
- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501-4523, 2002.
- HUNT, D.; TAYLOR, N. The genera of Cactaceae - Progress Toward Consensus. **Bradleya**, v. 8, p. 85-107, 1990.
- KAWALEC, M.; PIETRAS, Z.; DANIŁOWICZ, E.; JAKUBCZAK, A.; GNIADKOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W.; WILLEMS, R. J. L. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish Hospitals: Characterization of Epidemic Clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 147-153, 2007.
- KIM, J-Y.; PARK, S-C.; HWANG, I.; CHEONG, H.; NAH, J-W.; HAHM, K-S.; PARK, Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2860-2872, 2009.
- KIM, J-Y.; PARK, S-C.; KIM, M-H.; LIM, H-T.; PARK, Y.; HAHM, K-S. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 921-927, 2005.
- KLINE, K. A.; INGERSOLL, M. A.; NIELSEN, H. V.; SAKINC, T.; HENRIQUES-NORMARK, B.; GATERMANN, S.; CAPARON, M. G.; HULTGREN, S. J. Characterization of a Novel Murine Model of *Staphylococcus saprophyticus*. Urinary Tract Infection Reveals Roles for Ssp and SdrI in Virulence. **Infection and immunity**, v. 78, p. 1943-1951, 2010.
- KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 291, p. 113-135, 2000.
- KOH, K. H.; THAM, F.-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. **Journal of Microbiology**, v. 44, p. 144-148, 2009.

- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**, 5ª ed. Medsi: Rio de Janeiro, 2001.
- KRAUCHENCO, S.; PANDO, S. C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 1303-1308, 2003.
- LI, J.; ZHANG, C.; XU, X.; WANG, J.; YU, H.; LAI, R.; GONG, W. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 2466-2473, 2007.
- LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; ZHAO, X. J.; DU, L. F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: Isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 653-658, 2007.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, p. 486-498, 2011.
- MAJOR, I. T.; CONSTABEL, C. P. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in popular reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. **Journal of Plant Physiology**, v. 146, p.888-903, 2008.
- MENEZES, E. A.; CEZAFAR, F. C.; ANDRADE, M. S. S.; ROCHA, M. V. A. P.; CUNHA, F. A. Frequency of *Serratia* sp in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 70-71, 2004.
- MILLERS, E. K. I.; TRABI, M.; MASCI, P. P.; LAVIN, M. F.; DE, JERSEY J. Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textiles*). **FEBS Journal**, v. 276, p. 3163-3175, 2009.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I S.; ALBUQUERQUE, U. P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2112-2119, 2011.
- NASCIMENTO, V. T.; SOUSA, L. G.; ALVES, A. G. C.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Rural fences in agricultural landscapes and their conservation role in an area of Caatinga (dryland vegetation) in Northeast Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 11, p. 1005-1029, 2009.

- OLIVEIRA, T. R.; SANTOS, M. D. S.; FIGUEIREDO, M. F.; FONTENELLE, R. O. S.; ANDRADE, L. B. S. Enzimas, inibidores de proteases e atividade antibacteriana de extratos aquosos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, p. 3252, 2014.
- OLIVEIRA, L. J. **Bioensaios de *Pilosocereus Gounellei* (Weber) Byles e Rowley (Parâmetros fitoquímicos, toxicológicos, microbiológicos, hematológicos e bioquímicos)**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Lectinas: Proteínas Bioativas de Plantas da Caatinga. In: SILVA, M. V.; MACEDO, A. J.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. BAUM, I. J. R. vol. (Org.). **A Caatinga e seu Potencial**. 20^a ed. Recife: Editora Universitária, 2013, v. 20, p. 37-62.
- PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. In: POURALI, H.; RAAD, V.N (eds.). **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012, p. 37–55.
- PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; MOURA, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**, v. 113, p. 727–733, 2014.
- PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 80–88, 2010.
- PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina. 2005.
- RAMOS, D. B. M.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- RAMOS, M. A.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; FELICIANO, A. L. P.; ALBUQUERQUE, U. P. Use and knowledge of fuel wood in an area of Caatinga vegetation in NE Brazil. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 510–517, 2008a.
- RAMOS, M. A.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; FELICIANO, A. L. P.; ALBUQUERQUE, U. P. Can wood quality justify local preferences for firewood in an area of Caatinga (dryland) vegetation? **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 503–509, 2008b.

- RINCÉ, A.; LE BRETON, Y.; VERNEUIL, N.; GIARD, J. C.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y. Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 207-213, 2003.
- RIZZINI, C. **Cactáceas: Os segredos da sobrevivência**. Ciência Hoje, v. 30, p. 30-39, 1987.
- ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, p. 15-21, 2002.
- RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJA, C. F. L. A vegetação do bioma caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJA, C. F. L. (eds.). **Vegetação e Flora da Caatinga**. Associação Plantas do Nordeste/Centro Nordestino de Informação sobre Plantas, 2002, p. 49-90.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 31-42, 2010.
- SARTORI, L.; DANIEL, L. A. Microbiological quality adequation of effluents from secondary lagoons for the application of ozone in agriculture. **Información Tecnológica**, v. 18, p. 83-92, 2007.
- SCARPATE, E. C. B.; COSSATIS, J. J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 4, p. 1-11, 2009.
- SCHAECHTER, M.; EGGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, I. B. E.; MEDOFF, G. **Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SILVA, J. G. M.; SILVA, D. S.; FERREIRA, M. A.; LIMA, G. F. C.; MELO, A. A. S.; DINIZ, M. C. N. M. Xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1408-1417, 2005.
- SILVEIRA, G. P. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.
- SOARES, T. S.; WATANABE, R. M. O.; TANAKA-AZEVEDO, A. M; TORQUATO, R. J. S.; LU, S. Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 521-528, 2012.
- SOUZA C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 135-145, 2006.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: Resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

- TAYLOR, N. P; ZAPPI, D. C. In: Distribuição das espécies de Cactaceae na caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (eds.) **Vegetação e flora da caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste – APNE, 2002. p. 123-125.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- YANG, X.; WANG, Y.; LU, Z.; ZHAI, L.; JIANG, J. A novel serineprotease inhibitor from the venom of *Vespa bicolor* Fabricus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 116–120, 2009.
- WANG, H.; WANG, L.; ZHOU, M.; YANG, M.; MA, C. Functional peptidomics of amphibian skin secretion. A novel Kunitz-type chymotrypsin inhibitor from the African hyperoliid frog, *Kassina senegalensis*. **Biochimie**, v. 94, p. 891–899, 2012.
- WALLACE, R. S.; GIBSON, A. C. Evolution and systematics, In: NOBEL, P.S. (eds.). **Cacti: Biology and uses**. University of California Press, Berkeley, 2002, p. 1-21.

5. ARTIGO

Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Pilosocereus gounellei* stem with antibacterial activity

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“Journal of Applied Microbiology”

Fator de Impacto: 2,836

Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Pilosocereus gounellei* stem with antibacterial activity

C.A.A. Rocha-Filho¹, P.K. Amorim¹, M.C. Moura¹, L.C.B.B. Coelho¹, E.V. Pontual^{1,2}, T.H. Napoleão¹, P.M.G. Paiva¹

¹Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.

Running headline: Antimicrobial protein from *P. gounellei* stem

Correspondence: Patrícia M.G. Paiva, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida. Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aims: This work aimed to isolate a trypsin inhibitor from *Pilosocereus gounellei* stem (PgTI) and to evaluate its antibacterial activity.

Methods and Results: Stem extract in 0.15 M NaCl was chromatographed onto a Sephadex G-100 column and the protein fraction obtained (P1) was loaded onto a DEAE FF 16/10 column coupled to the ÄKTApriime system. PgTI was recovered by elution using 1.0 M NaCl with a purification fold of 2.02. It showed a K_i of 14 nM and appeared as a single spot, with 37.1 kDa and pI 5.88 on two-dimensional electrophoresis. The trypsin inhibitor activity of PgTI was stable to heating until 50 °C but was abolished at 60 °C. PgTI showed bacteriostatic effect against *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* (minimal inhibitory concentrations: 37.5, 150, 37.5, 18.7, 7.5, 7.5 and 18.7 µg/mL, respectively) and showed bactericidal activity only against *E. coli* (minimal bactericide concentration: 75 µg/ml).

Conclusion: Stem of *P. gounellei* contains a trypsin inhibitor with antibacterial activity against species with medical relevance.

Significance and Impact of the Study: This work defines the stem of *P. gounellei*, a common cactus in Brazilian semi-arid region, as a source of antibacterial agent, increasing the biotechnological value of this plant.

Keywords: xique-xique; protease inhibitor; antibacterial activity.

INTRODUCTION

Protease inhibitors are a heterogeneous group of molecules whose reactive site is capable to interact with the enzyme molecule, reducing or blocking its activity (Oliva et al., 2010). It has been well reported that these inhibitors can be involved in a wide range of biological activities, acting for example as insecticidal, antihelminthic, antitumor, healing or antimicrobial agents (Lai et al., 2004; Vermeire et al., 2012; Pontual et al., 2014; Huang et al., 2015).

According to Li et al. (2007), peptides that contain a trypsin (serine protease) inhibitory loop are generally good antimicrobial peptides. These inhibitors can promote inhibition of growth or kill bacteria by inhibiting their proteases or interact with the cell wall or plasma membrane altering the cell permeability (Paiva et al., 2014). In this sense trypsin inhibitors are promising alternatives for replacing the currently antibiotics used, against which bacteria have developed resistance (Ramos et al., 2014).

Caatinga region is an exclusively Brazilian biome that has received increasing attention from researchers due to the high diversity of plant species and the medicinal purposes assigned to them by the local population (Albuquerque et al., 2009). Although they are still little prospected, Caatinga plants have been pointed as promising sources of bioactive compounds. Arcoverde et al. (2014) reported the presence of trypsin inhibitory activity in 23 plants from Caatinga, including species of the genera *Buchenavia*, *Chamaecrista*, *Harpochilus*, *Jacaranda*, *Myracrodruon*, *Myroxylum*, *Pityrocarpo* and *Sida* and considered these plants interesting materials for exploitation by the scientific community.

Pilosocereus gounellei (vernacular name “xique-xique”) is a cactus plant endemic of Brazilian semi-arid region that grows even over rocks and multiplies regularly covering large areas (Gomes, 1977; Silva et al., 2005). The xique-xique is employed in feeding of cattle and

goats, especially in prolonged dry period (Silva et al., 2005; Cavalcanti and Resende, 2007). Its use in folk medicine has also been reported; for example, an ointment prepared from the stem is used for treating inflammatory processes resulting from injuries in members and preparations of xique-xique roots are used for treating prostate and urethra inflammations (Agra et al., 2008; Roque et al., 2010). In general, there are still few scientific publications on the biotechnological potential of *P. gounellei*.

This study describes the purification of a trypsin inhibitor (PgTI) from stem of *P. gounellei* and its characterization for subunit composition, isoelectric point, dissociation constant (K_i) toward bovine trypsin and stability to heating. In addition, the investigation of its antibacterial activity against medically important species was also performed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Stem of *Pilosocereus gounellei* (F.A.C.Weber ex K. Schum.) Byles & G.D. Rowley was collected in Limoeiro City, State of Pernambuco, Northeastern Brazil. The authors have authorization (number 38690-2) from the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from Brazilian Ministry of the Environment for plant collection. After removal of the thorns, the *P. gounellei* stems were cut into small pieces and dried at 28°C for 3 days. Next, the material was powdered and stored at -20°C.

Purification of PgTI

The *P. gounellei* stem powder was added to 0.15 M NaCl (in proportion of 5%, w/v) and the mixture was stirred for 16 h at 28 °C. Next, the material was centrifuged (3000 *g*, 15 min) and the supernatant corresponded to the extract.

P. gounellei stem extract (2 mL) was loaded onto a Sephadex G-100 column 33,2 x 1 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 6.0 mL/min. Fractions of 2 mL were collected in assay tubes and absorbance at 280 nm was monitored using a GeneQuant™ 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). A protein fraction (P1) was obtained by pooling the contents of tubes 16–28 and then evaluated for protein concentration and trypsin inhibitor activity as described below. Next, P1 was dialyzed against 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 for use in next chromatography step.

Dialyzed P1 was loaded (2.0 mL; 2.0 mg of protein) onto an ion exchange chromatography on a DEAE FF 16/10 column coupled to the FPLC system ÄKTAprime (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) and equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 at a flow rate of 5.0 mL/min. After washing with the equilibrating solution until absorbance at 280 nm was zero, adsorbed proteins were eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 NaCl. The pool of eluted fractions with absorbance higher than 0.100, which was called *P. gounellei* trypsin inhibitor (PgTI), was dialyzed against distilled water (4 h) and dried by lyophilization. For determination of trypsin inhibitor activity and dissociation constant (K_i), PgTI was resuspended in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0.

Protein concentration

The protein concentration of samples was estimated according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (31.25-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as standard.

Trypsin inhibitor activity

Trypsin inhibitor activity was assayed in 96-well microtiter plates (TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) using 0.1 mg/mL bovine trypsin in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl_2 (Pontual et al., 2012). Bovine trypsin (5 μL) was

incubated (5 min, 37 °C) with aliquots of the sample (30 µL) and the volume was adjusted for 200 µL with Tris-HCl pH 8.0. Next, the synthetic substrate *N*-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA; 8 mM) dissolved in DMSO was added (5 µL) and the mixture was incubated for 30 min at 37 °C. In control (100 % of substrate hydrolysis) the reaction between trypsin and BAPNA was run in absence of the sample. The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm using a universal microplate spectrophotometer (µQuant, MQX200; BioTek Instruments, Inc., VT, USA). Blank reactions were performed under the same conditions, without the substrate or without enzyme. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 after 30 min at 37 °C, in regard to control (Oliveira et al. 2012).

Two-dimensional electrophoresis

PgTI (250 µg of protein) in water was dried using a vacuum concentrator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany), resuspended in a rehydration buffer (8 M urea; 2 % (w/v) CHAPS; 1 % (v/v) IPG buffer pH 3–10; 0.002 % (w/v) bromophenol blue) and taken up into a strip (linear pH gradient 3–10) passively during rehydration for 16 h at 25 °C. Isoelectric focusing was performed using Ettan IPGPhor III (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) at 20 °C according to manufacturer's instructions. Next, the strip was washed three times during 15 min with 50 mM Tris-HCl pH 8.8 containing 6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS and 0.002 % (w/v) bromophenol blue. Then, the strip was washed once with Tris-glycine-SDS buffer and transferred to the top of a 12 % (w/v) polyacrylamide gel containing SDS, prepared according to Laemmli (1970). The strip was sealed with 0.5 % (w/v) agarose containing bromophenol blue. Standard molecular mass markers (Amersham™ Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers, 12–225 kDa, GE Healthcare) were submitted to electrophoresis in the same gel. The gel was

stained with 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue. After destaining, the gel was digitalized and analyzed using the software ImageMaster (GE Healthcare).

Determination of K_i

A Dixon plot analysis was employed to determine the constant of inhibition (K_i) for bovine trypsin (Segel, 1975). Enzyme inhibition was carried out at two different BApNA concentrations ([BApNA]; 4 mM and 8 mM). The initial slope v was determined for each inhibitor concentration. Dixon plots were generated using the reciprocal velocity ($1/v$) versus inhibitor concentration. Intersection of the two regression lines for each [BApNA] yielded the K_i .

Effect of heating on trypsin inhibitor activity

The effect of temperature on the trypsin inhibitor activity was evaluated by heating an aliquot of PgTI (500 μ L) during 30 min at 30, 40, 50 or 60°C prior to the assay for determination of activity.

Antibacterial activity

The bacterial strains (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*) were provided by the *Departamento de Antibióticos* from the *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, Brazil. The bacteria were cultured in Nutrient Broth (NB) overnight at 37 °C under permanent shaking. After this period, the culture concentrations were adjusted turbidimetrically to 10^5 - 10^6 colony forming units (CFU)/mL.

The effects of PgTI on growth and survival of the bacteria were evaluated as described by Carvalho et al. (2015) through the determination of the minimal inhibitory (MIC) and

minimal bactericide (MBC) concentrations. Initially, 100 μ L of NB were dispensed in each well of a 96-well microplate. In each row, PgTI (300 μ g/mL in distilled water) was two-fold serially diluted in the culture medium from the third well and next 20 μ L of the microorganism culture was added to each well. The first corresponded to negative control and contained only the culture medium while the second well contained medium, distilled water and microorganism, without the sample (100 % growth control). The plates were incubated at 37 °C for 24 h and assays were made in triplicate. After incubation, the optical density at 490 nm (OD_{490}) was measured using a microplate reader. MIC was determined as the lowest sample concentration able to promote a reduction ≥ 50 % in the optical density relative to the 100 % growth control (Amsterdam, 1996). The MBC values were determined by transferring inocula from the wells corresponding to PgTI concentrations $\geq$ MIC to petri plates containing Nutrient Agar. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The MBC corresponded to the lowest inhibitor concentration able to reduce the number of CFU in 99.9 % in comparison with 100 % growth control.

RESULTS

The extract from *P. gounellei* stem showed high viscosity and, for this reason, the trypsin inhibitory activity and protein concentration could not be measured. Then, aiming to remove this viscosity, the extract was loaded onto a gel-filtration column (Sephadex G-100), which resulted in a single protein peak that was deemed P1 (Figure 1A). P1 showed no viscosity and presented a trypsin inhibitory activity of 184 U/mg.

When P1 was chromatographed in ion exchange column it was detected only one peak of adsorbed proteins, which was eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl (Figure 1B). The eluted fractions were pooled and corresponded to PgTI. Trypsin inhibitor

assay revealed that PgTI showed a specific activity of 373 U/mg and a purification factor of 2.02 was calculated regarding to P1 inhibitory activity. Table 1 summarizes the results from purification of PgTI.

Two-dimensional electrophoresis revealed PgTI as a single spot of 37.1 kDa and isoelectric point of 5.88 (Figure 1C). The Dixon plot analysis indicated a K_i of 14 nM toward bovine trypsin. The inhibitory activity of PgTI was not significantly altered when the inhibitor was heated until 50 °C, but was abolished at 60 °C.

PgTI inhibited the growth of the human pathogenic bacteria *E. coli*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *Serratia* sp., *S. aureus* and *S. saprophyticus* and the MIC values ranged from 7.5 to 150 µg/ml as shown in Table 2. On the other hand, the inhibitor was bactericidal only against *E. coli* (MBC: 75 µg/ml) being obtained a MBC/MIC ratio of 2.0 for PgTI against this bacteria.

DISCUSSION

The plant species used for develop the experiments reported here is part of the underestimated biodiversity from Caatinga and was chosen in order to contribute to unravel the biochemical wealth of this region. This work was also motivated by the current necessity to found new antimicrobial agents for development of antibiotics to be used in replace of those against which bacteria have developed resistance. Furthermore, the recognized antimicrobial potential of protease inhibitors encouraged us to inquire about the presence of this protein group in the stem of *P. gounellei*.

When the extract from *P. gounellei* stem was obtained, a high viscosity was observed probably due to the high carbohydrate content in the plant tissue. Indeed, Nascimento et al. (2012) reported that *P. gounellei* contains about 5.7 g of carbohydrate per 100 g of stem, in

contrast with a protein content of 0.4 g/100 g. The high viscosity prevented the determination of protein concentration and trypsin inhibitory activity in the extract and thus we employed the gel filtration chromatography in order to obtain a more workable preparation to begin the protein purification.

The protocol employed for isolation of PgTI was efficient as revealed by the increasing of specific inhibitory activity in regard to that detected for P1. The high yield (98%) indicated that the most of the proteins present in P1 adsorbed on the ion exchange matrix and the purification factor showed that PgTI is about two times purer than P1. The isoelectric point of PgTI (5.88) demonstrated its anionic nature and this datum corroborates with the adsorption of the inhibitor in the anion-exchanger DEAE. According to the K_i value, PgTI (14 nM) showed higher affinity for trypsin than the inhibitor from *Moringa oleifera* flowers (K_i of 2.4 μ M) but lower than the inhibitor from *Entada acaciifolia* seeds (1.75×10^{-9} mol/L) (Oliveira et al., 2012; Pontual et al., 2014).

According to the results of thermal treatment, PgTI was sensitive to heating at 60°C. This finding can be attributed to denaturing of the PgTI domain responsible for inhibitory activity since it is well known that globular proteins generally unfold when the temperature overtakes a critical value from which the exposing of nonpolar groups occurs (McClements, 2004). Heating is also able to promote protein aggregation (Chen et al., 2014) and then it is possible that PgTI molecules have aggregated, which would prevent the contact of the reactive sites with trypsin. Unlike to PgTI, the activity of the trypsin inhibitor from *Senna tora* remained unchanged until 60 °C and the inhibitors from *Poincianella pyramidalis* and *Entada acaciifolia* were stable up to 70 °C (Oliveira et al., 2012; Guimarães et al., 2014; Tripathi et al., 2014).

According to Li et al. (2007), antimicrobial proteins that are able to inhibit proteases constitute promising antibiotics and, in addition, they do not show the sensitivity to

proteolysis as limitation to their application. In this sense, the antibacterial potential of PgTI was investigated. The bacterial species used here have medical relevance since they are known to cause various infectious processes in humans including pneumonia (*K. pneumoniae*), infections at digestive (*E. coli*) and urinary (*Serratia* sp. and *S. saprophyticus*) tracts and more severe infections such as endocarditis and bacteremia (*E. faecalis*, *M. luteus* and *S. aureus*) (Menezes et al., 2004; Trabulsi and Alterthum, 2005; Kawalec et al., 2007; Sartori, 2007; Scarpace and Cossatis, 2009; Kline et al., 2010).

The low MIC values detected in antibacterial assay suggested that the inhibitor is a good antibacterial agent against all tested species. In addition, the MBC/MIC ratio detected for PgTI against *E. coli* (2.0) pointed the inhibitor as a good bactericide agent according to Levison (2004). This author considered that MBC/MIC ratios not higher than four characterize good bactericide drugs.

The antibacterial activity of trypsin inhibitors has been ascribed to the interaction with bacterial proteases or proteins from cell wall and plasma membrane (Kim et al., 2005; Paiva et al., 2014), which can be possible mechanisms of PgTI activity. A protease inhibitor from *Coccinia grandis* leaves showed antibacterial activity against *S. aureus* (MIC of 1 mg/mL), *B. subtilis* (MIC of 1 mg/mL) and *K. pneumoniae* (MIC of 0.01 mg/mL). This inhibitor also killed *E. coli* (MBC of 1 mg/mL; MIC of 0.63 mg/mL) and the authors suggested that it may have induced the formation of a channel on bacterial membrane resulting in the out flowing of cellular content (Satheesh and Murugan, 2011).

In conclusion, the stem of *P. gounellei* contains an anionic trypsin inhibitor stable to heating up to 50 °C and toxic to medically important bacterial species. The investigation of toxicity of PgTI to mammalian cells is in course. The outcomes reported here contribute for increasing the knowledge about Caatinga biodiversity by revealing new insights on the biochemistry of *P. gounellei*, increasing the biotechnological value of this plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 472546/2012-0), the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) and the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI; 01200.003711/2011-11) for financial support. C.A.A. Rocha-Filho and M.C. Moura would like to thank CNPq and FACEPE for graduate scholarships. E.V. Pontual would like to thank FACEPE and CAPES for post-doctoral scholarship (APQ-0137-2.08/12; BCT-0421-2.08/12). P.M.G. Paiva and L.C.B.B. Coelho would like to thank CNPq for research grants and fellowship.

REFERENCES

- Agra, M. F.; Silva, K. N.; Basílio, I. J. L. D.; França, P. F.; Barbosa-filho, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 472-508, 2008.
- Albuquerque, U. P., de Sousa Araújo, T. A., Ramos, M. A., do Nascimento, V. T., de Lucena, R. F. P., Monteiro, J. M., Alencar, N.L., Lima Araújo, E. (2009). How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 18 (1), 127-150.
- Arcoverde, J. H. V.; Carvalho, A. S.; Neves, F. P. A.; Diozínio, B. P.; Pontual, E. V.; Paiva, P. M. G.; Napoleão, T. H.; Correia, M. T. S.; Silva, M. V.; Carneiro-da-Cunha, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Natural Product Research*, v. 28, p. 1297-1301, 2014.
- Carvalho, A. S.; Silva, M. V.; Gomes, F. S.; Paiva, P. M. G.; Malafaia, C. B.; Silva, T. D.; Vaz, A. F. M.; Silva, A. G.; Arruda, I. R. S.; Napoleão, T. H.; Carneiro-da-Cunha, M. G.;

- Correia, M. T. S. (2015) *Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from Apuleia leiocarpa seeds*. International Journal of Biological Macromolecules 75, 402-408.
- Cavalcanti, N. B.; Resende, G. M. (2007). Consumo de xiquexique [*Pilosocereus gounellei*] (A. Weber ex K. Schum.) Byl. ex Rowl.] por caprinos no semiárido da Bahia. Revista Caatinga, 20, 22-27.
- Chen, Y.; Xu, Z.; Zhang, C.; Kong, X.; Hua, Y. (2014). Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. Food Chemistry, 154 (1), 108–116.
- Gomes, R.P. Forragens fartas na seca. 4.ed. São Paulo: Nobel, 1977. 233p.
- Guimarães, L.C.; Oliveira, C.F.R.; Marangoni, S.; Oliveira, D.G.L.; Macedo, M.L.R. (2014). Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. Pesticide Biochemistry and Physiology, doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.001.
- Huang, W.; Wu, Q.; Zhang, M.; Kong, Y.; Cao, P.; Zheng, W.; Xu, J. (2015). Novel Hsp90 inhibitor FW-04-806 displays potent antitumor effects in HER2-positive breast cancer cells as a single agent or in combination with lapatinib. Cancer Letters, 356 (2) Part B, 862–871.
- Kawalec, M.; Pietras, Z.; Daniłowicz, E.; Jakubczak, A.; Gniadkowski, M.; Hryniewicz, W.; Willems, R.J.L. (2007). Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish Hospitals: Characterization of Epidemic Clones. Journal of Clinical Microbiology, 45, 147–153.
- Kim, J.Y.; Park, S.C.; Kim, M.H.; Lim, H.T.; Park, Y.; Hahm, K.S. (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. Biochemical and Biophysical Research Communications, 330, 921-927.

- Kline, K.A.; Ingersoll, M.A.; Nielsen, H.V.; Sakinc, T.; Henriques-Normark, B.; Gatermann, S.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. (2010), Characterization of a Novel Murine Model of *Staphylococcus saprophyticus*. Urinary Tract Infection Reveals Roles for Ssp and SdrI in Virulence. *Infection and immunity*, 78, 1943-1951.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lai, J.Y.; Borson, N.D.; Strausbauch, M.A.; Pittelkow, M.R. (2004). Mitosis increases levels of secretory leukocyte protease inhibitor in keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316 (2), 407–410.
- Levison, M.E. (2004). Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18, 451–465.
- Li, J.; Zhang, C.; Xu, X.; Wang, J.; Yu, H.; Lai, R.; Gong, W. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. *The FASEB Journal*, v. 21, p. 2466-2473, 2007.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.
- McClements, D.V. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (5), 305–313.
- Menezes, E.A.; Cezafar, F.C.; Andrade, M.S.S.; Rocha, M.V.A. P.; Cunha, F.A. (2004). Frequency of *Serratia* sp in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37, 70-71.
- Nascimento V.T., Vasconcelos M.A.S., Maciel, M.I.S., Albuquerque U.P. (2012) Famine Foods of Brazil's Seasonal Dry Forests: Ethnobotanical and Nutritional Aspects. *Economic Botany*, 66(1), 22-34.

- Oliveira, C.F.R.; Vasconcelos, I.M.; Aparicio, R.; Freire, M.G.M.; Baldasso, P.A.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. (2012). Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochemistry*, 47 (6), 929–935.
- Paiva, P.M.G.; Pontual, E.V.; Coelho, L.C.B.B.; Napoleão, T.H. (2014) Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. In: Méndez-Vilas, A. Ed. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex, info, microbiology, 1, 641-649.
- Pontual E.V., Santos N.D.L., Moura M.C., Coelho L.C.B.B., Navarro D.M.A.F., Napoleão T.H., Paiva P.M.G. (2014) Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitology Research*, 113, 727-733.
- Pontual, E.V.; Napoleão, T.H.; Assis, C.R.D.; Bezerra, R.S.; Xavier, H.S.; Navarro, D.M.A.F.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. (2012) Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 79, 135-152.
- Ramos, D. B. M.; Gomes, F. S.; Napoleão, T. H.; Paiva, P. M. G.; Silva, M. D. C.; Coelho, L. C. B. B. (2014) Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. *Chinese Journal of Biology*, 2014, Article ID 219392.
- Roque, A. A.; Rocha, R. M.; Loiola, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, p. 31-42, 2010.

- Sartori, L.; Daniel, L.A. (2007). Microbiological quality adequation of effluents from secondary lagoons for the application of ozone in agriculture. *Información Tecnológica*, 18, 83-92.
- Satheesh, L.S.; Murugan K. (2011). Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(5), 366-374.
- Scarpate, E.C.B.; Cossatis, J.J. (2009) A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. *Saúde e Ambiente em Revista*, 4, 1-11.
- Segel IH (1975) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. Wiley-Interscience Publication, New York.
- Silva J. G. M.; Silva D. S.; Ferreira M. A.; Lima, G. F. C.; Melo A. A. S.; Diniz, M. C. N. M. (2005) Xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34 (4), 1408-1417
- Trabulsi, L.R.; Alterthum. F. *Microbiologia*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- Tripathi, V.R.; Sahasrabuddhe, A.A.; Kumar, S.; Garg, S.K. (2014). Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer. *Process Biochemistry*, 49(2), 347–355.
- Vermeire, J.J.; Lantz, L.D.; Caffrey, C.R. (2012). Cure of Hookworm Infection with a Cysteine Protease Inhibitor. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1680.

Figure captions

Figure 1. Purification of the trypsin inhibitor from stem of *P. gounellei* (PgTI). (A) Gel-filtration chromatography (Sephadex G-100) of the extract from *P.gounellei* stem (2 mL) in

0.15 M NaCl (flow rate of 6.0 mL/min). (B) Ion exchange chromatography of P1 (2.0 mL; 2.0 mg of protein) on DEAE FF 16/10 column equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (flow rate of 5.0 mL/min) and eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl. The arrow indicates the addition of eluent solution.

Figure 1

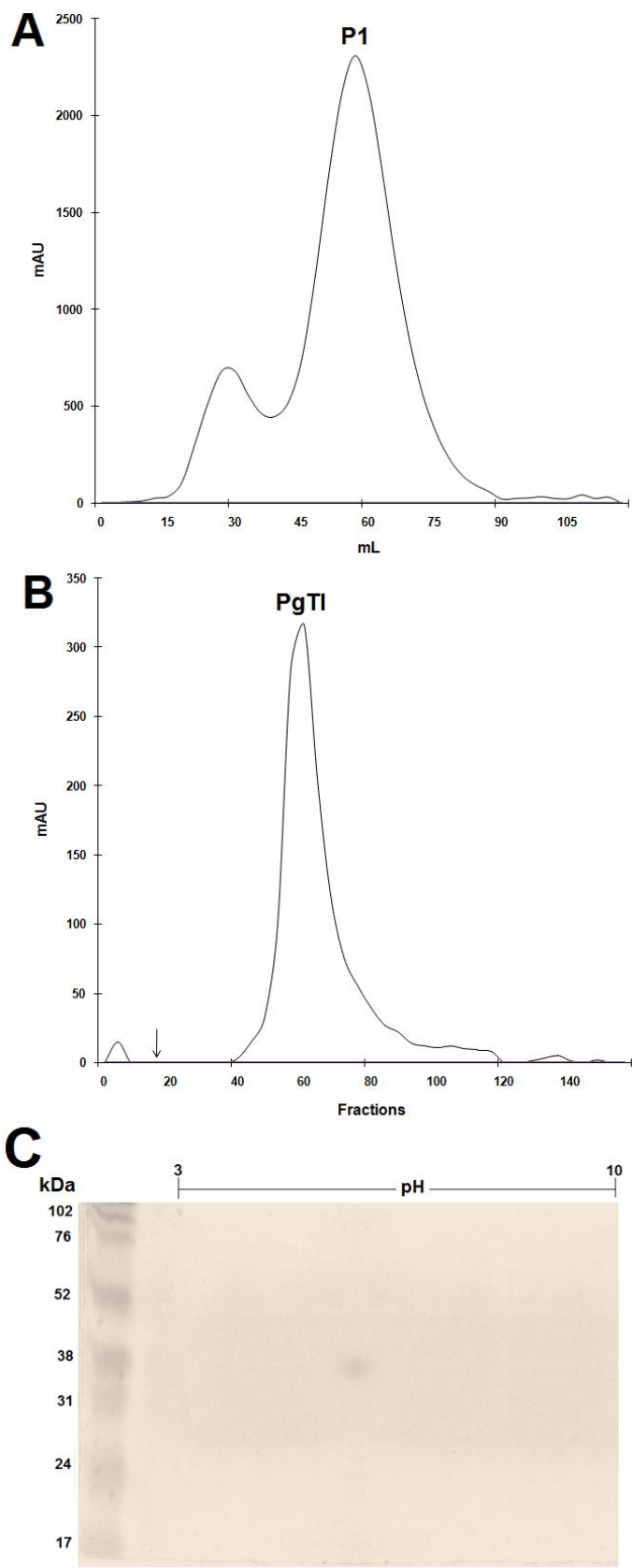


Table 1. Summary of the purification of trypsin inhibitor from stem of *P. gounellei* (PgTI).

Sample	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg) ^a	Yield (%) ^b	Purification (fold) ^c
P1	2.0	184	100	1
PgTI	1.96	373	98.0	2.02

P1 corresponds to protein peak recovered after chromatography of stem extract on Sephadex G-100, ^aSpecific activity was determined as the ratio between trypsin inhibitor activity (U) and protein content used in the inhibition assay (mg). ^bYield corresponded to the amount of protein from P1 recovered after the purification. ^cThe purification was measured as the ratio between the specific activity of PgTI and specific activity of P1.

Table 2. Antibacterial activity of the trypsin inhibitor from stem of *P. gounellei* (PgTI).

Bacteria	MIC (µg/ml) ^a	MBC (µg/ml) ^b
<i>Escherichia coli</i>	37.5	75.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	150.0	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	37.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18.7	ND
<i>Serratia</i> sp.	7.5	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5	ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	18.7	ND

^aMinimal inhibitory concentration (the lowest concentration of PgTI able to promote a reduction $\geq 50\%$ the growth of bacteria strains regarding to negative control). ^bMinimal bactericide concentration (the lowest concentration of PgTI able to reduce the number of CFU in 99.9% in comparison with the negative control). ND: not detected.

6. CONCLUSÕES

- O inibidor de tripsina de *P. gounellei* (PgTI) foi purificado com alto rendimento (98%) e fator de purificação de 2,0.
- PgTI mostrou-se uma proteína aniônica de PI 5.88 e massa molecular de 37,1 kDa.
- A constante de inibição (K_i) determinada (14 nM) revelou a alta afinidade de PgTI pela tripsina.
- PgTI foi estável ao aquecimento até 50 °C, mas sensível à temperatura de 60 °C na qual teve sua atividade abolida.
- PgTI foi tóxico sobre bactérias de importância médica e os resultados sugerem seu potencial para substituição ou uso combinado com antibióticos atualmente utilizados.
- Os resultados contribuem com a prospecção bioquímica de *P. gounellei*, acrescentando o valor biotecnológico desta espécie.