



LUZIA APARECIDA PANDO

Purificação, caracterização físico-química e atividade biológica de inibidores de serinoproteinases de sementes do gênero *Crotalaria*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Bioquímica.

ORIENTADOR: PROF. Dr. SÉRGIO MARANGONI

CAMPINAS-SP

1996

Este exemplar corresponde à redação final da tese de Luzia Aparecida Pando (a) e aprovada pela Comissão Julgadora.

Luzia Aparecida Pando
Sérgio Marangoni

21/8/96



9616910

2M 00093503-2
UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
UNICAMP
P192p
V. Ex.
TOMBO BC/ 28778
PROC. 667/96
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 11/10/96
N.º CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P192p Pando, Luzia Aparecida
Purificação, caracterização físico-química e atividade biológica de serinoproteinases de sementes do gênero *Crotalaria* / Luzia Aparecida Pando. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Sérgio Marangoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Crotalaria*. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos.
3. Serina proteinases. 4. Tripsina. 5. Leguminosa.
I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia . III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 21 de Agosto de 1996

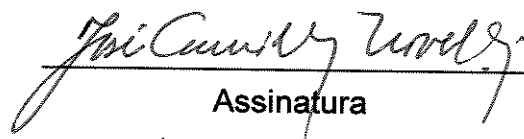
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Santoro


Assinatura

SUPLENTE:

Prof^a Dra. Satie Hatsushika Ogo

Assinatura

APROVADA

“A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria, emprega tudo o que possues na aquisição de entendimento”.

Provérbios, 4-7

À Luciana Di Ciero Toledo Leme, pela co-orientação, demonstrando toda sua compreensão, amizade e incentivo, sempre que precisei; dedico esta tese.

Aos meus pais,
Wanderley e Maria, pelo amor, carinho e incentivo,
dedico este trabalho

Às minhas irmãs,
Solange e Silvana, agradeço
pela compreensão e incentivo

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela orientação deste trabalho.

- À Luciana Di Ciero Toledo Leme, pós-graduanda (nível Doutorado), do Laboratório de Química de Proteínas, pela co-orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Jürgen K. P. Weder do Institut Für Lebensmittelchemie, da Technische Universität München, Munique, Alemanha, pela realização dos experimentos de focalização isoelétrica.

- Ao Dr. Romeu Benatti Junior (Instituto Agronômico de Campinas) e ao Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), pelo fornecimento de sementes de *Crotalaria*.

- À pós-graduanda Kátia Viviane, do Departamento de Fisiologia Vegetal pela amizade e colaboração.

- Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, por valiosas sugestões neste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Benedito Oliveira, pelo carinho e amizade.

- Ao pós-graduando Marcos Toyama, pela confecção dos gráficos do HPLC e resultados da análise de aminoácidos.

- Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica da UNICAMP que, direta ou indiretamente, auxiliaram-me na realização deste trabalho.

- À todos os amigos do Laboratório de Química de Proteínas e do Departamento de Bioquímica, pela convivência agradável durante esta jornada.

- À CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida

ABREVIATURAS

ATEE	acetil-tirosil-etil-éster
BAPNA	N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BTPNA	N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida
CjnrTI	inibidor de tripsina de <i>Crotalaria juncea</i> não resistente
CjrTI	inibidor de tripsina de <i>Crotalaria juncea</i> resistente
CpTI	inibidor de tripsina de <i>Crotalaria paulina</i>
DEAE	dietilamino etil
DMSO	dimetil sulfóxido
HPLC	high performance liquid chromatography
IEF	focalização isoeletrica
kDa	quilodalton
Ki	constante de inibição
mA	miliampere
NPGB	p-nitrofenil-p-guanidinobenzoato
PITC	fenil-isotiocianato
PSA	persulfato de amônio
PTC	feniltiocarbamil
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TFA	ácido trifluoracético
TRIS	hidroximetil amino metano

ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviação (3 letras)	Símbolo (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

ÍNDICE

	pg
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 Família Leguminosae	01
1.1.1 Gênero Crotalaria	01
1.2 Enzimas proteolíticas	02
1.3 Inibidores de proteinases	05
1.3.1 Inibidores sintéticos	05
1.3.2 Inibidores protéicos de origem vegetal	06
1.3.3 Mecanismo de ação dos inibidores	09
1.3.4 Família de inibidores	10
1.3.4.1 Inibidores do tipo Bowman-Birk	10
1.3.4.2 Inibidores do tipo Kunitz	12
1.3.4.3 Inibidores do tipo Batata I e Batata II	14
1.3.4.4 Inibidores do tipo abóbora	15
1.4 Papel fisiológico dos inibidores de proteinases em sementes	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS	18
3.1 Material vegetal	18
3.2 Enzimas e substratos	18
3.3 Resinas	18
3.4 Reagentes para eletroforese e análise de aminoácidos	18
4.MÉTODOS	19
4.1 Dosagem enzimática	19
4.1.2 Titulação da concentração de tripsina ativa	19
4.1.3 Hidrólise de substratos cromogênicos	20
4.1.4 Medida da inibição sobre tripsina	20
4.2 Determinação das constantes de inibição	20
4.3 Extração e purificação do inibidor de tripsina a partir das sementes de <i>C. paulina</i> , <i>C. juncea</i> resistente e <i>C. juncea</i> não resistente à murcha bacteriana	21
4.3.1 Preparo do extrato de sementes para determinação do Ki	21
4.3.2 Precipitação das proteínas por acetona 80%	21
4.3.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50	21
4.3.4 Cromatografia de fase reversa em HPLC	22
4.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE SDS (10-20%)	23
4.3.6 Análise automática de aminoácidos	24
4.4 Preparo do extrato de inibidor de tripsina a partir de sementes de <i>C. paulina</i> , <i>C. juncea</i> resistente e <i>C. juncea</i> não resistente à murcha bacteriana para determinação da atividade do inibidor contra tripsina e α -quimotripsina, bovina, porcina e humana.	25
4.4.1 Determinação da atividade de tripsina	26

4.4.2	Determinação da atividade de quimotripsina	26
4.4.3	Determinação da atividade do inibidor sobre tripsina bovina e porcina	26
4.4.4	Determinação da atividade do inibidor sobre quimotripsina bovina e porcina	27
4.5	Preparo do extrato do suco duodenal bruto humano	28
4.5.1	Determinação da atividade de tripsina e quimotripsina no suco duodenal humano	28
4.5.2	Determinação direta da atividade inibitória de sementes de <i>Crotalaria paulina</i> sobre tripsina	28
4.6	Focalização isoeétrica e identificação dos inibidores de tripsina	29
5.	RESULTADOS	31
5.1	Detecção da presença de inibidor de tripsina nas sementes	31
5.2	Dosagem da atividade inibitória dos extratos salinos de CpTI, CjNRTI e CjNRTI sobre tripsina bovina	32
5.3	Purificação do inibidor de tripsina	35
5.3.1	Precipitação acetônica	35
5.3.2	Determinação das constantes de inibição (K _i)	38
5.3.3	Cromatografia de troca iônica em DEAE - Sephadex A-50	38
5.3.4	Cromatografia de fase reversa em HPLC	40
5.3.5	Controle do rendimento da purificação	42
5.3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS (10-20%)	43
5.3.7	Análise de aminoácidos do CpTI	47
5.3.8	Determinação da atividade do inibidor de tripsina de CpTI, CjRTI e CjNRTI	48
6.	DISCUSSÃO	50
7.	RESUMO	56
8.	SUMMARY	57
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



Exemplar adulto de *Crotalaria paulina*

1.INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae compreende 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies e é uma das três maiores famílias entre as Angiospermas, depois das Compositae e Orchidaceae (Heywood, 1971).

Entre as Leguminosas estão algumas das espécies economicamente mais importantes do mundo, provendo uma ampla variedade de fontes de alimento, principalmente de sementes. São também utilizadas como plantas forrageiras, para alimentação animal e na produção de madeira em partes temperadas e tropicais do mundo (Heywood, 1971).

A família Leguminosae pode ser subdividida em três sub-famílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae. A sub-família Papilionoideae (ou Faboideae) é muito maior do que as outras sub-famílias e compreende aproximadamente 500 gêneros e 12.000 espécies. Aproximadamente 30 gêneros contêm 100 ou mais espécies, como por exemplo, *Desmodium* (350-450 espécies), *Erythrina* (100 - 200 espécies) e *Crotalaria* (500 espécies) (Dickison, 1981)

1.1.1 O Gênero Crotalaria

O gênero *Crotalaria* é composto por espécies que se distribuem amplamente pelos Continentes Asiáticos, Africanos, Australiano e Americano. Em relação ao cultivo, as plantas desenvolvem-se rapidamente e requerem pouco cuidado após seu plantio.

Sob o ponto de vista econômico, algumas espécies merecem destaque, como por exemplo, *Crotalaria brevidens*, que é cultivada para forragem verde e controle de

erosão do solo, na África tropical; *Crotalaria juncea* é cultivada para produção de fibras em vários países, inclusive o Brasil e serve, também, de alimento para alguns animais, como cavalos, na antiga União Soviética e porcos na Rodésia; *Crotalaria pallida* serve para pastagens, e as sementes algumas vezes são usadas como substituto para o café, e *Crotalaria spectabilis*, cultivada nos USA para forragem verde, alimentação para o gado e como planta ornamental (Duke, 1980).

Algumas dessas espécies são usadas, também, em medicina popular. como por exemplo, a *Crotalaria juncea*, onde as sementes são usadas para purificar o sangue, no tratamento de impetigo e psoríase; e da *Crotalaria spectabilis*, onde as plantas são usadas no tratamento de escabiose e impetigo na Índia.

O gênero é reconhecido por apresentar várias substâncias venenosas, entre elas, os alcalóides e a monocrotalina, sendo esta última extremamente venenosa para animais domésticos (Duke, 1980).

1.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As enzimas proteolíticas ou proteinases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. Na literatura, os três termos, proteinase, protease e endopeptidase, são usados como sinônimos. O termo proteinase refere-se às enzimas que têm atividade endopeptidase, ou seja, habilidade em clivar ligações peptídicas internas em proteínas com a produção de peptídeos, e o termo peptidase refere-se às enzimas que não têm atividade endopeptidase mas liberam resíduos de aminoácidos C- ou N- terminal de peptídeos e ou proteínas (Mikola, 1983). Alguns exemplos dessas proteinases são: tripsina, quimotripsina, pepsina, presentes em animais e a papaína, bromelaína e ficina, em vegetais (White et al., 1986). O papel das enzimas proteolíticas em todas as formas de vida pode ser visto como parte de um processo global de renovação de proteína. Essas proteinases adquiriram um alto grau de especialização durante sua evolução biológica, restringindo seu mecanismo de ação sobre ligações peptídicas específicas. Muitos processos biológicos são regulados por este tipo de ação de proteinases, por

exemplo, coagulação do sangue e fibrinólise, a liberação de proteínas hormonais de precursores moleculares, o transporte de proteínas secretoras através da membrana, ativação do sistema de complemento, fertilização, germinação e controle da digestão proteolítica (Neurath & Walsh, 1976).

As enzimas proteolíticas são indispensáveis para os processos fisiológicos em animais, mas se não forem adequadamente controladas, podem representar um risco em potencial, destruindo componentes protéicos celulares e teciduais (Neurath, 1983). A natureza desenvolveu dois mecanismos básicos de regulação, cuja finalidade é controlar a atividade proteolítica. Um desses mecanismos é a ativação de precursores de proteinases inativos (zimogênios) por proteólise limitada, que consiste na quebra específica de algumas ligações peptídicas, sendo essa especificidade determinada pelo acesso da enzima à ligação peptídica alvo na proteína a ser hidrolisada, na formação do complexo enzima-substrato (Neurath, 1983); o outro mecanismo envolve a inativação de proteinases pela formação de complexos com inibidores protéicos, com a complementariedade do substrato ao sítio ativo da enzima, com a formação do complexo enzima-inibidor (Laskowski & Kato, 1980).

A importância fisiológica de ambos os mecanismos tem sido demonstrada em certas doenças que estão relacionadas à deficiência de zimogênios funcionais ou inibidores de proteinases, respectivamente. Por exemplo, vários tipos de hemofilias hereditárias são decorrentes da deficiência de uma ou outra proteinase do plasma que normalmente ativa zimogênios na cascata da coagulação sanguínea; em outros casos, enfisema pulmonar, uma mutação genética em α -1 inibidor prejudica sua secreção no fígado, resultando em concentrações anormalmente baixas no plasma e, conseqüentemente, em destruição do tecido conectivo do alvéolo pulmonar por elastase de leucócitos (Neurath, 1983).

As enzimas proteolíticas encontradas na natureza podem ser subdivididas em seis grupos principais, que são caracterizados pela natureza de seus sítios ativos e mecanismo de reação envolvidos (Richardson, 1977). Estas enzimas (Tabela 1) são: serinoproteinases I, serinoproteinases II, cisteinoproteinases, metaloproteinases I, metaloproteinases II, e proteinases ácidas (Neurath, 1983).

Família	Proteínases representativas	Componentes característicos do sítio ativo
Serinoproteínases I	Quimotripsina, Tripsina Elastase, Calicreínas	Asp(102), Ser(195), His(57)
Serinoproteínases II	Subtilisina	Asp(32), Ser(221), His(64)
Cisteínoproteínases	Papaína, Actinidina Catepsinas B e H de fígado de rato	Cys(25), His(159), Asp(158)
Proteínases ácidas	Penicilopepsina, Pepsina <i>Rhizopus chinensis</i> <i>Endothia parasítica</i> Renina	Asp(33), Asp(213)
Metaloproteínases I	Carboxipeptidase bovina A e B	Zn, Glu(270), Tyr(24)
Metaloproteínases II	Termolisina	Zn, Glu(143), His(23)

Tabela 1. Famílias de enzimas proteolíticas

Cada família de proteínases tem sua característica fixada em certos resíduos de aminoácidos arrançados em uma configuração particular para formar o sítio ativo. Acredita-se que membros de uma família evoluíram de um ancestral comum. Dessa forma, as serinoproteínases incluem duas famílias distintas que presumivelmente, evoluíram independentemente entre si, por exemplo, as serinoproteínases de mamíferos tal como quimotripsina, difere de certas serinoproteínases de bactérias, tal como a subtilisina em sequência de aminoácidos e conformação tridimensional, e o ancestral comum não é provavelmente o mesmo (Neurath & Walsh, 1976). De maneira semelhante, a carboxipeptidase pancreática de mamíferos e a enzima termolisina de bactérias, cada uma contendo um átomo de zinco responsável pela catálise, têm configuração no sítio ativo muito similar, mas não sustentam nenhuma outra relação estrutural ou evolucionária entre si (Neurath & Walsh, 1976).

A classe de enzimas mais bem estudada e bem caracterizada é a das serinoproteínases, tendo como exemplo, tripsina, quimotripsina e elastase, que são secretadas pelo pâncreas de animais na forma de zimogênios e são ativadas no trato intestinal por modificações proteolíticas (Barret, 1986; Neurath, 1989). Essas enzimas têm sido os melhores modelos para estudos sobre a estrutura, função e mecanismos de ação das serinoproteínases, sendo a tripsina a serinoproteínase

que mais contribuiu para isso. É um importante grupo que tem serina e histidina em seu centro ativo, que participam diretamente no mecanismo de catálise (Richardson, 1977; Hartley, 1960), o qual envolve a formação de um complexo covalente com o substrato. No mecanismo de ação dessas serinoproteinases, principalmente do tipo tripsina, ocorre a formação de um tetraedro intermediário durante a transferência de prótons do resíduo Ser (195) para o resíduo His (57) e, em seguida, deste para o resíduo Asp (102). Esta transferência de prótons acaba gerando uma carga negativa que irá promover a catálise, por meio de um ataque nucleofílico aos radicais carbonila dos resíduos de Arg ou Lys dos substratos (Warshel et al., 1989).

As serinoproteinases possuem um pH ótimo de ação de aproximadamente 8,0 e massa molecular em torno de 25 kDa. Em geral, três tipos de especificidades são encontradas nas serinoproteinases: enzimas do tipo tripsina que clivam proteínas na ligação peptídica, onde estão presentes os resíduos de Lys e Arg; enzimas do tipo quimotripsina, que clivam nos resíduos hidrofóbicos do substrato, tais como Tyr ou Phe; e enzimas do tipo elastase que clivam quando pequenos resíduos hidrofóbicos, tais como Ala, estão presentes no substrato (Ryan & Walker-Simmons, 1981; Dickerson & Geis, 1969).

1.3 INIBIDORES DE PROTEINASES

Os inibidores de proteinases podem ser compostos sintéticos, de baixo peso molecular (Walsh & Wilcox, 1970); ou proteínas com alta especificidade (Laskowski Jr. & Sealock, 1971), que reduzem a velocidade de reações enzimáticas através da formação de um complexo enzima-inibidor.

1.3.1 Inibidores sintéticos

Os inibidores sintéticos ligam-se covalentemente e irreversivelmente ao resíduo de um aminoácido essencial para a função enzimática (Walsh & Wilcox, 1970). A serina e a histidina nos sítios ativos das serinoproteinases podem reagir especificamente e estequiometricamente com vários reagentes que inativam

completamente e irreversivelmente as enzimas. Esses inibidores incluem reagentes tais como PMSF (Fenilmetano sulfonil fluor) e DFP (Diisopropil fluorofosfato), que reagem com a serina do sítio ativo da maioria, se não todas, serinoproteínases, e TLCK (N-tosil- L-lisina-clorometil cetona) ou TPCK (N- tosil - l fenilalanina-clorometil cetona), que reagem especificamente com a histidina do sítio ativo das enzimas do tipo tripsina e quimotripsina, respectivamente e PCMB (p-cloro-mercuribenzoato), específico para cisteínoproteínases (Ryan & Walker-Simmons, 1981).

1.3.2 Inibidores protéicos de origem vegetal

Os inibidores protéicos podem ser definidos como proteínas, que associadas às proteinases, formam um complexo estequiométrico, inibindo competitivamente a atividade proteolítica (Laskowski Jr. & Sealock, 1971).

Os vegetais, de maneira geral, contêm inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas. Alguns inibidores foram bem caracterizados e o seu mecanismo de ação tem sido objeto de considerável atenção. Revisões sobre esse assunto foram publicados por Vogel et al., 1968; Laskowski Jr. & Sealock, 1971; Tschesche 1974; Richardson 1977; Laskowski Jr. & Kato, 1980; Xavier-Filho & Campos, 1984; Richardson, 1991. Esses inibidores são tipicamente polipeptídeos contendo alta porcentagem de resíduos de meia-cistina, presentes como ligações dissulfeto; outros, contêm poucos resíduos de meia-cistina, apresentando uma ou duas pontes dissulfetos. Esses inibidores são deficientes ou destituídos de resíduos de metionina, histidina e triptofano, e possuem alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina. (Ryan & Walker-Simmons, 1981; Kortt & Caldwell, 1990).

A massa molecular desses inibidores vegetais varia de 8 a 25 kDa, sendo moléculas extremamente estáveis, resistente ao calor, a variações de pH, e à proteólise por proteinases, eventualmente por aquelas que eles não inibem. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfetos e outras interações não covalentes que também contribuem significativamente para a estabilidade dos inibidores (Belitz & Weder, 1990).

A especificidade de inibição exibida por estas proteínas é altamente variável e muitos dos inibidores de tripsina também inibem quimotripsina (Vogel et al., 1968; Kassel, 1970). Em alguns casos, o sítio reativo é o mesmo para ambas enzimas (Bidlingmeyer et al., 1972), ou a inibição ocorre através de sítios reativos independentes (Ikenaka et al., 1974; Stevens et al., 1974).

Há poucos relatos que inibidores de serinoproteinases são ativos contra enzimas de outros grupos. Por exemplo, um inibidor de tripsina e quimotripsina purificado por Warsy et al., (1974) inibiu também papaína, uma importante cisteinoproteinase.

Alguns inibidores bifuncionais efetivos de enzimas têm sido isolados de plantas e pertencem a classes completamente diferentes, como por exemplo, inibidores extraídos de milho e cevada que inibem tanto tripsina como amilases (Richardson et al; 1987;.Odani et al., 1983).

Muitos dos trabalhos recentes sobre inibidores de proteinases de origem vegetal concentram quase que exclusivamente sobre os inibidores de tripsina, uma importante serinoproteinase do trato digestivo de animais (Richardson, 1977).

Esses inibidores de proteinases são usualmente encontrados nas sementes e tubérculos, particularmente nas famílias leguminosas, gramíneas e solanáceas, onde eles representam um percentual elevado da proteína total. Pode-se encontrar em um único tecido vegetal várias espécies de inibidores que são específicos para um amplo espectro de serinoproteinases de origem animal e microbiana. Esses inibidores podem pertencer à famílias diferentes, que não estejam relacionadas, ou eles podem estar estritamente relacionados com formas de iso-inibidores diferindo somente em poucos aminoácidos.

Esses inibidores são classificados de acordo com a classe de enzimas que inibem. Assim, podemos ter inibidores de serinoproteinases, cisteinoproteinases, metaloproteinases e proteinases ácidas, ou ainda inibidores multifuncionais, que podem inibir duas ou mais diferentes classes de enzimas (Richardson, 1991).

Os inibidores mais estudados até o momento são aqueles que inibem enzimas pertencentes à família das serinoproteinases (Ryan, 1981). Esses inibidores de proteinases de plantas têm sido estudados extensivamente em leguminosas, por causa de sua importância como fonte básica de proteínas (Richardson, 1977).

As sementes de leguminosas são reconhecidas por serem uma excelente fonte de proteínas (Richardson, 1977). Apresentam baixos teores lipídicos, com exceção, por exemplo, de *Glycine max* (soja) e *Arachis hypogaea* (amendoim), bem como elevado teor de carboidrato (Belitz & Grosch, 1988). As sementes dessas plantas contêm, ainda, substâncias antinutritivas, como os inibidores de proteinases, phytohemaglutininas (lectina), taninos, etc., que provocam efeitos adversos quando ingeridos na dieta, podendo interferir direta ou indiretamente na digestão e absorção de proteínas, ou por afetar as funções de digestão e absorção das células intestinais limitando, assim, o uso dessas sementes na nutrição humana e animal. Destas substâncias, os inibidores de proteinases são alguns dos compostos antinutritivos mais importantes e que merecem uma atenção especial (Pusztai, 1986).

A descoberta de proteínas termolábeis em soja, que inibem a atividade proteolítica da tripsina, levou a conclusão que os inibidores de tripsina são responsáveis pela baixa absorção das proteínas da soja, quando ingeridos sem tratamento prévio. É bem estabelecido que alimentação de soja crua e muitos produtos de leguminosas que contêm altos níveis de inibidores de proteinases quando testados em animais experimentais tais como ratos, camundongos e pintos, conduz ao aumento de depressão, hipertrofia e/ou hiperplasia pancreática, bem como decréscimo na taxa de crescimento. (Liener & Kakade, 1980; Gallaher & Schneeman, 1984; Pusztai, 1986; Birk & Applebaum, 1985; Pearce et al., 1979).

Embora os inibidores sejam compostos termolábeis, alguma atividade residual ainda permanece, mesmo após o tratamento térmico (Churrela et al., 1976). Inibidores de lentilhas purificados por Weder & Link, (1993), mostraram uma considerável habilidade em inibir tripsina humana (HT) e quimotripsina humana (HCT), após aquecimento (95°C-2 hr). A estabilidade destes inibidores, está provavelmente, relacionada com sua estrutura compacta, estabilizada por pontes de dissulfetos (Weder et al., 1992).

A primeira indicação de um inibidor de proteinase em plantas foi publicada em 1938 por Read & Haas e, posteriormente, seguido pela demonstração de inibição de tripsina por extratos de *Glycine max* (soja) por Ham et al (1945) e Bowman, (1946). O interesse nestes estudos de inibidores enzimáticos de plantas começou na

década de 40 quando Kunitz (1945) isolou e purificou uma proteína termo-lábil de soja que inibia tripsina, uma importante enzima proteolítica do sistema digestivo (Richardson, 1991). Desde então, quase todas as espécies de leguminosas estudadas têm mostrado a presença destes inibidores (Liener & Kakade, 1980).

Portanto, há um interesse muito grande por parte dos pesquisadores em utilizar os inibidores de plantas no tratamento de amplas desordens metabólicas que são associadas com aumento da atividade proteolítica, tais como: pancreatite, enfizema, inflamação, coagulação sanguínea. (Richardson, 1991).

1.3.3 Mecanismo de ação dos inibidores

O mecanismo de reação entre serinoproteinases e inibidor é estritamente competitiva, formando um complexo 1:1 enzima-inibidor, onde a atividade da enzima é completamente abolida (Laskowski & Kato, 1980). Todos os estudos indicam que os inibidores agem como um substrato altamente específico para a enzima, inibindo uma única ligação peptídica chamada ligação peptídica do sítio ativo (Neurath, 1983).

O mecanismo de interação das serinoproteinases com pequenos inibidores protéicos foi verificado através de estudos de difração de raios X e espectroscopia de ressonância nuclear magnética. A proposta elaborada sugere que o radical hidroxila do resíduo Ser(posição 195).da enzima interage com o sítio ativo do inibidor, formando um complexo covalente estável do tipo enzima-inibidor, mas complexos intermediários instáveis também ocorrem no curso de reações (Matheson et al., 1991).

Uns poucos resíduos de aminoácidos, 10 - 12 , estão em contato com a enzima. Esses resíduos de aminoácidos no sítio reativo do inibidor determinam a especificidade da interação (Belitz & Weder, 1990).

Quando o sítio reativo é ocupado por um aminoácido lisina ou arginina, e for reconhecido pela tripsina ou enzima do tipo tripsina, o inibidor é um inibidor de tripsina. Quando o sítio reativo apresenta triptofano, fenilalanina, tirosina ou leucina, o inibidor é um inibidor de quimotripsina. Assim, dependendo do tipo de resíduo de

aminoácido no sítio reativo do inibidor, existe uma enzima específica que atua sobre este inibidor.

1.3.4 Família de inibidores

Os inibidores de serinoproteinases presentes em plantas são classificados em famílias através de características da homologia na estrutura primária, massa molecular e conteúdo de cisteína.

Existem várias famílias de inibidores: família Kunitz, família Bowman-Birk, família tipo Batata I, família tipo Batata II, família tipo abóbora, a superfamília de inibidores de cereal, família Taumatina /PR-proteínas, família Ragi I-2 e família cistatina (Richardson, 1991). Entre as várias famílias de inibidores existentes, as mais estudadas são: família Bowman-Birk, família Kunitz, família Batata I e Batata II.

Tabela 2.

Família	MONÔMERO		Enzimas inibidas	Distribuição
	Massa molecular (kDa)	Cys		
1. Bowman-Birk	8-9	14(18)	tripsina, quimotripsina, elastase	Leguminosae
2. Kunitz	21-22	4	tripsina, quimotripsina, subtilisina, calicreína	Leguminosae Gramineae Araceae Alismataceae
3. Batata I	8-9	0-2	quimotripsina tripsina subtilisina	Solanaceae Gramineae Leguminosae Cucurbitaceae
4. Batata II	6-12	8	tripsina, quimotripsina	Solanaceae

Tabela 2. Famílias dos inibidores de serinoproteinases de plantas

1.3.4.1 Inibidores do tipo Bowman-Birk

Os primeiros inibidores de sementes a terem suas seqüências de aminoácidos determinadas foram os assim-chamados inibidores de proteinases Bowman-Birk de (*Phaseolus lunatus*) (Tan & Stevens, 1971) e (*Glycine max*) (Odani & Ikenaka, 1972). Este tipo de inibidor é amplamente distribuído em sementes de leguminosas e em cereais, principalmente em milho. Outras seqüências homólogas de aminoácidos têm sido encontrada nos inibidores de *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) (Wilson & Laskowski, 1975), *Vigna angularis* (feijão adzuki) (Ishikawa et al., 1985), *Vigna radiata* (feijão mung) Chi et al., 1982; Wilson & Chen, 1983). As proteínas desta família são caracterizadas por apresentarem massa molecular em torno de 8-12 Kda, aproximadamente 71 resíduos de aminoácidos, dos quais 14 são resíduos de cisteína que formam 7 pontes dissulfetos intramoleculares. Eles são geralmente inibidores "double-headed", de cadeia única, capazes de formar complexos 1:1 com diferentes proteinases (usualmente tripsina e quimotripsina, raramente elastase) em sítios reativos independentes Lys(16)-Ser(17) e Leu(43)-Ser(44), resultando em um complexo ternário (Birk & Applebaum, 1985).

A estrutura covalente do inibidor de tripsina de *Glycine max* (soja) do tipo Bowman-Birk está representada na Figura 1.

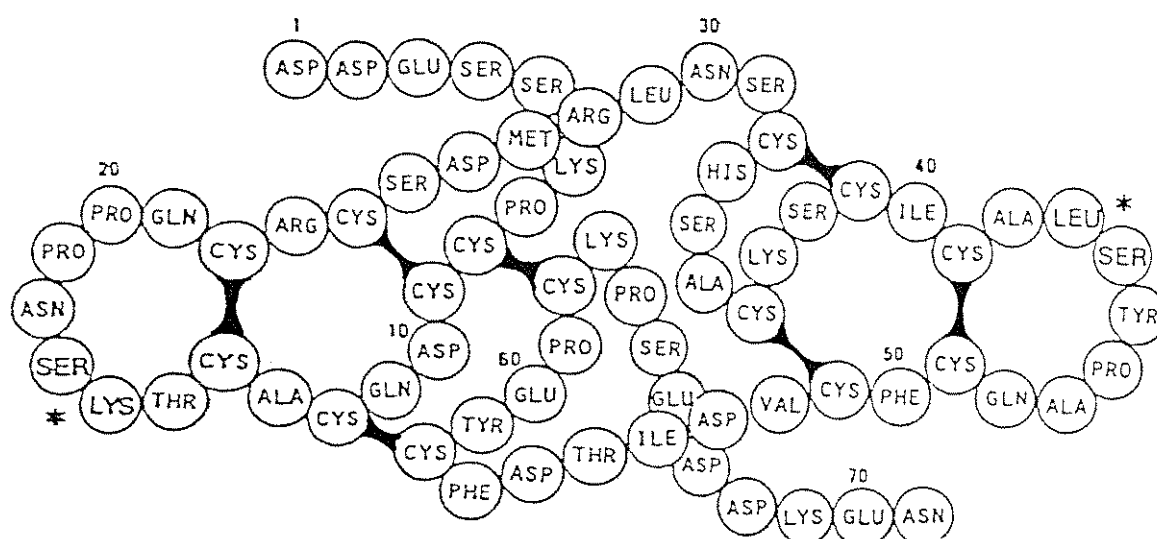


Figura 1. Estrutura covalente do inibidor de tripsina tipo Bowman-Birk de *Glycine max* (soja) (Odani & Ikenaka, 1973).

1.3.4.2 Inibidores do tipo Kunitz

A estrutura primária completa de um inibidor de proteinase do tipo Kunitz de soja foi primeiro elucidado por Koide & Ikenaka, 1973 a,b e Koide et al., 1973) A cadeia única do inibidor apresenta uma massa molecular em torno de 20 kDa, aproximadamente 181 resíduos de aminoácidos, incluindo somente 4 resíduos de cisteína formando 2 pontes dissulfeto (Richardson, 1991). Além do inibidor de tripsina de soja, foram caracterizados os inibidores isolados de outras leguminosas que apresentam homologia com este tipo de inibidor. Esses inibidores foram isolados de *Psophocarpus tetragranulobus* (Shibata et al., 1986), *Erythrina latissima* (Joubert & Sharon, 1985), *Adenantha pavonina* (Richardson, 1986), *Bauhinia petandra* e *Bauhinia bauhinoides* (Oliva et al., 1988), *Enterolobium contortisiliquum* (Batista, 1993), *Acacia confusa* (Wu & Lin, 1993), *Prosopis juliflora* (Monte-Negreiros et al., 1991), *Bauhinia forficata*, *Bauhinia rufa* e *Bauhinia unguolata* (Sallai, 1993).

As sequências de aminoácidos da região N-terminal foram determinadas em inibidores de espécies das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae (Kortt & Jermyn, 1981; Odani et al., 1979; Joubert & Sharon, 1985), e no inibidor de, tripsina e de quimotripsina das sementes de *Peltophorum africanum* (Joubert, 1981) e no inibidor de quimotripsina das sementes de *Schizolobium parahyba* (Souza, 1992), ambas da subfamília Caesalpinoideae.

Os inibidores tipo Kunitz isolados de várias espécies de leguminosas apresentam cadeia polipeptídica única, enquanto os inibidores da subfamília Mimosoideae são compostos por duas cadeias, uma alfa (16 kDa) e uma beta (5 kDa), ligadas entre si por pontes dissulfeto. Segundo Richardson, (1991), essas duas cadeias resultam de um processamento proteolítico de um precursor de cadeia única, mas as causas que determinaram esta clivagem unicamente em espécies da subfamília Mimosoideae são ainda desconhecidas.

Os inibidores de cadeia dupla não se restringem ao grupo das leguminosas (Richardson, 1991). Foram recentemente encontrados em batata (*Solanum tuberosum*) dois inibidores cujas sequências da região N-terminal são homólogas. Um deles é o primeiro inibidor do tipo Kunitz de subtilisina encontrado em plantas dicotiledôneas (Walsh & Twitchell, 1991).

A localização do sítio reativo determinado em inibidores do tipo Kunitz é sempre na posição Arg(63) - Ile(64) em soja (Koide & Ikenaka, 1973a;; Yamamoto et al, 1983; Richardson et al., 1986, Joubert & Dowdle, 1987), enquanto que inibidores isolados de *Acacia confusa* possui os resíduos de Arg(64) - Ile(65) no seu sítio reativo (Wu & Lin, 1993).

Trabalhos recentes mostram que a estrutura primária do inibidor de Catepsina D de tubérculo de batata tem uma grande relação com os inibidores desta família (Mares et al., 1989), e certos cereais isolados de cevada, trigo e arroz, exibem um grau de homologia (20-30%) com os inibidores do tipo Kunitz de leguminosas (Yoshikawa et al., 1976; Odani et al., 1979; Mundy et al., 1984).

A estrutura covalente de um inibidor tipo Kunitz isolado de *Glycine max*, está representada na Figura 2.

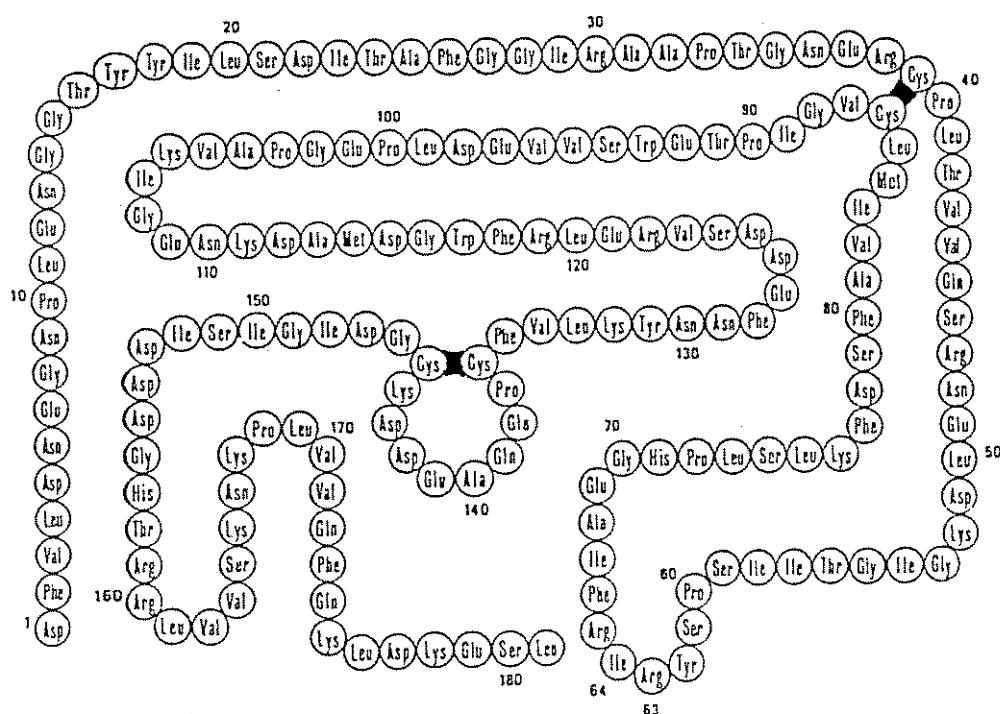


Figura 2. Estrutura covalente do inibidor de tripsina tipo Kunitz de *Glycine max* (Koide & Ikenaka, 1973b).

A tabela 3 mostra alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio reativo de alguns inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk.

Enzima inibida	Resíduos do sítio reativo	Espécies/inibidor
Tripsina	Arg(63)-Ile(64) Lys(16)-Ser(17)	Soybean (Kunitz) Soybean (Bowman-Birk)
Quimotripsina	Arg(63)-Leu(64) Leu(43)-Ser(44)	Soybean (Kunitz) Soybean (Bowman-Birk)

Tabela 3 Sítios reativos de alguns inibidores de proteinases de plantas

1.3.4.3 Inibidores do tipo Batata I e Batata II

Os inibidores do tipo Batata I incluem todos aqueles cuja sequência mostra altos níveis de homologia com o inibidor quimotriptico I isolado de tubérculos de batata (Melville & Ryan, 1972). Este forte inibidor é um pentâmero, de massa molecular 8 kDa, e existem no mínimo, 10 formas isoelétricas diferentes, codificadas por mais de seis genes (Richardson et al., 1977). A sequência de aminoácidos consiste de aproximadamente 70 -71 resíduos e contém baixo teor de cisteína, formando somente uma ponte dissulfeto. Esses inibidores atuam sobre tripsina, quimotripsina e subtilisina (Richardson, 1991). É uma das famílias de inibidores das mais difundidas, presente, também em Solanaceae, Gramineae, Leguminosae, Polygonaceae, Cucurbitaceae e animal (Richardson, 1991; Nasawa et al., 1989). Os inibidores desta família apresentam uma forte homologia com um inibidor extraído da sanguessuga, *Hirudo medicinalis* (Seemuller et al., 1980) e contêm os resíduos Met/Leu(47) - Asp(48) no sítio reativo (Richardson et al., 1977).

O primeiro inibidor tipo batata II a ter sua sequência completa de aminoácidos determinada foi o inibidor de tripsina de *Solanum melongena* (Richardson, 1979).

O sítio reativo deste inibidor foi identificado como sendo a ligação peptídica Arg(38) - Asn(39). Este tipo de inibidor apresenta 96 - 98 resíduos de aminoácidos massa molecular de aproximadamente 12 kDa e possui alto conteúdo de cisteína, formando 6 pontes dissulfetos. Apresenta homologia com inibidores de

carboxipeptidases de batata e tomate (Hass et al., 1975) & (Hass & Hermodson, 1981).

1.3.4.4 Inibidor do tipo abóbora

Os menores inibidores de serinoproteinases conhecidos em plantas são os de tripsina e fator Hageman (fator XII da cascata da coagulação sanguínea), e têm sido isolados de sementes da família Cucurbitaceae (Hojima et al., 1982). Todos contêm aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares de 4 kDa, apenas 3 pontes dissulfetos e apresentam Arg - Ile ou Lys - Ile nos seus sítios reativos (Hara et al., 1989). A substituição química do aminoácido Arg no sitio reativo por uma Ala converte o inibidor de tripsina em um inibidor de elastase. Apesar desses inibidores apresentarem baixa massa molecular, possuem as maiores constantes de inibição entre os inibidores de tripsina já estudados (Wieczorek et al., 1985).

1.4 PAPEL FISIOLÓGICO DOS INIBIDORES DE PROTEINASES EM SEMENTES

Aos inibidores de proteinases vegetais são atribuídos alguns papéis fisiológicos, tais como: proteínas de reserva, reguladores de proteinases endógenas e agentes de defesa contra animais predadores e insetos ou pestes microbianas (Richardson, 1991)

A função de proteínas de reservas é sustentada por sua presença em grandes quantidades em sementes e tubérculos. Esses inibidores representam aproximadamente 6% da proteína de soja e 10% das proteínas solúveis de grãos de cevada ou tubérculos de batata. A presença destes inibidores, em todo caso, é aparentemente transitória, indicando um possível papel de armazenamento temporário, pois em *Vigna radiata* formas modificadas de inibidores do tipo Bowman-Birk aparecem durante a germinação e crescimento da planta. (Wilson & Chen, 1983; Ryan, 1973).

No que diz respeito à regulação de proteinases endógenas, alguns pesquisadores acreditam que essas proteinases nas sementes dormentes estão

inativadas pela presença dos inibidores, e as reservas de alimento são somente utilizadas durante a germinação, por causa das proteinases endógenas que são ativadas com o declínio do conteúdo de inibidores (Richardson, 1977).

Quanto ao papel desses inibidores na proteção das plantas, Green & Ryan, (1972) primeiro demonstraram que ferimentos provocados por injúria mecânica ou por insetos, conduz ao local do ferimento um rápido acúmulo de inibidores de proteinases. Esta resposta de defesa é regulada sistematicamente por um sinal, provavelmente um hormônio chamado fator indutor de inibidor de proteinase (PIIF) (Ryan, 1973).

A bibliografia do assunto revelou o interesse de alguns pesquisadores nas proteínas das sementes de espécies de *Crotalaria*, com destaque para aquelas que atuam como inibidores de enzimas proteolíticas. O relato de que a espécie *Crotalaria juncea* continha inibidor de tripsina foi fornecido por Weder, (1981). Não há nenhum trabalho que relate a purificação desses inibidores de proteinases em espécies de *Crotalaria* e, conseqüentemente, não há nenhuma informação disponível a respeito da ação desses inibidores sobre sistemas fisiológicos.

2. OBJETIVOS

Isolamento e purificação parcial de inibidores de tripsina presentes nas sementes de *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* (variedade resistente e não resistente à murcha bacteriana).

Caracterização físico-química, molecular e determinação das constantes de inibição de serinoproteinases.

Determinação da atividade dos inibidores contra tripsina e α -quimotripsina de diversas fontes animais.

3. MATERIAIS

3.1 Material vegetal

As sementes de *Crotalaria paulina* foram cedidas pelo Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Centro Universitário de Três Lagoas. As sementes de *Crotalaria juncea* (variedade resistente e não resistente à murcha bacteriana) foram cedidas pelo Dr. Romeu Benatti Junior do Instituto agrônômico de Campinas (IAC) Seção de Plantas Fibrosas.

3.2 Enzimas e substratos

As enzimas e substratos utilizados foram: tripsina de pâncreas bovinos (BT) 3,5 U/mg (Merck), tripsina de pâncreas de porco (PT) cristalizada e liofilizada (Serva), tripsina humana (HT), sendo utilizado extrato bruto de suco pancreático humano, α -quimotripsina de pâncreas bovino (BCT) 87U/mg, α -quimotripsina de pâncreas de porco (PCT) foi utilizado tripsina tipo II extrato bruto de pâncreas de porco, onde tem 1,540 ATEE U/mg de quimotripsina (Sigma) α -quimotripsina humana (HCT) foi utilizado extrato bruto de suco pancreático humano, (BAPNA) (MERCK) e (BTPNA) (Sigma)

3.3 Resinas

A resina utilizada para cromatografia de troca iônica foi a DEAE Sephadex A-50, adquirida da Pharmacia Fine Chemical, Suécia e a coluna de fase reversa (sistema de HPLC) foi a μ -Bondapack C18 adquirida da Waters (USA).

3.4 Reagentes para eletroforese e análise de aminoácidos

Os padrões de massas moleculares utilizados foram fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa),

inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa). As demais substâncias foram: dodecil sulfato de sódio (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250, acrilamida, N, N', metilenobisacrilamida, TEMED e persulfato de amônio adquiridos da Bio-rad Laboratories (EUA). Clean gel IEF(Pharmacia), sorbitol (10%), Ampholine (3%), N-acetil- DL-fenilalanina-B-neftilester, Fast Blue B (Merck). Os demais reagentes utilizados foram de grau HPLC.

4. MÉTODOS

4.1 DOSAGEM ENZIMÁTICA

4.1.2 Titulação da Concentração de Tripsina Ativa

O procedimento descrito por Chase & Shaw, (1970) e Sampaio et al., (1984) para titulação de serinoproteinases que hidrolisam ésteres de arginina, por p-nitrofenil-p'-guanidina benzoato (NPGB), foi empregado para determinação da concentração efetiva de solução de tripsina. Este método envolve a formação de um acil-enzima estável e a liberação do p-nitrofenil, que é medido espectrofotometricamente. A reação foi realizada em cubeta de plástico, adicionando-se 5 μ l do substrato NPGB (9,4 mM) a 100 μ l de uma solução recém preparada de tripsina (1mg/ml em HCl 1mM) em meio de tampão barbital 0,06 M pH 8,3 em volume final de 1 ml. A reação foi monitorada a 410nm.

O valor da absorbância, após acilação total, foi multiplicado pelo fator $6,025 \times 10^{-5}$ que considera as condições de ensaio e o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol liberado, fornecendo a molaridade da enzima ativa no meio de reação Walsh, (1970).

As soluções tituladas foram utilizadas para os cálculos de concentração dos inibidores em estudo.

4.1.3 Hidrólise de substratos cromogênicos

Substratos sintéticos derivados da p-nitroanilida foram utilizados para dosagem de tripsina e α -quimotripsina. Estes substratos, peptídeos derivados de p-nitroanilida, tem sido amplamente utilizados, principalmente pela alta sensibilidade, através de medida fotométrica em A405 da p-nitroanilida liberada após a hidrólise enzimática (Erlanger et al., 1961, Oliva et al., 1987). Os ensaios foram realizados em excesso de substrato e o produto de hidrólise (p-nitroanilida) foi acompanhado por verificação da absorbância em 405 nm.

4.1.4 Medida da inibição sobre tripsina

Nestes ensaios o substrato cromogênico utilizado foi o BAPNA 1 mM. Para a dosagem, 10 μ g de tripsina (volume 1mL), foi pré-incubada durante 10 minutos, a 37°C, com diferentes concentrações dos inibidores extraídos de CpTI, CjrTI e CjnrTI, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Decorrido o tempo descrito, 1,0 mL de substrato foi adicionado e a incubação prosseguiu a 37°C por mais 10 minutos. A reação foi interrompida por acidificação pela adição de 500 μ l de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente em 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE INIBIÇÃO

As constantes de inibição das serinoproteinases empregada nos estudos com os inibidores das plantas investigadas, foram calculadas assumindo-se o mecanismo de inibição do tipo "slow, tight - binding" e a formação de um complexo estequiométrico de 1:1 entre enzima e inibidor, computando-se os dados no programa Enziffter.

4.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE TRIPSINA A PARTIR DAS SEMENTES DE *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* RESISTENTE E NÃO RESISTENTE À MURCHA BACTERIANA

4.3.1 Preparo do extrato de sementes para determinação do Ki

Aproximadamente 100g de sementes de cada espécie foram trituradas em um moinho e um material totalmente pulverizado foi obtido. Ao material pulverizado foi adicionada uma solução de NaCl a 10%, permanecendo sob leve agitação por 1 hora em temperatura ambiente (25°C), para a extração das proteínas. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e centrifugada a 3000 x g, por 20 minutos a 4°C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante utilizado nos passos posteriores. Esta extração foi feita para a determinação do Ki do inibidor contra tripsina.

4.3.2 Precipitação das proteínas por acetona 80%

O fracionamento das proteínas extraídas em NaCl 10% foi realizado por adição lenta de acetona gelada ao sobrenadante obtido na etapa anterior, sob agitação, em câmara fria, até concentração final de 80% (v/v). Após um período de decantação (30 minutos), parte da acetona foi retirada e a fração restante foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado protéico foi espalhado em placas de Petri e seco à temperatura.

4.3.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sephadex A-50

O material, precipitado com acetona, foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, dialisado contra água destilada por 24 em câmara fria e submetido a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE Sephadex A-50, medindo (27 x 1,8 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0.

A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio até que a absorbância em 280 nm, do material efluente, fosse menor que 0,02. Foram aplicados 15 ml deste material no topo da coluna.

As frações eluídas em um gradiente linear de tampão Tris-HCl 0,05 M / NaCl (0 a 0,5 M), pH 8,0, foram coletadas num volume de 2,0 ml por tubo em fluxo descendente de 12 ml/h. A leitura dos eluatos foi realizada por absorção em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV 1201, no comprimento de onda de 280nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A atividade inibitória foi acompanhada pela dosagem da atividade residual de tripsina, sobre BAPNA. O pool ativo foi dialisado contra água destilada por um período de 24 horas em câmara fria e, em seguida, liofilizado e reservado a -20°C.

4.3.4 Cromatografia de fase reversa em HPLC

O material ativo proveniente da cromatografia de troca iônica em Sephadex A-50, foi submetido a uma cromatografia de fase reversa, sistema HPLC modelo PDA/991, equipado com duas bombas Waters modelo 510. Foi usado injetor automático de amostra Waters modelo U6K e uma coluna μ -Bondapack C18 (3,9 x 30 cm), equilibrada em solução de TFA 0,1% em água filtrada no sistema milli Q (solvente A). O material (500 μ g/200 μ L de TFA 0.1%) aplicado à coluna foi eluído com gradiente de TFA 0,1% em acetonitrila (solvente B), conforme a tabela 4. A absorbância foi acompanhada em 220 nm.

Tempo (min)	Solvente A(%)	Solvente B(%)
5	100	0
10	31	69
18	31	69
19	30	70
27	30	70
28	29	71
36	29	71
40	0	100
45	0	100
48	100	0

Tabela 4. Gradiente utilizado no HPLC para eluição do material aplicado à coluna de μ -Bondapack C18.

O material proveniente do HPLC foi liofilizado para ser analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida e para determinação da composição de aminoácidos.

4.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS (10-20%)

A análise eletroforética das proteínas foi feita segundo Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi preparado sob um gradiente 10 a 20% de acrilamida (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida). O gel de corrida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,8, contendo, SDS 0,2%, PSA 0,025% (100mg/mL) e TEMED 0,05%, em volume final de 8 mL para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida foi preparado o gel superior, de aplicação de amostras, usando-se acrilamida 5% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo 0,5% de SDS, 0,05% de PSA (100mg/mL) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2 mL. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras liofilizadas, proveniente da troca iônica em DEAE Sephadex A-50 e do HPLC, foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerina e 0,02% de azul de bromofenol. No caso das amostras reduzidas, empregou-se ditioneitol (100mg/mL) no mesmo tampão. Em seguida foram aplicadas em volume máximo de 40uL. A corrida eletroforética foi desenvolvida em temperatura ambiente, em tampão Glicina/Tris-HCl (0,18 M/0,025 M) pH 8,3, contendo 0,1%(m/v) de SDS com duração aproximada de 2 horas sob corrente de 30 mA. Após a corrida, o gel foi retirado das placas e colocado em uma solução contendo Coomassie Blue R-250 0,25% em metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v/v), para coloração das proteínas. A descoloração do gel, para remoção do excesso de corante e visualização das bandas de proteínas, foi efetuada por lavagem na mistura de metanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v/v).

4.3.6 Análise automática de aminoácidos

O sistema utilizado foi basicamente o do analisador Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos das proteínas é feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos, obtidos de hidrólise ácida (Heinrikson & Meredith, 1984). Estas formas de cromóforos podem ser detectados a níveis de 1 μmol .

Preparação da amostra

40 nmoles do inibidor foram dissolvidos em água e acetonitrila (1:1, v/v) e transferidos para pequenos tubos de reação em um volume de 20 microlitros. Estes foram colocados dentro do frasco de reação, que possui tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

Hidrólise ácida

A hidrólise foi efetuada colocando-se no fundo do frasco de reação 100 μl de uma solução de HCl 6N, onde foi adicionado 1 mg/ml de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Deve-se evitar que o ácido caia dentro dos tubos de reação. Em seguida foi feito vácuo próximo 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo deixou-se entrar nitrogênio (SS - Ultra puro) por 5 segundos. Repete-se estas etapas por três vezes sendo por último vácuo até 1 Torr, fechando o frasco de reação, que é removido para o forno de hidrólise a 105°C por 24 horas. Após este período o tubo de reação foi colocado a vácuo até 65 miliTorr, para secagem da amostra hidrolisada.

Derivatização

A amostra hidrolisada foi lavada com 20 μl de uma solução de metanol: água:triethylamina 2:2:1 (v/v). Cada tubo é agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até a leitura de 65 miliTorr. Este procedimento remove sais e solventes, que possam estar adsorvidos nos aminoácidos.

Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:trietilamina água:feniltiocianato na relação 7:1:1:1 (v/v), sendo adicionados 20 µl a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após derivatização a amostra foi seca à vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a completa remoção de todo o PITC. A amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM fosfato de sódio, cujo pH foi titulado a 7,4 com ácido fosfórico a 10%, sendo adicionado 5% de acetonitrila.

A análise dos PTC aminoácidos foi realizada em HPLC, usando coluna C18/Bondapack em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrila (60%). A identificação de cada aminoácido foi feita com uma corrida padrão de PTC aminoácidos

4.4 PREPARO DO EXTRATO DO INIBIDOR DE TRIPSINA A PARTIR DE SEMENTE DE *Crotalaria paulina* e *Crotalaria juncea* RESISTENTE E NÃO RESISTENTE À MURCHA BACTERIANA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO INIBIDOR CONTRA TRIPSINA E α -QUIMOTRIPSINA, BOVINA, PORCINA E HUMANA

Uma extração alternativa dos inibidores de tripsina de sementes de *Crotalaria* foi feita, como descrito por Weder (1978). Os inibidores foram extraídos em baixo pH com ácido sulfúrico.

5 g de sementes trituradas foram colocadas em solução de H₂SO₄ 0,25N, e deixadas sob agitação durante 1 hora. A solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos. 70mL do sobrenadante foram ajustados para o pH 7,6 com NaOH. Completou-se o volume para 100 mL com tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,6 / 66mM CaCl₂.

4.4.1 Determinação da Atividade de Tripsina

Foi feita uma curva de calibração das enzimas pré-tituladas. Uma solução de 0,1mg/ml de tripsina dissolvida em HCl 1 mM foi pipetada em tubos de ensaio em quantidades crescentes de 0,05 a 0,25 ml em duplicata, e acrescentando tampão tris-HCl 0,2 M/CaCl₂ 66mM pH 7,6 até o volume final de 2,9 ml. Após a incubação por 10 minutos a 30°C foi acrescentado em intervalos regulares cronometrados, 0,1 ml de uma solução de BAPNA de 5mg/ml em dimetil sulfóxido (DMSO). A incubação prosseguiu por mais 10 minutos a 30°C, sendo interrompida com ácido acético 30%, no mesmo intervalo e ordem em que se acrescentou BAPNA. A absorbância foi monitorada a 405 nm. As enzimas utilizadas neste experimento foram tituladas conforme descrito anteriormente.

4.4.2 Determinação da Atividade de Quimiotripsina

A curva de calibração da quimiotripsina foi feita com a enzima titulada com sulfona do ácido 2-hidróxi-5-nitro-benzeno-sulfônico. Uma solução 0,2 mg/ml de quimiotripsina dissolvida em 1mM de HCl foi pipetada em tubos de ensaio em quantidades crescentes de 0,05 a 0,30 ml em duplicata, e acrescentando tampão tris-HCl 0,2 M, CaCl₂ 66mM pH 7,6 até o volume final de 2,9 ml. Após incubação por 5 minutos a 30°C em banho maria, foi acrescentado em intervalos regulares cronometrados 0,3 ml de uma solução de BTPNA de 0,81 mg/ml em dimetil formamida. A incubação prosseguiu por mais 15 minutos a 30°C, sendo interrompida com ácido acético 30%, no mesmo intervalo e ordem em que se acrescentou BTPNA. A Absorbância foi monitorada a 405 nm.

4.4.3 Determinação da atividade do inibidor sobre tripsina bovina e porcina

A determinação da quantidade do inibidor nos extratos foi feita pela inibição da tripsina medida sobre o BAPNA. Foram pipetados de 0,2 a 0,8 ml da amostra de

inibidor em solução e adicionados 0,2 ml da solução de tripsina, com um volume final de 2,9 ml, em tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6/66mM CaCl₂. Para os tubos de referência foram misturados 0,2 ml da solução de tripsina com 2,7 ml de tampão em duplicata. Após a pré-incubação por 10 minutos a 30°C, a reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml da solução de BAPNA, em intervalos regulares cronometrados. Incubou-se 10 minutos a 30°C, interrompendo a reação com ácido acético 30%. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

A quantidade de tripsina reativa em cada amostra foi calculada a partir de uma curva de calibração. A porcentagem de inibição para cada amostra de inibidor em um experimento foi calculada, pela relação da tripsina reativa na amostra contendo inibidor e o valor médio das amostras de tripsina controle. A porcentagem de inibição foi plotada contra a quantidade de inibidor (ml da amostra). O início da curva foi extrapolado para 50 ou 100 % de inibição. Foi, então, calculada a quantidade de tripsina que é inibida por 1g das preparações.

4.4.4 Determinação da atividade do inibidor sobre quimotripsina bovina e porcina

A determinação da quantidade do inibidor nos extratos foi feita pela inibição da quimotripsina medida sobre o BTPNA. Foram pipetados de 0,2 a 0,8 ml da amostra de inibidor em solução. Foram adicionados 0,2 ml da solução de tripsina e o volume completado foi de 2,7 ml com tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,6/66mM CaCl₂. Para os tubos de referência misturou-se 0,2 ml da solução de tripsina com 2,5 ml de tampão em duplicata. Após a pré-incubação por 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada pela adição de 0,3 ml da solução de BTPNA, em intervalos regulares cronometrados. Incubou-se 15 minutos a 30°C, interrompendo a reação com ácido acético 30%. A absorbância foi monitorada a 405 nm.

A quantidade de quimotripsina reativa em cada amostra foi calculada a partir de uma curva de calibração. A porcentagem de inibição para cada amostra de inibidor em um experimento foi calculada, pela relação da tripsina reativa na amostra contendo inibidor e o valor médio das amostras de tripsina controle. A porcentagem de inibição foi plotada contra a quantidade de inibidor (ml da amostra). O início da

curva foi extrapolado para 50 ou 100 % de inibição. Foi, então, calculado a quantidade de tripsina que é inibida por 1g das preparações.

4.5 Preparo do extrato do suco duodenal bruto humano

O suco duodenal bruto foi obtido em hospital local e conservado a temperatura de -20°C até ser usado no experimento. Após o descongelamento do material, este foi filtrado em papel 589³ banda azul, imediatamente antes da utilização. O suco pancreático foi diluído de tal forma que a leitura espectrofotométrica da reação com o BAPNA foi igual à leitura da curva de calibração da tripsina bovina.

Dessa forma, os resultados dos ensaios foram dados através da curva de calibração da tripsina bovina.

4.5.1 Determinação da atividade de tripsina e quimotripsina no suco duodenal humano

Para se calcular a quantidade de tripsina ou quimotripsina humana no suco duodenal bruto humano é feita uma curva de calibração comparativa à curva de calibração da tripsina ou da quimotripsina bovina.

O suco duodenal bruto clarificado foi diluído em HCl 0,005M de modo que 0,2 ml da solução apresentasse a mesma leitura em absorbância A 405nm, sendo os mesmos valores observados para tripsina e quimotripsina bovina quando se fez a curva de calibração destas, de acordo com a enzima que se quer determinar a atividade. Estes resultados apresentaram uma curva linear, podendo ser comparado com as enzimas bovinas.

4.5.2 Determinação direta da atividade inibitória de sementes de *Crotalaria* sobre tripsina.

Foi feita uma focalização isoeletrica que permitiu analisar a atividade inibitória de tripsina em preparações do extrato de semente diretamente sobre as placas de

eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes com um gradiente de pH (focalização isoelétrica).

O gel foi incubado com tripsina e revelado com o substrato específico, sendo a presença do inibidor revelado pela reação negativa na região do gel onde ele se encontrava. Deste modo, foi feito um gel contendo o marcador de ponto isoelétrico e as amostras do extrato de farinha de sementes de *C. paulina*, *C. juncea* resistente e não resistente à murcha bacteriana. As quantidades de amostras utilizadas para aplicação no gel estão na Tabela 4.

espécies	mg de tripsina bovi na inibida por g de farinha de semente	diluição da farinha de sementes (g/ml)	quantidade aplicada no gel (ul)
<i>C. paulina</i>	1,8	0,5 g / 3ml	2,5
<i>C. juncea R.</i>	1,1	0,5 g / 2ml	5,0
<i>C. juncea N. R.</i>	0,4	0,5 g / 2ml	5,0

Tabela 4. Quantidades de extrato de farinha de sementes de espécies de *Crotalaria* aplicadas em gel de poliacrilamida para focalização isoelétrica

4.6 Focalização Isoelétrica e identificação dos Inibidores de tripsina

A preparação do gel de corrida foi realizada com anfolitos da Pharmacia seguindo as instruções do fabricante. A focalização isoelétrica foi feita com o objetivo de se verificar a distribuição de pI das proteínas das amostras, sendo neste caso utilizado o pH entre 3,5 e 9,5.

As condições de corrida para a focalização isoelétrica estão modificadas (tabela 5), e foram obtidas após variações de voltagem e amperagem nas três fases de focalização.

SUPORTE UTILIZADO	Condições de corrida	Fase de IEF
CLEAN GEL IEF PHARMACIA	500V 8mA 8W 45 min	pre IEF
	1200V 14mA 14W 105 min	separação
	3000V 14mA 30W 30 min	concentração das bandas

Tabela.5. Condições de corrida para focalização isoelétrica das amostras dos extratos de *C. Paulina* e as duas variedades de *C. juncea*.

Revelação do gel

Após a corrida, o gel foi cortado em duas metades, uma delas corada para proteínas (Coomassie Blue) e a outra para inibidores de tripsina (coloração negativa).

1,0 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 foi dissolvido em 250 ml de água destilada e misturado com 250 ml de ácido sulfúrico 2N (a solução deve ser filtrada para evitar distorções por resíduos). Misturou-se 9 partes dessa solução com 1 parte de hidróxido de potássio 10N. Foi adicionado ácido tricloroacético até a concentração final de 12% (p/v). O gel foi coberto com essa solução e deixado sob leve agitação durante 4 a 5 horas e em seguida lavado com água destilada. O gel foi deixado "overnight" em água destilada para retirar o excesso de reagentes.

Na coloração negativa para inibidores a outra metade do gel foi lavado com tampão fosfato 0,1M pH 7,6, durante 10 minutos a 37°C e incubado numa solução de 2,8 mg de tripsina bovina em 50 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,6, durante 30 minutos a 37°C (Uriel & Berges, 1968). O recipiente foi lavado com água bidestilada e o gel foi incubado em recipiente vedado e seco, por 30 minutos a 37°C. O gel foi revelado em solução de substrato contendo 5 mg N-acetil-DL-fenilalanina-B-naftilester, em 2ml de dimetilformamida, mais 10 mg de Fast Blue B (MERCK) em 18 ml de 0,05M de tampão fosfato pH 7,6. A reação foi interrompida com ácido acético 20% assim que as bandas apareceram.

5. RESULTADOS

5.1 Detecção da presença de inibidor de tripsina nas sementes

Na fase inicial do trabalho, buscou-se caracterizar alguns aspectos da natureza físico-química dos inibidores, que facilitassem o desenvolvimento de métodos adequados de purificação.

A verificação da presença de inibidores de tripsina nas sementes de *Crotalaria* foi feita através da focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, usando-se o método padrão de coloração para inibidores, segundo Uriel & Bergers (1968). A figura 3 mostra a revelação negativa das formas de inibidor de tripsina no gel.

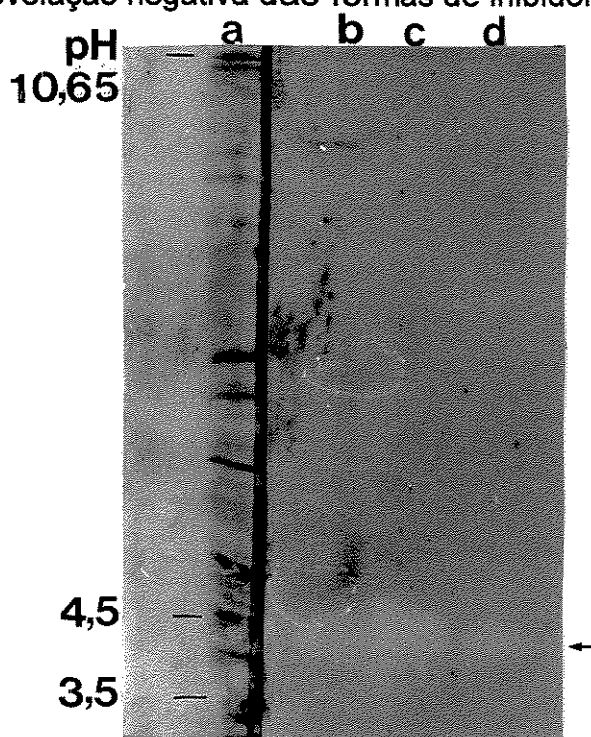
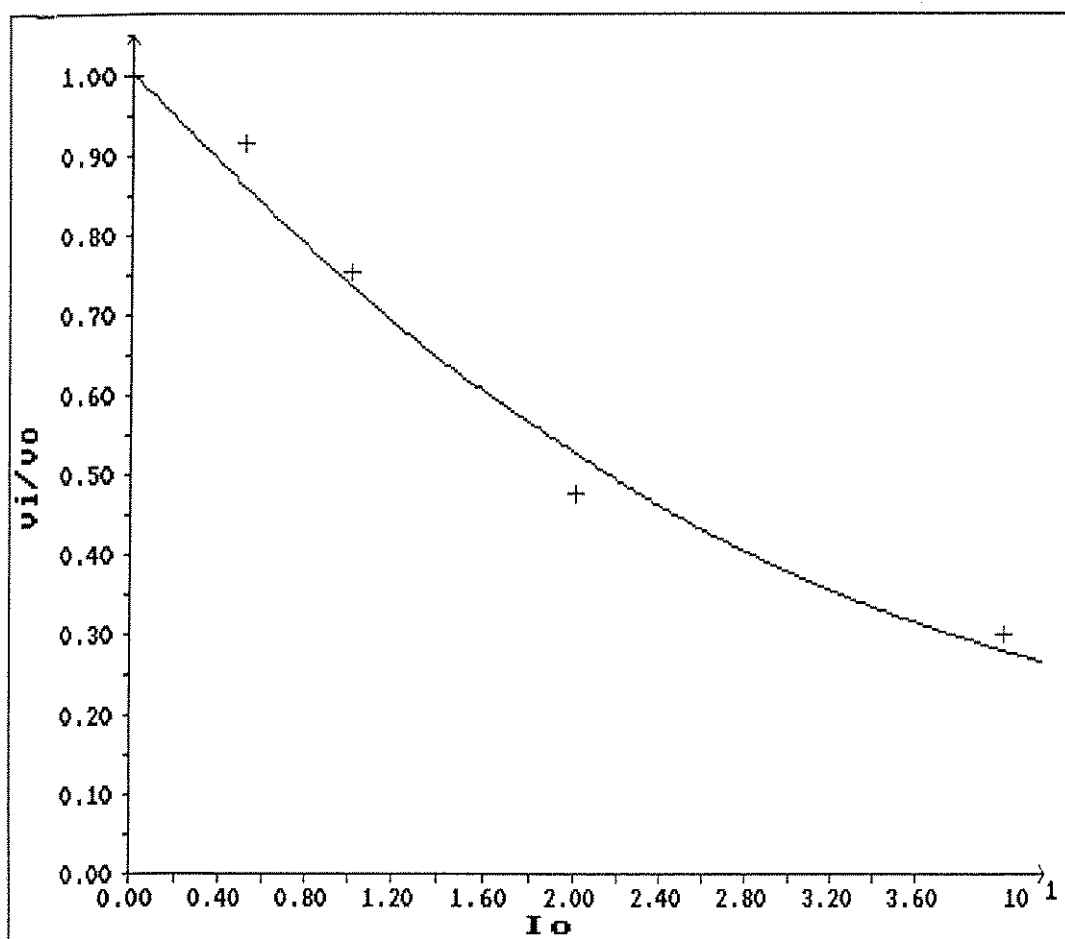


Figura 3. Focalização isoelétrica do extrato bruto de sementes de *C. Paulina*, *C.juncea* não resistente e *C. juncea* resistente à murcha bacteriana.

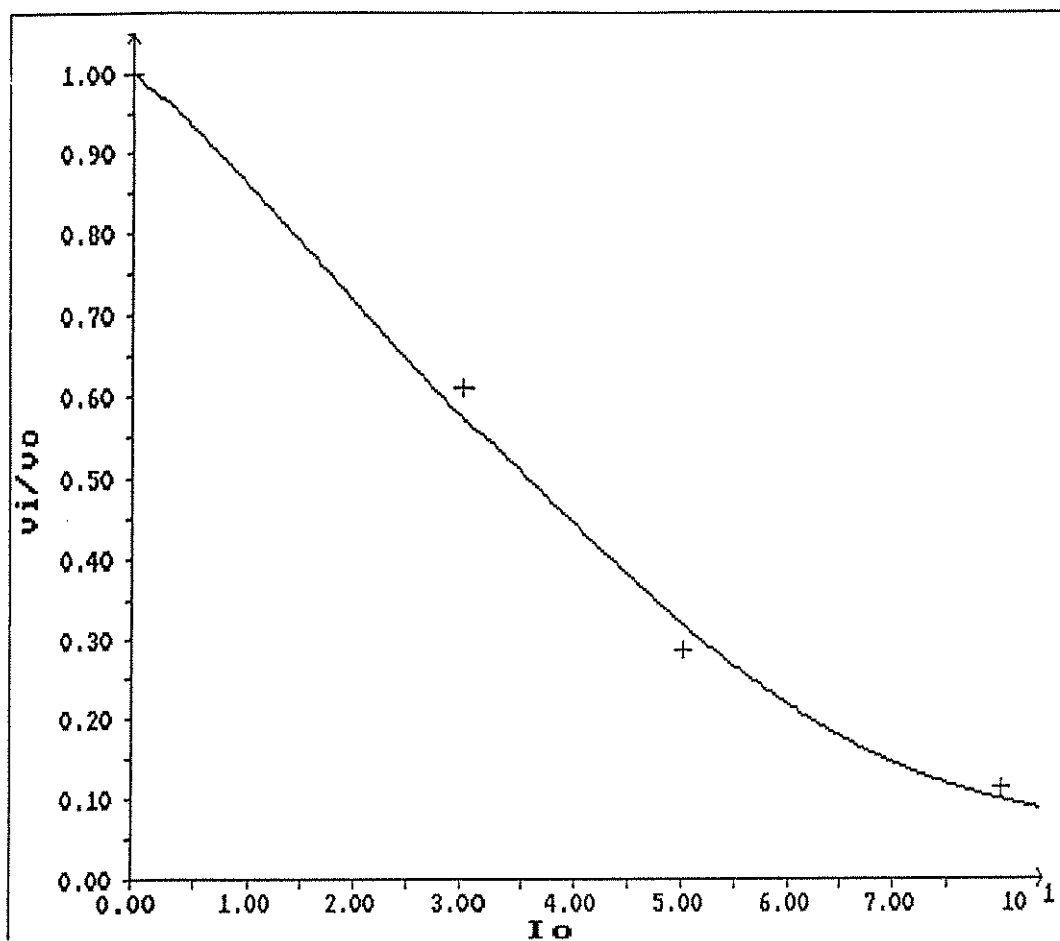
a-marcador de ponto isoelétrico (0,2 mg / 20 μ l): SERVA - Protein Test mixture 3 - 10, contendo Cotocromo C de cavalo, pI 10,65; Ribonuclease A de pâncreas bovino, pI 9,45; Lectina de *Lens culinaris*, pI 7,75/8,0/8,3; Mioglobina de cavalo, pI 6,9/7,35; Carboanidrase de eritrócitos bovino, pI 6,0; β -lactoglobulina de leite de vaca, pI 5,15/5,3; Inibidor de tripsina de soja, pI 4,5; Glucoseoxidase de *Aspergillus niger*, pI 4,2 e Amiloglucosidase de *Aspergillus niger*, pI 3,5; b-Extrato bruto de sementes de *Crotalaria paulina* (0,41mg/2,5 μ l); c-Extrato bruto de sementes de *Crotalaria juncea* não resistente (1,25mg/5,0 μ l); d-Extrato bruto de sementes de *Crotalaria juncea* resistente (1,25mg/5,0 μ l). Na figura está representado o âmbito entre 10,65 - 3,5.

5.2 Dosagem da atividade inibitória dos extratos salinos de CpTI, CjRTI e CjNRTI sobre tripsina bovina.

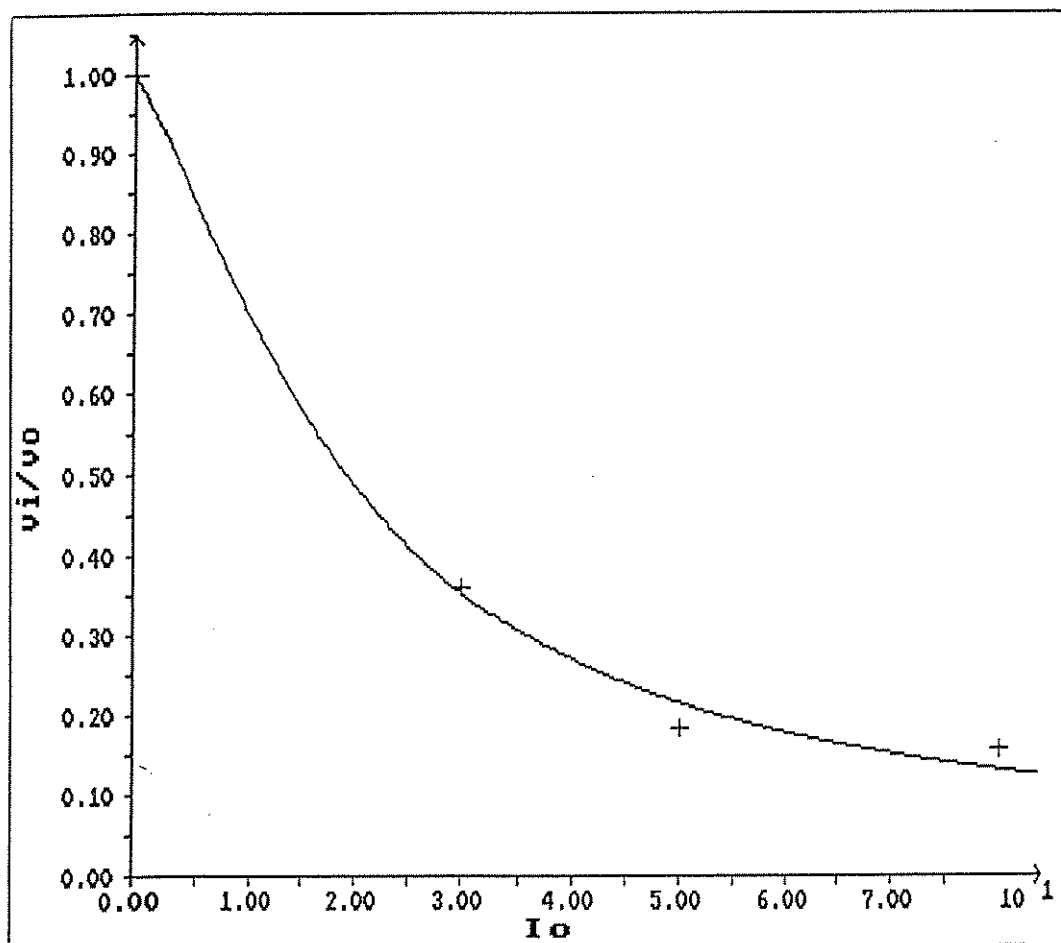
As curvas de dosagem da atividade inibitória sobre tripsina pelos extratos salinos das sementes de *Crotalaria paulina* e *Crotalaria juncea* resistente à murcha bacteriana e *Crotalaria juncea* não resistente à murcha bacteriana, foram determinadas pela atividade residual da enzima no ensaio. Através das figuras 4, 5 e 6, relativas às dosagens da *C. paulina*, *C. juncea* resistente e *C. juncea* não resistente, respectivamente, foram calculadas as concentrações dos inibidores pela tangente das curvas, obtendo os valores 0,332 mg/ml, 0,125 mg/ml e 0,043 mg/ml, respectivamente.



Figuras 4: Curva de inibição de tripsina pelo extrato salino da semente de *C. paulina*, onde V_i/V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μ l) do extrato salino. Tripsina ($4,17 \mu$ M) foi pré-incubada com diferentes volumes de extrato salino de *C. paulina* (CpTI, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0). A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-rginina-p-nitroanilida (BAPNA).



Figuras 5: Curva de inibição de tripsina pelo extrato salino da semente de *C. juncea* resistente onde V_i / V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μ l) do extrato salino. Tripsina ($4,17 \mu$ M) foi pré-incubada com diferentes volumes de extrato salino de, *C. juncea* resistente (CjrTI), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).

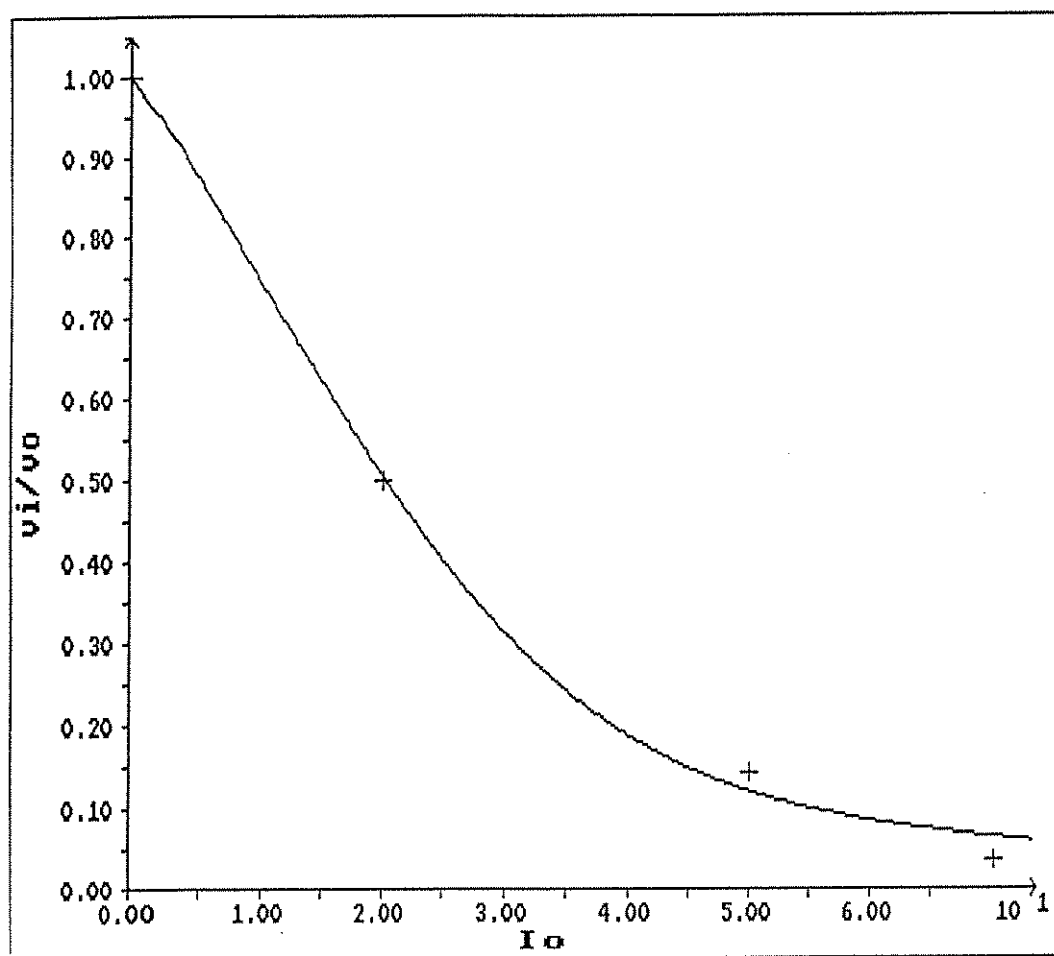


Figuras 6: Curva de inibição de tripsina pelo extrato salino da semente de *C. juncea* não resistente onde V_i / V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μ l) do extrato salino Tripsina ($4,17 \mu$ M) foi pré-incubada com diferentes volumes de extrato salino de *C. juncea* não resistente (CjnrTI), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-rginina-p-nitroanilida (BAPNA).

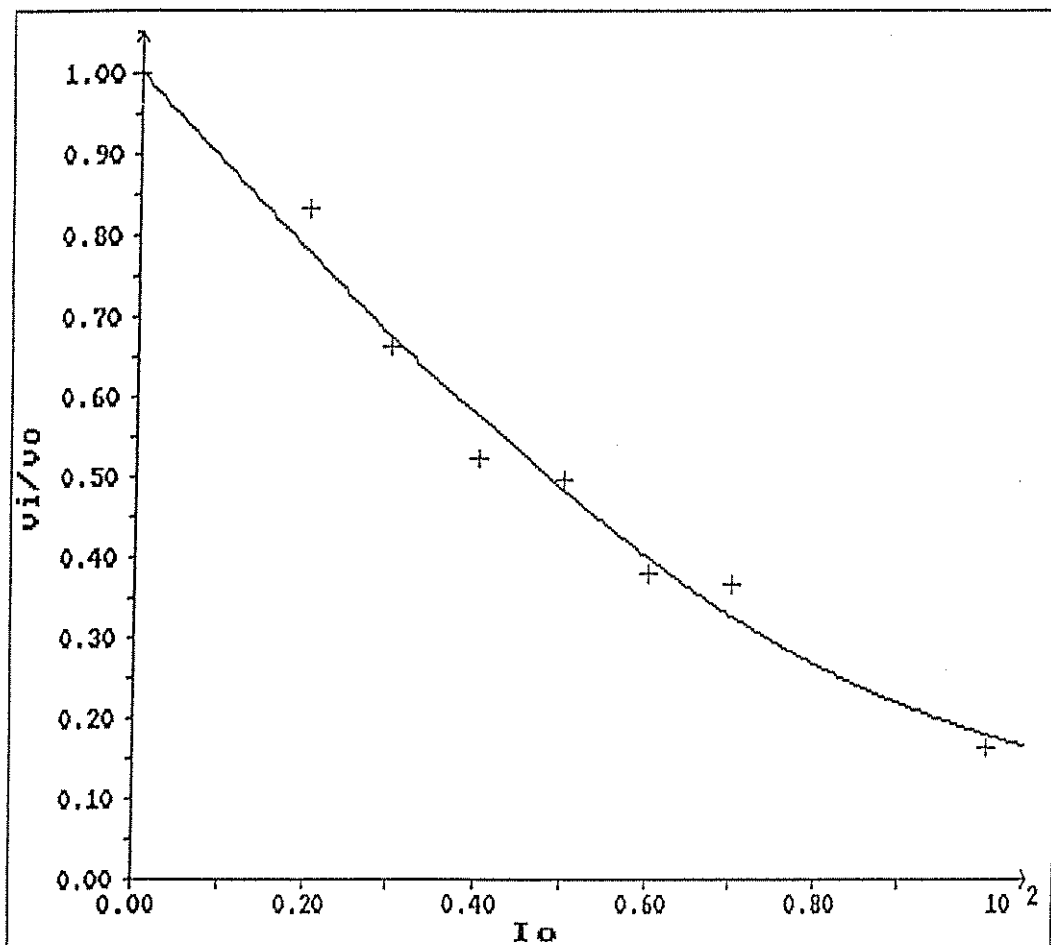
5.3 Purificação do inibidor de tripsina

5.3.1 Precipitação acetônica

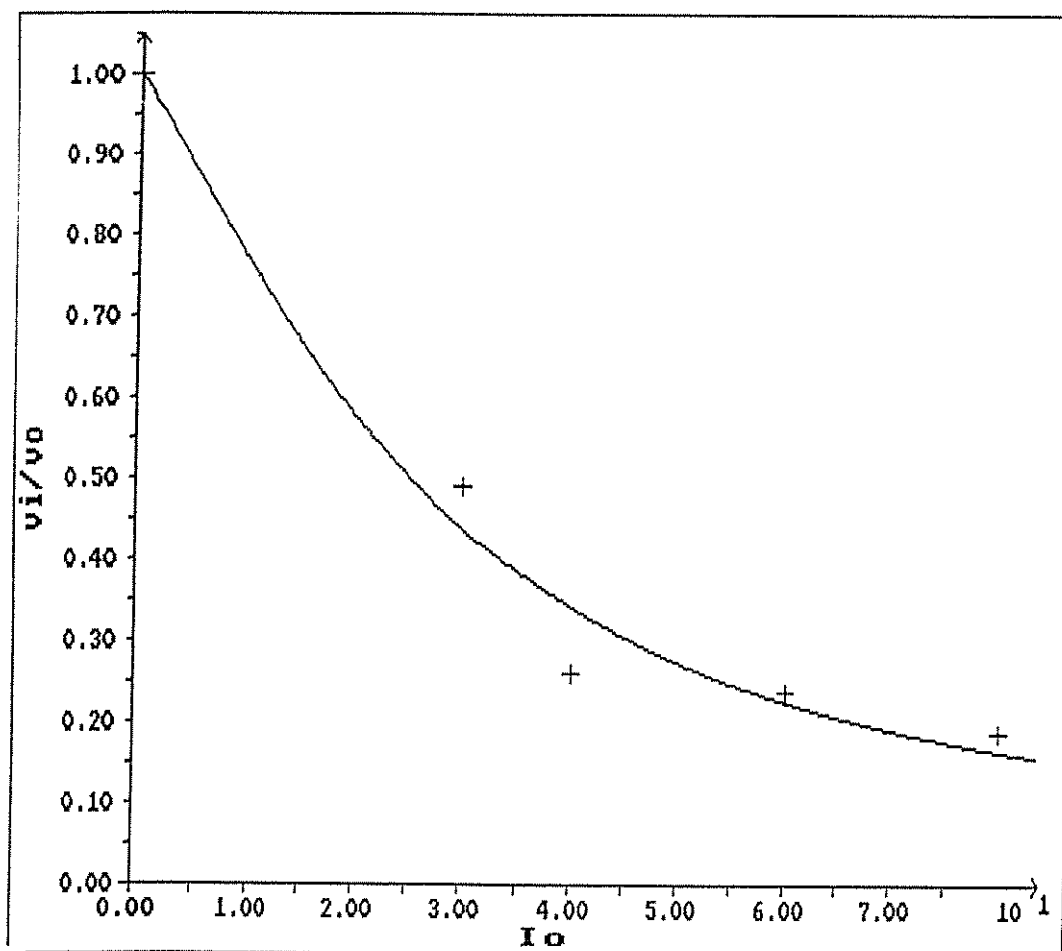
Os extratos salinos foram fracionados por acetona (80% v/v). A representação das curvas de inibição por tripsina pelo CpTI, CjrTI e CjnrTI (inibidor de tripsina de *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistente e *Crotalaria juncea* não resistente, respectivamente), encontram-se nas figuras 7, 8 e 9.



Figuras 7. Curva de inibição de tripsina pelo precipitado acetônico de *C. paulina* onde V_i/V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μl) do precipitado acetônico. Tripsina ($4,17 \mu\text{M}$) foi pré-incubada com diferentes volumes de precipitado acetônico de *C. paulina* (CpTI), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).



Figuras 8. Curva de inibição de tripsina pelo precipitado acetônico de *C. juncea* resistente onde V_i / V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μl) do precipitado acetônico. Tripsina ($4,17 \mu\text{M}$) foi pré-incubada com diferentes volumes de precipitado acetônico de *C. juncea* resistente (CjrTI), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).



Figuras 9. Curva de inibição de tripsina pelo precipitado acetônico de *C. juncea* não resistente onde V_i / V_0 representa a atividade residual (%) e I_0 representa a quantidade (μl) do precipitado acetônico. Tripsina ($4,17 \mu\text{M}$) foi pré-incubada com diferentes volumes de precipitado acetônico de *C. juncea* não resistente (CjnrTI), em tampão Tris-HCl $0,1 \text{ M}$, pH $8,0$. A atividade residual da tripsina foi acompanhada pela hidrólise do N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).

5.3.2 Determinação das constantes de inibição (Ki)

Os valores de K_i para tripsina ensaiada foi obtido através da equação proposta por Morrison (1982) e adaptada ao programa de computador ENZIFTER. As tabelas 1 e 2 mostram os valores de K_i (M) obtidos dos extratos salinos e precipitados acetônicos, respectivamente.

Enzima	CpTI	CjrTI	CjnrTI
TRIPSINA	$2,6 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-7}$

Tabela 1. Constantes de Inibição dos extratos salinos Abreviaturas: CpTI (inibidor de tripsina de *C. paulina*), CjrTI (inibidor de tripsina de *C. juncea* resistente) e CjnrTI (inibidor de tripsina de *C. juncea* não resistente).

Enzima	CpTI	CjrTI	CjnrTI
TRIPSINA	$2,5 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-7}$	$6,7 \times 10^{-7}$

Tabela 2. Constantes de inibição dos precipitados acetônicos de CpTI, CjrTI e CjnrTI.

5.3.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50

A purificação do inibidor de tripsina prosseguiu somente com a *Crotalaria paulina*. A figura 10 mostra o perfil cromatográfico, onde a fração com atividade biológica encontra-se no "pool" 3, a qual corresponde aos tubos 31 a 40. A fração ativa começa a ser eluída na concentração de 0,13M de NaCl.

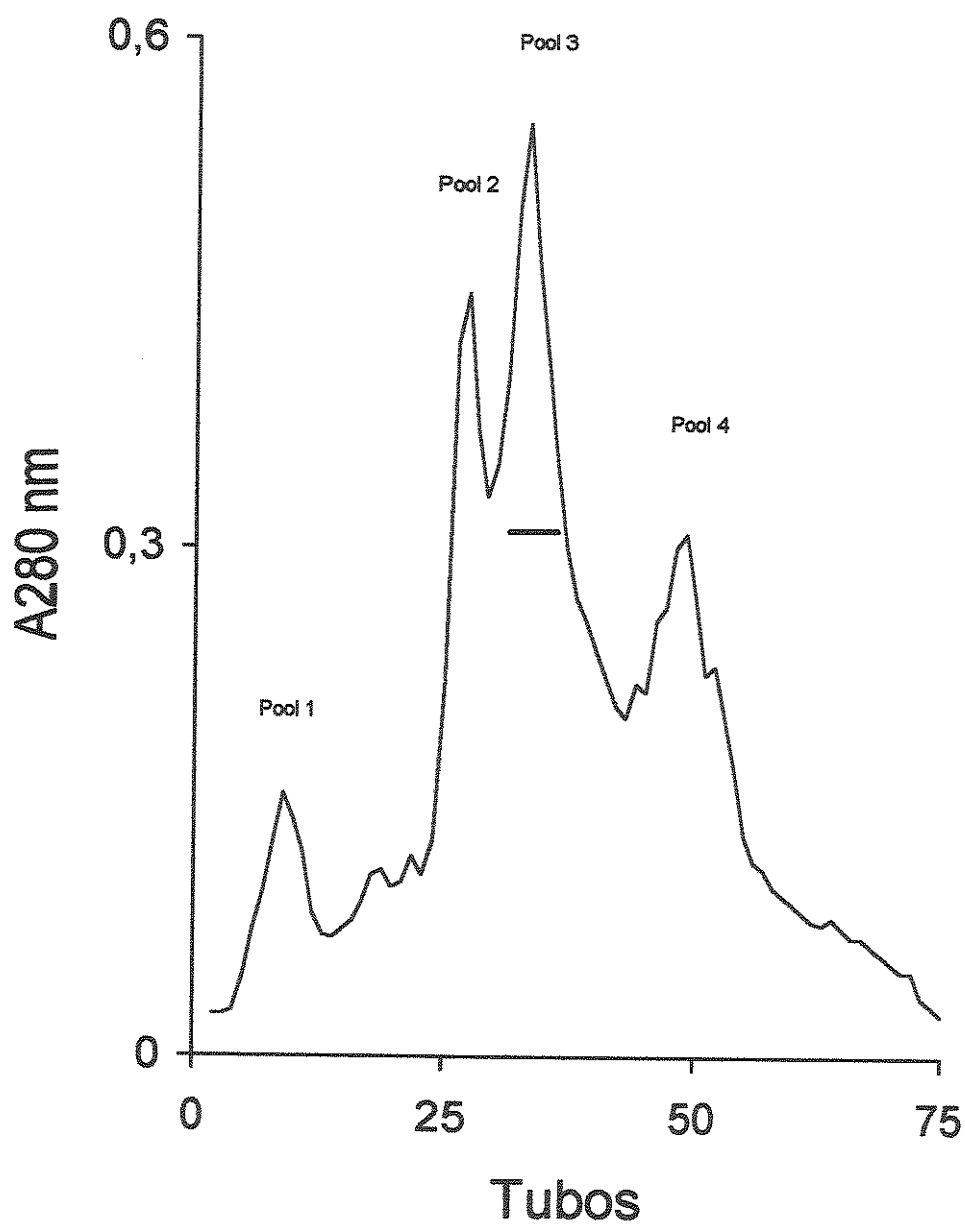


Figura 10. Cromatografia em DEAE Sephadex A-50 com uma coluna (1,8 x 27 cm) equilibrada com tampão Tris HCl 0,05M pH 8,0. Condutividade: 2,5 mMHO. Gradiente linear de NaCl (0 - 0,5M). Amostra aplicada: 15 ml de solução. Frações coletadas: 2 ml, fluxo de 12 ml/hora à temperatura de 4°C. Absorbância: 280nm. A barra indica atividade inibitória de tripsina

5.3.4 Cromatografia de fase reversa em HPLC

500 μ g da fração ativa liofilizada obtida em DEAE A-50, foram ressuspendidos em 200 μ l de tampão A (TFA 0,1%). A figura 11 mostra aparentemente a obtenção do material puro, no pico 1. Mas, através da eletroforese em gel de poliacrilamida (figura 14), verifica-se a presença de uma banda protéica fraca. Este material foi repurificado em HPLC, onde a figura 12 mostra a presença de 2 picos. O pico 2 submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou-se puro. Figura 15.

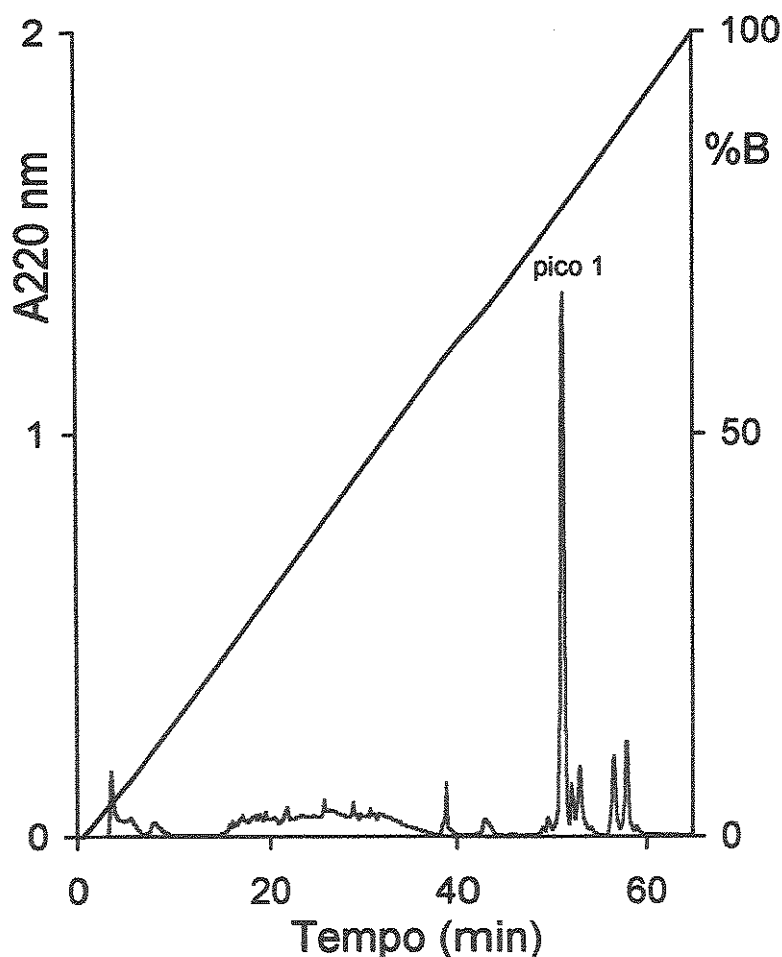


Figura 11. Cromatografia em fase reversa com uma coluna μ Bondapack C18 (3,9 x 30 cm), equilibrada em solução de TFA 0,1% (solvente A). Amostra aplicada: 500 μ g do material obtido em troca iônica. Gradiente linear contínuo até 100% de solvente B. Solvente A: TFA 0,1%, Solvente B: acetonitrila 66% em TFA 0,1%. Fluxo: 1ml/min. A absorbância foi monitorada em 220 nm.

A recromatografia do material obtido em coluna de fase reversa (pico 1) mostra dois picos (figura 12). O pico número 2 analisado em eletroforese de gel de poliacrilamida mostrou-se puro, indicando a ausência de contaminantes detectados na primeira etapa de purificação em fase reversa.

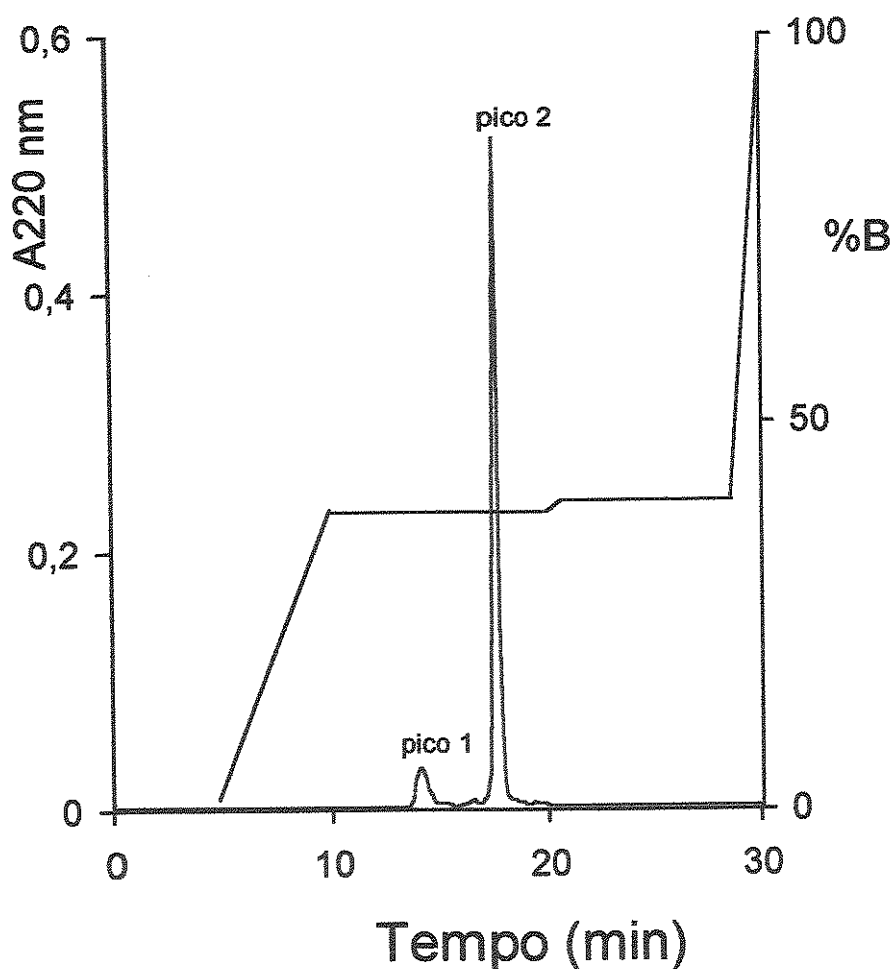


Figura 12. Cromatografia em fase reversa com uma coluna μ Bondapack C18 (3,9 x 30 cm), equilibrada em solução de TFA 0,1% (solvente A). Amostra aplicada: pico 1 da cromatografia de fase reversa. A eluição foi iniciada com solvente A (TFA 0,1%), seguido por um gradiente linear de 0-100% de solvente B, sob o fluxo de 1ml/min. A absorbância foi monitorada em 220 nm.

5.3.5 Controle do rendimento da purificação

O controle do rendimento da purificação do inibidor de tripsina de *Cortalaria paulina* está demonstrado na tabela 3. O controle foi feito até a etapa anterior à cromatografia de fase reversa, pois o inibidor perde a atividade após a passagem pelo HPLC. O rendimento de purificação foi de 15,2%. A atividade específica aumentou conforme a purificação, sendo 0,05 no início e 0,82 no final. Da etapa de cromatografia de troca iônica resultou uma preparação purificada 16,4 vezes, a partir do precipitado acetônico.

ETAPA	Volume	Absorbância	Absorbância total	Atividade	Atividade Total*	Atividade Específica	Purificação	Rendimento
	mL	280nm/mL	280nm	mg/mL				%
Extrato Salino	123	6,4	786	0,332	40,83	0,05	1	100
Precipitado acetônico	15	3,5	52,5	0,568	8,52	0,16	3,2	20,86
DEAE Sephadex A-50	26	0,288	7,488	0,238	6,2	0,82	16,4	15,18

Tabela 3. A atividade inibitória foi medida sobre tripsina utilizando-se o BAPNA como substrato. * A concentração de proteínas foi estimada por A 280nm.

5.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE-SDS (10 - 20%)

A Figura 13 apresenta um gel com os extratos salinos e precipitados acetônicos das três espécies de *Crotalaria*. O gel mostra um padrão protéico uniforme para todas as amostras.

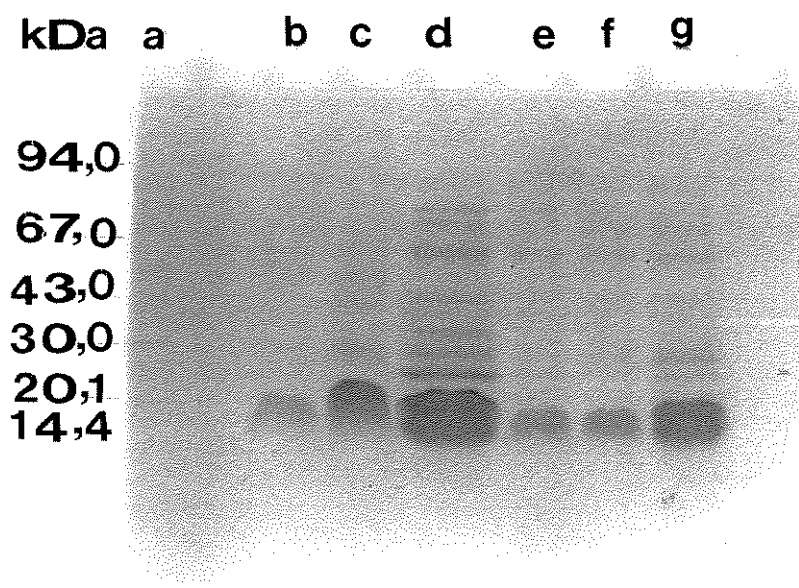


Figura 13. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (10-20%) dos extratos salinos e precipitados acetônicos de sementes, não reduzidos. a-padrão de massa molecular (8 μ l), b-Extrato salino de CpTI (20 μ l), c-Precipitado acetônico de CpTI (10 μ l), d-Extrato salino de CjrTI (20 μ l), e-Precipitado acetônico de CjrTI (10 μ l), f-Extrato salino de CjnrTI (20 μ l), g-Precipitado acetônico de CjnrTI (10 μ l).

A Figura 14 mostra um gel com todas as etapas de purificação do CpTI. Podemos notar a evolução da purificação desde o extrato bruto, onde ocorre a presença de maior número de proteínas, distribuídas em todas as faixas de massa molecular, até a etapa de purificação em cromatografia de fase reversa em HPLC, onde o controle do perfil; de massa molecular mostra a presença de uma banda principal e uma de coloração fraca na faixa de massa molecular 20 kDa.

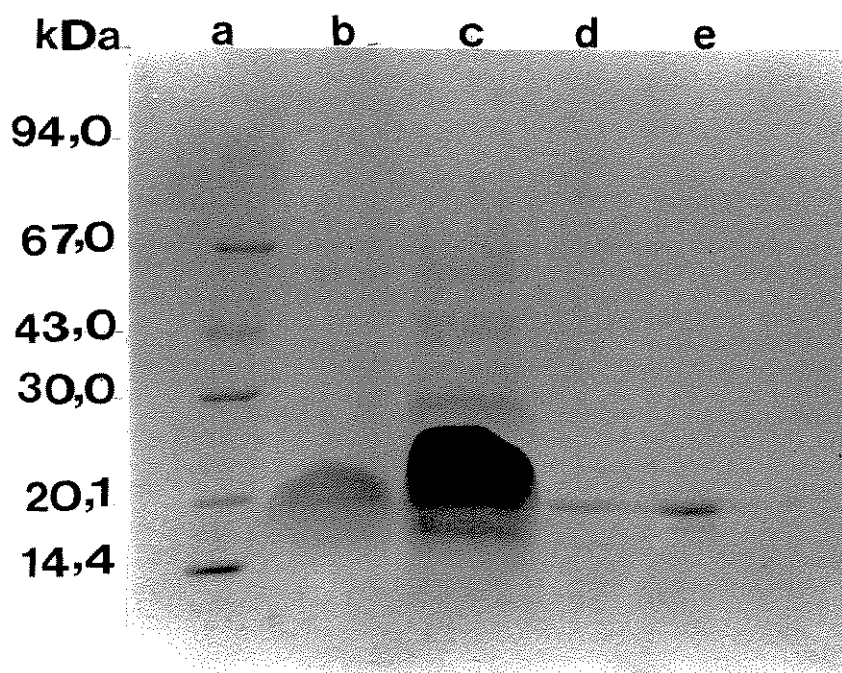


Figura 14. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (10-20%), representando as etapas de purificação do inibidor de *C. paulina*. a-padrão de massa molecular (12 μ l), b-extrato bruto de CpTI (20 μ l), c-precipitado acetônico de CpTI (10 μ l), d-pico 3 da DEAE-Sephadex A-50 (20 μ l), e-pico 2 obtido em fase reversa (20 μ l).

Na Figura 15 mostra o material da repurificação em HPLC, onde temos uma única banda protéica, indicativo de material com alta purificação.

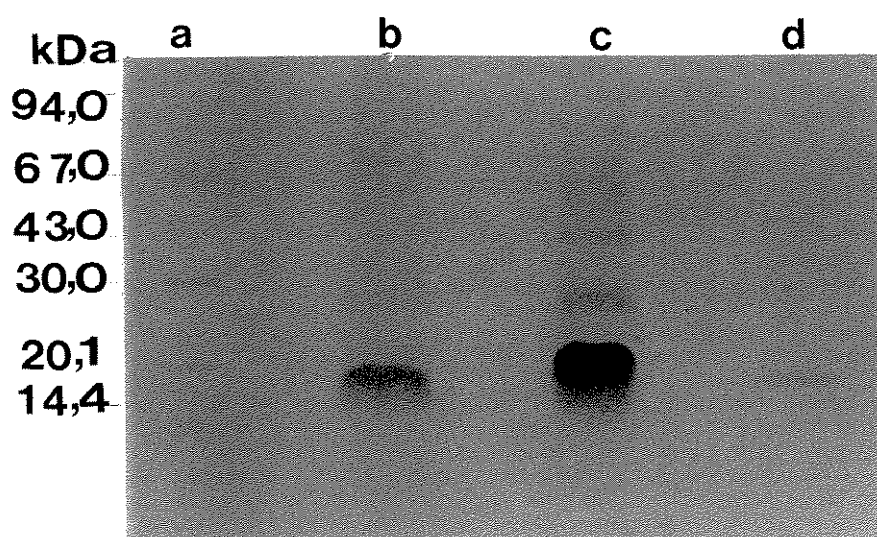


Figura 15. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (10-20%), do extrato salino, precipitado acetônico e fase reversa (após recromatografia). a-padrão de massa molecular (8 μ l), b-extrato salino(20 μ l), c-precipitado acetônico (10 μ l), d-pico 2 obtido na repurificação em fase reversa (10 μ l).

A análise do perfil eletroforético do material purificado de CpTI, em condições redutoras, evidencia apenas uma banda protéica, como mostra a figura 16.

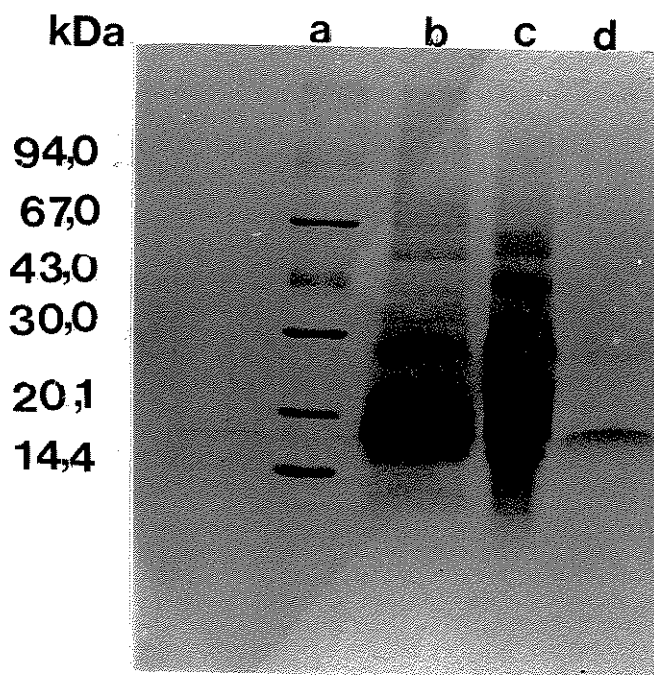


Figura 16. Eletroforese em condições redutoras do material obtido em HPLC, após recromatografia. a- padrão de massa molecular, b- extrato salino (20 μ l), c- precipitado acetônico (10 μ l), d- material obtido em fase reversa após recromatografia (10 μ l).

5.3.7 Análise de aminoácidos do CpTI

O inibidor de tripsina de *C. Paulina*, com grau de pureza obtido em cromatografia de fase reversa (HPLC) foi submetido à hidrólise ácida (HCl 6N) e derivatizada, revelando ser constituído por 176 resíduos de aminoácidos, e um massa molecular de aproximadamente 20 kDa. (tabela 5).

Aminoácidos	CpTI
ASX(D/N)	22,2 (22)
GLX(E/Q)	14,33 (14)
SER	14,85 (15)
GLY	15,37 (15)
HIS	0
ARG	9,80 (10)
THR	9,83 (10)
ALA	7
PRO	11,53 (12)
TYR	6,57 (7)
VAL	10,81 (11)
MET	0
1/2CYS	ND
ILE	13,18 (13)
LEU	15,80 (16)
PHE	13,18 (13)
LYS	10,27 (10)
TRP	ND

Tabela 6. Análise da composição de aminoácidos do inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria paulina* (CpTI), expressa em moles de resíduo por moles de proteína. Os números entre parênteses representam o número inteiro mais próximo. ND: não determinado.

5.3.8 Determinação da atividade do inibidor de tripsina de *C. paulina*, *C. juncea* resistente e *C. juncea* não resistente.

Os inibidores de tripsina das três espécies foram determinadas contra tripsina e quimotripsina bovina, porcina e humana.

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para cada enzima. Podemos notar que o inibidor de *C. paulina* é bem mais ativo que os inibidores de *C. juncea*, sendo que é melhor para tripsina humana que para tripsina bovina. Os inibidores de *C. juncea* mostram-se melhores para tripsina bovina (ver figura 17). Somente a *C. paulina* inibiu fracamente a quimotripsina bovina, não inibindo a porcina e humana, nos métodos utilizados.

ENZIMA	E.S. paulina	E.S.juncea r.	E.S.juncea n.r.
BT(mg/g)	1,79	1,13	0,42
BCT(mg/g)	0,44	NI	NI
PT(mg/g)	1,12	0,31	0,27
PCT(mg/g)	NI	NI	NI
HT(mg/g)	2,55	0,35	0,28
HCT(mg/g)	NI	NI	NI

Tabela 6. Atividade inibitória de tripsina e quimotripsina em extratos de sementes de *C. paulina*, *C. juncea* resistente e não resistente.

NI: indica que não houve atividade inibitória.

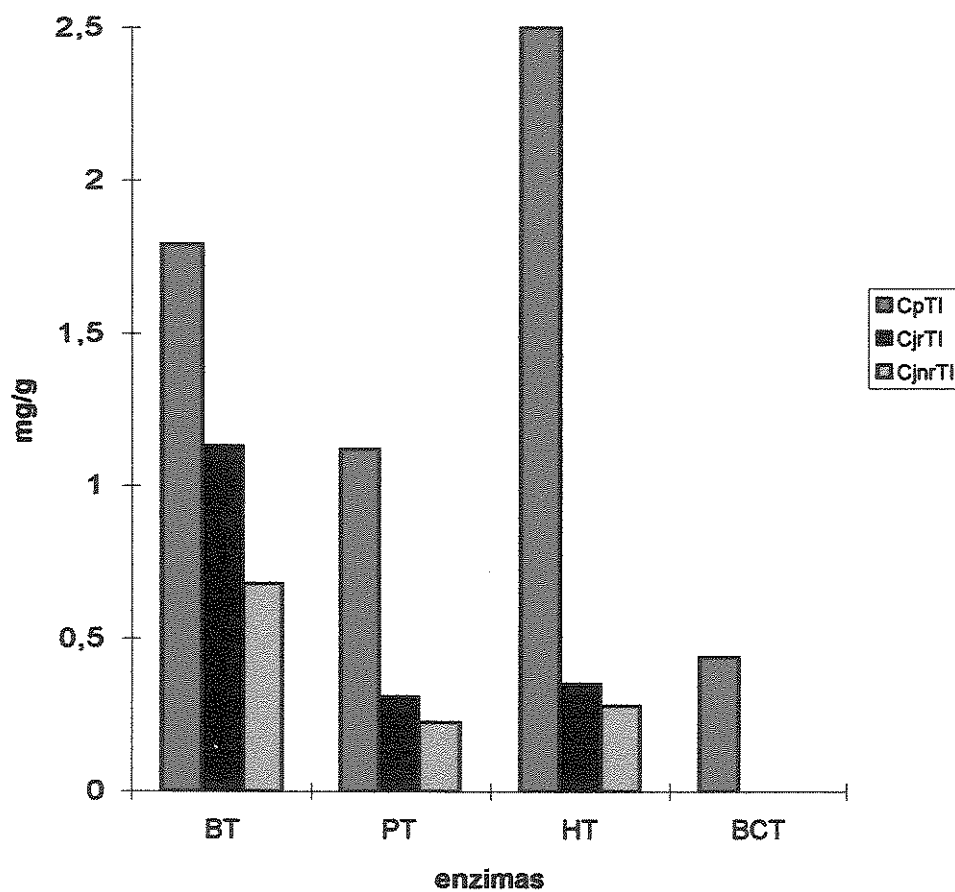


Figura 17. Atividade inibitória de tripsina e quimotripsina em extrato bruto de sementes de *C. paulina*, *C. juncea* resistente à murcha bacteriana e *C. juncea* não resistente à murcha bacteriana. BT: tripsina bovina, PT: tripsina porcina e HT: tripsina humana, BCT: quimotripsina bovina. O eixo das ordenadas representa o valor em mg de enzimas inibidas por grama de pó de semente.

6. DISCUSSÃO

As sementes das Leguminosas contêm um alto teor de proteínas em relação às outras partes das plantas. Dentre essas proteínas estão os inibidores de proteinases, particularmente inibidores de enzimas da família das serinoproteinases, que inclui tripsina e quimotripsina, entre outras (Ryan, 1973; Richardson, 1977).

Os inibidores protéicos presentes em plantas e que inibem enzimas digestivas vêm recebendo consideráveis atenções por um grande número de razões. Primeiro: os inibidores são importantes na determinação da qualidade nutricional de sementes de leguminosas, que é dependente não somente do conteúdo de proteínas e composição de aminoácidos, mas também da presença de fatores antinutricionais, incluindo os inibidores de proteinases. Os inibidores inativam suas enzimas, que resulta na redução da digestibilidade e absorção protéica e, em muitos animais, uma redução no ganho de peso (Liener & Hasdai, 1986). Segundo: inibidores enzimáticos de plantas são de significância nutricional positiva, uma vez que muitos deles são proteínas que são ricas em aminoácidos contendo enxofre, usualmente cistéina. A remoção destas proteínas da semente pode resultar em uma proteína de composição pobre deste aminoácido. Terceiro: muitos inibidores têm sido implicado na defesa das plantas contra ataques microbiais e de insetos (Tan-Wilson & Wilson, 1986).

O papel fisiológico desses inibidores em plantas pode estar relacionado diretamente no envolvimento de defesa. Inibidores de enzimas endógenas pode ser importante na proteção de reservas de sementes de hidrólise prematura (Poerio et al., 1989; Abe et al., 1987).

O inibidor de tripsina de origem vegetal do tipo Kunitz mais estudado é o inibidor de tripsina das sementes de soja (Soybean Trypsin Inhibitor - SBTI), descrito por Kunitz em 1945. O SBTI é frequentemente utilizado como um modelo de comparação para o estudo de outros inibidores com a mesma classificação.

A primeira indicação de que as sementes de *Crotalaria* continham inibidores de tripsina foi fornecida por Weder (1981), o qual trabalhou com três espécies: *Crotalaria brevidens*, *Crotalaria juncea* e *Crotalaria retusa*.

As sementes de *Crotalaria paulina* apresentaram uma quantidade maior de inibidor (0,332mg/ml, contra 0,125mg/ml e 0,043mg/ml) que *Crotalaria juncea* resistente à murcha bacteriana e *Crotalaria juncea* não resistente à murcha bacteriana, respectivamente. Esses valores mostram-se baixos, quando comparados com outras Leguminosas. Em levantamento realizado com sementes de 59 espécies de leguminosas tropicais pertencentes às sub-famílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, Janzen et al (1986) verificaram que a concentração média de inibidores de tripsina nas sementes é da ordem de 2,2 mg de inibidor por grama de sementes.

A etapa de focalização isoelétrica dos extratos brutos, logo no início dos estudos, é importante, pois, através deste método é possível detectar a presença ou não de inibidor no extrato. A presença do inibidor é detectada através da coloração negativa, resultando na determinação de seu ponto isoelétrico, uma característica físico-química importante, através da qual é possível selecionar o tipo de resina e do tampão a serem utilizados na purificação dos inibidores. Esta técnica permite, também, detectar o tipo e número de inibidores presentes na semente (Belitz & Weder, 1990).

Os resultados obtidos na etapa de focalização isoelétrica dos extratos de CpTI, CjrTI e CjnrTI e coradas com atividade para tripsina, demonstraram a presença de inibidores com pontos isoelétricos na faixa de 4,5.

Os valores de K_i demonstram a afinidade existente entre a enzima e o inibidor. Quanto menor for o valor de K_i , mais forte é a interação do inibidor com a enzima alvo. Os valores de K_i obtidos para as espécies estudadas foram da mesma ordem de grandeza, mas o inibidor que apresentou maior afinidade para tripsina foi o inibidor extraído de *C. paulina* (CpTI), cujo valor de K_i é da ordem de $2,6 \times 10^{-7}$. Os inibidores extraídos de *C. juncea* resistente (CjrTI) e *C. juncea* não resistente

(CjnrTI), também mostraram-se capazes de inibir tripsina, embora mais fracamente (tabela 1).

Entre as duas variedades de *C. juncea*, o inibidor extraído da variedade não resistente à murcha bacteriana mostrou-se menos eficaz para tripsina. Segundo Richardson (1991), os inibidores podem desempenhar, nas plantas uma função de defesa contra insetos e agentes microbiais. Os resultados mostram que a variedade não resistente, cujo inibidor interage mais fracamente com a tripsina, é suscetível a ação de patógenos, sugerindo uma possível função de defesa da planta por esses inibidores. Entretanto, estudos mais detalhados serão necessários para chegar a tal conclusão.

A solubilidade das proteínas é muito variável e a escolha do solvente para efetuar a precipitação dessas proteínas apresenta alguma dificuldade em função dessa solubilidade. Os solventes mais usados neste processo são: acetona, etanol e ácido tricloroacético, que possibilitam a eliminação dos contaminantes presentes nas sementes (Laskowski & Laskowski Jr. 1954, Pearce & Ryan, 1983, Richardson et al., 1986). Há relatos de que alguns inibidores de proteinases e amilase tem sido extraído com misturas de clorofórmio e metanol (Richardson, 1991).

A escolha da acetona como solvente para a extração inicial dos inibidores foi baseada na literatura, onde diversos autores (Oliva, 1988; Tanaka, 1991; Sallai, 1993) utilizaram para os inibidores de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Torresea cearensis* e *Bauhinias*, respectivamente. O fracionamento de proteínas com acetona pode causar a perda irreversível da atividade biológica, mas as atividades presentes nos extratos salinos das espécies estudadas de *Crotalaria* foram preservadas, mostrando que essa metodologia de precipitação protéica não é drástica para estes inibidores.

A etapa seguinte de purificação do inibidor consistiu na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50 da *Crotalaria paulina*. Essa espécie foi escolhida para a purificação, pelo fato de apresentar uma quantidade maior de inibidor de tripsina em sua semente e pela disponibilidade do material. O perfil cromatográfico mostrou a concentração maior do inibidor no pico principal, relativo ao "pool 3" (Fig.

10). Nesta fase do processo, o inibidor é purificado cerca de 16,4 vezes com rendimento de aproximadamente 15,2%. Este inibidor perde sua capacidade inibitória sobre tripsina após cromatografia em fase reversa, portanto não foi possível determinar o rendimento final do processo de purificação. Isto provavelmente ocorre porque os inibidores pertencentes à família Kunitz não se mostram tão compactos quanto os inibidores pertencentes à família Bowman-Birk. A estrutura compacta e rígida da molécula deste inibidor é estabilizada por sete pontes dissulfetos, ao contrário da molécula de inibidor do tipo Kunitz, que apresenta 1 ou 2 pontes dissulfetos. Dados que comprovam esse fato foram obtidos por Tanaka (1991), ao constatar que o inibidor tipo Bowman-Birk não perde sua atividade após cromatografia de fase reversa.

A Figura 14 mostra a análise em gel de poliacrilamida das diferentes etapas de purificação, e é indicativa de que a etapa de purificação em cromatografia em DEAE Sephadex A-50 é suficiente para obter a amostra com grau de pureza para iniciar a análise em HPLC. Essa metodologia permitiu eliminar a etapa de exclusão molecular, normalmente utilizada após a cromatografia de troca iônica.

A primeira cromatografia de fase reversa em HPLC, apesar de não aparentar no cromatograma, não purificou totalmente o inibidor, fato visto na Figura.14, onde o perfil de massa molecular mostra uma banda fraca, próxima à banda principal. Devido a isso, o material da primeira cromatografia de fase reversa foi recromatografado num gradiente linear contínuo até 100% de solvente B, obtendo-se daí o material purificado (figura 15).

Extratos de sementes de *C. paulina*, *C. juncea* resistente e não resistente à murcha bacteriana foram testadas para atividade de inibidor de tripsina e quimotripsina bovina, porcina e humana, seguindo a metodologia descrita por Weder (1991). Foi encontrada baixa atividade contra as três tripsinas em todas as amostras, quando comparadas com inibidores extraídos de soja e feijão, que inibem fortemente essas enzimas. Entre as amostras, a *C. paulina* apresentou a mais alta inibição (tabela 7). A tripsina humana foi mais inibida que a bovina e a porcina. A *C. juncea* resistente à murcha bacteriana inibiu mais a tripsina bovina (1,13mg/g) que a *C. juncea* não resistente (0,42mg/g). Com a metodologia utilizada, os três tipos de

quimotripsinas não foram inibidas por estas amostras, com exceção da quimotripsina bovina, que foi fracamente inibida pelo extrato de *C. paulina* (0,44mg/g). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Weder (1981), onde proteínas com atividade inibitória também foram detectadas em *C. juncea*, inibindo somente tripsina.

É interessante ressaltar que embora extraído do mesmo gênero (*Crotalaria*), o inibidor isolado das espécies em estudo distinguem-se na sua atividade de inibição sobre serinoproteinases. Os resultados mostram que o inibidor tipo Kunitz isolado de CpTI, é capaz de inibir enzimas com especificidade diferentes, como é o caso da tripsina e da quimotripsina. Resultados semelhantes foram relatados por Vogel et al. (1968) e Kassel (1970).

Os dados da composição global de aminoácidos mostram que CpTI possui 176 resíduos de aminoácidos, compatível com aqueles encontrados para a espécie de *Acacia confusa* (175 resíduos), tendo um massa molecular calculada de aproximadamente 20 kDa e está de acordo com a massa molecular obtido em gel de poliacrilamida, cujo valor foi de aproximadamente 20 kDa. Os aminoácidos mais frequentes são: Leucina (16 resíduos), Serina e glicina (15 resíduos), Isoleucina e Fenilalanina (13 resíduos), Prolina (12 resíduos), Valina (11 resíduos), Arginina, Treonina e Lisina (10 resíduos). Apresenta, também, uma quantidade razoável de resíduos de alanina e Tirosina (7). Podemos constatar um alto conteúdo de ASx (22 resíduos) e GLx (14 resíduos). O analisador de aminoácido identifica os resíduos de asparagina e glutamina como ácido glutâmico e ácido aspártico.

O método utilizado não detectou resíduos de metionina e histidina, o que já era esperado, pois as proteínas de origem vegetal, em geral, apresentam concentrações baixas ou nulas desses aminoácidos (Ryan, 1981, Kortt & Caldwell, 1990). Além disso, a análise não detectou a presença de resíduos de triptofano. Esta ausência deve-se ao fato de o triptofano ser um aminoácido suscetível à hidrólise ácida. Quanto aos resíduos de cisteína, a presença de grupos sulfidrilas livres não foi determinada e nenhuma correção para possíveis perdas durante a hidrólise ácida foi feita para o conteúdo de cisteína.

A composição de aminoácidos desse inibidor foi comparada com dados de inibidores obtidos de *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia confusa*, *Bahinia pentandra* e *Glycine max*, que também pertencem à família Kunitz de inibidores.

Os resultados mostram que o inibidor purificado de *C. paulina* possui massa molecular da ordem de 20 kDa. A análise eletroforética na presença de SDS e sob condições redutoras, mostra o mesmo padrão de bandas protéicas, indicando que o inibidor é constituído por cadeia polipeptídica única, e que ele pertence a família de inibidores vegetais tipo Kunitz. Segundo Richardson (1991) esta classe de inibidores de serinoproteinases caracterizam-se por possuir uma cadeia polipeptídica única com massa molecular de 20 kDa, aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos, e 1 ou 2 pontes dissulfetos intramoleculares. Contudo, apenas os estudos da estrutura primária podem acertadamente incluir o inibidor de CpTI nesta família.

O baixo número de resíduos de histidina e metionina é característico dos inibidores isolados de *Glycine max* (Koide & Ikenaka, 1973) e *Acacia confusa*, (Wu & Lin, 1993), que apresentam 2 resíduos de histidina e, respectivamente, 2 e nenhum resíduos de metionina. Enquanto que os inibidores isolados de *Enterolobium contortisiliquum* e *Bahinia pentandra* (Oliva, 1988), o conteúdo de histidina presente é menos de 1% e 3%, respectivamente, não havendo presença de metionina.

7. RESUMO

A presença de inibidores de serinoproteinases foi investigada em sementes das plantas *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistente à murcha bacteriana e *Crotalaria juncea* não resistente à murcha bacteriana. (Leguminosae-Papilionoideae).

A purificação do inibidor de *Crotalaria paulina* por cromatografia de troca iônica e subsequente cromatografia em fase reversa, evidenciaram nessa espécie, uma proteína com cadeia polipeptídica única. A massa molecular ao redor de 20 kDa é similar aos da família de inibidores vegetais do tipo Kunitz.

A coloração para inibidor de tripsina após focalização isoeletrica demonstrou a presença de inibidor com ponto isoeletrico ao redor de 4,5, e a análise de aminoácidos revelou a presença de 176 resíduos.

Os inibidores de *Crotalaria* atuam seletivamente sobre serinoproteinases. Extratos de sementes de *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistente e *Crotalaria juncea* não resistente à murcha bacteriana foram testados para atividade de inibição contra tripsina e quimotripsina bovina, porcina e humana. Entre estas amostras, *Crotalaria paulina* exibiu a mais alta inibição, com tripsina humana sendo melhor inibida do que tripsina bovina e porcina. A variedade resistente de *Crotalaria juncea* inibiu melhor tripsina bovina do que a variedade não resistente. As três quimotripsinas não foram inibidas por estas amostras, com exceção da quimotripsina bovina que foi fracamente inibida pelo extrato de *Crotalaria paulina*.

8.SUMMARY

The presence of serine proteinase inhibitors was investigated in the seeds of *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistant and non resistant to bacterial infection. This plants belongs to Leguminosae (Papilionoideae) family.

The purification of inhibitor from *Crotalaria paulina* by ion-exchange chromatography and subsequent reverse phase chromatography using a C18 column showed the presence of a single polypeptide chain. The purified serine proteinase inhibitor (CpTI), has a molecular mass of 20 kDa in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 10-20%) suggesting that this protein belongs to the Kunitz-type plant inhibitors family.

Staining for inhibitors trypsin after isoelectric focusing showed the presence of inhibitors with isoelectric point about 4,5 and amino acid analysis revealed the presence of 176 amino acids residues.

Crotalaria inhibitors act selectively on serine proteinases. Extracts from seeds of *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistant and non-resistant were tested for inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin, from cattle, pig and humans. Within these samples, *Crotalaria paulina* exhibited the highest activity, inhibiting human trypsin better than bovine and porcine. The resistant *Crotalaria juncea* variety inhibited bovine trypsin better than the non-resistant one. The three kinds of chymotrypsin were not inhibited by these samples excepted bovine chymotripsin, that was weakly inhibited by the *Crotalaria paulina* extract.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K., EMORI, Y., KONDO, H., SUZUKI, K. & ARAI, S. (1987). Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *Journal of Biological Chemistry*, 262: 16793-7.

BARRET, A.J. (1986). The classes of Proteolytic Enzymes. In: Dalling, M. J.,ed. *Plant proteolytic enzymes*. Florida, CRC Press, p: 1-6.

BATISTA, I.F.C. (1993). Purificação e determinação da estrutura primária do inibidor de tripsina (Tipo Kunitz) do *Enterolobium contortisiliquum*. São Paulo (Tese de Mestrado-Escola Paulista de Medicina).

BELITZ, H.D. & WEDER, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International*, 6 (2): 151-211.

BELITZ, H.D. & GROSCH, W. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, p: 584-98, 1988.

BIDLINGMEYER, U.D.V., LEARY, T.R & LAKOSWSKI, M.J. (1972). Identity of the tryptic and alpha-chymotryptic reatives sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* 11: 3303- 3309.

BIRK, Y. & APPLEBAUM, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor: trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 25: 113-131.

BOULTER, D., THURMAN, D.A. & DERBYSHIRE, E. (1967). A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytol.*, 66: 27-36.

BOWMAN, D.E. (1946). Differentiation of soybean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 63: 547-50.

CHASE, T. & SHAW, E. (1970). Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-nitrophenyl-p-guanidinobenzoate HCl. *Meth. Enzymol.* 19: 20-27.

CHI, C., LO, S., TAN, F., ZHANG, Y. & CHU, H. (1982). In: *Proteins in Biology and Medicine* (R.BRADSHAW et al., eds), p: 362. Academic Press, New York.

CHURELLA, H.R., YAO, B.C. & THOMSON, W.A.B. (1976). Soybean trypsin activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. *J.agric. Fd. Chem.* 24: 393-396.

DICKERSON, R.G. & GEIS, J (1969). *The structure and action of proteins*. Harper & Row, Publishers. New York, p. 67-97.

DICKISON, W.C (1981). Evolutionary Relationship of the Leguminosae, In: Advances in Legume systematics, Polhill, R. M. & Raven, P. H (Eds) p: 35-51. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England.

DUFTON, M.J. (1990). Could domain movements be involved in the mechanism of trypsin-like serine proteases? FEBBS Letters, 271: 9-13.

DUKE, J.A. (1980). Handbook of Legumes of World Economic Importance, p: 61-70. Plenum Press, New York and London.

ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N. & COHEN, N. (1961). Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys, 95, 271 - 278.

GALLAHER, D. & SCHNEEMAN, B.O. (1984). Nutritional and metabolic response to plant inhibitors of digestive enzymes. Adv. Exp. Med. Biol., 177: 299-320.

GREEN, T.R. & RYAN, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves : a possible defense mechanism against insects. Science, 175: 776-777.

HAM, W.E., SANDSTEDT, R.M., & MUSSEHL, F.E. (1945). The proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal and its effect upon growth in chicks. J. Biol. Chem., 161: 635-642.

HARA, S., MARINO, J. & IKENAKA, T. (1989). Amino acids sequences and disulfide bridges of serine proteinase inhibitors from bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seeds. J. Biochem. 105:88-92.

HARTLEY, B.S. (1960). Proteolytic Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 29: 45-72.

HASS, G.M. & HERMODSON, M.A. (1981). Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. Biochemistry, 20: 2256-60.

HASS, G.M., NAU, H., BIEMANN, K., GRAHAN, D.T.; ERICSON, L.H. & NEURATH, H. (1975). The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. Biochemistry, vol. 14(6): 1334-42.

HEINRIKSON, R.L. & MEREDITH, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. Analytical Biochemistry, 136: 65-72.

HEYWOOD, V.H. (1971). The Leguminosae - a systematic purview, In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. Harborne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.L., eds., p: 1-29. Academic Press, London and New York.

HOJIMA, Y., PIERCE, J.V. & PISANO, J.J. (1982). Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIIa (Activated Hageman Factor) and bovine trypsin. Biochem, 21: 3741-3746.

IKENAKA, T., ODANI, S. & KOIDE, T. (1974). Chemical structure and inhibitory activities of soybean proteinase inhibitor. In: Bayer - symposium Proteinase inhibitors. Fritz, H., Tschesche, H.T., Green, L.J. and Truscheit, E. (eds), p. 325 - 343. Springer-Verlag, New York.

ISHIKAWA, C., WATANABE, K., SAKATA, N., NAKAGAKI, C., NAKAMURA, S.E. & TAKAHASHI, K. (1985). Proteinase Inhibitors: Isolation and amino acid sequences. *J. Biochem.* 97: 55-70.

JANZEN, D.H., RYAN, C.A., LIENER, I.E. & PEARCE, G. (1986). Potentially defensive protein in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. *J. Chem. Ecol.*, v. 12, p. 1469-80.

JOUBERT, F.J., HERISSEN, C. & DOWDLE, E. B. (1985). The complete amino acid sequence of trypsin inhibitor DE-3 from *Erythrina latissima* seeds. *J. Biol. Chem.*, 260: 12948-53.

JOUBERT, F.J. & DOWDLE, E.B.D. (1987). The primary structure of the inhibitor of tissue plasminogen activator found in the seeds of *Erythrina caffra*. *thromb. haemost.*, 57: 356-360.

JOUBERT, F.J. (1981). Purification and some properties of a proteinase inhibitor (DE-1) from *Peltophorum africanum* (Weeping Wattle) seed. *Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem.*, 362: 515-1521.

JOUBERT, F.J., & SHARON, N. (1985). Proteinase inhibitors from *Erythrina corallodendron* and *Erythrina cristagalli* seeds. *Phytochemistry*. 24: 1169-79.

KASSEL, B. (1970). Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *Meth. Enzimol.*, 19: 853-871.

KNIGHT, D.G. (1986). The characterization of enzymes inhibitors. In: Barret, A.J and Salvesen, N.G, ed., *Proteinase inhibitors*. Amsterdam , Elsevier, p. 23-51.

KOIDE, T. & IKENAKA, T. (1973a). Studies on soybean trypsin inhibitors. Fragmentation of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by limited proteolyses and by chemical cleavage. *Eur. J. Biochem.*, 32: 401-407.

KOIDE, T. & IKENAKA, T. (1973b). Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete aminoacid of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.*, 32: 417-431.

KOIDE, T.; TSUNASAWA, S.; IKENAKA, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. Amino acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.* 32: 408-16.

KORTT, A.A & JERMYN, M.A. (1981). *Acacia* proteinase inhibitors purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. *Eur. J. Biochem.*, 115: 551 - 557.

KORTT, A.A & CALDWELL, J.B. (1990). Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. *Phytochemistry*, 9: 2805-2810.

KUNITZ, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101: 668-669.

KUNITZ, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J.Gen.Physiol.*, 29: 149-154.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227: 680-685.

LASKOWSKI, M. & KATO, J. (1980). Protein inhibitors proteinase. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 593-626.

LASKOWSKI, JR.M. & SEALOCK, R.W. (1971). Protein proteinase inhibitors-molecular aspects. In: *The enzymes*. Boyer, P. (ed.), p. 375 - 473. vol. 3, Academic Press, New York.

LASKOWSKI, M. & SEALOCK, R.W. (1971). Protein proteinase inhibitors-Molecular Aspects. IN: BOYER, P. D. *The Enzymes*. New York, Academic Press, 3: 17-22.

LASKOWSKI, M. & LASKOWSKI JR., M. (1954). Naturally occurring trypsin inhibitor. *Adv. Prot. Chem.* 9: 203-242.

LIENER, I.E. & KAKADE, M.L. (1980). Proteinase inhibitors. In: *Toxic Constituents of Plant Foodstuff* (Edited by Liener I.E.), p. 7-77. Academic Press, New York.

MARES, M., MELOUM, B., PAVLIK, M. KOSTRA, V. & BAUDS, M. (1989). Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBBS Lett.*, 251: 94-8.

MATHESON, N.R., VANHALBEEK, H & TRAVIS, J. (1991). Evidence for tetrahedral intermediate complex during serpin-proteinase interactions. *J. Biol. Chem.* 25: 13489-13491.

MELVILLE, J.C. & RYAN, C.A. (1972). Chymotrypsin inhibitor from potatoes. *J. Biol. Chem.* 247:3445 - 3453.

MIKOLA, J. (1983). Proteinases, Peptidases and Inhibitors of Endogenous Proteinases in Germinating Seeds. In: *Seeds Proteins*. Daussant, J., Mossè, J. and Vaughan, J., eds, p. 35-51. *Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe*. Academic Press.

MONTE-NEGREIROS, A.N. , CARVALHO, M.M. , XAVIER-FILHO, J., BLANCO-LABRA, A. , SHEWRY, P.R. & RICHARDSON, M. (1991). The complete amino acid

sequence of a major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. *Phytochem.* 30: 2829-2833.

MORRISON, J.F. (1982). The slow - binding and slow tight - binding inhibitor of enzyme catalysed reactions. *Trends Biochem. Sci.*, March, 102-105.

MUNDY, J., HEJGAARD, J., SVENDSEN, J. (1984). Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amilase and subtilisin. *FEBBS Lett.*, 167: 210-214.

NAZAWA, H., YAMAGATA, H., AIZONO, Y., YOSHIKAWA, M. & IWAZAKI, T. (1989). The complete amino acid sequence of a subtilisin inhibitor from adzuki beans (*Vigna angularis*). *J. Biochem.*, 106: 1003-1008.

NEURATH, H. (1983). Evolution of Proteolytic Enzymes. *Science*, 224:350-7.

NEURATH, H. (1989). The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R.J. and Bond, J.S., ed. *Proteolytic Enzymes*, Oxford, IRL Press, p. 1-13.

NEURATH, H. & WALSH, K.A. (1976). Role of Proteolytic Enzymes in Biological Regulation (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73 (11): 3825-32.

ODANI, S., ONO, T. & IKENAKA, T. (1979). Proteinase inhibitor from a Mimosoideae legume, *Albizia julibrissim*. *J. Biochem.*, 86: 1795-1805.

ODANI, S., KOIDE, T. & ONO, T. (1983). The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 258: 7998-8003.

ODANI, S., & IKENAKA, T. (1972). Studies on soybean trypsin inhibitors. IV. Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J. Biochem. (Tokyo)*, 71: 839-848.

ODANI, S., & IKENAKA, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. VIII. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitors. *J. Biochem. (Tokyo)*, 74: 697-715.

OLIVA, M.L.V., SAMPAIO, M.U. & SAMPAIO, C.A.M. (1987). Serine and SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contortisiliquum* beans. Purification and preliminary characterization. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20: 767-70.

OLIVA, M.L.V. (1988). Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinase de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, *Torresea cearensis*, *Bauhinia pentandra* e *Bauhinia bauhinoides*. São Paulo (Tese de doutorado-Escola Paulista de Medicina).

OLIVA, M.L.V., SAMPAIO, M.U. & SAMPAIO, C. A. M. (1988). Purification and partial characterization of thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Beans. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369: 229-232.

OLIVA, M.L., SAMPAIO, M.U. & SAMPAIO, C.A.M. (1988). Isolation and characterization of plant inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. *Adv. Med. Exp. Biol.* 247A: 467-71.

PEARCE, G., MCGINNIS, J. & RYAN, C.A. (1979). Utilization by chicks of half-cystine from native and denaturated proteinase inhibitor protein from potatoes. *Proc. Spc. Exp. Biol. Med.* 160: 180-184.

PEARCE, G. & RYAN, C.A. (1983). A rapid, large-scale method for purification of metallocoxy-peptidase inhibitor from potato tubers. *Anal. Biochem.* 130: 223-225.

POERIO, E., CARRANO, L., GARZILLO A.M. & BUONOCORE, V. (1989). A trypsin inhibitor from the water-soluble protein fraction of wheat kernel. *Phytochemistry*, 28: 1307-11.

PUSZTAI, A. (1986). Importance of anti-nutritive factors in feeding-stuffs evaluation. In: *Feedingstuffs evaluation, modern aspects, problems and future trends.* (Livingstones, M. ed.) FEEDS publication, Aberdeen.

READ, J.W. & HAAS, L.W. (1938). Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity, *Cereal Chem.*, 15: 59-68.

RICHARDSON, M. (1977). The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16: 159-169.

RICHARDSON, M. (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry, Amino acids, proteins and nucleic acids vol. 5*, (ed. Rogers, L.J).

RICHARDSON, M. (1979). The complete amino acid sequence and the trypsin reactive (inhibitory) site of the major proteinase inhibitor from the fruits of aubergine (*Solanum melongena*). *FEBBS Lett.* 104: 322 - 326.

RICHARDSON, M., CAMPOS, F.A.P., XAVIER-FILHO, J., MACEDO, M.L.R., MAIA, G.M.C. & YARWOOD, A. (1986). The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin iso-inhibitor (DE 5) isolated from seeds of the Brazilian caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.), *Biochem. Biophys. Acta*, 872: 134 - 140.

RYAN, C.A. (1973). Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 173-196.

RYAN C.A. & WALKER-SIMONS, M. (1981). Plant proteinases. *The Biochemistry of Plants*, vol. 6 Academic Press, p: 321-350.

SALLAI, R.C. (1993). Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteínas no gênero *Bauhinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). São Paulo, (Tese de mestrado - Escola Paulista de Medicina).

SAMPAIO, C.A.M., SAMPAIO, M.U. & PRADO, E.S. (1984). Active titration of horse urinary kallikrein. Hoppe - Seylers z. Physiol. Chem., 365: 297 - 302.

SAMPAIO, M.U. , TANAKA, A.S. , OLIVA, M.L.V, BATISTA, I.F.C., STELLA, R.C.R. & SAMPAIO, C.A.M. (1990). Plant proteinase inhibitors. Action on blood clotting contact phase enzymes proceedings of the first Brazilian Congress on Proteins (Oliveira, B. Sgarbieri, V., ed.), Campinas, UNICAMP, p. 56-65.

SEEMULLER, V., EULITZ, M., FRITZ, H. & STROBE, A. (1980). Structure of the elastase cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis*. Hoppe - Seylers z. Physiol. Chem. 361: 1841 - 1846.

SHIBATA, H., HARA, S., IKENAKA, T. & ABE, J. (1986). Purification and characterization of proteinase inhibitors from winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) seeds. J. Biochem., 99: 1147-55.

SOUZA, E.M.T. (1992). Inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell) toledo. Caracterização físico-química e sequenciamento parcial. São Paulo, (Tese Doutorado- Escola Paulista de Medicina).

STEVENS, F.C. , WUERZ, S. & KRAHN, J. (1974). Structure function relationships in lima bean proteinase inhibitor. In: Bayer-symposium Proteinase Inhibitors. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E. (eds.), p 344-354, Springer-Verlag, Berlin, New York.

TAN, C.G.L & STEVENS, F.C. (1971). Amino acid sequence of lima bean proteinase inhibitor componente IV.2. Isolation and sequence determination of the chymotryptic peptides and the complete amino acid sequence . Eur. J. Biochem., 18: 515-523.

TANAKA, A.S. (1991). Purificação, determinação de especificidade e aspectos estruturais do inibidor de serinoproteinases das sementes de *Torresea cearensis*. São Paulo. (Tese de Mestrado em Biologia Molecular-Escola Paulista de Medicina).

TANAKA, A.S. (1993). Inibidor de tripsina (Bowman-Birk) de sementes de *Torresea cearensis*. Determinação da estrutura primária e estudos comparativos com o inibidor de tripsina de sementes de *Torresea acreana*. São Paulo. (Tese de Doutorado em Biologia molecular-Escola Paulista de Medicina).

TAN-WILSON, A. L. & WILSON, K.A. (1986). Relevance of multiple soybean trypsin inhibitor forms to nutritional quality. In: Friedman, M., ed. Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in plant foods. New York: Plenum Press, 391-411.

TRAVIS, J., SALVESEN, G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. Ann. Rev. Biochem., 52: 655-709.

TSCHESCHE, H. (1974). Biochemistry of natural proteinase inhibitors. *Chem.* 13, 10-28.

URIEL, J. & BERGES, J. (1968). Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature (London)* 218: 578-580.

VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, I. & WERLE, E. (1968). Natural proteinase inhibitors, Academic Press, New York and London. p. 9-49.

WALSH, T.A. & TWITCHELL, W.P. (1991). Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol.*, 97: 15-8.

WALSH, K.A. & WILCOX, P.E., (1970). Serine proteases. In: Perlman, G.E., Lorand, L. *Meth. Enzymol.* New York. Academic Press, v. 19, p. 31-41.

WARSHEL, A., NARAY-SZABO, G., SUSSMAN, F. & HWANG, J.K. (1989). How do serine proteases really work? *Biochemistry*, 28: 3629-3637.

WARSY, A.S., NORTON, G. & STEIN, M. (1974). Protease inhibitors from broad bean. Isolation and purification. *Phytochemistry* 13: 2481-2486.

WEDER, J.K.P. (1978). Occurrence of proteinase inhibitors in Mimosoideae. *Z. Pflanzen physiol.* Bd. 90. S. 285-291.

WEDER, J.K.P. (1981). Protease Inhibitors in the Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics*. Polhill, R. M. & Raven, P. H (Eds) p. 533-560. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England.

WEDER, J.K.P.; MUELLER, R.; KAHLEYSS, R. (1992). Lentil Proteinase Inhibitors: Reaction with human enzymes and significance. In: *Proc. First European Conference on grain Legumes, Angers/ France, June-13*, p. 455-456.

WEDER, J. K. P. & LINK, I. (1993). Effect of treatments on legume inhibitor activity against human proteinases. In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds; Proc. 2nd Int. Workshop Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds, Dec 1-3, 1993* (Van der Poel, A.F.B.; Huisman, J., Saini, H.S., eds.); Wageningen Pers, Wageningen, p. 481-485.

WHITE, A., HANDLER, P. & SMITH, E. L. (1986). In: *Principios de Bioquímica. Enzimas Hidrolíticas*. Ed. Guanabara Koogan. p. 183.

WIECZOREK, M., OTLEWSKI, J., COOK, J. PARKS, K., LELUK, I. & WILIMOWSKA PELC, A. (1985). The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acids sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini and cucumber seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 646-652.

WILSON, K.A. & CHEN, J.C. (1983). Amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified appearing during germination. *Plant Physiol.*, 71: 341-349.

WILSON, K.A. & LASKOWSKI, M. (1975). The partial amino acid sequence of trypsin inhibitor II from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, with location of the trypsin and elastase-reactive sites. *J. Biol. Chem.* 250: 4261-4267.

WU, H.C. & LIN, J.Y. (1993). The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. *J. Biochem.*, 113: 258-263.

XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. (1984). Inibidores de enzimas proteolíticas em plantas *Arch. Biol. Technol.* 27: 407-18.

YAMAMOTO, M., HARA, S. & IKENAKA, T. (1983). Amino acid sequences of two trypsin inhibitors from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus*) (L) DC.). *J. Biochem.*, 94: 849-863.

YOSHIKAWA, M., IWASAKI, T., FUJI, M. & OOGAKI, M. (1976). Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. *J. Biochemistry*, 79 (4): 765.

YU, Y. G., CHUNG, C. H.; FOWLER, A., SUH, S. W. (1988). Amino acid sequence of a probable amylase/protease inhibitor from rice seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 265: 466-475.