

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

RENATO RODRIGUES ROMA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO INIBIDOR DE
TRIPSINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH. E SEU POTENCIAL
ANTICOAGULANTE**

Chapadinha - MA

2021

RENATO RODRIGUES ROMA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO INIBIDOR DE
TRIPSINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH. E SEU POTENCIAL
ANTICOAGULANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Pinheiro
Dias

Chapadinha - MA
2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Roma, Renato.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO INIBIDOR DE TRIPSINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH. E SEU POTENCIAL ANTICOAGULANTE / Renato Roma. - 2021.

56 p.

Coorientador(a): Lucas Pinheiro Dias.

Orientador(a): Claudener Souza Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2021.

1. Coagulação sanguínea. 2. Fabaceae. 3. Inibidor.
I. Pinheiro Dias, Lucas. II. Souza Teixeira, Claudener.
III. Título.

RENATO RODRIGUES ROMA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO INIBIDOR DE
TRIPSINA DAS SEMENTES DE *Bauhinia pulchella* BENTH. E SEU POTENCIAL
ANTICOAGULANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Aprovado em: 16 de março de 2021

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

Orientador - UFCA

Prof.^a Dr.^a Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa

Examinador externo ao programa - UFC

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza

Examinador externo ao programa - UFC

À Olga de Abreu Viana Roma (*In memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela concessão do dom da vida, e pela sua infinita benevolência e compaixão.

À minha família, meu avó José de Ribamar por sempre me ajudar, as minhas tias Orlanilde e Orlandina pelo carinho e afeto de mães durante todos esses anos, e a todos meus familiares que de forma direta ou indireta contribuíram para essa conquista.

Ao meu orientador, prof. Dr. Claudener Souza Teixeira por todos os ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelas oportunidades que me apresentou, por sua amizade e por sempre acreditar no meu potencial durante todos esses anos. O profissional que sou hoje é graças a você.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Lucas Pinheiro Dias, por todos os ensinamentos, paciência, e confiança que depositou em mim durante minha estadia em Fortaleza, sem esquecer de mencionar minha gratidão por sua amizade. Deixo aqui minhas palavras de admiração profissional e pessoal.

Ao laboratório de Biologia Estrutural e Molecular (LaBEM) e a todos meus companheiros de laboratório Ana Lúcia, Romério, Maria Helena, Valdenice, Karla, Evelyn que me ajudaram durante essa caminhada.

Ao Laboratório de Proteínas de Defesa Vegetal (UFC), Laboratório de Toxinas Vegetais (UFC), e ao Laboratório de Patologia Experimental LaPEX (UFCA), por cederem o espaço, equipamentos, reagentes e insumos para a realização deste trabalho. E a todos que os compõem pela ajuda e colaboração científica.

À minha turma do PPGCAM, Ana Lúcia, Rakel, Geolane, Wanderson, Augusto, Juliana e Rosalina pelo companheirismo durante esses dois anos de muita luta e dedicação.

A todos os professores do PPGCAM pelos ensinamentos e a todos os funcionários por tornarem esse sonho realidade.

A todos os funcionários do FINEP, que ajudaram imensamente na concretização deste trabalho.

A todos os amigos que conheci na graduação e pós-graduação, que ajudaram de forma direta ou indireta.

Aos integrantes da banca por dedicarem seu tempo a melhoria deste trabalho.

A todos os meus professores do ensino básico até o mestrado por ajudarem na minha formação profissional e pessoal.

A FAPEMA pela concessão da bolsa de mestrado, e ao CNPq por acreditar nas nossas pesquisas e pelo apoio financeiro.

A UFMA em especial ao PPGCAM por poder participar da turma pioneira do programa.

A todos que de forma direta ou indiretamente ajudaram a realização desse trabalho.

E por fim...

A Beatriz da Silva Costa...

Quem eu dedico uma página dos meus agradecimentos,
porém já se tornou vários capítulos em minha vida...

Obrigado por ser essa pessoa...
Que sempre está comigo
independente das dificuldades ou
circunstância...

Que sempre esteve me ajudando
durante todos esses anos,
enfrentando distância e todos os
percalços dos caminhos...

E que sempre segurou minha mão em cada conquista...

E lá se vão duas páginas de agradecimento kkkkk.

Meu muito
obrigado!

Pensar é o trabalho mais difícil que existe.
Talvez por isso tão poucos se dediquem a
ele.

Henry Ford

RESUMO

Os inibidores de proteases (IPs) são moléculas que regulam a atividade das proteases. Esses inibidores são classificados de acordo com suas proteases alvos. Os inibidores de tripsina pertencem à classe de inibidores de serino protease, e têm a capacidade de regular a ação da tripsina e demais enzimas serínicas. Logo podem atuar em diversos processos fisiológicos como, por exemplo, inflamação, metástase e coagulação sanguínea. Esses inibidores são comumente descritos em plantas da família Fabaceae, podendo constituir até 10% do total de proteínas solúveis em órgãos de reserva. Espécies do gênero *Bauhinia* são fontes de compostos biologicamente ativos e contêm altas concentrações de inibidores de proteases. Portanto o objetivo deste estudo foi purificar e caracterizar um novo inibidor de sementes de *Bauhinia pulchella* com atividade anticoagulante. O inibidor foi purificado por cromatografia de afinidade na coluna de tripsina-Sepharose 4B, com rendimento proteico de 43,1%, recebendo a denominação de *BpTI* (Inibidor de tripsina de *Bauhinia pulchella*), com massa molecular aparente de 20 kDa, especificidade à tripsina bovina e com glicosilações (1,15%) em sua estrutura. O *BpTI* é um inibidor não competitivo que possui IC_{50} (3×10^{-6} M) e K_i ($1,05 \times 10^{-6}$ M). E grande estabilidade a variações de temperatura e pH, pois manteve sua atividade inibitória por 30 minutos a 100 °C e em faixas de pH extremos. Entretanto o inibidor é suscetível a agentes redutor, como o DTT, que foi capaz de inibir por completo sua atividade inibitória. Toda via o *BpTI* conseguiu induzir *in vitro*, efeito anticoagulante na concentração de 33 uM, prolongando o tempo de coagulação nas vias intrínseca e comum, resultados que encorajam novos estudos *in vivo*, prospectando-o como um agente antitrombótico natural.

Palavras chaves: Fabaceae; inibidor; coagulação sanguínea.

Abstract

Proteases inhibitors (IPs) are molecules that regulate and control the activity of proteases. These inhibitors are classified according to their target proteases. Trypsin inhibitors belong to the class of serine protease inhibitors, and have the ability to regulate the action of trypsin and other serine enzymes. They can act in many physiological processes such as inflammation, metastasis and blood clotting. These inhibitors are commonly described in plants of the Fabaceae family, and can constitute up to 10% of the total soluble proteins. Species of the genus *Bauhinia* are sources of biologically active compounds and contain high concentrations of protease inhibitors. Therefore, the aim of this study was to purify and characterize a new *Bauhinia pulchella* seed inhibitor with anticoagulant activity. The inhibitor was purified by affinity chromatography in the trypsin-Sepharose 4B column, with protein yield of 43.1%, receiving the name *BpTI* (*Bauhinia pulchella* trypsin inhibitor) with apparent molecular mass of 20 kDa, specificity to bovine trypsin and with glycosylation (1.15%) in its structure. *BpTI* is an uncompetitive inhibitor that has IC_{50} (3×10^{-6} M) and K_i (1.05×10^{-6} M). And great stability to temperature and pH variations, as it maintained its inhibiting activity for 30 minutes at 100 °C and in extreme pH ranges. However, the inhibitor is susceptible to reducing agents, such as DTT, which was able to completely inhibit its inhibitory activity. The entire *BpTI* was able to induce *in vitro* an anticoagulant effect at the concentration of 33 μ M, prolonging the coagulation time in the intrinsic and common pathways, results that encourage further *in vivo* studies, prospecting it as a natural antithrombotic agent.

Keywords: Fabaceae; Inhibitor; blood clotting.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Principais famílias de enzimas proteolíticas em plantas. | 18 |
| Tabela 2 – Principais famílias de inibidores de proteases de plantas-..... | 20 |
| Tabela 3 - Inibidores purificados do gênero <i>Bahuinia</i> | 24 |
| Tabela 4 – Fatores de coagulação..... | 25 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Mecanismos de interações dos inibidores de protease. | 20 |
| Figura 2 - <i>Bauhinia pulchella</i> , A = Folhas bifolioladas; B= Vagens verdes; C= Vagens maduras deiscentes. | 23 |
| Figura 3 – Modelo clássico da cascata de coagulação sanguínea. | 26 |
| Figura 4 – Modelo da coagulação sanguínea baseado nas superfícies celulares..... | 27 |
| Figura 5 – Cascata de coagulação com os locais de ação dos medicamentos anticoagulantes. | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| Asp = Aspartato; | mg/mL = Miligrama por mililitro; |
| Cys = Cisteína; | BAPNA = N- α -benzoil-L-arginina p-nitroanilida cloridrato; |
| His: Histidina; | μ L = Microlitro; |
| Ser = Serina; | v/v = Volume por volume; |
| Trp = Triptofano; | IU = Unidade de atividade inibidora de tripsina; |
| Zn = Zinco; | Tris = hidroximetil aminometano; |
| IPs = Inibidores de proteases; | HCl = Ácido clorídrico; |
| pH = Potencial hidrogeniônico; | CaCl ₂ = Cloreto de cálcio; |
| Ki = Constante de inibição; | MgCl ₂ = Cloreto de magnésio; |
| ES = Complexo enzima substrato; | NaOH = Hidróxido de sódio; |
| ESI = Complexo enzima-substrato-inibidor; | BANA = N α - Benzoil - DL - arginina β - naftilamida cloridrato; |
| kDa = Kilodalton; | EDTA = Ácido etilenodiamino tetraacético; |
| TF = Fator Tecidual; | DTT = Ditioneitol; |
| FBG = Fibrinogênio; | DMACA = p-dimetilaminocinamaldeído; |
| FB = fibrina; | PRP = Plasma rico em plaquetas; |
| w/v = Peso / volume; | PPP = Plasma pobre em plaquetas; |
| mM = Milimolar; | aPTT = Tempo de tromboplastina parcial ativada; |
| M = Molar; | TP = Tempo de protrombina; |
| g = Força Gravitacional; | TT = Tempo de trombina. |
| cm = Centímetro; | |
| nm = Nanômetro; | |
| BSA = Albumina de soro bovino; | |
| SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio; | |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 1.1 Proteases | 18 |
| 1.2 Inibidores proteicos de proteases | 19 |
| 1.3 Inibidores de serino proteases de plantas | 21 |
| 1.4 Gênero <i>Bauhinia</i> | 22 |
| 1.4.1 <i>Bauhinia pulchella</i> | 22 |
| 1.5 Inibidores Tipo-<i>Bauhinia</i> | 23 |
| 1.6 Hemostasia | 24 |
| 1.6.1 Coagulação sanguínea | 25 |
| 1.6.2 O modelo da coagulação baseado nas superfícies celulares | 27 |
| 1.6.3 Fibrinólise e inibidores da coagulação | 28 |
| 1.7 Prospecção de moléculas anticoagulantes | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 30 |
| 2.1 Geral | 30 |
| 2.2 Objetivos específicos | 30 |
| REFERÊNCIAS | 31 |
| MANUSCRITO | 31 |

Todas as normas a seguir estão de acordo com o periódico *International Journal of Biological Macromolecules*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Proteases

As proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, formam um grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas nas proteínas, convertendo-as em suas unidades menores, os peptídeos e aminoácidos, ou podem ser específicas, levando a clivagem seletiva de proteínas para modificações pós-traducionais [1,2].

As proteases podem ser classificadas de acordo com a reação em que atuam: em exopeptidases que atuam na extremidade da cadeia de polipeptídios e as endopeptidases que clivam ligações no interior da cadeia. Nas plantas são encontradas cinco classes de peptidases que são classificadas de acordo com o principal resíduo de aminoácido funcional no sítio ativo (Tabela 1), em peptidases que possuem ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína, serina e treonina. Porém, ainda há as metalopeptidases, que possuem íons metálicos em seu sítio ativo [3]. Por outro lado, no banco de dados MEROPS, as proteases são classificadas em famílias, de acordo com suas similaridades de sequências, e em clãs, de acordo com sua similaridade estrutural [4].

Tabela 1- Principais famílias de enzimas proteolíticas em plantas.

| Família de proteases | Representantes | Sítios ativos |
|-----------------------------|--|------------------------------|
| Serino proteases | Quimotripsina Tripsina Elastase Calicreína pancreática Subtilisína | Asp, Ser, His |
| Cisteíno proteases | Papaina Actinidina Catepsina | Cys, His, Asp |
| Aspárticos proteases | Penicilopepsina Renina | Asp |
| Metaloprotease | Termolisina Carboxipeptidase A | Zn, Glu, His Zn, Glu, Trp |
| Treonina proteases | Treonina peptidase autoclivável | Thr |

Fonte: Adaptado de North [5]. Aminoácidos dos sítios catalíticos: Asp = aspartato, Cys = cisteína, His: histidina, Ser = serina, Trp = triptofano, Thr = Treonina. Nas metaloproteases há a ocorrência de íons como Zn = zinco.

Essas enzimas estão presentes em todas as formas de vida, ou seja, sua ocorrência é ubíqua indicando seu papel crítico nas funções metabólicas e regulatórias em muitos processos biológicos, como por exemplo, nos animais elas desempenham funções como, coagulação, ciclo

celular e funções nutricionais. Nas plantas, elas atuam desde a germinação da semente até a senescência [6].

Além de sua importância fisiológica, as proteases podem ser potencialmente nocivas para os organismos, uma vez que a hidrólise de uma ligação peptídica é um evento irreversível. Por sua vez quando há erros e anomalias na atividade das proteases várias condições patológicas, incluindo câncer e doenças autoimunes podem ocorrer [7,8]. Portanto, o controle da atividade proteolítica é regulado com precisão através de sua expressão genética na forma de zimogênio e inibição de sua atividade através de inibidores específicos [9].

1.2 Inibidores proteicos de proteases

Os inibidores de protease (IPs) são moléculas que regulam a atividade de suas proteases alvo. Os inibidores de natureza proteica são moléculas diversas, com baixo peso molecular, alguns com alto teor de resíduos de cisteína (Cys), que formam pontes dissulfetos, que os conferem resistências a temperatura, pH e forças iônicas [10,11,12].

Além de sua grande estabilidade os inibidores de proteases nos seres vivos desempenham papéis regulatórios significativos em processos como, lise celular, coagulação sanguínea e vias hormonais. Por isso essas moléculas vêm sendo alvos de diversos estudos biotecnológicos, principalmente de estudos farmacológicos, visto que sua atividade inibitória atua seletivamente sobre o sítio ativo de sua protease alvo, assim minimizando efeitos colaterais [13].

Os inibidores de origem proteica, podem ser classificados de acordo com suas proteases alvos, ou seja, foram relatados para quatro, das cinco classes de proteases encontradas nas plantas, incluindo serina, cisteína, aspartato e metaloproteases (Tabela 2). Os inibidores de proteases podem ser específicos inibindo apenas uma classe de proteases com altíssima afinidade, ou podem inibir proteases de diferentes classes, isto significa, que possuem valores distintos de constante de inibição (K_i) para os diferentes tipos de proteases [14].

Os inibidores podem interagir com proteases de maneiras diferentes, porém há somente dois mecanismos de interação amplamente distribuídos na natureza, reações de "captura" (irreversíveis) e reações de ligação forte (reversíveis) (Figura 1). As reações de captura ocorrem quando a interação inibidor e protease induz a clivagem de uma ligação peptídica interna na estrutura do inibidor, desencadeando uma mudança conformacional. Por outro lado, as reações de ligação forte ou também chamada de mecanismo padrão, ou canônico, são mais comuns

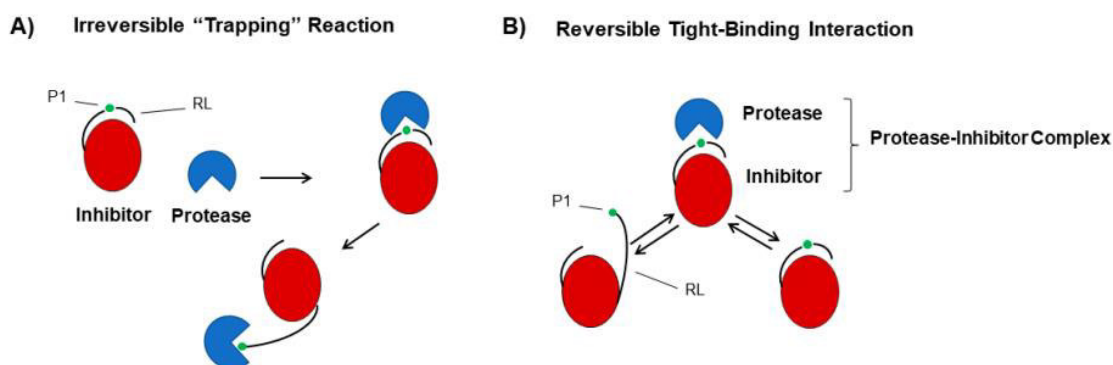
entre os inibidores de origem proteicos e a inibição ocorre de maneira semelhante à interação do complexo enzima substrato (ES) [15,16,17].

Tabela 2 – Principais famílias de inibidores de proteases de plantas:

| Proteases | Classe | Famílias de inibidores |
|------------------|-------------------------------------|--|
| Serínicas | Inibidores de proteases serínicas | Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de cereais taumatina Ragi I-2/milho |
| Cisteínicas | Inibidores de proteases cisteínicas | Cistatinas (Fitocistatinas em plantas) |
| Aspárticas | Inibidores de proteases aspárticas | Inibidores de proteases aspárticas |
| Metaloproteases | Inibidores de metaloproteases | Inibidores de carboxipeptidases A e B |

Fonte: Adaptado de Migliolo [18].

Figura 1 - Mecanismos de interações dos inibidores de protease.



Fonte: Clemente [19]. (A) Interação irreversível, (B) Interação reversível. P1: sítio ativo; RL: loop reativo.

Os inibidores que são classificados como canônicos, ainda apresentam distinções no processo de inibição, podendo ser competitiva, quando o inibidor compete pelo sítio ativo da enzima bloqueando-o. Esse tipo de inibição pode ser revertido aumentando a concentração de substrato [20]. Há também o processo de inibição não competitiva, sendo mais raro entre os inibidores, uma vez que o inibidor pode não competir pelo sítio ativo da enzima, e se ligar a um domínio distinto, mudando a conformidade do sítio catalítico, esse tipo de inibição somente ocorre quando a protease esta complexada com o substrato (ES), transformando-o assim em um complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) [21].

Assim como as proteases, os inibidores também são classificados em famílias e clãs, através de suas homologias, similaridades sequenciais e estrutura [4]. Tradicionalmente as famílias mais conhecidas são Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, Abóbora, Cevada, Cistatinas, Thaumatin-like e Ragi A1. Dentre estas, as famílias Kunitz e Bowman-Birk são as mais estudadas e melhor caracterizadas [20].

1.3 Inibidores de serino proteases de plantas

A história dos inibidores de serino proteases tem início quando Kunitz [22] isola e purifica uma proteína das sementes de soja (*Glycine max*), que tinha a capacidade de inibir a ação catalítica da tripsina. Um pouco mais tarde Bowman [23] e Birk [24], conseguem purificar outra proteína das sementes de soja, porém esse inibidor de protease tinha característica de inibir além da tripsina, a quimotripsina [25]. Estes estudos preliminares serviram como os primeiros modelos clássicos metodológicos para a bioquímica de inibidores de proteases. Atualmente, é conhecida a sequência completa de aminoácidos da maioria dos inibidores já identificados [4,26].

Nas plantas os inibidores de serino proteases são descritos com maior frequência em espécies das famílias, Solanaceae, Fabaceae e Poaceae, podendo constituir até 10% do total de proteínas solúveis, principalmente em órgãos de armazenamento como, sementes e tubérculos [12]. Essas proteínas atuam na regulação de diversos mecanismos, porém principalmente, na defesa contra patógenos e herbívoros [27]. Os inibidores de tripsina, pertencem à classe de inibidores de serino protease, e têm a capacidade de regular a ação da tripsina, esses inibidores podem ser classificados em duas famílias principais (Kunitz e Bowman-Birk) através de suas características estruturais [28].

Os inibidores pertencentes ao tipo Kunitz são proteínas que possuem em torno de 180 resíduos de aminoácidos e peso molecular aproximado de 20 kDa, em geral apresentam quatro resíduos de cisteína, formando duas pontes dissulfeto [28]. Por outro lado, os inibidores do tipo Bowman-Birk são moléculas menores com peso molecular em torno de 8 a 10 kDa, e com alto teor de cisteína, formando uma estrutura assimétrica com dois domínios inibitórios distintos [29].

A função mais conhecida e estudada dos inibidores de tripsina é o seu efeito na defesa da planta [30,31]. Porém estudos com inibidores de tripsina de planta relatam aplicabilidades terapêuticas, no tratamento de câncer e doenças neurológicas, essa característica evidencia diferentes ações dessas proteínas fora do seu contexto biológico da planta. Atividades como

anticarcinogênica, inibição do crescimento e indução de apoptose em células leucêmicas, tratamento de inflamações pulmonares, e até na produção de kits para diagnóstico de doenças, relatam o potencial biológico, biotecnológico e econômico dos inibidores tripsina [32,33].

1.4 Gênero *Bauhinia*

Bauhinia é um gênero de plantas pertencente à família Fabaceae que compreende mais de 300 espécies, sendo que 64 destas podem ser encontradas no Brasil. Todas as espécies deste gênero são popularmente conhecidas como pata de vaca ou unha de vaca, devido a sua morfologia foliar se assemelhar a pata do animal, essas espécies são amplamente distribuídas em todas as zonas tropicais, principalmente na África, Ásia e América do Sul, e fazem parte da medicina popular nessas regiões [34].

As plantas desse gênero podem ser descritas como de porte arbóreo, arbustivo ou escandente (trepadeiras), folhas do tipo coriáceas (duras e rígidas), bifolioladas, isto é, apresentam dois folíolos, frequentemente unidos, portanto denominada de folha bifoliolada geminada e flores com um plano de simetria (zigomorfas) de coloração variada e fruto do tipo legume [35].

Folhas, cascas do caule e raízes de algumas espécies do gênero são utilizadas como medicamentos contra várias patologias e sintomas, como diabetes, inflamação, infecções e dores [36]. Diversos estudos relatam a presença de metabólitos primários (lectinas e inibidores de proteases) e secundários (alcaloides, quinonas, lactonas e terpenos), sendo responsáveis por suas propriedades medicinais [37]. Atividades como antitumoral e anticoagulantes já foram descritas para as moléculas bioativas desse gênero [38,39].

As espécies do gênero *Bauhinia* têm sido estudadas há muito tempo com a finalidade de determinar cientificamente suas possíveis propriedades farmacológicas, uma vez que o gênero *Bauhinia* faz parte das plantas medicinais indicadas pelo Sistema Único de Saúde no Brasil [40]. Toda via, apenas uma pequena parcela de moléculas foi descrita para este gênero. Assim torna-se primordial as prospecções de novas moléculas bioativas e suas aplicabilidades, principalmente o isolamento e purificação de proteínas de espécies pouco descritas na literatura como a espécie em estudo *B. pulchella*.

1.4.1 *Bauhinia pulchella*

É uma espécie de planta arbustiva, com folhas bifolioladas, sendo reduzidas entre as inflorescências (período de floração em julho), com pétalas lineares e vagens com os frutos

deiscentes. *B. pulchella* (Figura 2) é encontrada em toda a região do cerrado, abrangendo os estados do Maranhão, Bahia, Tocantins, Ceará, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Minas Gerais e Pará [41]. Porém na literatura não há nenhum trabalho que aborde a purificação de proteínas para esta espécie, sendo descrito apenas dois trabalhos que retratam a presença de flavonoides com efeito antioxidante [42] e taninos com atividade anti-helmíntica [43] para esta planta.

A classificação da espécie em estudo:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Subfamília: Caesalpinioideae

Tribo: Cercideae

Subtribo: Bauhininae

Gênero: *Bauhinia*

Espécie: *Bauhinia pulchella*



Figura 2 - *Bauhinia pulchella*, A = Folhas bifolioladas; B= Vagens verdes; C= Vagens maduras deiscentes. Fonte: Autor

1.5 Inibidores Tipo-*Bauhinia*

Sementes do gênero *Bauhinia* são fontes de compostos biologicamente ativos e contêm altas concentrações de inibidores de proteases, que podem ser extraídos e purificados por cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose. Uma vez que o rendimento global do processo de purificação é de 30% e os inibidores aparecem como uma única cadeia polipeptídica com massa molecular aproximada de 20 kDa [44].

Os inibidores do tipo Kunitz isolados de espécies do gênero *Bauhinia* (Caesalpinioideae) (Tabela 3), apresentam similaridade significativa na sequência de aminoácidos entre si e são

agrupados na Família I03, de acordo com o banco de dados MEROPS [4], que são divididos em diferentes "tipos" com base na homologia de seus membros. Um desses tipos é o "inibidor de tripsina do tipo-*Bauhinia*", que compreende inibidores isolados do gênero *Bauhinia* e inibidores isolados da subfamília botânica Caesalpinoideae, todos esses inibidores possuem quatro resíduos de cisteína [20].

Porém ainda ocorrem inibidores do tipo Kunitz, isolados do gênero *Bauhinia* que possuem somente dois resíduos de cisteína, estes indivíduos são agrupados em inibidores de *Bauhinia* do tipo II. Também há inibidores que possuem somente um resíduo de cisteína, que são agrupados na família de inibidores I03.12, e os inibidores que não possuem resíduos de cisteína, pertencentes a família I03.16 [4,20].

Os inibidores isolados do gênero *Bauhinia*, ainda podem diferir em sua especificidade inibitória, podendo inibir serino ou cisteíno proteases (Tabela 3), possuindo valores distintos de K_i (constante de inibição), principalmente quando submetidos a inibir enzimas relacionadas a cascata de coagulação sanguínea [29].

Tabela 3 - Inibidores purificados do gênero *Bauhinia*.

| Nome do inibidor | Proteases que inibem |
|--|-----------------------------|
| <i>BvTI</i> , inibidor de tripsina <i>B. variegata</i> | |
| <i>BuXI</i> , inibidor do fator Xa de <i>B. unguolata</i> | |
| <i>BvcTI</i> , inibidor de tripsina <i>B. variegata candida</i> | |
| <i>BbKI</i> , inibidor da calicreína <i>B. bauhinioides</i> | Serino proteases |
| <i>BrTI</i> , inibidor de tripsina <i>B. rufa</i> | |
| <i>gBrEI</i> , inibidor da elastase <i>B. rufa</i> , forma glicosilada | |
| <i>BmTI</i> , inibidor de tripsina de <i>B. mollis</i> | |
| <i>BmEI</i> , Inibidor de elastase de <i>B. mollis</i> | |
| <i>BbCI</i> , inibidor da cruzipaina de <i>B. bauhinioides</i> | Cisteíno proteases |

Fonte: Adaptado de Oliva e colaboradores [20] e Valois e colaboradores [45].

1.6 Hemostasia

A hemostasia é um mecanismo fisiológico essencial para a vida que envolve o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Esse processo tem como função manter o sangue em um estado fluido na corrente sanguínea e cessar sangramentos após lesões vasculares, limitar a perda de sangue para regiões externas, e posteriormente a restauração da integridade vascular. [46,47].

Quando ocorre um dano vascular, a superfície subendotelial desencadeia uma variedade de fatores (Tabela 4) e reações induzindo à vasoconstrição, adesão e ativação de plaquetas, ativação da coagulação e deposição de fibrina na parede do vaso. Após a regeneração do tecido, o coágulo de fibrina é dissolvido e o fluxo sanguíneo é restaurado [46,48]. Uma perturbação

neste equilíbrio onde existe a interação de elementos pró-coagulantes e anticoagulantes pode levar à eventos trombóticos em excesso ou a hemorragias severas [49].

Tabela 4 – Fatores de coagulação.

| Número do fator | Nome descritivo | Forma ativa |
|------------------------|--|-----------------------|
| II | Protrombina | |
| VII | Proconvertina | |
| IX | Fator Christmas | Serino protease |
| X | Fator Stuart-Prower | |
| XI | Antecedente de tromboplastina plasmática | |
| XII | Fator Hageman (Pré-caliceína) | |
| III | Fator tecidual | |
| V | Fator lábil | Cofator |
| VIII | Fator anti-hemofílico (Fitzgerald)* | |
| I | Fibrinogênio | Subunidade de fibrina |
| XIII | Fator estabilizador da fibrina | Transglutaminase |

Fonte: Hoffbrand e Moss [50]. *Ativado sem clivagem proteolítica.

A hemóstase pode, então, ser dividida em primária, secundária e fibrinólise, sendo que a hemóstase primária corresponde à resposta rápida. Nesta fase, ocorre a contração do vaso sanguíneo (vasoconstrição) de forma a parar a hemorragia e em seguida o endotélio lesado libera substâncias pró-coagulantes que ativam as plaquetas, promovendo sua aderência entre si e ao endotélio (ativação e agregação plaquetária) [51].

Por sua vez, a hemóstase secundária tem início quando há uma maior lesão nos vasos e tecidos circundantes. Ocorrendo a ativação de proteínas plasmáticas e fatores de coagulação que no final irão levar à síntese de trombina que promove a conversão de fibrinogênio em fibrina que irá intensificar o coágulo tornando-o mais estável [51].

O evento final da hemóstase, a fibrinólise (lise da fibrina), promove a dissolução do coágulo de fibrina enquanto ocorre o processo de cicatrização e as vias de regulação da coagulação atuam como mecanismos anticoagulantes naturais, através da inibição enzimática ou modulando a atividade dos cofatores [49,51].

1.6.1 Coagulação sanguínea

O conceito mais aceito de coagulação surge em 1964, quando Macfarlane propôs um modelo de separação de duas vias de iniciação da coagulação que resultavam em uma “via comum” (Figura 3), que por fim levava à ativação da trombina, também denominada fator II (FII). A fase inicial da coagulação pode se dar por duas vias distintas: uma envolvendo o fator

tecidual (TF), ou também chamada de via extrínseca; e outra envolvendo a ativação por contato, denominada de via intrínseca [52].

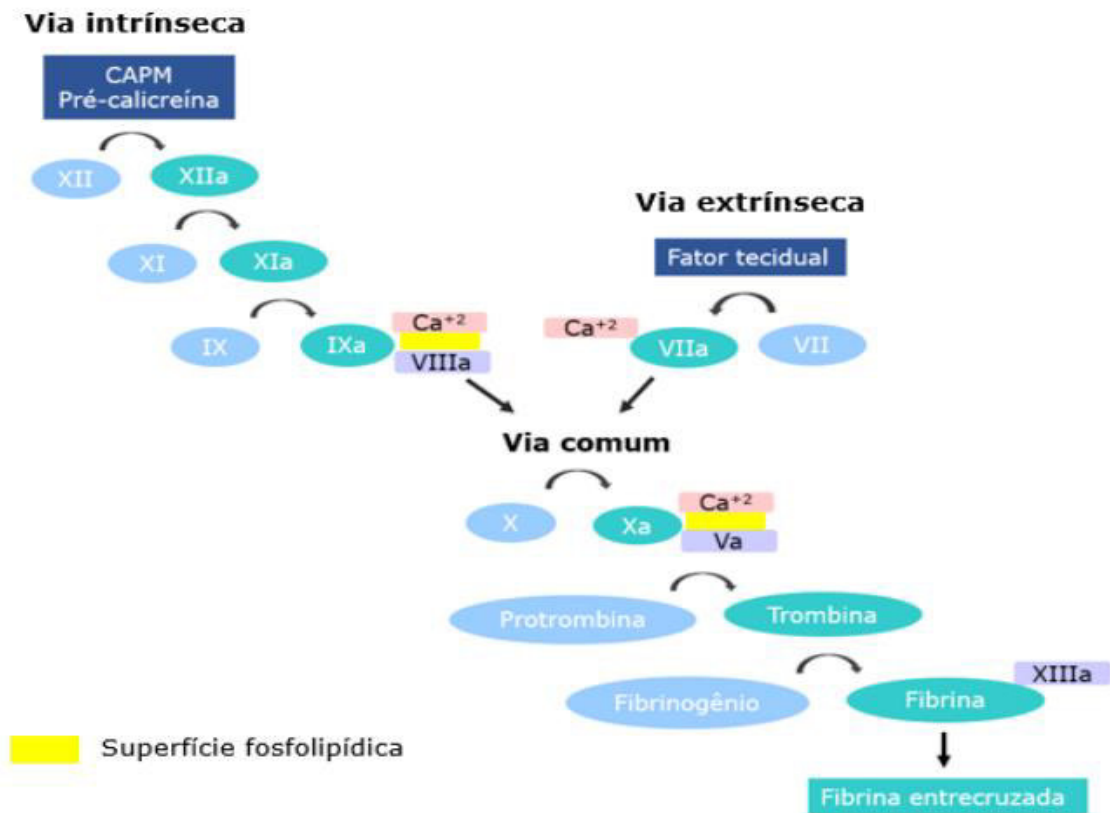


Figura 3 – Modelo clássico da cascata de coagulação sanguínea. Fonte: Palta e colaboradores [53].

A via intrínseca começa pela auto-clivagem do fator XII quando em contato com superfícies hidrofílicas, ocorre a conversão da pré-caliceína em caliceína e finalmente a ativação do fator XI. O fator XIa aciona o fator IX, que se complexa com o fator VIIIa. A presença do fator VIIIa junto ao IXa amplia seu poder catalítico levando a conversão de X em Xa. Já a via extrínseca é desencadeada pela formação do complexo TF:VIIa que juntos ativam o fator X. Agora na “via comum”, em que via intrínseca e extrínseca se convergem para ativação do fator X, o fator Va funciona como cofator do fator Xa, levando-o a ativar o FII (protrombina) gerando trombina (FIIa). A trombina transforma então o fibrinogênio (FBG) e posteriormente em fibrina (FB) [54].

Estudos atuais relatam que o modelo da cascata de coagulação que melhor explica os eventos hemostáticos *in vivo* é o modelo baseado em superfícies celulares (inter-relação entre as vias de coagulação) [55]. Entretanto, o modelo clássico de coagulação que divide as vias intrínseca e extrínseca, que convergem em uma via comum, apesar de suas limitações, é

particularmente útil para a compreensão dos testes de coagulação *in vitro*, principalmente sobre o mecanismo de ação de medicamentos anticoagulantes [56].

1.6.2 O modelo da coagulação baseado nas superfícies celulares

Este modelo relaciona as vias de coagulação anteriormente descritas com o importante papel das plaquetas, mostrando que essas vias não funcionam de forma independente (Figura 4) [51]. De acordo com este modelo, a coagulação pode ser dividida em três fases: iniciação, amplificação e propagação [55].

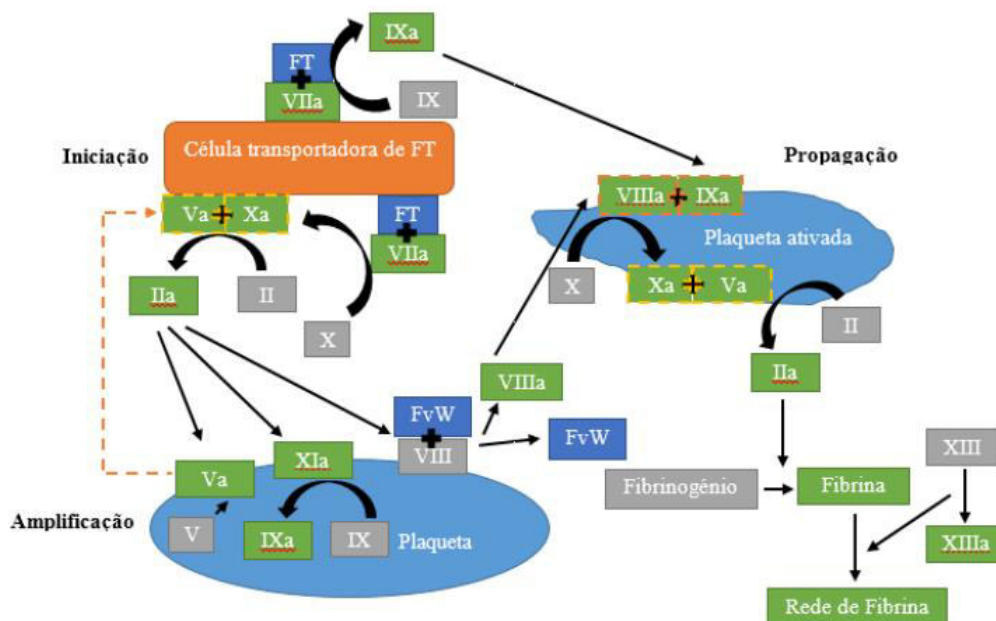


Figura 4 – Modelo da coagulação sanguínea baseado nas superfícies celulares. Fonte: Adaptado de Ferreira e colaboradores [55].

Na fase de iniciação, o FT expresso após a lesão dos vasos se liga ao fator VII, promovendo assim a ativação do fator VIIa. Em seguida, o complexo fator VIIa-FT inicia uma clivagem gradual de pequenas quantidades de fator X e IX. O fator Xa em conjunto com o fator Va formam o complexo protrombinase que convertem pequenas quantidades de protrombina em trombina [49,55].

A fase de amplificação começa com a acumulação de pequenas quantidades de trombina, que ativam as plaquetas a se deslocarem ao local da lesão. Estas plaquetas ativadas vão produzir substâncias quimiotáticas que atraem os fatores de coagulação e ao mesmo tempo liberam pequenas quantidades de fator V parcialmente ativado. Outro papel da trombina é a de converter o fator V em Va, aumentando a atividade do complexo protrombinase e converter o fator VIII a FVIIIa nas plaquetas [54].

Na fase de propagação, quantidade maior de plaquetas dirigem-se ao local lesado. O fator IXa, se ligar ao fator VIIIa formando o complexo tenase. Este complexo catalisa a conversão do fator X em Xa. O fator Xa se liga então ao fator Va formando o complexo protrombinase que catalisa a formação de protrombina em trombina. E por fim a trombina converte o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo estável [54,55].

1.6.3 Fibrinólise e inibidores da coagulação

A função do sistema fibrinolítico é dissolver o coágulo formado e limitar sua extensão através de diversas enzimas proteolíticas, por exemplo, a plasmina, uma serina-protease semelhante à tripsina que possui uma grande afinidade para a fibrina e por consequência, ao coágulo [57].

Além do sistema fibrinolítico que regula as reações bioquímicas do processo de coagulação, os inibidores naturais da coagulação também estão envolvidos. Esses inibidores regulam estritamente as proteases envolvidas na coagulação que em sua maioria são serino proteases, com o intuito de evitar a proteólise em excesso, a produção inadequada de fibrina e a oclusão vascular, como por exemplo o inibidor TFPI que inativa os fatores VIIa e Xa, causando a supressão rápida da coagulação, mecanismo esse utilizado por alguns medicamentos anticoagulantes (Figura 5) [53].

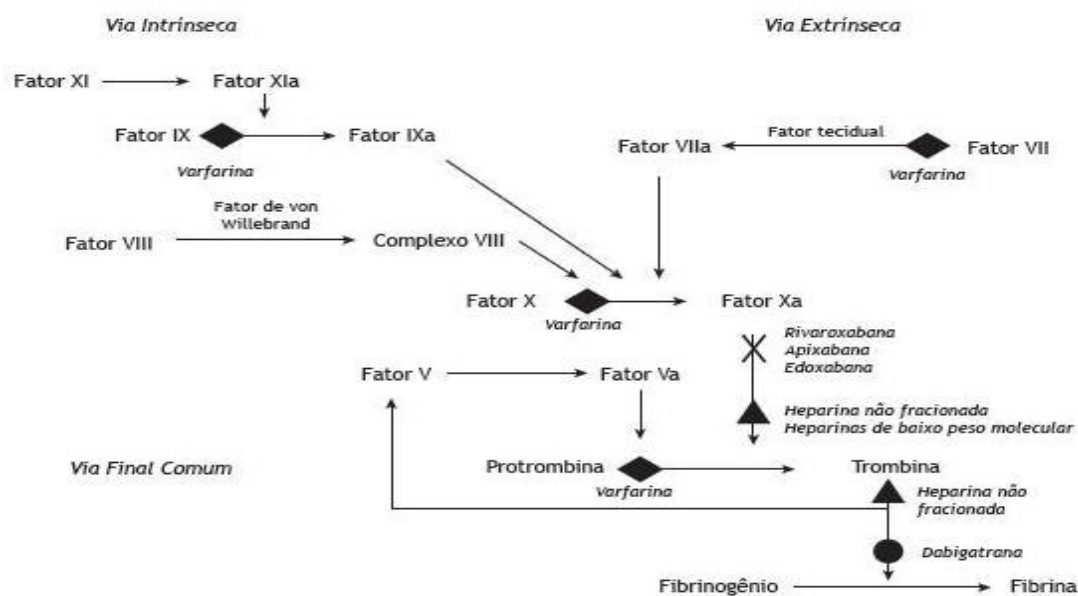


Figura 5 – Cascata de coagulação com os locais de ação dos medicamentos anticoagulantes. Fonte: Fernandes e colaboradores [56].

1.7 Prospecção de moléculas anticoagulantes

A utilização de plantas medicinais pelo homem para fins terapêuticos é tão antiga quanto a sua história [58]. Por isso, vários estudos vêm investigando a presença de compostos químicos com potencial biológico em extratos vegetais, principalmente em plantas utilizadas pelas comunidades locais, no tratamento das inúmeras enfermidades, inclusive no tratamento de hemorragias e infecções [59].

O cerrado apresenta uma rica biodiversidade, oferecendo os mais diversos recursos naturais como, raízes, cascas, resinas, óleos, folhas, argilas, água, que podem ser coletados em suas áreas nativas [59]. A utilização das plantas medicinais por meio da população nem sempre é feita da maneira correta, devido aos mais diversos modos de preparo, podendo assim haver uma perda do princípio ativo, seguido da redução do efeito desejado. Dessa forma, a ciência usa o conhecimento empírico produzido pela comunidade para a descoberta e/ou a validação da informação científica desse conhecimento [58,61].

Atualmente, as doenças que acometem o sistema circulatório são uma das principais causas de óbitos no mundo e geram grandes despesas, principalmente por causa da quantidade de medicamentos com atividades antitrombótica, anticoagulante e antiplaquetária que são utilizados nos tratamentos contínuos [62,63]. Porém, os tratamentos com drogas anticoagulantes trazem efeitos adversos aos pacientes, como hemorragias e imunossupressão. Estas e outras inconveniências nos tratamentos com fármacos anticoagulantes vem incentivando a busca por novas alternativas terapêuticas [64] e as plantas têm sido, historicamente, a primeira fonte de moléculas bioativas (lectinas, proteases e inibidores de proteases) e atualmente as mais recorrentes com atividades anticoagulantes e antitrombóticas [65].

O que leva a investigações sobre alternativas naturais, através de ensaios exploratórios para identificar novos anticoagulantes provenientes de plantas medicinais, capazes de inibir as enzimas da via de coagulação e reduzir a ativação das plaquetas sanguíneas, sem causar efeitos desfavoráveis ao organismo [66]. Como por exemplo os estudos que descreveram a atividade anticoagulantes dos inibidores isolados do gênero *Bauhinia* (*BbKI*, inibidor calicreina *B. bauhinoides*, e *BuXI*, inibidor do fator Xa de *B. unguolata*) [44]. Que funcionam como forte incentivo pela busca de novos inibidores em espécies do gênero *Bauhinia* que possam elucidar os mecanismos de interação dessas proteínas sobre a cascata de coagulação sanguínea, prospectando possíveis medicamentos antitrombóticos naturais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Purificar e caracterizar um novo inibidor de tripsina das sementes de *B. pulchella*, avaliando sua cinética enzimática e seu efeito *in vitro* na coagulação sanguínea.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair, purificar um novo inibidor de tripsina das sementes de *B. pulchella*;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos do novo inibidor de tripsina das sementes de *B. pulchella*;
- Estimar o comportamento cinético do inibidor;
- Avaliar o efeito do inibidor, *in vitro*, na cascata de coagulação sanguínea.

REFERÊNCIAS

- [1] P. Fernandes, I.S. Tecnico, U. Lisboa, *Enzymatic Processing in the Food Industry*. [s.l.] Elsevier. (2018).
- [2] J. Sabotic, J. Kos, Microbial and fungal protease inhibitors—Current and potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1351–1375.
- [3] P. Gurumallesh, K. Alagu, B. Ramakrishnan, S. Muthusamy, A systematic reconsideration on proteases, *Int. J. Biol. Macromol.* 1 (2019) 254-267.
- [4] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, R. Finn, Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 343–350.
- [5] M.J. North, Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms, *Microbiol. Reviews.* 46 (1982) 308-340.
- [6] G.S. Chinnadurai, S. Krishnan, P. Perumal, Studies on detection and analysis of proteases in leaf extract of medicinally important plants, *Phytomedicine.* 40 (2018) 176–188.
- [7] T. Berg, Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11 (2008) 666-74.
- [8] W.P. Heal, S.R. Wickramasinghe, E.W. Tate, Activity based chemical proteomics: profiling proteases as drug targets, *Curr. Drug Discov. Technol.* 5 (2008) 200-212.
- [9] C. Lopez-Otin, J.S. Bond, Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J Biol Chem.* 283 (2008) 30433–30437.
- [10] J.E. Monteiro Júnior, N.F. Valadares, H.D.M. Pereira, F.H. Dyszy, A.J. Da Costa Filho, A.F. Uchôa, A.S. De Oliveira, C.P.S. Carvalho, T.B. Grangeiro, Expression in *Escherichia coli* of cysteine protease inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*): the crystal structure of a single-domain cystatin gives insights on its thermal and pH stability, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 29–41.
- [11] J. Cotabarren, M.E. Tellechea, F.X. Avilés, J. Lorenzo Rivera, W.D. Obregón, Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annuum* L). A novel contribution to the knowledge of mini proteins stability, *Protein Expr. Purif.* 144 (2018) 55–61.
- [12] T.F. Martins, I.M. Vasconcelos, R.G.G. Silva, F.D.A. Silva, P.F.N. Souza, A.L.N. Varela, L.M. Albuquerque, J.T.A. Oliveira, A bowman-birk inhibitor from the seeds of *Luetzelburgia auriculata* inhibits *Staphylococcus aureus* growth by promoting severe cell membrane damage, *J. Nat. Prod.* 81 (2018) 1497–1507.

- [13] B. Vagadia, S.K. Vanga, V. Raghavan, Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review, *Trends Food Sci Technol.* 64 (2017) 115-125.
- [14] G. Fear, S. Komarnytsky, I. Raskin, Proteases inhibitors and their peptidomimetic derivates as potential drugs. *Pharmacol Ther.* 113 (2007) 354-368.
- [15] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman, MEROPS: The Peptidase Database, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 227-233.
- [16] K.S. Bateman, M.N. James, Plant protein proteinase inhibitors: Structure and mechanism of inhibition, *Curr. Protein Pept. Sci.* 12 (2011) 340–347.
- [17] R.S. Joshi, M. Mishra, C.G. Suresh, V.S. Gupta, A.P. Giri, Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 5087–5094.
- [18] L. Migliolo, Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L. para as enzimas cisteínicas e serínicas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- [19] M. Clemente, M.G. Corigliano, S.A. Pariani, E.F. Sánchez-López, V.A. Sander, V.A. Ramos-Duarte, Inibidores de Serina Protease de Plantas: Aplicação da Biotecnologia na Agricultura e Pecuária Molecular, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1324-1345.
- [20] M.L. Oliva, M.C. Silva, R.C. Sallai, M.V. Brito, M.U.A. Sampaio, novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds, *Biochimie.* 92 (2010) 1667-1673.
- [21] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M M. Cox, *Princípios de Bioquímica.* 6. ed. Sarvier. São Paulo, 2014, pp. 839-1196,
- [22] M. Kunitz, Crystalline trypsin inhibitor. II. General properties, *J. Gen. Physiol.* 30 (1947) 295-310.
- [23] D.E. Bowman, Differentiation of Soy Bean Antitryptic Factors, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 3 (1946) 547–550.
- [24] Y. Birk, Purification and some properties of a highly active inhibitor of soybean trypsin and alpha-chymotrypsin, *Biochim. Biophys. Acta.* 54 (1961) 378-381.
- [25] A. Di Maro, F. Farisei, D. Panichi, V. Severino, N. Bruni, A.G. Ficca, P. Ferranti, V. Capuzzi, F. Tedeschi, E. Poerio, WCI, a novel wheat chymotrypsin inhibitor: purification, primary structure, inhibitory properties and heterologous expression, *Planta.* 234 (2011) 723-735.

- [26] C.R. Tremacoldi, Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas, Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA, 2009.
- [27] S. Srikanth, Z. Chen, Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 470.
- [28] C. Proaño-Bolaños, R. Li, M. Zhou, L. Wang, X. Xi, E.E. Tapia, L.A. Coloma, T. Chen, C. Shaw, Novel Kazal-Type Proteinase Inhibitors from the Skin Secretion of the Splendid Leaf Frog, *Cruziophyla calcarifer*, *EuPA Open Proteom.* 15 (2017) 1–13.
- [29] M.L. Oliva, R.D.A.S. Ferreira, J.G. Ferreira, C.A. De Paula, C.E. Salas, M.U. Sampaio, Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from Leguminosae: a mini review, *Curr. Protein Pept. Sci.* 12 (2011) 348–357.
- [30] MA. Yuan, Q. Zhao, LU.M. Zhu, J. Wang, Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra*, *Tree Genetics & Genomes.* 7 (2011) 431–441.
- [31] M. Hartl, A.P. Giri, I.T. Kaur, T. Baldwin, Serine protease inhibitors specifically defend *Solanum nigrum* against generalist herbivores but do not influence plant growth and development, *Plant Cell.* 22 (2010) 4158–4175.
- [32] M.A. Santos, Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de tripsina do *Theobroma cacao* L. Dissertação (mestrado) Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014.
- [33] S. Garantziotis, Y-P. Lim, JW. Hollingswths, W.M. Foster, Inhibition of inter-alpha trypsin inhibitor for the treatment of airway disease, United States Patent Appli. Publi. (2011) 1-19.
- [34] V.C. Filho, Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*, *Phyther. Res.* 23 (2009) 1347–1354.
- [35] T.B. Flores, H. Lorenzi, V.C. Souza, Introdução à botânica: morfologia. ed. Nova Odessa, Plantarum. São Paulo, 2013.
- [36] A. Negi, N. Sharma, M. Singh, Spectrum of pharmacological activities from *Bauhinia variegata*: a review, *J. Pharm. Res.* 5 (2012) 792–797.
- [37] V. Singh, K. Singh, D. Singh, Multidimensional uses of medicinal plant Kachnar (*Bauhinia variegata* Linn.), *Am. J. Phytomed.* 4 (2016) 1–15.
- [38] M.C.C. Silva, L.A. Santana, R. Mentele, R.S. Ferreira, A. Miranda, R.A. Silva-Lucca, M.U. Sampaio, M.T.S. Correia, M.L.V. Oliva, Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds, *Process. Biochemistry.* 47 (2012) 1049–1059.

- [39] S. Pandey, R.C. Agrawal, Effect of *Bauhinia variegata* bark extract on DMBA-induced mouse skin carcinogenesis: a preliminary study, *Significance*. 3 (2009) 158–162.
- [40] Rénisus (2014) Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> (acessado em 15 de junho de 2020).
- [41] A.M.S.F. Vaz, A.M.G.A. Tozzi, *Bauhinia* ser. Cansenia (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil, *Rodriguésia*. 83 (2003) 55-143.
- [42] I.R. Pinto, H.V. Chaves, J. Freire, L. De Sousa, D. Monteiro, J. Costa, K. Pereira, G. Santiago, L.M. De Sousa, M.R. Da Silva, A.O. Monteiro, R.C. Montenegro, M. De Moraes, G.C. Filho, V. Pinto, M.M.A. Bezerra, semi-synthetic flavonoid from *Bauhinia pulchella* stem attenuates inflammatory osteolysis in periodontitis in rats: Impact on cytokine levels, oxidative stress, and RANK/RANKL/OPG pathway, *Arch. oral biol.* 117 (2020) 104816.
- [43] S.G. Lopes, L.B. Barros, H. Louvandini, A.L. Abdalla, L.M. Costa Junior, Efeito do alimento taninífero de *Bauhinia pulchella* na contaminação de pastagens por nematóides gastrointestinais de cabras, *Parasitas & vetores*. 9 (2016) 102.
- [44] M.L. Oliva, M.U. Sampaio, *Bauhinia* Kunitz-type proteinase inhibitors: structural characteristics and biological properties, *Biol. Chem.* 389 (2008) 1007-1013.
- [45] M.V. Valois, C. De Oliveira, A.J. Lapa, C. Souccar, M.L. Oliva, *Bauhinia* Protease Inhibitors Attenuate Gastric Ulcer by Blocking Neutrophil Enzymes, *Planta medica*. 10 (2020) 1055-1202.
- [46] S.K. Austin, Haemostasis, *Medicine*, 4, (2017) 204-208.
- [47] L. Jobling, L. Eyre, Haemostasis, blood platelets and coagulation, *Anaesth. Intensive Care Med.* 14 (2013) 51-53.
- [48] J. Sira, L. Eyre, Physiology of haemostasis, *Anaesth. Intensive Care Med.* 17 (2016) 79-82.
- [49] R. De Caterina, S. Husted, L. Wallentin, F. Andreotti, H. Arnesen, F. Bachmann, J.I. Weitz, General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I): Position paper of the ESC Working Group on Thrombosis - Task force on Anticoagulants in heart disease, *Thrombosis and Hemostasis*. 109 (2013) 569–579.
- [50] A.V. Hoffbrand, P.A.H. Moss, *Hoffbrand's essential haematology*. [s.l.], John Wiley & Sons. (2015) 38.

- [51] M.G. Fritsma, G.A. Fristma, Normal Hemostasis and Coagulation. In B. F. RODAK, G.A. Fritsma, E. Keohane, (Eds.), Hematology: Clinical Principles and Applications (4thed.,). St. Louis, USA: Elsevier Saunders. 2012. pp. 626–646
- [52] M. Franchini, G. Lippi, F. Manzato, P. Vescovi, G. Targher, Hemostatic abnormalities in endocrine and metabolic disorders, Eur. J. Endocrinol. 162, (2010), 439–451.
- [53] S. Palta, R. Saroa, A. Palta, Overview of the coagulation system, Indian J Anaesth., 58 (2014) 515-523.
- [54] H. Versteeg, H. Heemskerk, M. Levi, P. Reitsma, New Fundamentals in Hemostasis, Physiological Reviews, 93 (2013) 327–358.
- [55] C.N. Ferreira, M.O. Sousa, L.M.S. Dusse, M.G. Carvalho, O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações, Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 32 (2010) 416-21.
- [56] C.J.C.S. Fernandes, J.L.A. Júnior, F. Gavilanes, L.F. Prada, L.K. Morinaga, R. Souza, Os novos anticoagulantes no tratamento do tromboembolismo venoso, J. bras. pneumol. 42 (2016) 146-152.
- [57] J.A. Ezihe-Ejiofor, N. Hutchinson, Anticlotting mechanisms I: Physiology and pathology, Contin Educ Anesth Crit Care Pain. 13 (2013) 87-92.
- [58] C.N. Souza, A.C. Almeida, M.T.R. Xavier, J.P.R. Costa, L.M.V. Silva, E.R. Martins, Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite, Revista Unimontes Científica. 19 (2017) 51-61.
- [59] A.G. Guimarães, M.R. Serafini, L.J. Quintans-Júnior, Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review, Expert Opin Ther Pat. 24 (2014) 243–265.
- [60] J.E. Dias, L.C. Laureano, Farmacopéia popular do cerrado. 1ª ed. Goiás: Articulação Pacari. 2010.
- [61] G.M. Conceição, A.C. Ruggieri, M.F.V. Araujo, T.T.M.M. Conceição, M.A.M.M. Conceição, Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí, Scientia Plena. 7 (2011) 1-6.
- [62] I. Pawlaczyk, L. Czerchawski, W. Kuliczkowski, B. Karolko, W. Pilecki, W. Witkiewicz, R. Gancarz, Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic- 55 polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L, Thrombosis Research. 127 (2011), 328–340.

- [63] Z. Shi, N. Li, Y. Tang, WEI-LI. Lian-Yin, J. Yang, J. Duan, Metabolism-based synthesis, biologic evaluation and SARs analysis of O-methylated analogs of quercetin as thrombin inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 210–222.
- [64] A.P. Ostrowski, S.A. Valentini, M.F. Pavanelli, Atividade anticoagulante do extrato aquoso, hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Tropaeolum majus*, *SaBios-Revista de Saúde e Biologia.* 9 (2014) 46–53.
- [65] J. Félix-Silva, T. Souza, R.B.G. Camara, B. Cabral, A.A. Ilva-Junior, I.M.M. Rebecchi, S.M. Zucolotto, H.A.O. Rocha, M.F. Fernandes-Pedrosa, *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications, *BMC Complement Altern Med.* 14 (2014) 405.
- [66] F. Keihanian, A. Saeidinia, R.K. Bagheri, T.P. Johnston, A. Sahebkar, Curcumin, hemostasis, thrombosis and coagulation. *J. Cell. Physiol.* 6, (2017), 4497-4511.

Manuscrito a ser submetido no periódico International Journal of Biological Macromolecules, que possui fator de impacto: 5.162 (2020).

MANUSCRIPT:

Anticoagulant effect of a trypsin inhibitor purified from *Bauhinia pulchella* seeds

Renato R. Roma^a, Lucas P. Dias^b, Ana L.E. Santos^a, Romério R.S. Silva^a, Maria H.C. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^b, José T.A. Oliveira^b, Maria L.V. Oliva^c, Claudio G.L. Silva^d, Racquel O.S. Souza^d, Claudener S. Teixeira^{e*}

a Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, MA, Brazil.

b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

d Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Cariri, Barbalha, CE, Brazil.

e Instituto de Formação de Educadores, Universidade Federal do Cariri, Brejo Santo, CE, Brazil.

Author for Correspondence:

Claudener S. Teixeira, Instituto de Formação de Educadores – IFE, Universidade Federal do Cariri - E-mail: claudener@gmail.com Tel.: +55 88 3221 9590; fax: +55 88 3221 9590

Abstract

Trypsin inhibitors (TIs) have the ability to bind competitively to trypsin and inhibit its action. These inhibitors are commonly found in plants, and can act on biological models, such as the blood coagulation cascade, given the importance of serine proteases for this process. Recently, TIs have been drawing attention for their anticoagulant activity and low toxicity. Thus, this work aimed to purify a new trypsin inhibitor from *Bauhinia pulchella* seeds, describing its kinetic mechanism and anticoagulant effect. Affinity chromatography in trypsin-Sepharose 4B column led to a yield of 43.1%, later named of *BpTI* (*Bauhinia pulchella* trypsin inhibitor). *BpTI* has an apparent molecular mass of 20 kDa with glycosylation (1.15%) spots on its structure. *BpTI* inhibits bovine trypsin as uncompetitive inhibitor with IC_{50} (3×10^{-6} M) and K_i (1.05×10^{-6} M). Additionally, *BpTI* showed high stability to temperature and pH variations maintaining its activity up to 100 °C and at extreme pH ranges. However, the inhibitor is susceptible to reducing agents, such as DTT, which completely inhibit its activity. The *BpTI* showed *in vitro* an anticoagulant effect at the concentration of 33 μ M, prolonging the coagulation time in the intrinsic and common pathways. Our results encourage further *in vivo* studies, prospecting *BpTI* as a natural antithrombotic agent.

Keywords: Fabaceae; Inhibitor; blood coagulation.

1. Introduction

Protease inhibitors (PIs) are ubiquitous molecules that regulate proteases through different mechanisms by complete or partial inhibition [1,2]. PIs are classified according to their target proteases in serine, cysteine, aspartic, and metalloprotease inhibitors [3]. Classified in the serine family, trypsin inhibitors regulate trypsin activity by bind to it either competitively or uncompetitively [4]. These inhibitors are found in plants and animals [5] presenting great inhibitory potential on blood coagulation and fibrinolysis and enzymes as on enzymes involved in digestion and in inflammation [6].

The Fabaceae family is a target of studies aimed at purifying new trypsin inhibitors. The genus *Bauhinia* hosts plants popularly known of cow's hoof and are well explored to find and isolate these molecules. [7]. Trypsin inhibitors from *Bauhinia* genus have been described by presenting biological properties such as, anti-inflammatory and antimetastatic [8].

Trypsin inhibitors could be employed in the treatment of diseases that affect the circulatory system since the cascade of blood clotting is mostly coordinated by serine proteases [9]. These diseases are the most causes of death in the world and generate large monetary expenses, mainly due to the employment of antithrombotic, anticoagulant, and antiplatelet drugs used in continuously treatments [10,11].

The treatment with anticoagulants unfortunately brings adverse effects to patients, such as hemorrhages and immunosuppression. These and other drawbacks in anticoagulant drugs have encouraged the search for new therapeutic alternatives [12]. Based on that, plant proteins have been receiving attention given their anticoagulant activity and low toxicity [13]. Therefore, the objective of this work is to purify a new trypsin inhibitor from *Bauhinia pulchella* seeds, describing its kinetic mechanism and anticoagulant effect.

2. Material and Methods

2.1 Materials

B. pulchella seeds were collected from plants located at, Chapadinha, Maranhão, Brazil (3°44'08.5"S 43°18'60.0"W). The plant was identified in the Herbarium Prisco Bezerra/Universidade Federal do Ceará, number 6,0212, and registered in SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID:

AF8E1DD). Reagents were purchased from Sigma Aldrich. Chromatographic columns, gradient gel were obtained from GE Healthcare Life Science (New York, USA). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co (St.17 Louis, USA).

2.2 Trypsin inhibitory activity assay

This assay was carried according to Erlanger [17], using BApNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide) to determine the residual hydrolytic activity of bovine trypsin. The samples were prepared in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.02 M CaCl₂, and incubated in a water bath with 10 μ L trypsin (0.3 mg mL⁻¹ in 0.001 M HCl) at 37 °C. After 10 min incubation, 500 μ L of 1.25 \times 10⁻³ M BApNA (prepared in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5) was added, and the mixture incubated (37 °C for 15 min). Next, 120 μ L of 30% (v/v) glacial acetic acid were added to stopped the reaction. The absorbance was monitored at 410 nm. Each activity unit (IU) was defined by decrease of 0.01 units of absorbance at 410 nm in relation to the control sample (without inhibitor).

2.3 Protein extraction and purification

Mature seeds from *B. pulchella* were ground into a fine powder homogenized in 1:10 (w/v) in 0.1 M glycine buffer pH 9.0 containing 0.15 M NaCl, 5 \times 10⁻³ M and incubated at room temperature under continuous stirring for 4 h before centrifugation at 8,000g for 20 min at 4 °C (High-Speed Refrigerated Centrifuge, Hitachi, Japan). The precipitate was discarded, and the supernatant, designated as SPE (soluble protein extract), loaded onto a Trypsin-Sepharose 4B column (2.5 x 5 cm) pre-equilibrated with 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.15 M NaCl, 5 \times 10⁻³ M (Better conditions according to optimal pH screening for chromatographic column extraction and balance. Data not shown). The non-retained proteins were eluted with the equilibration buffer. The fractions retained were eluted with 0.1 M glycine buffer pH 2.6 containing 0.15 M NaCl and collected manually in 1.5 mL fractions were collected at a flow rate of 30 mL.h⁻¹. The protein elution was monitored at 280 nm (Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) and the fractions with trypsin inhibitory activity were pooled, dialyzed against distilled water, and lyophilized for further analysis.

2.4 Enzyme specificity

The chymotrypsin inhibitory activity was evaluated using azocasein as the substrate [19]. One hundred microliters of *BpTI* (3×10^{-6} M) were incubated at 37 °C with 10 µL chymotrypsin solution (0.3 mg/mL^{-1} prepared in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.02 M CaCl_2). After 15 min incubation, 200 µL 1% (m/v) azocasein (prepared in same buffer above) was added and the mixture was incubated for 30 min, 37 °C. Solution of 20% (v/v) trichloroacetic acid was used to stop the reaction. Next, the mixture was centrifuged (10.000g, 10 min, room temperature) and 500 µL of the supernatant were homogenized with 500 µL of 2 M NaOH. Then, the absorbance was measured at 440 nm.

The papain inhibitory assay was determined using BANA (N α -benzoyl-DL-arginine β naphthylamide hydrochloride) as the substrate [20]. Firstly, were mixed: 60 µL of papain solution (0.02 mg/mL^{-1} in 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0), 40 µL of the activating solution (0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0, 2×10^{-3} M EDTA, 3×10^{-3} M DTT, 200 µL 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0, and 200 µL of *BpTI* (3×10^{-6} M) After incubation (37 °C for 10 min), 200 µL of 1×10^{-3} M BANA (solubilized in dimethyl sulfoxide and 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0) were added. After 20 min, the reaction was stopped by the addition of 500 µL 2% (v/v) HCl in 95% (v/v) ethanol. Next, 500 µL of 0.06% (m/v) DMACA (4-[dimethylamino]-cinnamaldehyde), dissolved in 95% (v/v) ethanol were added and incubated for 30 min (room temperature), and the absorbance was measured at 540 nm. To both assays, the residual enzymatic activity in the presence of inhibitor was calculated in relation to the enzymatic activity in the absence of inhibitor.

2.5 Protein concentration and electrophoresis (SDS-PAGE) 12.5%

The concentration of total soluble proteins was estimated by the Bradford's method [14], using bovine serum albumin (BSA) as a standard protein.

The inhibitor was subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing and reducers conditions [15]. After was stained with Coomassie brilliant blue (R-350).

2.6 Glycosylation

The glycosylation of *Bp*TI (50 μ M in 0.15 M NaCl) was subjected to the methodology described by Dubois [16] using glucose as the standard.

2.7 IC_{50} and kinetic analysis

The *Bp*TI concentration to reduce in 50% the trypsin activity (IC_{50}) and kinetic analysis were determined as described in 2.5 section. *Bp*TI (with concentrations range of 9×10^{-6} M to 2×10^{-6} M) was prepared in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.02 M $CaCl_2$ and incubated with 10 μ L trypsin (0.3 mg/mL^{-1} in 0.001 M HCl) at 37 °C for 10 min. Then, were added 500 μ L of BApNA at different concentrations ($0.5\text{-}3.0 \times 10^{-3}$ M). After incubation at 37 °C for 15 min, the reaction was interrupted by addition of 30% (v/v) glacial acetic acid. The BApNA hydrolysis was monitored at 410 nm. A Lineweaver–Burk double reciprocal plot was determined using the reciprocal of the rate of the enzyme reaction ($1/v$) versus the reciprocal of the substrate concentration ($1/[S]$) in the absence and presence of inhibitor. The inhibition constant (K_i) was obtained according to Dixon [18]. K_i was by determined intersection of the three lines at the x-axis, corresponding to the BApNA concentrations (0.5×10^{-3} M, 1.25×10^{-3} M, and 3.0×10^{-3} M).

2.8 Stability of the inhibitory activity against bovine trypsin

To evaluate the thermal stability of *Bp*TI, the inhibitor was prepared (3×10^{-6} M) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 and incubated in a water bath at different temperatures (40 to 100 °C) for 30 min. After cooling ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) the residual inhibitory activity of the *Bp*TI against trypsin was measured as described in 2.5.

To evaluate the pH influence in the inhibitory activity of *Bp*TI, the inhibitor was prepared (3×10^{-6} M) in different buffers: sodium citrate (pH 4.0), sodium acetate (pH 5.0), sodium phosphate (pH 6.0 and 7.0), Tris–HCl (pH 8.0) and glycine–NaOH (pH 9.0 and 10.0). After incubation (at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min) the residual trypsin inhibitory activity was determined as previously described in 2.5 [21].

The influence of reducing agent on the trypsin inhibitory activity of *Bp*TI was determined as previously described by Bezerra [22]. *Bp*TI (3×10^{-6} M) was incubated with DTT

in different concentrations (0.001, 0.01 and 0.1 M) for 15, 30, 60, and 120 min. After incubation, the reaction was interrupted by adding iodoacetamide at twice the DTT concentration, and the residual inhibitory activity was determined.

2.9 Assay biological:

2.9.1 Human plasma

The experiments were be carried out after the approval of the Ethics Committee on Research in Human Beings of the Universidade Federal do Cariri. Human blood was obtained from healthy donors from the Centro de Hemoterapia do Ceará, who did not use medicines, according to resolution 466/2012 of the National Health Council, Brazil. Samples were collected in tubes containing 3.2% sodium citrate and centrifuged to obtain platelet-rich plasma (PRP, 118g, 10 minutes, 25 °C) and platelet-poor plasma (PPP, 1,062g, 15 minutes, 25 °C).

2.9.2 Evaluation of anticoagulant activity of BpTI *in vitro*

The tests of activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (TP) (Diagnostic BIOS) assess intrinsic and extrinsic pathways of coagulation cascade, respectively, and the thrombin time test (TT) evaluates the rate of conversion of fibrinogen to fibrin (Instrumentation Laboratory). All experiments were performed according to the manufacturer's specifications.

For aPTT, 90 µL of PPP was incubated (37 °C, 1 min) with 10 µL of the inhibitor (6.6, 33, 66 µM) and saline (0.9% NaCl). Then, 100 µL of cephalin reagent was added to the mixture and incubated for 3 min. The coagulation was triggered by the addition of 100 µL of calcium chloride (0.25 M). For TP test, PPP (90 µL) was incubated (37 °C, 2 min) with 10 µL of the inhibitor (6.6, 33, 66 µM) and saline (negative control). After incubation, the thromboplastin reagent (200 µL) was added for the triggering coagulation.

For TT, PPP (90 µL) was incubated (37 °C, 1 min) with 10 µL of the inhibitor (6.6, 33, 66 µM), and saline. After incubation, the thrombin reagent (100 µL) was added for coagulation time determination. All the tests were performed in triplicate (n=3) and the data expressed in seconds (s) and as ratio (T1/T0) of clotting time in the presence (T1) and absence of inhibitor (T0).

2.10 Statistical analysis

All analyzes were performed at least in triplicate and the results were expressed as the mean \pm standard deviation. All analyzes were performed using the GraphPad Prism software (version 6.0). For each set of results, analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by the Bonferroni test. Where $P < 0.05$ was considered significant difference between the means.

3. Results

3.1 Inhibitor Purification

The purification process of the trypsin inhibitor from *B. pulchella* seeds involved only two steps: extraction (SPE), and an affinity chromatography technique (Table 1). The extract showed a weak inhibitory activity against trypsin ($0.240 \text{ IU mgP}^{-1}$), however through the purification process (Figure 1), we obtained a sample with a very strong inhibitory activity against trypsin ($603.5 \text{ IU mgP}^{-1}$), evidencing the effectiveness of the chromatographic step. The purification index of *BpTI* is 2,514.5 times with a recovery of 43.1%. The purified inhibitor was called *BpTI* (*B. pulchella* trypsin inhibitor).

Table 1. Purification steps of *BpTI*.

| Steps | Total protein ^a (mg) | Total inhibitory activity ^b (IU) | Specific activity (IU. mg ⁻¹ protein) | Yield ^c (%) | Purification fold ^d (x) |
|----------------------------------|------------------------------------|---|--|---------------------------|--|
| Soluble protein extract (SPE) | 1.16 | 0.278 | 0.240 | 100 | 1 |
| Trypsin- Sephrose 4B | 0.5 | 301.75 | 603.5 | 43.1 | 2,514.5 |

Results are presented as the average of six similar runs.

^aThe total amount of protein recovered from 4 g of flour from *B. pulchella* seeds.

^bOne IU (trypsin inhibitory activity unit) was defined as the decrease in 0.01 unit of absorbance at 410 nm.

^cThe recovery of protein at each purification step (SPE 100%).

^dPurification index is calculated as the ratio between the specific activity obtained at each purification step and that of the SPE taken as 1.0.

3.2 Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and carbohydrate dosage

The electrophoretic profile of the inhibitor (Figure 1) proved the purity of *Bp*TI. The electrophoresis showed *Bp*TI has only one major band with an apparent molecular weight of 20 kDa, both in the absence and presence of β -mercaptoethanol, and its extract has only two well-evidenced bands, but only one of them was conserved after the purification process. In addition, *Bp*TI proved to be a glycosylated inhibitor, with carbohydrate content of 1.15%.

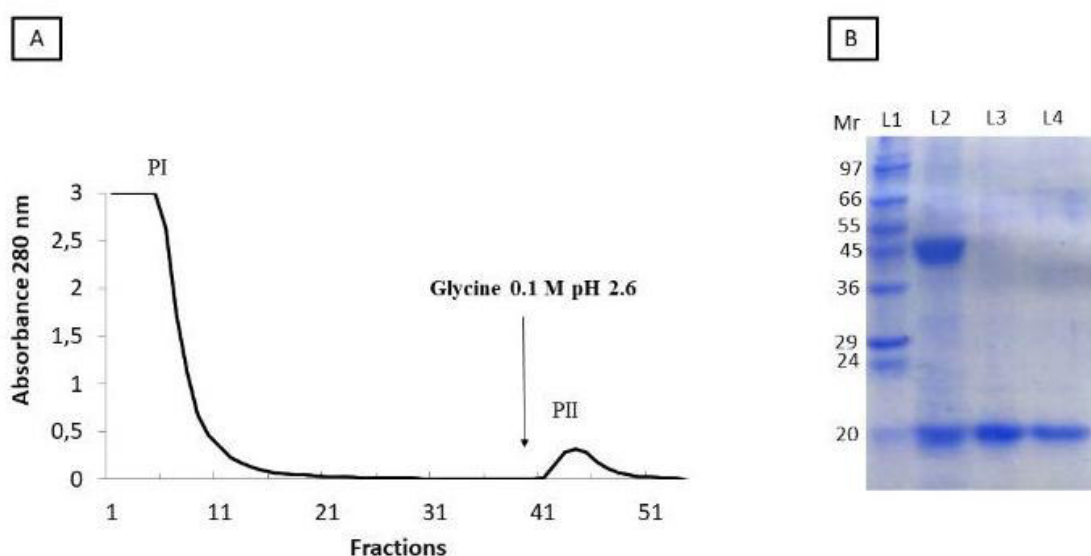


Figure 1. *Bp*TI purification. (A) Elution profile of Trypsin-Sepharose 4B chromatography, fractions of 1.5 mL were collected at a flow rate of 30 mL.h⁻¹ and measured at absorbance of 280 nm. PI (non-retained proteins), PII (retained proteins). (B) SDS-PAGE profile of *Bp*TI, (L1) Molecular mass markers: phosphorylase B, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; glutamic dehydrogenase, 55 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20 kDa; (L2) Soluble protein extract SPE (0.5 μ M); (L3) *Bp*TI PII eluted trypsin-Sepharose 4B (0.5 μ M); (L4) *Bp*TI PII + β -mercaptoethanol (0.5 μ M in 5%).

3.3 Enzymatic specificity, IC₅₀, inhibition mechanism, and K_i determination

*Bp*TI strongly inhibited the bovine trypsin (serine protease), however showed no inhibition against chymotrypsin (also a serine protease) and papain, a cysteine protease. Its IC₅₀ for trypsin was 3 x 10⁻⁶ M (Figure 2), the Lineweaver – Burk (Figure 3) and Dixon (Figure 3) (Diagrams of 2 insertions) revealed that the maximum reaction velocity decreases due to

inhibitor concentration, indicating that *Bp*TI is an uncompetitive inhibitor, with a K_i of 1.05×10^{-6} M.

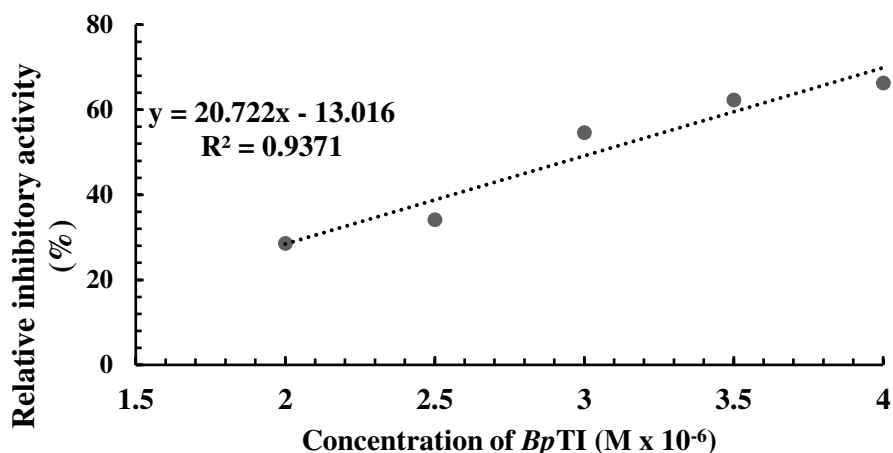


Figure 2. Inhibition parameters of *Bp*TI against trypsin. Relationship between the inhibitory activity (%) versus *Bp*TI concentration to calculate IC_{50} .

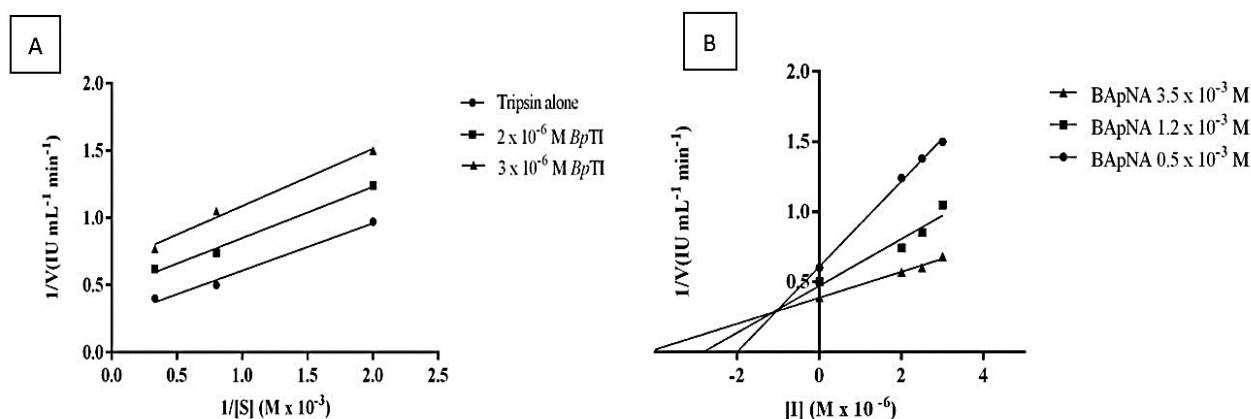


Figure 3. Enzymatic kinetics of *Bp*TI (A) The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot of *Bp*TI at different concentrations showing the uncompetitive inhibition mechanism. (B) Dixon plot to assess the inhibition constant ($K_i = 1.05 \times 10^{-6}$ M) of *Bp*TI.

3.4 Temperature, pH, and DTT stability

The *Bp*TI was thermostable up to 90 °C. The activity of *Bp*TI only reduced 9% when incubated at 100 °C (Figure 4A). The *Bp*TI stability was not compromised when incubated at different pH (Figure 4B), it remained constant, without loss of activity, in all tested pH ranges (4 to 10), with the optimal inhibitory activity at pH 6. However, the inhibitor in the presence of

DTT (Figure 5) had a reduction of 90% on its inhibitory activity at the concentration of 0.01 M for 2 hours and 100% of its activity when exposed to higher DTT concentration.

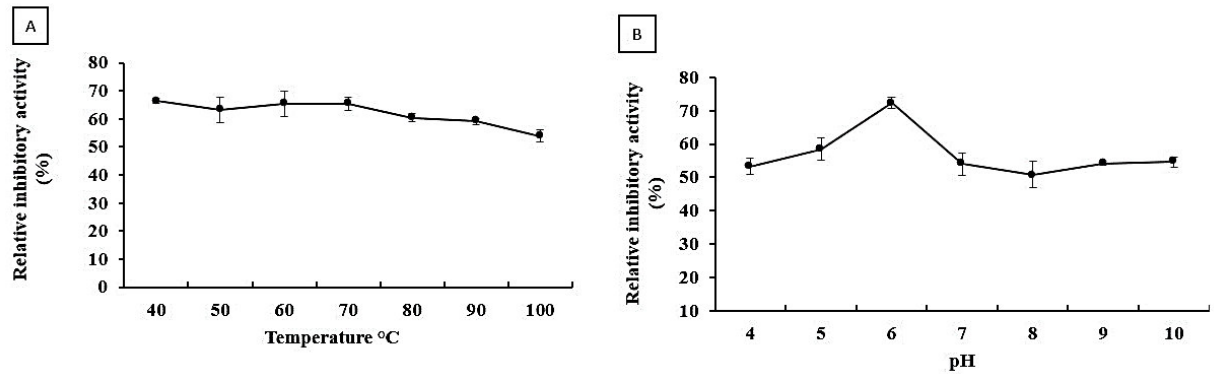


Figure 4. Stability of *BpTI*. (A) Thermal stability. Inhibitory activity after incubation of *BpTI* for 30 min. at temperatures varying from 40 to 100 °C. (B) pH stability of inhibitor after incubation for 30 min at 25 ± 2 °C, at the pH range of 4.0 to 10.0. The residual trypsin inhibitory activity was measured using BApNA as substrate. The bars represent standard deviation of three replicates.

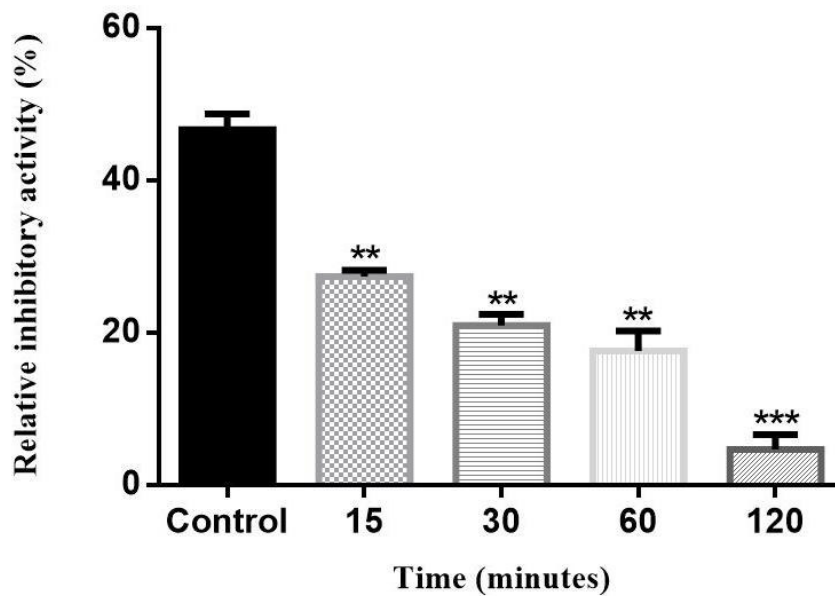


Figure 5. Stability of *BpTI* after incubation with 0.1 M DTT concentration. The residual trypsin inhibitory activity was measured using BApNA as substrate. The bars represent standard deviation of three replicates. The statistical analysis included ANOVA followed by Bonferroni test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. Control.

3.5 Effects of *BpTI* in blood coagulation *in vitro*

The *BpTI* was able to prolong the time of clot formation in the aPTT and TT tests but did not interfere in the time of clot formation in the PT test (Figure 6), which shows the affinity

of the interaction of the inhibitor with the coagulation factors belonging to the intrinsic and common pathway of the blood coagulation cascade. The extrinsic pathway was not affected by the concentrations tested, but there was a statistical difference between treatments.

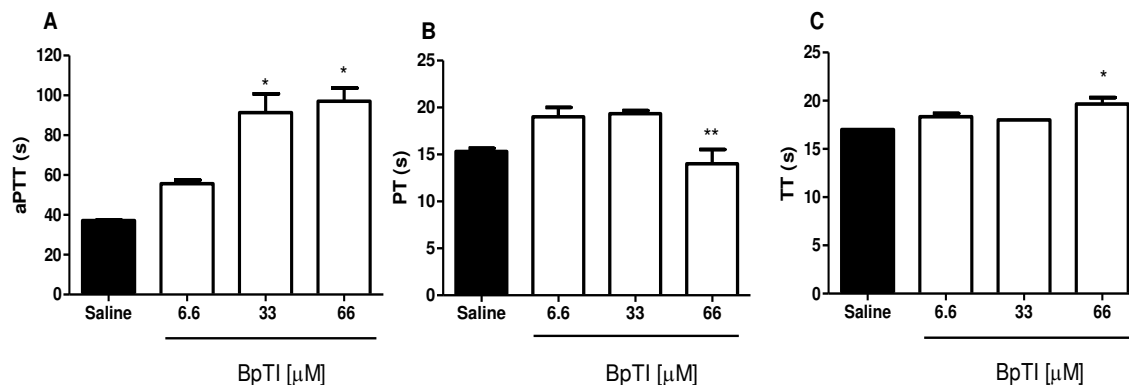


Figure 6. The influence of *BpTI* on blood coagulation. The results were determined by activated partial thromboplastin time (aPTT, A), prothrombin time (PT, B) and thrombin time (TT, C). Mean \pm S.E.M. (n = 3). ANOVA and Bonferroni test. * $p < 0.05$ vs. saline. ANOVA and Bonferroni test. * $p < 0.05$ vs. saline; ** $p < 0.05$ vs. *BpTI* (6.6 and 33 μ M).

4. Discussion

The purification of protease inhibitors requires at least 3 or more steps during the purification process, normally starting with precipitation by ammonium sulfate, acetone, or TCA. Gel filtration chromatography or ion exchange are the most chromatographic steps employed. Finally, affinity chromatography to generate a high degree of purity but very low protein yield [23,24,25]. *BpTI* was purified using a different strategy from the ones used, being purified with only two steps, the extraction in the basic buffer and affinity chromatography in the column of Trypsin Sepharose 4B (Figure 1). In this context, trypsin affinity chromatography selected, in the protein peak obtained after elution with glycine 0.1 M pH 2.6, only proteins that exclusively interact with trypsin [26].

Primary affinity for trypsin and apparent molecular weight of 20 kDa are characteristics often described for trypsin inhibitors [27]. Similar results were found for *B. rufa* trypsin inhibitors [28] *Senna tora* [29], and *Cassia leiandra* [25]. Here, it can be pointed out that the *BpTI* through its characteristics and because it is a purified inhibitor of the genus *Bauhinia* it can be within one of the families of *Bauhinia*-type inhibitors. However currently, the distribution of inhibitors in their families occurs by techniques involving sequencing and

homology [30,31] and not just by the type of enzymes that inhibits and molecular weight of protein.

Plant proteins because they have important functions, which are often catalytic, are synthesized in the form of proproteins, requiring post-translational mechanisms such as glycosylation to give rise to their active form [32]. Protease inhibitors of plant origin are mostly glycosylated, that is, their genic expression requires mechanisms after protein synthesis, such as *B. rufa* elastase inhibitor glycosylated form [33].

Generally, inhibitors sit competitive inhibition, however, *BpTI* presented uncompetitive kinetics, indicating that the inhibitor interacts only as enzyme-substrate complex (ES complex) outside the catalytic site, thus forming inhibitor-enzyme-substrate complex (ESI), this means that the inhibitor binds to the enzyme only if it is already in interaction with its substrate [34]. Few reports bring uncompetitive inhibitors such as *Moringa oleifera* inhibitors [35] and *C. leiandra* [25]. *BpTI* IC_{50} of 3×10^{-6} M demonstrates that it is a potent trypsin inhibitor, which this low concentration is sufficient to inhibit 50% of the catalytic activity of the enzyme, as well as *Jatropha curcas* inhibitors (IC_{50} 1.25×10^{-6} M) [23] and *Erythrina velutina* ($IC_{50} = 2.2 \times 10^{-6}$ M) [36]. This great affinity for trypsin is also highlighted because of the low value of its inhibition constant K_i 1.05×10^{-6} M as well as *Jatropha curcas* inhibitors 2×10^{-11} M [23] and *C. leiandra* K_i of 6.25×10^{-8} M [25].

The thermostability of the *BpTI* to support up to 100 °C maintaining 90% of its activity, is not a character is very common among trypsin inhibitors, where they generally withstand temperatures of no more than 70 ° C, however, they can withstand extreme pH, as is the case of *Entada acaciifolia* trypsin inhibitors [37] and *Luphiosilurus alexandri* [38].

Trypsin inhibitors are well known for their ability to withstand high temperatures and different pH ranges, due to the cysteine residues present in their structures, which form disulfide bridges [27]. However, these disulfide bridges can be reduced by certain agents, and may directly interfere with their injunction activity, as they may be related to the active site ensuring its preservation, structural compliance, and functionality [39]. This fact occurred with The *BpTI*, which lost its activity when incubated with DTT at the concentration of 0.1 M, indicating that The *BpTI* has intrachain sulfide bridges that are primordial to its activity, as well as *Cassia leiandra* trypsin inhibitor [25], but other inhibitors may have their cysteine residues out of the active site, such as *Cassia grandis* trypsin inhibitor [40].

BpTI's ability to prolong coagulation, its great affinity for serine proteases is due, a fact that has already been reported for other inhibitors of the genus *Bauhinia* (*BbKI*, calicrein

inhibitor *B. bauhinoides*, and *BuXI*, an inhibitor of factor Xa of *B. unguolata*) that inhibited trypsin, inhibited enzymes from the blood coagulation cascade [33]. The purification of such a promising molecule and the knowledge of its mechanism of action opens rational scope for several pharmacological studies since the intrinsic and common pathways are the target of classic drugs such as warfarin and heparin, and some of the new drugs such as dabigatran (a direct inhibitor of thrombin) and rivaroxaban (direct inhibitor of factor X) [41]. Also mention that among the optimal drugs for the replacement of classical anticoagulants, would be inhibitors of intrinsic factors [42]. As a comparison to the anticoagulant effect of heparin, for this drug to produce a delay in the time of coagulation in the intrinsic pathway, it needs a concentration of 333 μM , [43] while *BpTI* at a ten times lower concentration already has anticoagulant activity. These results encourage *in vivo* studies on the exploration of this inhibitor as a naturally occurring antithrombotic agent [44].

5. Conclusions

A new trypsin inhibitor from *B. pulchella* seeds, named *BpTI* with effect anticoagulant *in vitro*. This inhibitor is the first isolated and characterized protein in this plant species. Our results constitute an important contribution to a better understanding of the anticoagulant activity of trypsin inhibitors and indicate that *BpTI* has pharmacological potential as an alternative strategy to produce natural medicines anticoagulants.

Prospecções

O isolamento de uma nova molécula (*BpTI*) é um fato preponderante no entendimento do mecanismo de ação dos inibidores perante modelos biológicos fundamentais para o organismo, como a coagulação, tendo em vista que essa é uma atividade muito relevante e de difícil ação por partes das biomoléculas, levando em conta todos os processos de alergenicidade, toxicidade e viabilidade de concentração, que dificultam a usabilidade de moléculas nesse processo. Estudos futuros com o inibidor são de suma importância para elucidar a estrutura primária da molécula, sítios ativos, afinidade de ligação com as serino proteases e mecanismos de ação durante o processo de coagulação sanguínea *in vivo*.

References

- [1] J. Sabotic, J. Kos, Microbial and fungal protease inhibitors—Current and potential applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1351–1375. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>.
- [2] A.I. Lima, J. Mota, S.A. Monteiro, R.M. Ferreira, Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration, *Food Chem.* 197 (2016) 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.063>.
- [3] F. Lecaille, G. Lalmanach, P.M. Andrault, Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases, *Biochimie.* 122 (2016) 151–168. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.014>.
- [4] C. Hsieh, B. Hernández-Ledesma, H.J. Jeong, J.H. Park, O. Ben, Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable, *PLOS ONE.* 5 (2010) e8890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008890>.
- [5] C.O.V. Lima, G. Piuvezam, L.M.B. Leal, A.M.A. Heloneida, Trypsin Inhibitors: Promising Candidate Satiogenic Proteins as Complementary Treatment for obesity and metabolic disorders? *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 34 (2019) 405–419. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1542387>.
- [6] R. Almeida-Reis, O.A. Theodoro-Junior, B.T.M. Oliveira, L.V. Oliva, A.C. Toledo-Arruda, C.R. Bonturi, M.V. Brito, F.D.T.Q.S. Lopes, C.M. Prado, A.C. Florencio, M.A. Martins, C.A. Owen, E.A. Leick, M.L.V. Oliva, I.F.L.C. Tibério Plant proteinase inhibitor BbCI modulates lung inflammatory responses and mechanic and remodeling alterations induced by elastase in mice. *Biomed. Res. Int.* 2017, (2017), 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/8287125>.
- [7] V.C. Filho, Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*, *Phyther. Res.* 23 (2009) 1347–1354. <https://doi.org/10.1002/ptr.2756>.
- [8] M.L. Oliva, M.C. Silva, R.C. Sallai, M.V. Brito, M.U. Sampaio, A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds, *Biochimie.* 92 (2010) 1667-1673. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.021>.
- [9] S. Palta, R. Saroa, A. Palta, Overview of the coagulation system, *Indian J. Anaesth.* 58 (2014) 515-523. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.144643>.
- [10] I. Pawlaczyk, L. Czerchawski, W. Kuliczowski, B. Karolko, W. Pilecki, W. Witkiewicz, R. Gancarz, Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic- 55 polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L, *Thrombosis Research.* 127, (2011) 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.11.031>.

- [11] Z. Shi, N. Li, Y. Tang, WEI-LI. Lian-Yin; J. Yang, J. Duan, Metabolism-based synthesis, biologic evaluation and SARs analysis of O-methylated analogs of quercetin as thrombin inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.044>.
- [12] A.P. Ostrowski, S.A. Valentini, M.F. Pavanelli, Atividade anticoagulante do extrato aquoso, hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Tropaeolum majus*, *SaBios-Revista de Saúde e Biologia.* 9 (2014) 46–53. Disponível em: <<http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1624>>. Acesso em: 23 julho. 2020.
- [13] J. Félix-Silva, T. Souza, R.B.G. Camara, B. Cabral, A.A. Ilva-Junior, I.M.M. Rebecchi, S.M. Zucolotto, H.A. O. Rocha, M.F. Fernandes-Pedrosa, *In vitro* anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications, *BMC Complement Altern Med.* 14 (2014) 405. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-405>.
- [14] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [15] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- [16] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry.* 28 (1956) 350-355. <https://doi.org/10.1038/168167a0>.
- [17] B. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271-278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x).
- [18] M. Dixon, The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.* 55 (1953) 170-171. <https://doi.org/10.1042/bj0550170>.
- [19] M. Abe, K. Abe, M. Kuroda, S. Arai, Corn Kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies, *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 933–937. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17365.x>.
- [20] F. Jamal, P.K. Pandey, D. Singh, W. Ahmed, A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of

Helicoverpa armigera, Process Biochem. 50 (2015) 311-316.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.003>.

[21] S. Klomklao, S. Benjakul, H. Kishimura, M. Chaijan, Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), Food Chem. 129 (2011) 1348–1354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.029>.

[22] C.S. Bezerra, C.F.R. Oliveira, O.L.T. Machado, G.S.V. Mello, M.G.R. Pitta, M.J.B.M. Rêgo, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, S.F.F. Ribeiro, V.M. Gomes, O.N. Silva, S. Maria-Neto, O.L. Franco, M.L.R. Macedo, Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: a multifunctional Kunitz inhibitor, Process Biochem. 51 (2016) 792-803. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.008>.

[23] H.P.S. Costa, J.T.A. Oliveira, D.O.B. Sousa, J.K.S. Morais, F.B. Moreno, A.C.O. Monteiro-Moreira, R.A. Viegas, I.M. Vasconcelos, JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment, Front Microbiol. 30 (2014) 2-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00005>.

[24] I.R.S. Melo, L.P. Dias, N.M.S. Araújo, I.M. Vasconcelos, T.F. Martins, G.A. Morais, J.F.C. Gonçalves, C.S. Nagano, R.F. Carneiro, J.T.A. OLIVEIRA, CICPI, a cysteine protease inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has antifungal activity against *Candida tropicalis* by inducing disruption of the cell surface, Int. J. Biol. Macromol. 133 (2019) 1115–1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.174>.

[25] L.P. Dias, J.T.A. Oliveira, L.C.B. Rocha-Bezerra, D.O.B. Sousa, H.P.S. Costa, N.M.S. Araujo, A.F.U. Carvalho, P.M.S. Tabosa, A.C.O. Monteiro-Moreira, M.D.P. Lobo, F.B.M.B. Moreno, B.A.M. Rocha, A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*, Process Biochem. 57 (2017) 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.015>.

[26] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, Princípios de Bioquímica. 6. ed. Sarvier. São Paulo, 2014, pp. 839-1196,

[27] M.L. Oliva, R.D.A.S. Ferreira, J.G. Ferreira, C.A. De Paula, C.E. Salas, M.U. Sampaio, Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from Leguminosae: a mini review, Curr. Protein Pept. Sci. 12 (2011) 348–357. <https://doi.org/10.2174/138920311796391061>.

[28] A.M. Nakahata, N.R. Bueno, H.A.O. Rocha, C.R.C. Franco, R. Chammas, C.R. Nakaie, M.G. Jasiulionis, H.B. Nader, L.A. Santana, M.U. Sampaio, M.L.V. Oliva, Structural and

inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2006) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.05.008>.

[29] V. R. Tripathi, A.A. Sahasrabudhe, S. Kumar, S.K. Garg, Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer, *Process Biochem.* 49 (2014) 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.007>.

[30] C.A. Ryan, Proteinase inhibitors, *The biochemistry of plants.* 6 (2014) 351–370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675406-3.50015-3>.

[31] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, R. Finn, Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 343–350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>.

[32] N. Sharon, H. Lis, History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, *Glycobiology.* 14 (2004) 53–62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>.

[33] M.L. Oliva, M.U. Sampaio, *Bauhinia* Kunitz-type proteinase inhibitors: structural characteristics and biological properties, *Biol. Chem.* 389 (2008) 1007–1013. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.119>.

[34] A. Cornish-Bowden, *Principles of Enzyme Kinetics*, Butterworths & Co Ltd., London, 2014

[35] B. Bijina, S. Chellappan, S.M. Basheer, K.K. Elyas, A.H. Bahkali, M. Chandrasekaran, Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization, *Process Biochem.* 46 (2011) 2291–2300. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.008>.

[36] R.J. Machado, N.K. Monteiro, L. Migliolo, O.N. Silva, M.F. Pinto, A.S. Oliveira, O.L. Franco, S. Kiyota, M.P. Bemquerer, A.F. Uchoa, A.H.A. Morais, E.A. Santos, Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds, *PLoS ONE* 8 (2013) e63571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063571>.

[37] C.F.R. Oliveira, I.M. Vasconcelos, R. Aparicio, M.D.G.M.H. Freire, P.A. Baldasso, S. Marangoni, M.L.R. Macedo, Purification and biochemical properties of a Kunitz type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds, *Process Biochem.* 47 (2012) 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.022>.

[38] C.W.V. Santos, M.E.C. Marques, H.A. Tenório, E.C. Miranda, H.J.V. Pereira, Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum, *Biochim. Biophys. Acta* 8 (2016) 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.08.003>.

[39] R.S. Joshi, M. Mishra, C.G. Suresh, V.S. Gupta, A.P. Giri, Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase

- inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 5087-5094. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.019>.
- [40] R.M.P. Brandão-Costa, V.F. Araújo, A.L.F. Porto, CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 2296-2306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.110>.
- [41] R.A. Yoshida, W.B. Yoshida, H.A. Rollo, Novos anticoagulantes orais para a profilaxia e tratamento do tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte, *J. Vasc. Bras.* 10 (2011) 145-153. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492011000200009>.
- [42] B. Furie, B.C. Furie, Mechanisms of Thrombus Formation, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 938–949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>.
- [43] P. Indumathi, A. Mehta, A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate, *J. Funct. Foods*, 20 (2016) 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.016>.
- [44] J. Cotabarren, D.J. Broitman, E. Quiroga, W.D. Obregón, GdTI, the first thermostable trypsin inhibitor from *Geoffroea decorticans* seeds. A novel natural drug with potential application in biomedicine, *Int. J. Biol. Macromol.* 148 (2020) 869-879. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.214>.