

*Isolamento de Inibidores de Proteases de *Crotalaria spectabilis*, uma leguminosa tropical*

Aluna: Julie Ribeiro Pinheiro

Orientadora: Raquel Elisa da Silva López

Co-orientadora: Patrícia Fernandes Ferreira

Departamento: Produtos naturais

Laboratório: Produtos Naturais em Saúde pública

Resumo



Os inibidores de proteases (IPs) de plantas são pequenas proteínas que fazem parte do sistema de defesa contra insetos e microorganismos. Eles são capazes de matar bactérias, vírus, fungos e parasitos causadores de doenças. A prospecção de proteínas em diferentes órgãos vegetais podem representar uma alternativa para produção de fitofármacos e fitoterápicos com elevado potencial biotecnológico e econômico. Estes IPs foram obtidos de extratos aquosos de folhas de *Crotalaria spectabilis*, um leguminosa tropical, através de cromatografia de afinidade, que consiste em isolar estes inibidores pela afinidade destes com a fase estacionária da coluna de cromatografia que tem a protease tripsina imobilizada. A quantificação dos IPs é feita pela dosagem do teor de proteínas.

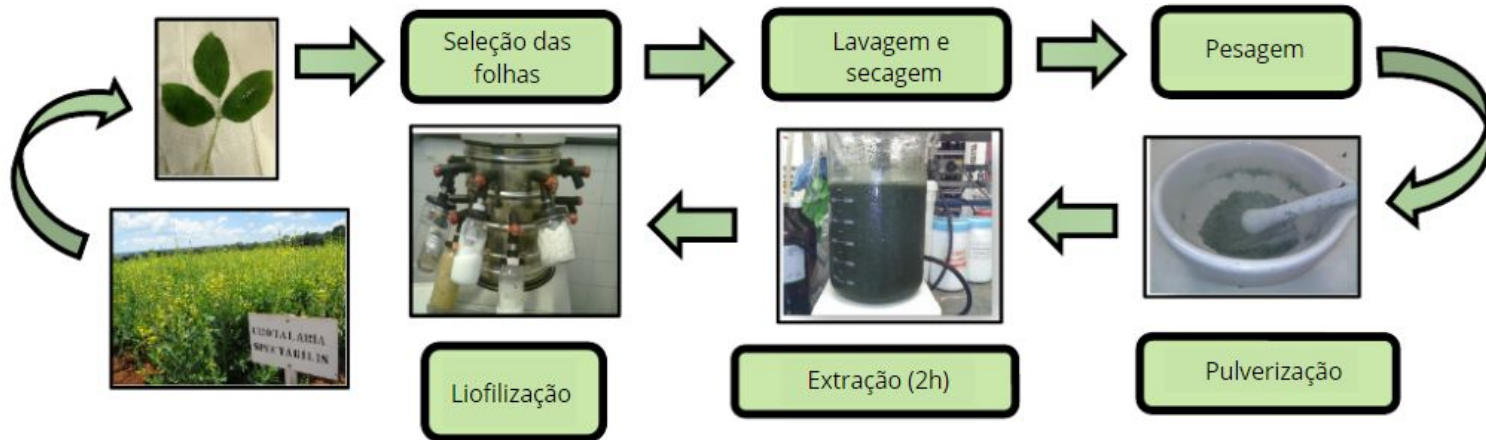
Objetivos

O objetivo do estudo é isolar IPs de extrato aquoso de folhas de *Crotalaria spectabilis*, uma leguminosa tropical e dosar seu teor de proteínas pelo método de Bradford.



Materiais e Métodos

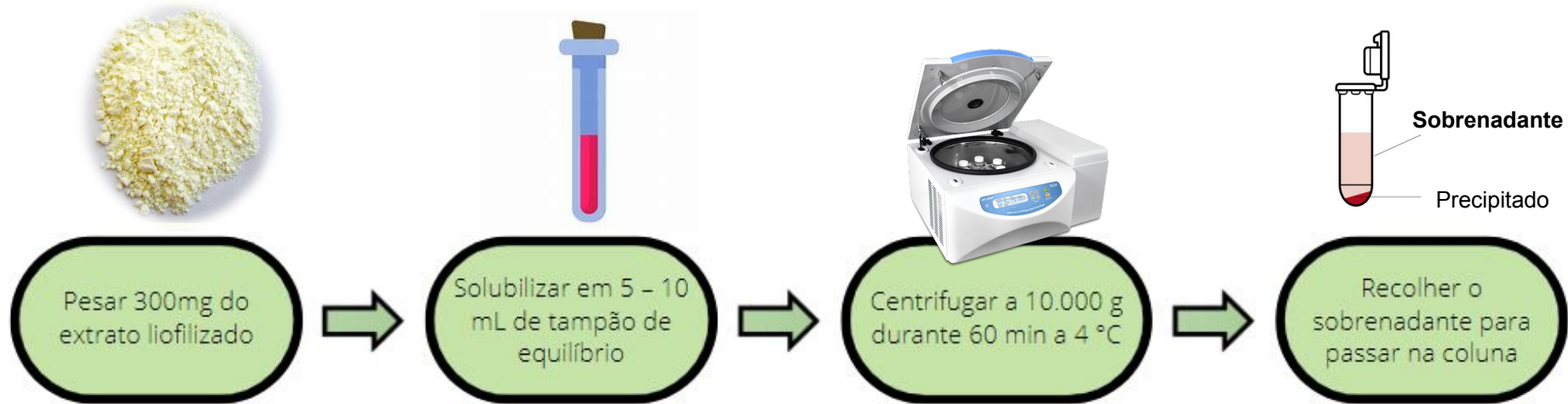
Preparo da extrato



Materiais e Métodos

Preparo da amostra para a cromatografia de afinidade

Tem como finalidade isolar as proteínas presentes (IPs) no extrato obtido após a liofilização

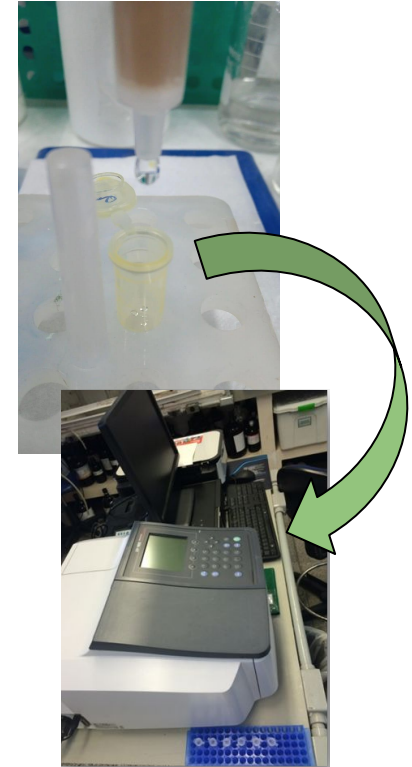
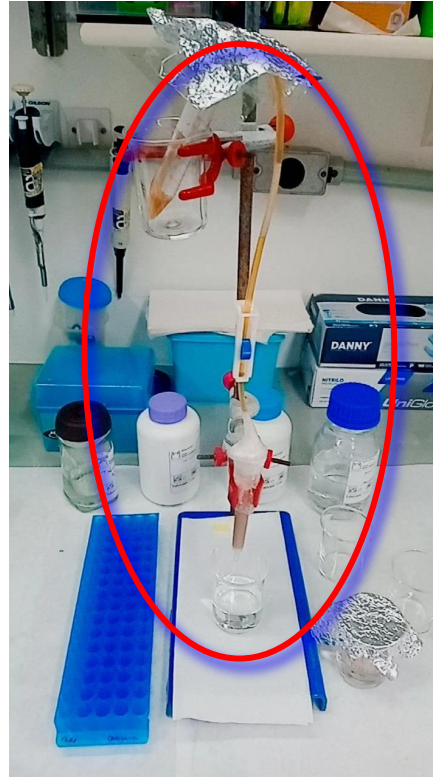


Materiais e Métodos

Coluna de Afinidade:

Isolamento e purificação dos IPs

- Equilibrar a coluna com tampão de equilíbrio
- Passar o extrato na coluna
- Limpar a coluna com tampão de equilíbrio
- Passar o tampão de eluição.
- Recolher 1 mL da eluição em tubo eppendorf
- Ler a absorbância dos tubos em espectrofotômetro a 280 nm.

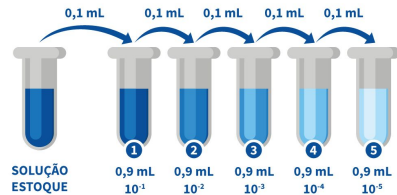


Materiais e Métodos

Dosagem de proteínas

Com o material obtido na coluna de afinidade, é realizada a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão:

- Diluição seriada



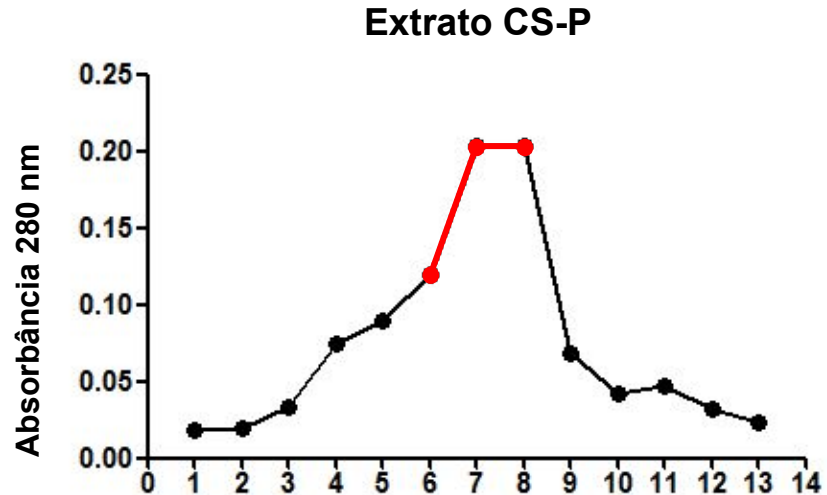
- Adicionar reagente de Bradford
- Esperar 15 min
- Realizar a leitura no espectrofotômetro a 595nm



Resultados e discussão

Isolamento do IPs (CSPI)

Amostra	Leitura		
		7	0,203
1	0,018	8	0,203
2	0,019	9	0,068
3	0,033	10	0,042
4	0,074	11	0,047
5	0,089	12	0,032
6	0,120	13	0,023

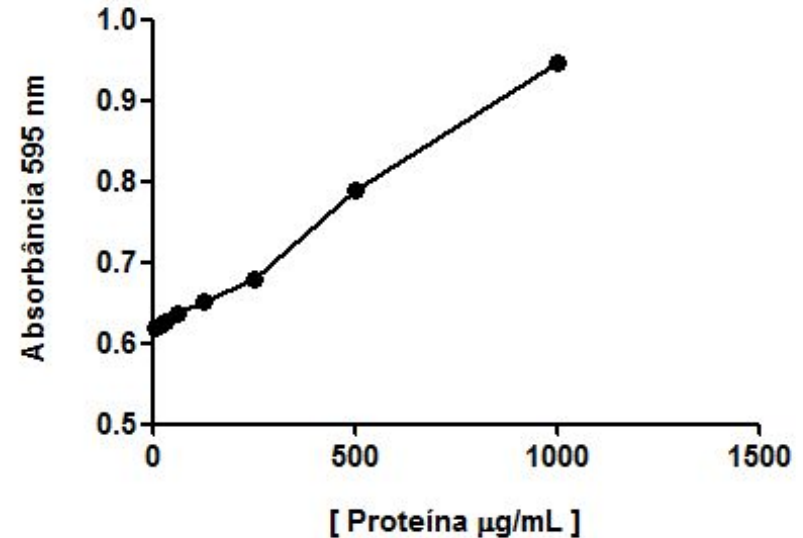


Resultados e discussão

Curva padrão de proteínas

- Equação da reta: $X = (a - 0,6139) \div 0,0003319$
- Coeficiente angular da reta: $r^2 = 0,9943$

Diluição	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
1000	0,937	0,953	0,948
500	0,786	0,788	0,790
250	0,677	0,675	0,686
125	0,650	0,653	0,655
62	0,635	0,638	0,640
31	0,625	0,624	0,632
15	0,619	0,622	0,626
7	0,620	0,614	0,621



Resultados e discussão

Determinação do teor de proteínas do isolado

Data do ensaio	Massa de Extrato aplicada (mg)	[Proteína] aplicada (μg) CSP	[Proteína] recuperada (μg) CSPI	Rendimento (%)
12.07.22	300	15.648	132	0,84
05.07.22	300	16.500	205	1,24
28.06.22	300	15.780	128	0,81

Conclusão

A cromatografia de afinidade é uma técnica de purificação de substâncias e foi empregada com sucesso no isolamento de IPs do tipo tripsina de *C. spectabilis*. Contudo, estudos adicionais de determinação da atividade inibidora de proteases e eletroforese são essenciais para a caracterização destes inibidores.

