

ISOLAMENTO E CARACTERIZACAO PARCIAL DE UM INIBIDOR
DE TRIPSINA DE *VIGNA SINENSIS*

Francisca Denize Nogueira de Souza

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1 9 7 7

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Francisca Denize Nogueira de Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

José Xavier Filho
Orientador da Dissertação

28/II/77
Data

Maria da Guia Silva Lima

28/II/77
Data

Renato de Azevedo Moreira

28/II/77
Data

A meu marido
a meus filhos
e a minha mãe

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Xavier Filho, pela orientação criteriosa, o estímulo constante e a oportunidade de participar de um tipo de trabalho que foi decisivo para a minha formação científica.

Aos professores Maria da Guia Silva Lima e Renato de Azevedo Moreira, pelas valiosas sugestões e discussões nas diversas etapas do trabalho.

A Profa. Iracema Lima Ainouz, Chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, pelas sugestões e pelas facilidades materiais postas à disposição durante a elaboração deste trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, responsáveis pelo ambiente de permanente cooperação e estímulo.

A Sra. Mônica Nancy Lopes de Souza, que indiretamente, e de modo particular, muito contribuiu para a execução deste trabalho e ao Sr. Carlos Alberto Pontes, pela revisão do texto.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-graduação.

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Organização dos Estados Americanos (OEA), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, através de bolsa de Pós-graduação.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	6
A - MATERIAIS	6
B - MÉTODOS	6
1. Purificação parcial de inibidores	6
2. Determinação de proteína	8
3. Determinações de atividades de proteinases e inibidor	8
3.1. Tripsina	8
3.2. Quimiotripsina	9
3.3. Inibidor	10
4. Cromatografia em coluna de troca iônica	10
4.1. Recromatografias em DEAE-celulose	11
5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	11
5.1. Gel de pH 8,1	11
5.2. Gel em uréia 8 M	12
5.3. Gel com SDS e β -ME	12
6. Determinação de peso seco	13
7. Espectro de absorção	14
8. Coeficiente de extinção	14
9. Estequiometria da reação inibidor-tripsina e determinação do peso molecular	14
10. Filtração em gel de dextrana - Sephadex G-75.	15

	Página
10.1. Ácido fórmico 0,1 M pH 2,4	15
10.2. Tampão TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0	15
11. Ação da quimiotripsina sobre o inibidor ...	16
12. Modificação e determinação dos grupamentos amino livres	16
13. Tratamento do inibidor com 1,2 ciclo hexano <u>diona</u>	17
III. RESULTADOS	18
1. Purificação do inibidor	18
2. Atividade do inibidor	24
3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	24
3.1. Gel de pH 8,1	24
3.2. Gel em uréia 8 M	24
3.3. Gel com SDS e β -ME	28
4. Peso seco	28
5. Espectro de absorção	28
6. Coeficiente de extinção	28
7. Estequiometria da reação inibidor-tripsina	31
8. Filtração em gel de dextrana	31
9. Determinação dos grupamentos amino livres	34
10. Modificação com TNBS	34
11. Tratamento com 1,2 ciclo hexanodiona (CHD)	34
IV. DISCUSSÃO	40
V. CONCLUSÕES	44
VI. BIBLIOGRAFIA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de obtenção do inibidor bruto	19
2. Cromatografia em DEAE-celulose do inibidor bruto	20
3. Primeira recromatografia do inibidor de tripsina em DEAE-celulose	21
4. Segunda recromatografia do inibidor de tripsina em DEAE-celulose	22
5. Ação do inibidor sobre a atividade de tripsina e quimiotripsina	25
6. Eletroforese do inibidor em gel de poliacrilamida	27
7. Determinação do peso molecular do inibidor por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME	29
8. Espectro de absorção do inibidor na região do <u>ul</u> travioleta	30
9. Estequiometria da reação tripsina-inibidor	32
10. Filtração em gel do inibidor em Sephadex G-75 ..	33
11. Modificação dos grupamentos amino do inibidor com TNBS	36
12. Tratamento do inibidor com CHD	37
13. Tratamento de SBTI com CHD	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
I. Atividades específicas dos inibidores de tripsi na e quimiotripsina	23
II. Ação da quimiotripsina sobre o inibidor	26
III. Reação do inibidor com ácido trinitrobenzeno sul fônico (TNBS)	35
IV. Propriedades do inibidor	39

ABREVIATURAS

CHD	- 1,2 ciclo hexanodiona
DEAE	- dietilaminoetil
Fração VI	- inibidor de tripsina de Ventura e Xavier Filho
IB	- inibidor bruto
IT	- inibidor de tripsina isolado neste trabalho
IT/IQ	- inibidor de tripsina e quimiotripsina de Ventura e Xavier Filho
β -ME	- β -mercaptoetanol
QT	- quimiotripsina
SBTI	- "soybean trypsin inhibitor" - inibidor de soja de Kunitz
SDS	- sódio dodecil sulfato
T	- tripsina
TCA	- ácido tricloroacético
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametilenodiamino
TNBS	- ácido trinitrobenzeno sulfônico
TRIS	- 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (trishidroximetilaminometano)
UI	- unidades de inibidor

O inibidor de tripsina, objeto do presente estudo, é referido, na maioria das vezes, simplesmente como "o inibidor". Quando houve necessidade de especificar, isto foi feito com a abreviatura referida acima, IT.

SUMÁRIO

Um novo inibidor de tripsina foi isolado de sementes de *Vigna sinensis* cv. seridô, em forma homogênea, por meio de extração com água e purificação com TCA a 2,5%, sulfato de amônio a 50% e cromatografia em DEAE-celulose. A homogeneidade do inibidor foi confirmada por DEAE-celulose, eletroforese em gel de poliacrilamida, em uréia 8 M e eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS e β -ME.

O inibidor apresentou um peso molecular de, aproximadamente, 10.000 daltons por eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS e β -ME, e 11.040 daltons quando se utilizou a razão de combinação molar de 1:1 com tripsina. A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor foi calculada como $3,04 \times 10^{-9}$ M.

Por Sephadex G-75 em pH ácido, o inibidor apresentou um peso molecular de 11.220 daltons, e em pH alcalino o valor encontrado foi 19.910 daltons, indicando que o inibidor provavelmente pertence a um sistema associante dependente de pH.

O espectro de absorção do inibidor na região do ultravioleta não apresentou máximo em 280 nm e o coeficiente de extinção molar neste comprimento de onda foi 3308.

O inibidor não tem atividade contra quimiotripsina, não, sendo, entretanto, inativado por esta enzima.

Por modificação dos grupamentos amino livres com TNBS, o inibidor teve sua atividade reduzida de cerca de 80%, sendo, portanto, classificado como do tipo lisina.

I. INTRODUÇÃO

A ocorrência de substâncias capazes de inibir a atividade de enzimas proteolíticas de origem animal (e.g. tripsina, quimiotripsina, subtilisina) tem sido observada desde há muito tempo numa grande variedade de tecidos de origem animal e vegetal. Alguns destes inibidores podem se combinar com mais de uma enzima em sítios distintos e são geralmente de natureza protéica (1,2,3,4).

Vogel e colaboradores (1) classificaram os inibidores de natureza protéica em dois grupos: os de baixo peso molecular, de 6.000 a 12.000, e os de alto peso molecular, de 20.000 a 60.000 daltons. A grande maioria dos inibidores de origem vegetal pertence ao primeiro grupo. Entre os inibidores vegetais pertencentes ao segundo grupo destaca-se o inibidor de Kunitz, de peso molecular 21.500 daltons, encontrado em soja (5).

Os inibidores apresentam em sua estrutura tridimensional regiões conhecidas como centro ativo. É a estrutura deste centro que dá especificidade ao inibidor. Assim, os inibidores de tripsina apresentam no centro ativo uma ligação do tipo Lis-X ou Arg-X. Esta ligação fica geralmente localizada numa alça formada por pontes dissulfeto e é hidrolisada pela enzima. Alguns pesquisadores sugeriram que mesmo após o rompimento da ligação no inibidor ele permaneceria atrelado à enzima devido a contribuição de um número muito grande de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas para a estabilidade do complexo enzima-inibidor (6).

No reino animal, foi detectada a presença de inibidores de enzimas proteolíticas na clara do ovo, suco pancreático, sangue, urina, colostro, *Ascaris lumbricoides* (1,4) e em muitas outras fontes.

No reino vegetal a presença de inibidores foi constatada numa grande variedade de famílias, sendo as das leguminosas, gramíneas e solanáceas as mais estudadas (7,8). Os inibidores se encontram principalmente nas sementes e outros órgãos de reserva e se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular e pertencerem geralmente a sistemas associantes, como os inibidores isolados de milho, batata e vários legumes (7,9,10,11,12,13), e serem constituídos por dímeros e tetrâmeros, na maioria dos casos. Os inibidores de origem vegetal têm atividade de contra enzimas proteolíticas de origem animal e microbial que tenham especificidade semelhante a da tripsina e a da quimiotripsina, e apenas raramente eles têm ação contra proteínas vegetais (7).

Os inibidores de tripsina de origem vegetal apresentam muitas características em comum. Entre elas destaca-se uma conformação rígida mantida por muitas pontes dissulfeto, tornando-os resistentes à hidrólise enzimática, a agentes químicos e ao calor (6). Estes inibidores são inativados pela eliminação destas pontes, tanto por redução como por oxidação, e a reoxidação destas mesmas pontes restaura a atividade (14).

Segundo Ryan (7), as semelhanças estruturais e de especificidade entre inibidores isolados de vegetais de diferentes fontes parecem indicar que o centro ativo dos inibidores pode ter sido conservado durante milhões de anos de evolução, o que sugere que a capacidade inibitória é importante para a sobrevivência do organismo.

Os inibidores de sementes de legumes são conhecidos como sendo substâncias de peso molecular inferior a 10.000 daltons, possuindo, em média, 80 resíduos de aminoácidos. Estes inibidores apresentam também, como característico, o fato de possuírem nenhum ou poucos resíduos de triptofano e metionina, baixo conteúdo de tirosina e fenilalanina e alto conteúdo de cistina.

Na família das leguminosas, do gênero *Vigna*, ao qual pertence o material objeto deste estudo, é citado na literatura o isolamento e caracterização de inibidores em *Vigna sinensis* cv. seridô (15) e *Vigna sinensis*, variedade Redbow (16). Da variedade Redbow, estudada por Gennis e Cantor, foram isolados dois inibidores de dupla cabeça ("double-headed") ou seja, inibidores que apresentam dois sítios distintos de combinação com enzima. Um destes inibe tripsina e quimiotripsina simultaneamente, enquanto o outro inibe duas moléculas de tripsina ao mesmo tempo. Os inibidores foram denominados de iso-inibidores devido a semelhança de suas propriedades. Eles apresentam o mesmo resíduo NH₂-terminal, serina, distintos pontos isoelétricos e têm peso molecular de aproximadamente 8.000 daltons. Estes inibidores foram isolados por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose e por cromatografia de afinidade em colunas de tripsina e quimiotripsina-Sepharose.

Outro inibidor desta mesma espécie, mas do cultivar seridô, isolado por Ventura e Xavier Filho (15), caracteriza-se por apresentar forte atividade anti-quimiotríptica e fraca atividade contra tripsina. Este inibidor apresentou peso molecular de 10.000 daltons, com 84 resíduos de aminoácidos por molécula, e não tem metionina.

Royer (17,18) demonstrou a presença de inibidores de tripsina nas frações globulínicas e albumínicas extraídas de cotilédones e eixos de *Vigna unguiculata*. Estes inibidores foram purificados por passagem numa resina-tripsina insolúvel. Por eletroforese, as frações apresentaram, respectivamente, 4 e 5 componentes que Royer sugere sejam inibidores modificados devido a passagem na resina sólida. A mistura de inibidores anti-trípticos, presentes em *Vigna unguiculata*, apresenta peso molecular de 12.000 daltons e alta concentração de cistina (19%) (17,18).

Desde que os inibidores foram detectados em tecidos vegetais que se investiga a função destas substâncias. Inicialmente foram considerados como proteínas reguladoras ou protetoras. Atualmente há evidências que sugerem poderem os inibidores funcionar como proteínas reguladoras, controlando proteases endógenas, como proteínas de reserva, devido a sua presença em grande quantidade em sementes e tubérculos, ou, ainda, como agentes protetores contra ataques de insetos ou microorganismos (7,19). No gênero *Vigna* as evidências obtidas por Xavier Filho, Royer e Gennis e Cantor parecem indicar uma participação, pelo menos parcial, dos inibidores de tripsina e quimiotripsina no controle de proteases endógenas (8,15,16,17,18).

Em virtude da presença de inibidores em altas concentrações em alimentos de origem vegetal, como na soja, onde 6% de sua composição protéica são inibidores, estas substâncias são consideradas de importância social e econômica, pois afetam a nutrição humana e animal. O estudo de inibidores tem, portanto, despertado o interesse de pesquisadores em diversos ramos da ciência. Assim, os nutricionistas investigam o valor nutricional de produtos que contenham estas substâncias, uma vez que sua presença é constatada em materiais vegetais que servem de alimento para o homem e animais. Ao químico de proteínas estas substâncias servem como modelo para o estudo de interações proteína-proteína devido à formação de complexo enzima-inibidor, caracterizado por uma alta estabilidade. Aos fisiologistas, devido ao possível papel desempenhado pelos inibidores no desenvolvimento animal e vegetal, eles constituem um instrumento de trabalho cada dia mais atraente.

Objetivos da investigação

Os inibidores de tripsina em leguminosas, conhecidos desde 1944, são os mais estudados devido sua possível influên-

cia no valor nutritivo das proteínas destas sementes, uma das mais importantes fontes de proteínas vegetais da alimentação humana e animal.

Os dados da literatura são conflitantes quanto aos efeitos produzidos por estes inibidores nos animais que os ingerem. Estes resultados conflitantes podem ser devidos:

- a) - ao uso, nas experiências, de inibidores brutos ou apenas parcialmente purificados;
- b) - à presença, em um mesmo tecido ou preparação, de várias substâncias capazes de inibir a tripsina, pois estas substâncias podem, além de inibir a tripsina, ter a capacidade de produzir outras alterações fisiológicas;
- c) - à composição química destes inibidores poder variar de um lote de semente para outro;
- d) - à imprecisa definição de inibidores de tripsina;
- e) - à presença em legumes de outros fatores tóxicos.

Por outro lado a caracterização química e físico-química de cada um dos inibidores encontrados em uma determinada planta é também um pré-requisito essencial ao estudo de sua significação fisiológica.

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de um inibidor que atua exclusivamente sobre a atividade de tripsina, oriundo de sementes de *Vigna sinensis* cv. seridó. Além do isolamento e purificação do inibidor, foi feita uma caracterização parcial do mesmo, como contribuição para o esclarecimento do papel que estas substâncias exercem no desenvolvimento vegetal, bem como de seus possíveis efeitos tóxicos para o homem e outros animais.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II - A. Materiais

Sementes de feijão de corda (*Vigna sinensis* cv. seri dõ) utilizadas no presente trabalho foram fornecidas pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Tripsina, pepsina e citocromo c foram preparações cristalinas adquiridas de Nutritional Biochemicals Co. (NBCo), EUA.

Quimiotripsina e inibidor de soja (Kunitz) foram preparações cristalinas obtidas de Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Ácido trinitrobenzeno sulfônico (lote 11180-7) foi adquirido de Pierce Chemical Co., Illinois, EUA.

Ciclohexanodiona (lote 071057) foi uma preparação de Aldrich Chemical Co., Wisconsin, EUA.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

II - B. Métodos

1. Purificação parcial de inibidores

A purificação parcial de inibidores de tripsina (T) e quimiotripsina (QT) foi feita essencialmente de acordo como método desenvolvido por Ventura e Xavier Filho (15), utilizando

do farinha de sementes moídas em moinho Wiley adaptado com uma peneira de 60 malhas por polegada linear (60 mesh). Esta purificação parcial, após a qual se obtém uma mistura de inibidores de T e QT, chamada de inibidor bruto (IB), consiste num processo de cinco etapas, a saber:

Etapa 1 - Extração com água: 500 g de farinha foram suspensas em 4 litros de água, com agitação frequente, durante seis horas e a temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 8000 X G durante 20 minutos e o resíduo desprezado.

Etapa 2 - Precipitação com ácido tricloroacético (TCA): ao sobrenadante obtido na etapa 1 foi adicionado ácido tricloroacético a 100%, sob agitação, de tal modo que a concentração final fosse 2,5 g/100 ml de solução. A suspensão permaneceu em repouso durante 15 horas, a 4°C, após o que o sobrenadante foi decantado e filtrado. O precipitado foi desprezado.

Etapa 3 - Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ao sobrenadante da etapa 2 foi adicionado, sob agitação, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, para se obter uma concentração final de 31,3 g/100 ml. A suspensão foi deixada em repouso a 4°C por ca. de 15 horas e em seguida centrifugada a 8000 XG durante 20 minutos, após o que o sobrenadante foi desprezado.

Etapa 4 - Reprecipitação com TCA: o precipitado obtido na etapa anterior foi redissolvido em 100 ml de água e em seguida precipitado com TCA a 100%, sendo a concentração final de 2,5 g/100 ml de solução. A suspensão permaneceu a 4°C por 30 minutos, sendo em seguida centrifugada a 8000 XG durante 20 minutos e o precipitado desprezado.

Etapa 5 - Reprecipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: ao sobrenadante da etapa 4 foi adicionado, sob agitação, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, até a concentração final de 31,3 g/100 ml de solução. O material permaneceu por 15 horas a 4°C, quando então foi feita cen

trifugação a 8000 X G por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi redissolvido em 10 ml de água e dialisado contra água, a temperatura ambiente, durante 24 horas, e em seguida liofilizado. O material assim obtido foi chamado de inibidor bruto (IB).

2. Determinação de proteína

As concentrações de proteína do inibidor bruto foram determinadas pelo método do microbiureto (20), usando-se albumina sérica bovina como padrão. A avaliação de proteína nos efluentes de colunas cromatográficas foi feita através da leitura de absorvância a 280 nm. Para ambas as determinações, foi utilizado o espectrofotômetro Beckmann modelo DU.

3. Determinações de atividades de proteinases e inibidor

3.1. Tripsina

Soluções estoque de tripsina, contendo de 0,150 a 0,400 mg/ml, foram preparadas em HCl 0,0025 M. A concentração real da enzima foi calculada por meio da leitura de absorvância a 280 nm, usando-se $F_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ mg/ml}} = 0,621$ (21). A atividade da tripsina foi medida pelo método de digestão da caseína, desenvolvido por Kunitz (22). A concentração da solução de tripsina usada nos ensaios de atividade foi obtida por diluição da solução estoque descrita acima, com HCl 0,0025 M. Diferentes alíquotas da solução de tripsina foram pipetadas em tubos de ensaio, o volume completado para 1 ml com tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 e em seguida colocadas num banho a 37°C. A cada tubo foi adicionado 1 ml de caseína a 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6. A mistura permaneceu no banho durante 20 minutos, após

o que foram adicionados 3 ml de TCA a 5% e os tubos retirados do banho. Após 30 minutos de repouso, a suspensão foi filtrada e a absorvância dos filtrados foi lida a 280 nm contra água. Provas em branco foram preparadas para as concentrações extremas de tripsina, sendo que nestes tubos a adição de TCA sempre precedeu a de caseína. As correções da prova em branco para as concentrações intermediárias de tripsina foram feitas por extrapolção. A curva de atividade assim obtida foi comparada com a curva obtida por Kunitz, tendo-se encontrado um valor correspondente a 40% de sua preparação, considerada pura (22). No presente trabalho utilizou-se esta correção onde se fez necessário. Em algumas experiências, a atividade da tripsina e da quimiotripsina foi avaliada empregando-se o reagente de Folin, modificado por Lowry et al. (23) nos filtrados de TCA. Nestes casos, o volume de reação totalizava 3 ml e a reação de Folin era feita utilizando-se 1 ml dos filtrados de TCA, neutralizados com 0,05 ml de NaOH 2 N, sendo a leitura da densidade ótica feita a 750 nm.

3.2. Quimiotripsina

Soluções estoque de quimiotripsina, contendo de 0,160 a 0,350 mg/ml, foram preparadas em HCl 0,001 M, e a concentração real da enzima calculada com auxílio do fator $F_{280\text{ nm}}^{1\text{ mg/ml}} = 0,500$ (22). A determinação da atividade da quimiotripsina foi feita essencialmente pelo método de Kunitz descrito acima, com pequenas modificações (24). Utilizou-se tampão borato 0,1 M pH 8,0, em substituição ao tampão fosfato, ao qual foi adicionado CaCl_2 cuja concentração final na mistura enzima-substrato foi 0,005 M. A quimiotripsina utilizada foi considerada como sendo 100% ativa.

3.3. Inibidor

A atividade do inibidor foi determinada pela atividade residual da tripsina. A medida consiste em comparar a atividade trípica de amostras contendo quantidades crescentes de inibidor, com a atividade de soluções de tripsina sem inibidor. O método usado foi o de Kunitz, já descrito. Foram feitas correções utilizando-se provas em branco para a enzima e também para as concentrações extremas de inibidor. Para as concentrações intermediárias de inibidor, as correções das provas em branco foram feitas por extrapolação. A atividade foi sempre expressa em porcentagem da atividade residual da tripsina, ou, quando se calculou a atividade específica (a tripsina foi determinada empregando-se o reagente de Folin, acima) esta foi expressa em UI/mg de material, utilizando-se a definição de UI (unidades de inibidor) dada por Xavier Filho (25).

4. Cromatografia em coluna de troca iônica

Dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) previamente suspensa em água, após retiradas as partículas finas, foi lavada sucessivamente com NaOH 0,1 N, água, HCl 0,1 N, água, e finalmente equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 7,0. A DEAE-celulose assim preparada foi empacotada sob a ação da gravidade em um tubo de vidro, para dar uma coluna de 25 x 2,0 cm. A solução de inibidor bruto, contendo 150 a 200 mg de IB, foi feita no tampão de equilíbrio da coluna e dialisada, a 4°C, por uma noite, contra o mesmo tampão. A amostra dialisada foi centrifugada e o precipitado desprezado. O sobrenadante limpo foi aplicado na coluna e a eluição, feita inicialmente com o tampão de equilíbrio da coluna, foi continuada com um gradiente linear de NaCl (0 - 1,5 M, 500 ml) no mesmo tampão. Mant

ve-se o fluxo em aproximadamente 36 ml/hora, sendo o efluente recolhido por meio de um coletor em frações contendo 2,7 ml cada. A absorvância do efluente foi determinada a 280 nm, com a finalidade de se localizar as diversas frações contendo proteína. As frações contendo inibidor de tripsina (IT) e inibidor de tripsina/quimiotripsina (IT/IQ) foram reunidas, dialisadas contra água e liofilizadas.

4.1. Recromatografias em DEAE-celulose

Uma coluna de DEAE-celulose medindo 28 x 2,0 cm foi preparada como descrito no item anterior. A amostra a ser aplicada, correspondente a fração IT da figura 2, foi dissolvida no tampão de equilíbrio da coluna e dialisada, a 4°C, contra o mesmo tampão, durante uma noite. Em seguida foi centrifugada e o sobrenadante límpido aplicado na coluna. A eluição foi iniciada com o tampão de equilíbrio e seguida por gradiente linear de NaCl (0 - 1,5 M, 500 ml) no mesmo tampão. O fluxo era de aproximadamente 28 ml/hora, sendo o efluente recolhido por um coletor em frações de aproximadamente 2,7 ml. A absorvância do efluente foi determinada a 280 nm para cada fração.

5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

5.1. Gel de pH 8,1

Para eletroforese em gel de poliacrilamida utilizou-se o método de Clarke (26). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, empregando-se uma diferença de potencial de 140-160 volts e 4-6 mA por coluna de gel. A quantidade de proteína aplicada era da ordem de 50 a 500 µg em 50 a 100 µl de solução. A localização das bandas foi feita com negro de amido

a 1% em ácido acético 7%, e o descoramento feito com ácido acético, a 7%, por eletroforese.

5.2. Gel em uréia 8 M

O gel de poliacrilamida em uréia 8 M foi preparado segundo o método descrito por Xavier Filho (27): 0,6 g de Cyanogum foram dissolvidas em 15 ml de tampão TRIS-glicina (glicina 29 g, TRIS 6,0 g e H₂O 980 ml), diluído para 135 ml com solução de uréia, de tal modo que a concentração final de uréia fosse 8 M e o pH da mistura 8,1. A esta solução foram adicionados 0,015 ml de TEMED e em seguida 11 mg de persulfato de amônio. A polimerização se completou em uma hora. As amostras foram dissolvidas num tampão semelhante, mas contendo uréia 10 M, o que aumentou a densidade da solução. O tempo de contacto do inibidor com o tampão contendo uréia 10 M foi de aproximadamente 24 horas, contado a partir da dissolução da amostra. A quantidade de proteína aplicada por coluna de gel era da ordem de 250 µg. O eletrólito foi o tampão usado para preparação do gel. A eletroforese desenvolveu-se a temperatura ambiente, com uma diferença de potencial de 120-140 volts e 4 mA por coluna de gel. A localização das bandas foi feita com solução de negro de amido a 1% em ácido acético 7%, durante 60 minutos, e o descoramento feito com ácido acético a 7%, por eletroforese.

5.3. Gel com SDS e β-mercaptoetanol

Eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo sódio dodecil sulfato (SDS), foi feita segundo o método de Weber e Osborn (28). As proteínas (concentrações finais de 0,8 mg/ml) foram dissolvidas numa solução de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo SDS 1% e β-mercaptoetanol a 1% e incubadas a 40°C por duas horas. O tampão para o gel continha 7,8 g de NaH₂PO₄.H₂O,

38,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g de SDS por litro. A solução de acrilamida (30%) foi preparada com 30,0 g de acrilamida e 0,8 g de metilenobisacrilamida em água para um volume final de 100 mL. Esta mistura foi sempre filtrada através de papel Whatman nº 1. O gel foi preparado na proporção de 2:2:1:1 em volume, correspondendo, respectivamente, a tampão para o gel, acrilamida 30%, TEMED 1% e persulfato de amônio 0,45%. A polimerização ocorreu a temperatura ambiente. As soluções de proteína foram adicionadas à solução densa preparada com azul de bromofenol 0,05% em água, glicerol, β -mercaptoetanol e tampão de diálise respectivamente (0,3:5,0:0,5:5,0), e em seguida aplicadas às colunas de gel. O eletrólito foi o tampão para o gel diluído com 2 volumes de água. A eletroforese se desenvolveu a temperatura ambiente, com corrente constante e igual a 8 mA por gel, durante 4 horas. A localização das bandas de proteína foi feita por imersão na solução corante, Coomassie brilliant blue 0,25% em metanol a 50% e ácido acético glacial (90,8:9,2). O descoramento foi feito inicialmente por imersão dos cilindros de gel na solução descorante (ácido acético 7,5%, metanol 5,0% em água) e em seguida por eletroforese, usando-se a mesma solução.

6. Determinação do peso seco

O peso seco do inibidor purificado foi determinado submetendo-se amostras de 10 mg a aquecimento a 110°C , em estufa, com posterior resfriamento a temperatura ambiente em dessecador, em presença de P_2O_5 , até ser obtido peso constante.

7. Espectro de absorção

Para a determinação do espectro de absorção do inibidor puro na região do ultravioleta, usou-se uma solução que continha 0,942 mg/ml em tampão fosfato pH 7,6, $\mu = 0,1$. O espectro foi determinado manualmente, utilizando-se um espectrofotômetro Beckmann modelo DU.

8. Coefficiente de extinção, $E_1^{1\%}$, 280 nm

O coeficiente de extinção, $E_1^{1\%}$, 280 nm, foi obtido a partir de medidas da absorbância de soluções diluídas a partir da solução utilizada para determinação do espectro de absorção na região do ultravioleta. As diluições foram feitas com tampão fosfato pH 7,6, $\mu = 0,1$, e continham 0,1884, 0,3768 e 0,5652 mg/ml.

9. Estequiometria da reação inibidor-tripsina e determinação do peso molecular

A estequiometria da reação inibidor-enzima foi determinada em função da atividade residual da enzima após reação com o inibidor. Com a razão de combinação inibidor-enzima obtida a partir da porção linear da curva, foi calculado um peso molecular para o inibidor, admitindo-se uma estequiometria molar de 1:1 e um peso molecular de 24.000 daltons para tripsina. A tripsina utilizada nesta experiência teve sua atividade corrigida de acordo com o descrito anteriormente.

10. Filtração em gel de dextrana - Sephadex G-75

Uma coluna de Sephadex G-75 em água foi montada em uma coluna de vidro K25/45 (Pharmacia), deixando-se o gel sedimentar por gravidade, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (29). Após equilíbrio, a coluna de gel media 48 x 2,5 cm.

10.1. Ácido fórmico 0,1 M pH 2,4

A coluna de Sephadex G-75 referida foi equilibrada com ácido fórmico 0,1 M pH 2,4. As amostras de inibidor (50 mg da fração resultante da 1ª cromatografia) dissolvidas em 2 ml de ácido fórmico 0,1 M pH 2,4 foram aplicadas após 1, 24 e 48 horas de sua preparação e mantidas a temperatura ambiente. A filtração foi iniciada com o fluxo ajustado para 25 ml/hora, e o volume das frações foi de 4,2 ml. A absorbância de cada fração foi lida a 280 nm em um espectrofotômetro Beckmann DU.

10.2. Tampão TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0

A mesma coluna usada para filtração em pH ácido foi também utilizada para filtração em pH alcalino. Neste experimento, a coluna foi equilibrada com tampão TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0 e o fluxo e volume das frações coletadas foram mantidos nos valores usados para a filtração em pH ácido. As amostras de inibidor (50 mg da fração resultante da 1ª cromatografia) dissolvidas no tampão de equilíbrio da coluna foram aplicadas observando-se o mesmo esquema seguido na filtração em meio ácido. Para ambas as experiências foi feita uma estimativa aproximada do peso molecular do inibidor através da equação derivada por Determann e Michel (30).

11. Ação da quimiotripsina sobre o inibidor

Cinco ml de uma solução de inibidor (16 $\mu\text{g/ml}$), em tampão fosfato 0,2 M pH 7,0, foram tratados com uma solução (5 ml) de quimiotripsina (32 $\mu\text{g/ml}$), em água, durante uma hora, a 37°C. A reação foi detida pela adição de TCA 100%, de tal modo que a concentração final desse ácido fosse 2,5%, e em seguida neutralizada com NaOH 4 N. Aliquotas de 0,5 ml da mistura acima foram retiradas para determinação da atividade antitriptica residual, de acordo com o método de digestão da caseína de Kunitz (22), descrito anteriormente.

12. Modificação e determinação dos grupamentos amino livres

A determinação dos grupamentos amino livres foi feita segundo o método de Habeeb (31), descrito a seguir: a 1 ml de solução de inibidor (0,5 mg/ml) foram adicionados 1 ml de solução de NaHCO_3 a 4%, pH 8,0 e 1 ml de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), a 0,1%, em água. A mistura foi deixada em banho, a 40°C, por duas horas. Em seguida foi adicionado 1 ml de SDS, a 10%, e 0,5 ml de HCl 1 N. A absorbância da solução foi lida em um espectrofotômetro Beckmann DU, a 345 nm, contra uma solução preparada da maneira descrita acima, mas contendo 1 ml de água ao invés de solução de inibidor. Aliquotas de 0,2 ml da solução usada para determinação dos grupamentos amino livres, descrita anteriormente, foram diluídas para 5,0 ml com água (32), e a atividade antitriptica residual das soluções resultantes foi determinada pelo método caseinolítico de Kunitz (22).

13. Tratamento do inibidor com 1,2 ciclo hexanodiona (CHD)

A modificação de resíduos de arginina no inibidor pu
ro (IT) ou no inibidor de soja de Kunitz, foi feita segundo o
método de Liu et al. (33), descrito a seguir: ao inibidor
(2,9 mg para IT e 5,4 mg para inibidor de soja) dissolvido em
4,5 ml de trietanolamina 0,1 M, pH 10, foram adicionados 0,5 ml
de uma solução aquosa de CHD, contendo 22,2 mg/ml. Uma prova
em branco foi feita onde 0,5 ml de água sem CHD foram adiciona
dos à solução de inibidor em trietanolamina 0,1 M, pH 10. Os
tubos permaneceram no escuro, a temperatura ambiente, durante
aproximadamente 15 horas. A seguir foi feita diálise contra
água, a temperatura de 4°C, durante aproximadamente 24 horas.
A atividade antitriptica residual desta solução foi determina
da do modo já descrito anteriormente.

III. RESULTADOS

1. Purificação do inibidor

A Figura 1 mostra, de forma esquemática, as etapas de extração e purificação inicial do inibidor. O material assim obtido foi chamado de "inibidor bruto" e representava de 0,04 a 0,16% da massa inicial da farinha. Em seguida o inibidor bruto, em quantidades que variavam de 150 a 200 mg, foi submetido a cromatografia em DEAE-celulose em gradiente linear de NaCl (0 - 1,5 M), como descrito anteriormente. O material contido nos tubos correspondentes à fração achuriada da Figura 2 foi reunido, dialisado e liofilizado. Este material, correspondente à Fração VI de Ventura e Xavier Filho (15), e aqui denominada IT, representa a maior parte das frações que inibem predominantemente a atividade da tripsina. O rendimento de IT, nesta primeira cromatografia, representava de 10 a 15% do inibidor bruto aplicado. O inibidor IT, resultante de várias cromatografias em DEAE-celulose, foi acumulado e recromatografado em porções de 150 mg. A Figura 3 mostra uma dessas recromatografias. O rendimento nesta etapa alcançou ca. de 33%. O inibidor IT, resultante de 3 recromatografias (150 mg) em DEAE-celulose (Fig. 3), foi submetido a uma segunda recromatografia, no mesmo sistema, e da qual foram obtidos 83 mg de inibidor considerado puro (Fig. 4). Este material foi usado nas experiências aqui relacionadas. Quando isto não aconteceu o material utilizado estava explicitamente definido. A Tabela I compara as atividades específicas, antitriptica e antiquimiotriptica, das diversas preparações do inibidor de tripsina. Verifica-se que há uma purificação de cerca de 3,7 vezes com relação ao inibidor bruto.

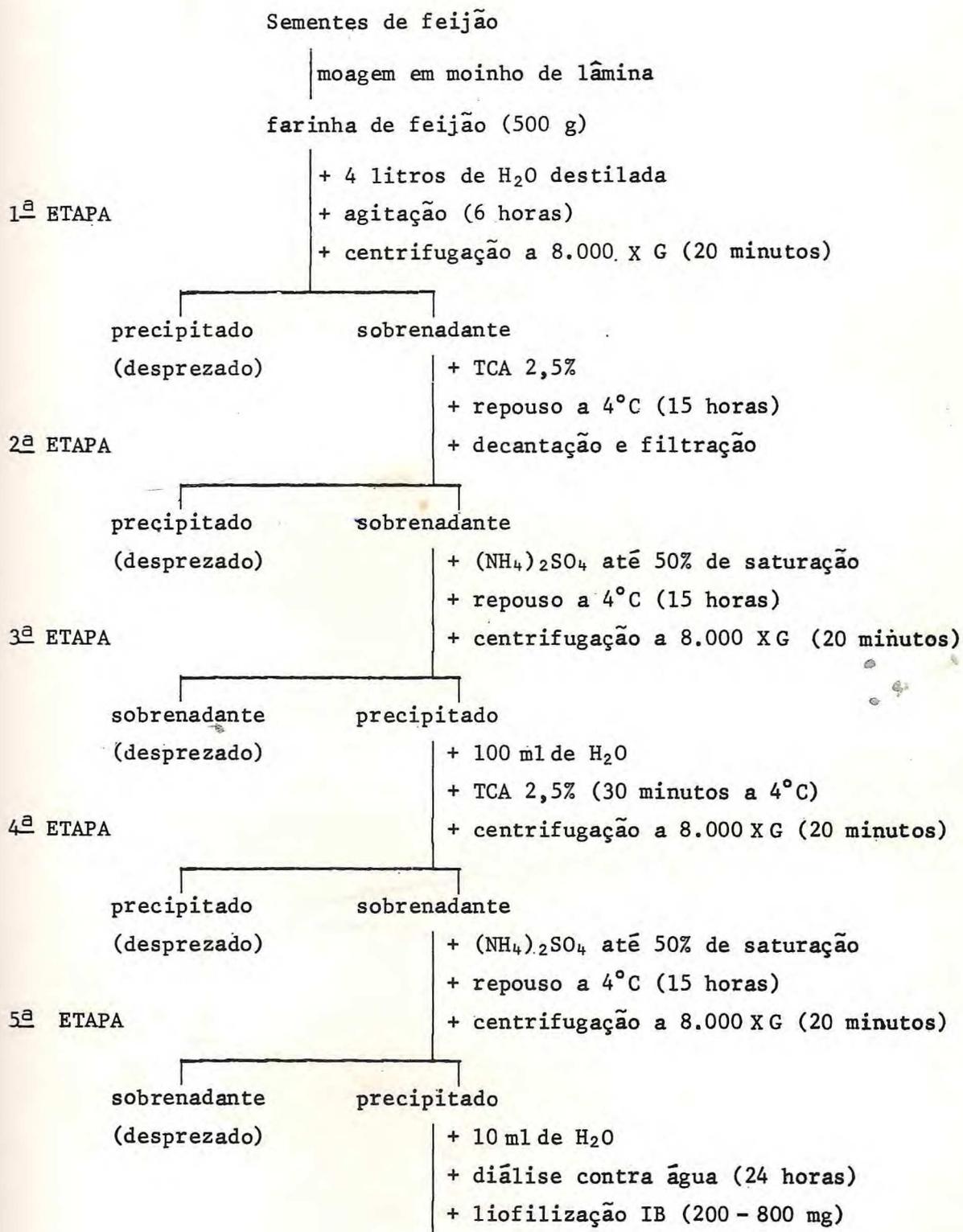


Figura 1 - Esquema de obtenção do Inibidor Bruto

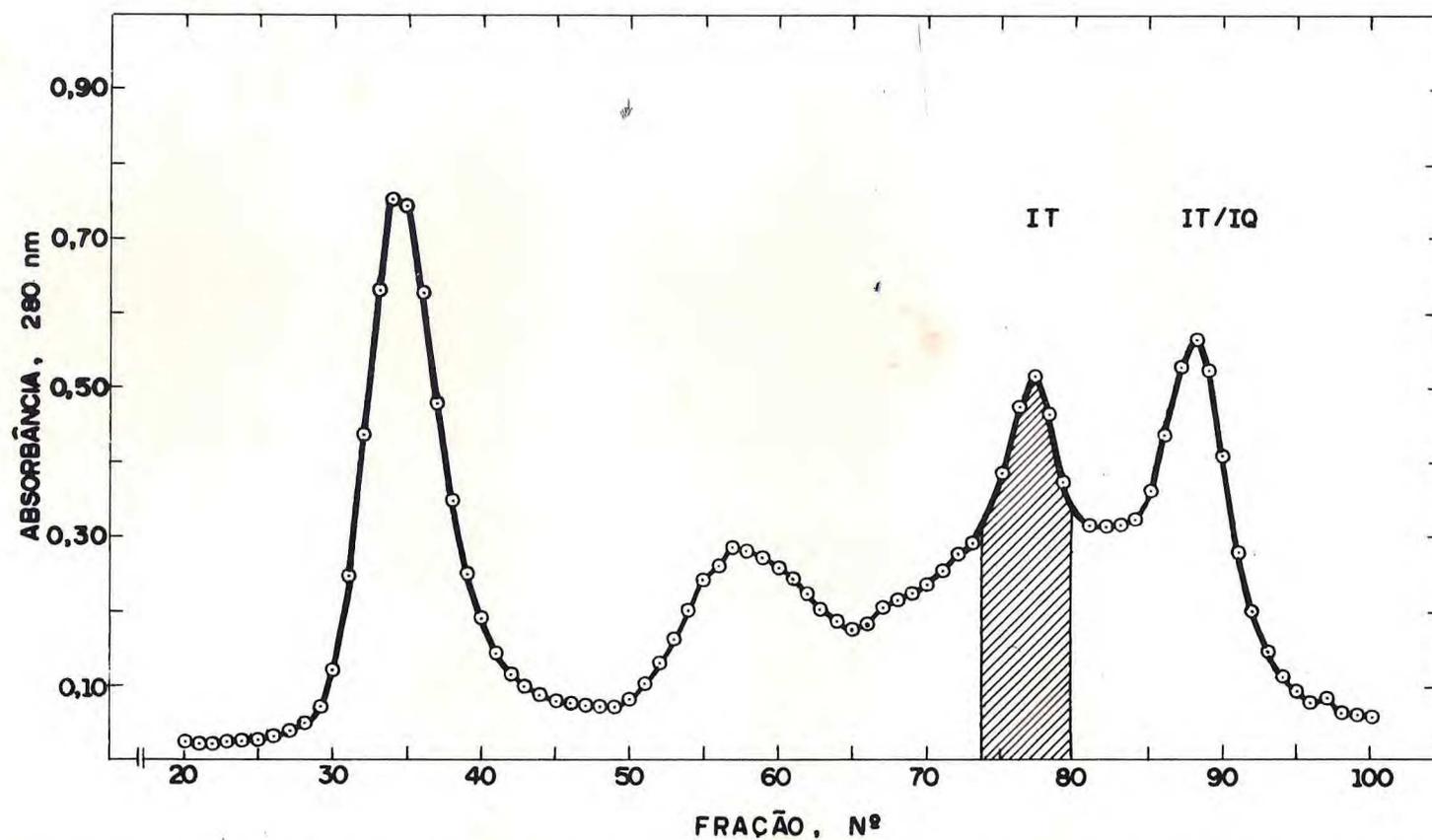


Figura 2 - Cromatografia do inibidor bruto em DEAE-celulose. Coluna 35 cm x 2,0 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M, pH 7,0. Gradiente linear de 0 - 1,5 M de NaCl iniciado no tubo 9. Volume da fração 2,7 ml.

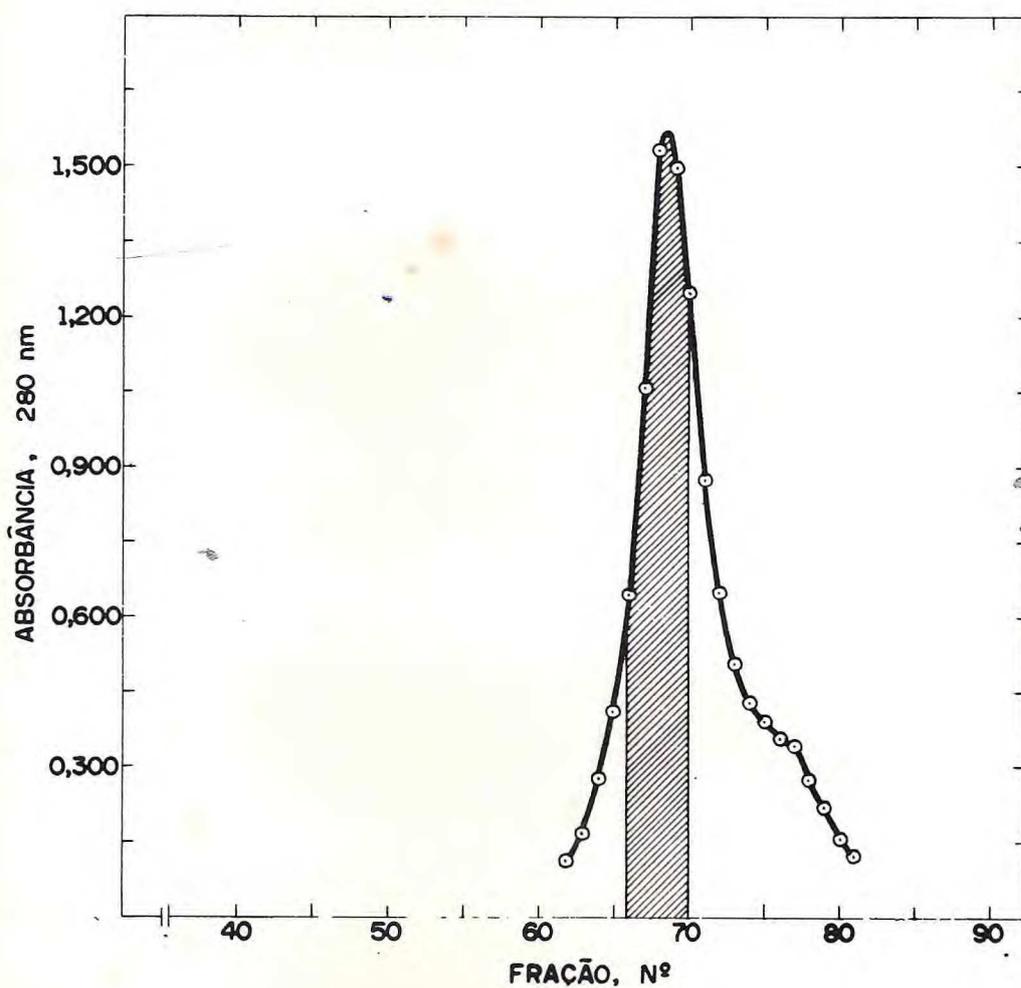


Figura 3 - Primeira recromatografia do inibidor em DEAE-celulose. Coluna 28 cm x 2,0 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M pH 7,0. Gradiente linear de 0 - 1,5 M de NaCl iniciado no tubo 9. Volume da fração 2,7 ml.

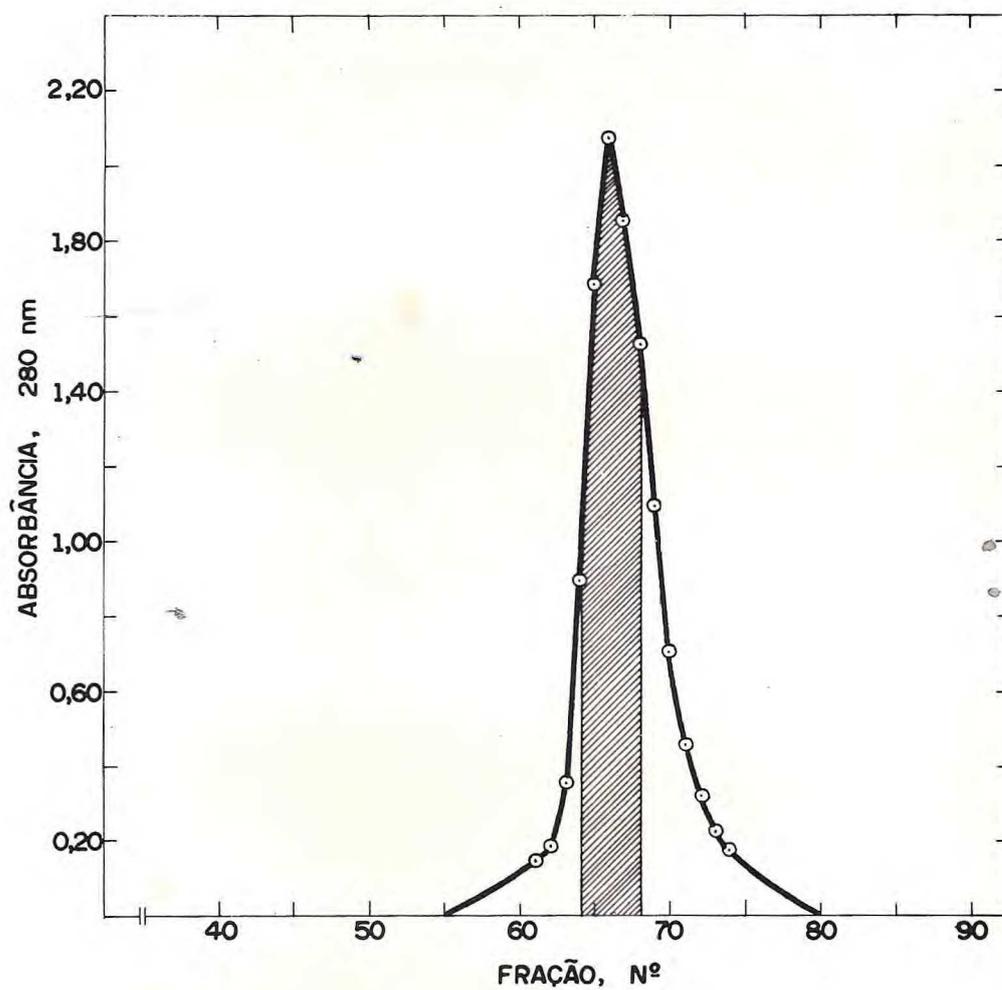


Figura 4 - Segunda recromatografia do inibidor em DEAE-celulose. Coluna 28 cm x 2,0 cm; tampão de partida: fosfato 0,005 M pH 7,0. Gradiente linear de 0 - 1,5 M de NaCl iniciado no tubo 9. Volume da fração 2,7 ml.

T A B E L A I

Atividades específicas dos inibidores de tripsina (IT) e quimiotripsina (IQ)

	Atividade específica	
	Antitriíptica UI/mg	Antiquimiotriíptica UI/mg
Inibidor Bruto (IB)	447,7	160,5
IT (1ª cromatografia)	1.617,0	108,0
IT (2ª recromatografia)	1.676,0	zero

2. Atividade do inibidor

A Fig. 5 mostra curvas de atividade residual de preparações de tripsina e quimiotripsina, quando incubadas com quantidades crescentes de inibidor. Como se vê, o inibidor tem uma forte atividade antitriptica e é inteiramente destituído de atividade contra quimiotripsina. Mostrou-se, por outro lado, que esta enzima não tinha nenhum efeito sob a atividade antitriptica do inibidor (Tabela II).

3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.1. Gel de pH 8,1

Por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1 segundo o método de Clarke (26), o inibidor mostrou a presença de 5 componentes, como demonstra a Figura 6A. Ainda na figura pode-se observar que o 2º componente, de menor mobilidade, é o quantitativamente mais significativo.

3.2. Gel em uréia 8 M

O inibidor, após desnaturação por uréia 10 M a pH 8,1 durante 24 horas, a temperatura ambiente, apresentou-se como um sistema homogêneo quando submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida em uréia 8 M, pH 8,1, como mostra a Figura 6B. Eletroforese das soluções de inibidor em uréia 8 M com 1 e 12 horas de contacto mostrou a presença de várias bandas que desapareceram no tratamento com 24 horas. Isto sugeriu que a heterogeneidade do inibidor, vista por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 8,1, poderia ser resultado de associação.

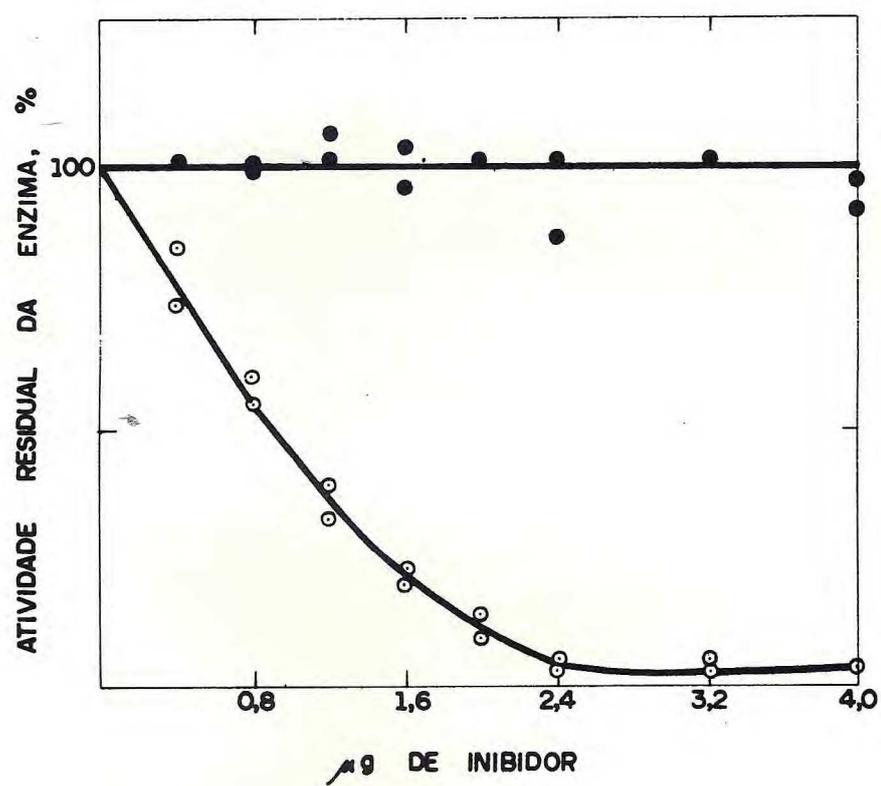


Figura 5 - Atividade do inibidor puro contra tripsina (○) e quimiotripsina (●), medida pelo método de Kunitz.

T A B E L A I I

Ação da quimiotripsina sobre o inibidor de tripsina (IT)

Tratamento	Atividade trípica residual (%)
Inibidor + água	3,96
Inibidor + quimiotripsina	5,06
Tampão fosfato + água	85,25
Tampão fosfato + quimiotripsina	100,00

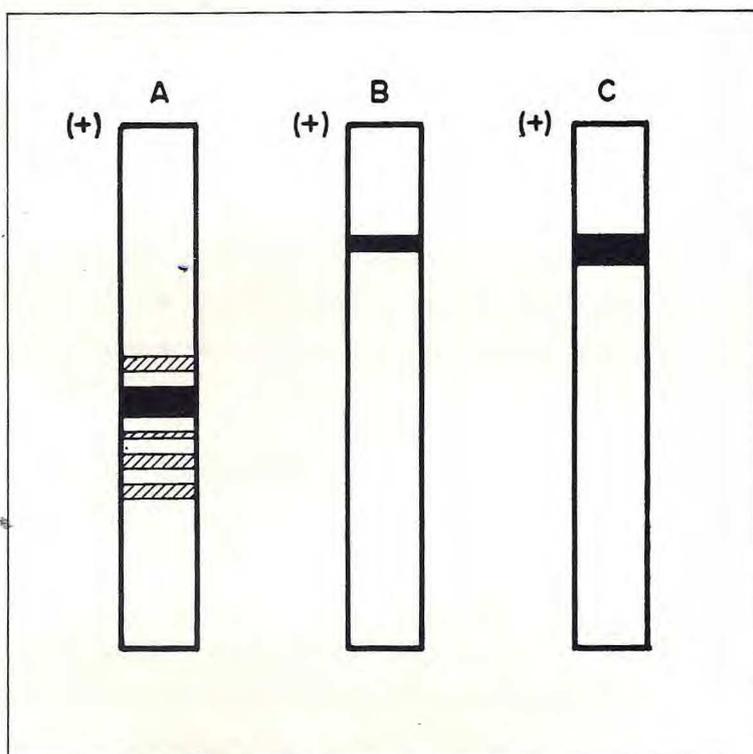


Figura 6 - Eletroforese do inibidor em gel de poliacrilamida.
A) pH 8,1; B) Uréia 8 M de pH 8,1; C) SDS e β -ME.

3.3. Gel com SDS e β -mercaptoetanol

A Figura 6C mostra o resultado obtido quando o inibidor, reduzido por β -mercaptoetanol em presença de SDS, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol. Também neste experimento o inibidor se apresenta como um sistema homogêneo. Foi encontrado um valor de 10.000 daltons para o peso molecular do inibidor, quando comparado a proteínas de peso molecular conhecido (Fig. 7).

4. Peso seco

O teor de água no inibidor, determinado como perda de peso a 110°C, foi de 5,8%. Este valor foi levado em consideração quando se obtinha a massa do inibidor por pesagem.

5. Espectro de absorção

O espectro de absorção do IT na região do ultravioleta é mostrado na Fig. 8 e foi determinado em solução de inibidor contendo 0,942 mg/ml em tampão fosfato, pH 7,6 $\mu = 0,1$, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico em um espectrofotômetro Beckmann modelo DU. O inibidor não apresenta máximo de absorção na região de 280 nm, o que sugere a ausência ou pequenas quantidades de triptofano e tirosina, ou, de ambos aminoácidos, em sua composição.

6. Coefficientes de extinção

O coeficiente de extinção $E_1^{1\%}$ cm, 280 nm, calculado a partir de medidas de absorbância de soluções diluídas convenientemente, foi 3,145. O fator ótico, $P_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ mg/ml}}$ para conversão de leituras de absorbância em 280 nm a concentração de proteí-

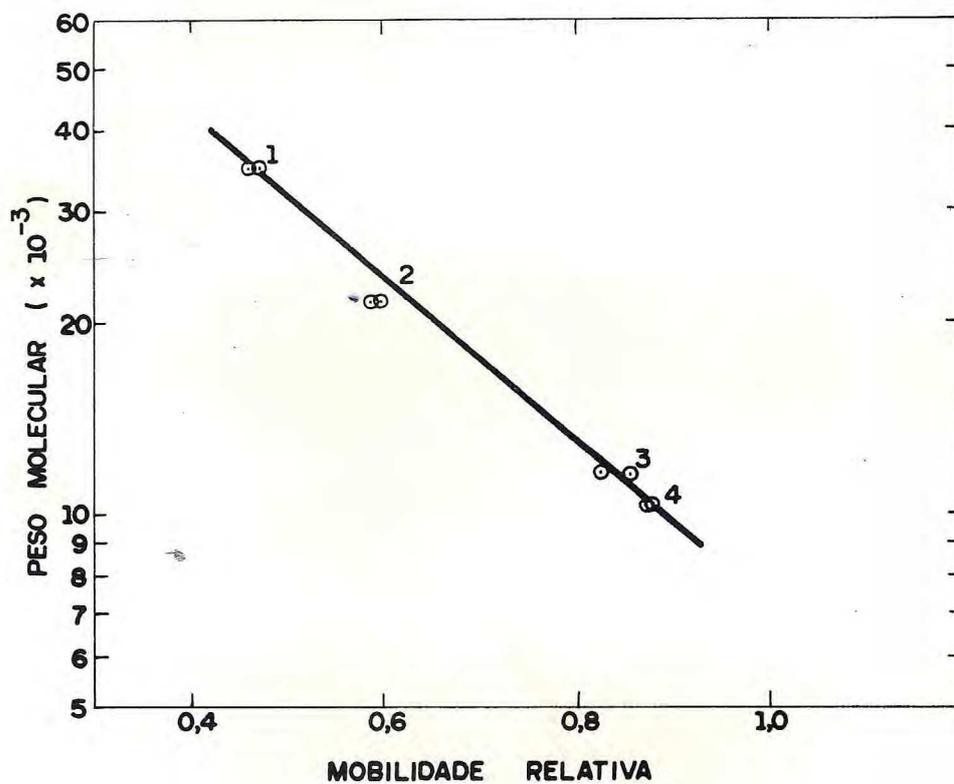


Figura 7 - Determinação do peso molecular do inibidor por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME. I. pepsina; 2. SBTI; 3. cit c; 4. inibidor.

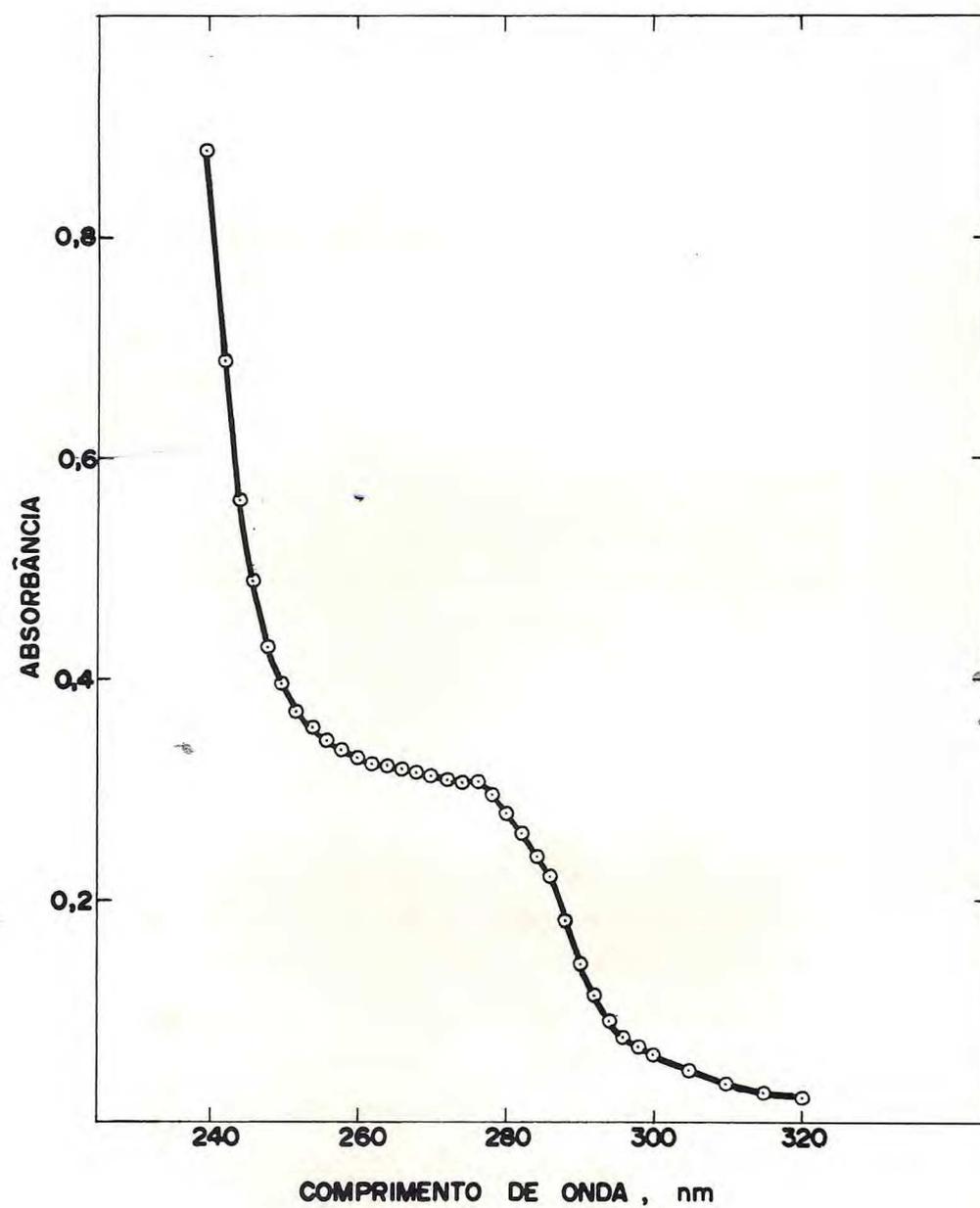


Figura 8 - Espectro de absorção do inibidor na região do ultra violeta, pH 7,6.

na em mg/ml, foi calculada como 3,18. Com o auxílio do peso molecular médio (Tab. IV) foi calculado o coeficiente de extinção molar de 3.308 para o inibidor purificado.

7. Estequiometria da reação inibidor-tripsina

A Figura 9 mostra a estequiometria da reação inibidor-tripsina, usando caseína como substrato. O peso molecular do inibidor purificado, 11.040 daltons, foi calculado pela razão inibidor/tripsina que anula a atividade da enzima, admitindo-se uma estequiometria de 1:1 e tomando-se como peso molecular da tripsina o valor de 24.000 daltons.

Com este experimento, avaliou-se também a constante de dissociação, K_i , do complexo enzima-inibidor. O valor encontrado, $3,09 \times 10^{-9}$ M, é da mesma ordem de grandeza de outros complexos entre inibidores de origem vegetal e as enzimas tripsina e quimiotripsina (34).

8. Filtração em gel de dextrana

A Figura 10 mostra os resultados obtidos quando o inibidor (resultante da 1ª cromatografia em DEAE-celulose) foi submetido a fracionamento, a temperatura ambiente, em coluna de Sephadex G-75, em ácido fórmico 0,1 M pH 2,4 e em tampão TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0. Em pH ácido, foi encontrado o valor 11.220 daltons para o peso molecular da fração mais significativa. Em pH 8,0, calculou-se o valor de 19.910 daltons para esta mesma fração. Esta variação de peso molecular, refletindo, provavelmente, uma associação a pH 8,0, parece não depender de tempo, pois os perfis não variaram quando se fez a filtração em gel, usando-se amostras que estiveram em solução durante 1, 24 e 48 horas.

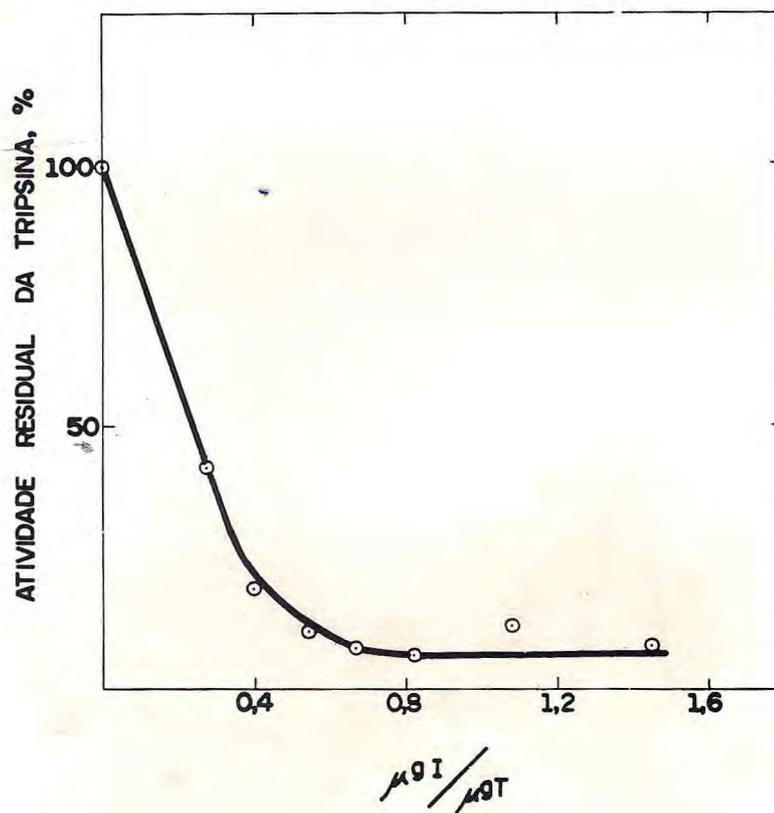


Figura 9 - Estequiometria da reação tripsina-inibidor, medida pela atividade residual da tripsina.

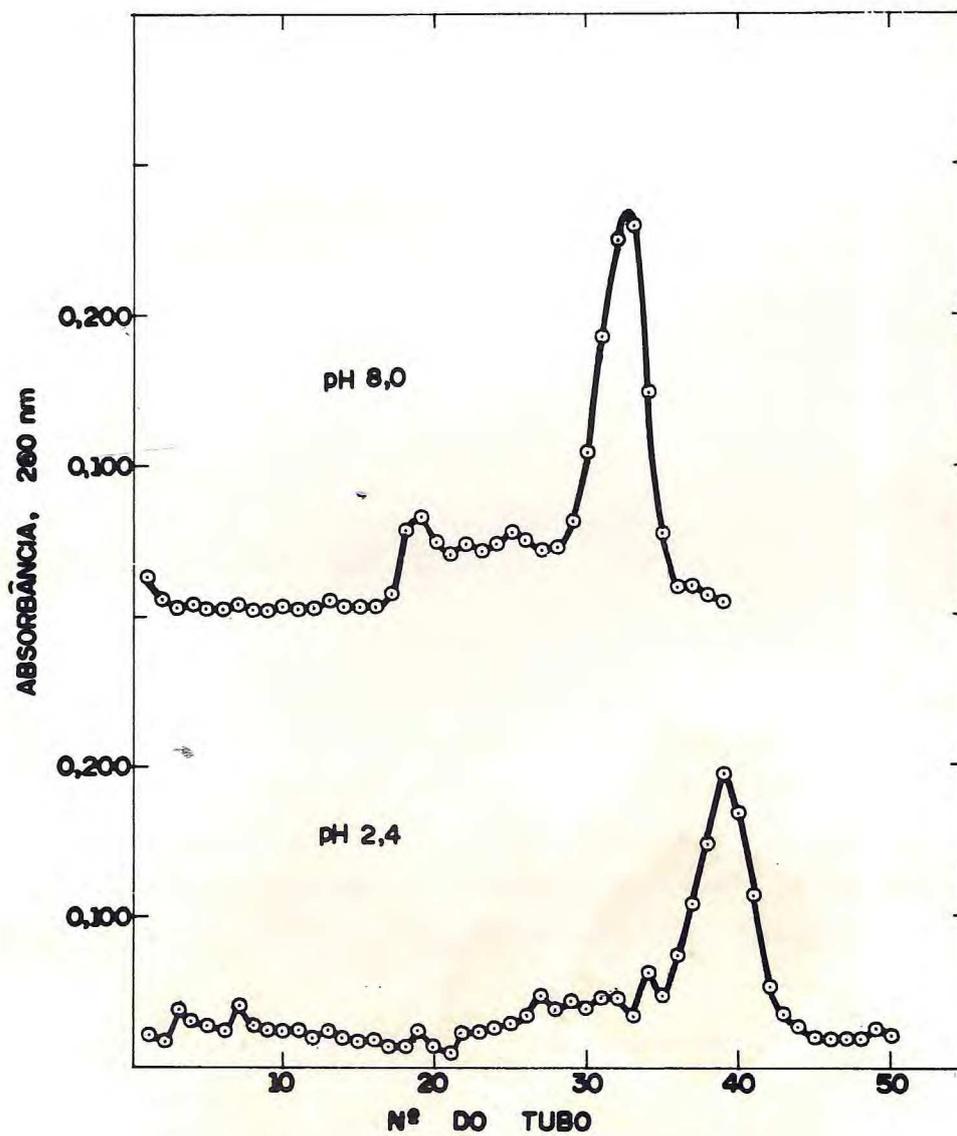


Figura 10 - Filtração em gel do inibidor em Sephadex G-75. A eluição foi feita com ácido fórmico 0,1 M pH 2,4 e tampão TRIS-HCl 0,01 M pH 8,0. Volume da fração 4,2 ml.

9. Determinação dos grupamentos amino livres

A quantização dos grupamentos amino livres do inibidor purificado foi feita pelo método de Habeeb (31), já descrito. O número destes grupamentos foi calculado usando-se o valor de $1,1 \times 10^4$, dado por Okuyama e Satake e citado por Haynes et al. (32), para o coeficiente de extinção molar de um grupamento trinitrofenilamino a 345 nm. Foram feitas leituras em 345 nm, imediatamente após a adição de TNBS (ver métodos). Nestas condições, foram detectados dois grupamentos amino livres. Após o tratamento a 40°C por duas horas, e a adição de SDS e HCl, foram encontrados valores que corresponderam a sete grupamentos amino livres (Tabela III).

10. Modificação com TNBS

O inibidor purificado, quando tratado com ácido trinitrobenzeno sulfônico, reagente específico para grupamentos amino livres, teve sua atividade diminuída para 20 e 72% dos valores calculados para o inibidor sem nenhum tratamento e para o inibidor aquecido a 40°C, por duas horas, respectivamente, como mostra a Figura 11. Estes resultados sugerem que o inibidor de tripsina é um inibidor do tipo lisina.

11. Tratamento com 1,2 ciclo hexanodiona (CHD)

As Figuras 12 e 13 mostram os resultados obtidos quando o inibidor purificado e o inibidor de soja foram tratados com CHD, reagente específico para resíduos arginil. O tratamento do inibidor de soja com CHD mostrou que sua atividade foi diminuída de aproximadamente 40%, o que confirma ser este inibidor do tipo arginina (35). A ação de CHD sobre o inibidor purificado (IT) foi aparentemente nula, mostrando que este inibidor não é do tipo arginina.

T A B E L A I I I

Reação do inibidor de tripsina (IT) com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)

Tratamento	Nº de grupamentos NH ₂ livres calculados
a. IT em pH 8,0, temperatura 25°C, leitura a 345 nm imediatamente após a adição de TNBS	1,88
b. IT em pH 8,0, temperatura de 40°C (2 horas), em presença de SDS 2,2%	6,65

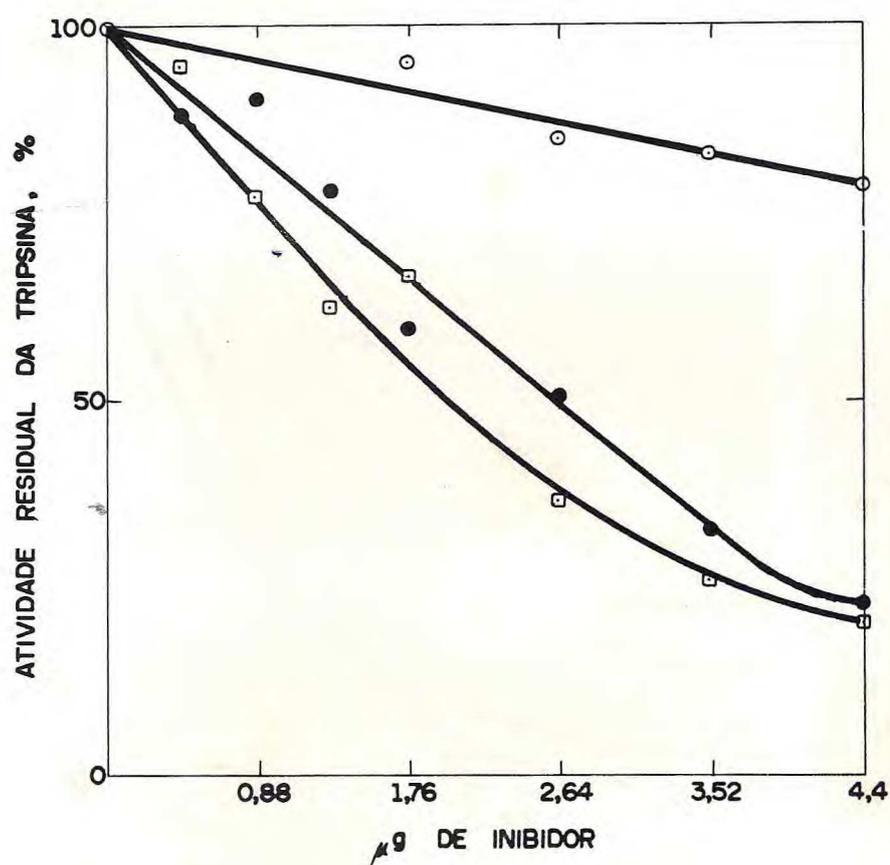


Figura 11 - Modificação dos grupamentos amino do inibidor com TNBS. ○—○, inibidor com TNBS; ●—●, inibidor a 40°C durante 120 minutos; □—□, inibidor sem TNBS.

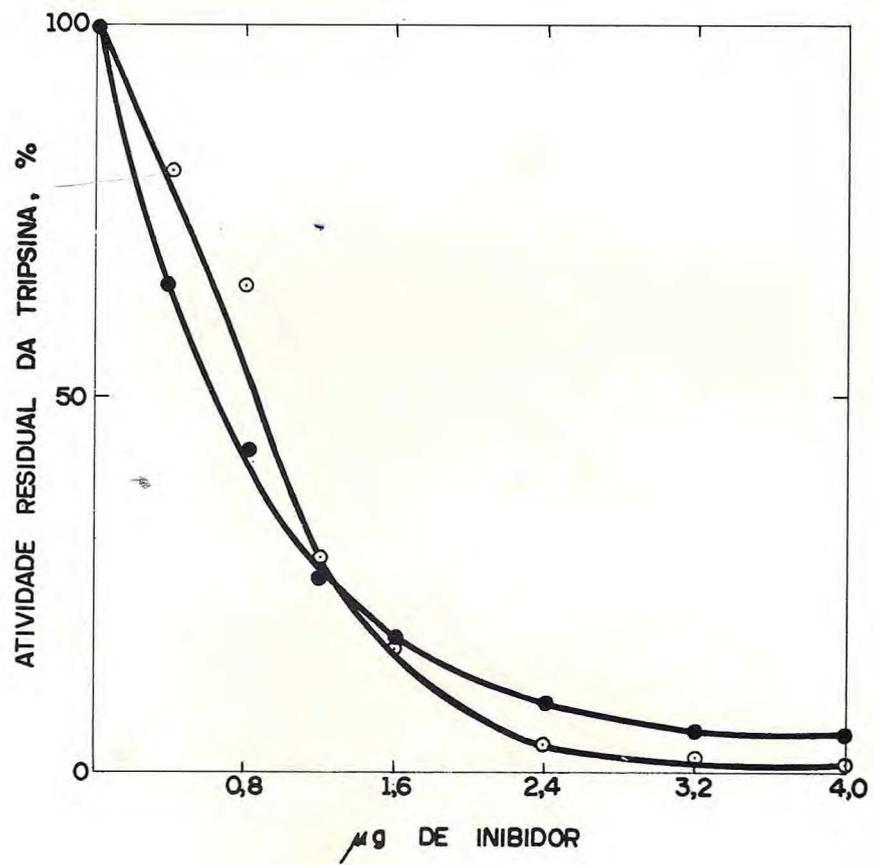


Figura 12 - Tratamento do inibidor com CHD. ●—●, inibidor com CHD; ○—○, inibidor sem CHD.

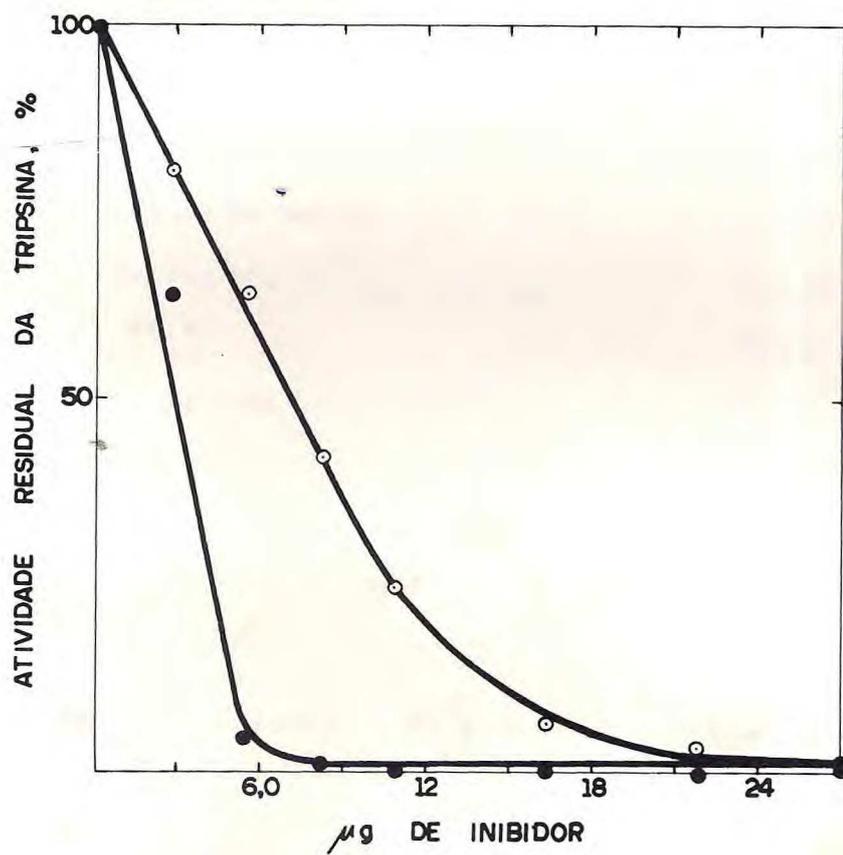


Figura 13 - Tratamento de SBTI com CHD. e—e, SBTI com CHD; ●—●, SBTI sem CHD.

T A B E L A IV

Propriedades do inibidor de tripsina (IT)

Atividade específica	1.676 UI/mg
Peso molecular, poliacrilamida/SDS	10.000 daltons
Peso molecular, Sephadex G-75 (pH 8,0)	19.910 daltons
Peso molecular, Sephadex G-75 (pH 2,4)	11.220 daltons
Peso molecular, estequiometria	11.040 daltons
Peso molecular, média*	10.520 daltons
Coeficiente de extinção molar	3.308
Coeficiente de extinção, $E_1^{1\%}$ cm, 280 nm	3,145
Fator Ótico, $F_{280 \text{ nm}}^1$ mg/ml	3,18
Grupamentos $-NH_2$ livres	7
Aminoácido no centro ativo	LISINA
Constante de dissociação do complexo tripsina-inibidor	$3,04 \times 10^{-9} \text{ M}$

* Peso molecular média entre o PM por eletroforese em SDS e o PM calculado por estequiometria.

IV. DISCUSSÃO

O inibidor de tripsina, objeto deste trabalho, assemelha-se, por suas propriedades (Tab. IV), à classe geral de inibidores de tripsina de baixo peso molecular, isolados de sementes de outras leguminosas. Para sua purificação foi utilizado o método clássico de cromatografia em troca iônica, obtendo-se um rendimento de, aproximadamente, 44 mg de IT/kg de farinha. Gennis e Cantor (16), trabalhando com sementes de *Vigna sinensis* var. Redbow, e utilizando cromatografia de afinidade, isolaram um inibidor de tripsina com um rendimento de 100 mg/kg de farinha. O inibidor isolado neste laboratório, de aproximadamente 10.000 daltons de peso molecular, aparentemente inibe apenas uma molécula de tripsina, enquanto o inibidor isolado por Gennis e Cantor, acima referido, apresentou peso molecular de, aproximadamente, 8.000 daltons, sendo do tipo "double-headed", ou seja: inibe duas moléculas de tripsina simultaneamente. Muitos outros inibidores de tripsina, de baixo peso molecular, encontrados em leguminosas, já foram isolados, destacando-se, entre estes, os de "lima bean", "mung bean", "navy bean", e o inibidor de Bowman Birk, de soja (2,5). Todos estes apresentam pesos moleculares em torno de 10.000 daltons, alto conteúdo de cistina e ausência de triptofano.

Aparentemente, os inibidores de leguminosas, quando inibem quimiotripsina, são do tipo "double-headed", pois geralmente inibem esta enzima e tripsina, simultaneamente. Outros, que inibem somente tripsina, podem também ser classificados como "double-headed", pois inibem duas moléculas de tripsina simultaneamente (16). Os resultados obtidos neste estudo parecem indicar que o inibidor de tripsina de *V. sinensis* cv. seridó inibe somente uma molécula de tripsina.

É interessante notar que, mesmo não afetando a atividade de quimiotripsina IT parece não ser afetado pela ação desta enzima, pelo menos nas condições utilizadas. Isto parece indicar mais uma vez a conformação rígida, característica que têm estas substâncias.

O espectro de absorção do inibidor puro na região do ultravioleta não apresentou máximo em 280 nm, indicando que o inibidor provavelmente não apresenta triptofano. Resultados semelhantes foram encontrados por Gennis e Cantor (36) para os inibidores isolados de *V. sinensis* var. Redbow. Estes autores sugerem que essa ausência de máximo em 280 nm seria devida à interferência de uma alta concentração de pontes dissulfeto na molécula (36). Esta alta concentração de grupos dissulfeto, característica da maior parte dos inibidores de proteases de vegetais, parece ser uma condição necessária à manutenção da estrutura compacta destas moléculas.

O inibidor, quando submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida de pH 8,1, mostrou-se heterogêneo, apresentando cinco bandas quando corado com negro de amido. Este resultado evidenciou a possibilidade desta proteína constituir um sistema associante, pois quando da segunda recromatografia em troca iônica o perfil obtido era nitidamente o de um sistema homogêneo. A presença de sistemas associantes tem sido comumente observada em outros inibidores de origem vegetal (7). Outra evidência em favor desta possibilidade foi obtida quando se tratou o inibidor por uréia 10 M durante 24 horas, a temperatura ambiente, e se analisou, por eletroforese em gel de poliacrilamida em uréia 8 M de pH 8,1, encontrando-se agora uma única banda corada. Em tratamentos com uréia por 1 e 12 horas, o inibidor ainda apresentou diversas bandas, sugerindo que o sistema associante só se desfaz após maior tempo de contacto com o agente desnaturante. Por eletroforese em gel de poliacri

lamida com SDS e β -ME, o inibidor, após redução por β -ME em presença de SDS, mostrou-se homogêneo e apresentou um peso molecular de 10.000 daltons, quando comparado a proteínas de peso molecular conhecido.

A partir das experiências de inibição (Fig. 9), foi calculado um peso molecular de 11.040 daltons para o inibidor. Este valor está de acordo com os valores encontrados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -ME. Por filtração em gel de dextrana (Sephadex G-75) em ácido fórmico 0,1 M, pH 2,4, foi obtido um peso molecular de 11.220 daltons para o inibidor (resultante da 1ª cromatografia em DEAE-celulose). Em pH alcalino, tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, esta mesma fração apresentou um peso molecular de 19.910 daltons. Estas experiências parecem confirmar que o inibidor pertence a um sistema as sociante e que este é dependente de pH. Esta associação, entre tanto, parece não depender de tempo, pois foram obtidos perfis semelhantes com 1, 24 e 48 horas de contacto do inibidor com os tampões. .

O número de grupamentos amino livres foi determinado pelo método de Habeeb (31), que utiliza o ácido trinitrobenzeno sulfônico tendo sido encontrado um valor correspondente a dois grupamentos amino livres, quando a leitura a 345 nm foi feita logo após a adição do reagente e usando-se o valor de $1,1 \times 10^4$ dado por Okuyama e Satake e citado por Haynes et al. (32) para o coeficiente de extinção molar de um grupamento tri nitrofenilamino. Para as leituras feitas após o tratamento com plete (ver métodos), foi encontrado um valor correspondente a sete grupamentos amino livres. Isto sugere que os cinco outros grupamentos amino livres, que foram detectados após o tratamento, ou estão no interior da molécula, não sendo portanto acces síveis ao reagente imediatamente após a adição deste, ou que estes grupamentos reagem mais lentamente com TNBS. Estes resulta dos parecem estar de acordo com a idéia de Huber (37,38,39),

de que os inibidores de tripsina têm uma forma de pêra com o sítio anti-tríptico exposto no ápice. Assim, os dois grupamentos inicialmente detectados seriam o grupamento do sítio ativo, de acordo com as sugestões de Ozawa e Laskowski (35), e o grupamento NH_2 terminal.

O inibidor quando tratado com TNBS teve sua atividade reduzida de cerca de 80% do valor calculado em relação a um controle não submetido a nenhum tratamento, e de 28% quando submetido somente a aquecimento a 40°C por duas horas. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de Ozawa e Laskowski (35), de que os inibidores de tripsina têm uma ligação susceptível a tripsina, do tipo Arg-X ou Lis-X, no seu centro ativo. Estes resultados parecem concordar também com os estudos de Haynes et al. (32), de que a capacidade de inibir tripsina é anulada por modificação dos resíduos de lisina com TNBS. O inibidor purificado, quando tratado com CHD, não teve sua atividade modificada, o que leva a acreditar ser este um inibidor do tipo lisina.

V. CONCLUSÕES

- 1) Um novo inibidor de tripsina foi isolado de sementes de *Vigna sinensis* cv. seridô, sob forma homogênea.
- 2) O inibidor isolado apresentou um peso molecular médio de aproximadamente 10.520 daltons.
- 3) Foi evidenciado que o inibidor provavelmente pertence a um sistema associante ácido dependente. A associação parece ser do tipo dimeros = monômeros.
- 4) O inibidor não apresentou máximo em 280 nm. O coeficiente de extinção molar calculado foi 3308.
- 5) O inibidor foi classificado como sendo do tipo lisina, desde que teve sua atividade marcadamente reduzida por tratamento com ácido trinitrobenzeno sulfônico e não apresentou nenhuma modificação no tratamento com 1,2 ciclo hexanodiona.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1 - Vogel, R., Trautschold, I. and Werle, E. 1968. Natural Proteinase Inhibitors. Academic Press, New York.
- 2 - Pusztai, A. 1968. General properties of a protease inhibitor from the seeds of Kidney bean. European J. Biochem. 5, 252-259.
- 3 - Wilson, K.A. and Laskowski, M. Sr. 1973. Isolation of three iso-inhibitors of trypsin from Garden bean, *Phaseolus vulgaris*, having either lysine or arginine at the reactive site. J. Biol. Chem. 248, 756-762.
- 4 - Laskowski, M. and Laskowski, Jr., M. 1954. Naturally occurring trypsin inhibitors in Adv. Prot. Chem. (C. Anfinsen, M. Anson, K. Barley, and J. Edsall, Eds.), Vol. 9, pp. 203-242, Academic Press, New York.
- 5 - Liener, L.E. and Kakade, M.L. 1969. Protease Inhibitors in Toxic Constituents of Plant Foodstuffs (I. E. Liener, ed.), pp. 7-68, Academic Press, New York.
- 6 - Royer, A. 1975. Inhibiteurs d'enzymes protéolytiques et protéases des graines in Les Protéines des Graines (J. Miège, ed.), pp. 159-201. Genève.
- 7 - Ryan, C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants in Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 173-196.
- 8 - Xavier Filho, J. 1973. Trypsin inhibitors during germination of *Vigna sinensis* seeds. Physiol. Plant. 28, 149-154.
- 9 - Belitz, H.D., Kaiser, K.P. and Santarius, K. 1971. Trypsin and α -chymotrypsin inhibitors from potatoes: isolation and some properties. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 420-427.

- 10 - Iwasaki, T., Kiyohara, T. and Yoshikawa, M. 1971. Purification and partial characterization of two different types of proteinase inhibitors (inhibitors II-a and II-b) from potatoes. *J. Biochem.*, 70, 817-826.
- 11 - Melville, J.C. and Ryan, C.A. 1972. Chymotrypsin inhibitor I from potatoes. Large scale preparation and characterization of its subunit components. *J. Biol. Chem.* 247, 3445-3453.
- 12 - Haynes, R. and Feeney, R.E. 1967. Fractionation and properties of trypsin and chymotrypsin inhibitors from Lima bean. *J. Biol. Chem.* 242, 5378-5385.
- 13 - Frattali, V. 1969. Soybean inhibitors III. Properties of a low molecular weight soybean proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 224, 274-280.
- 14 - Pusztai, A. 1967. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. *Nutr. Abstr. Rev.* 37, 1-9.
- 15 - Ventura, M.M. and Xavier Filho, J. 1966. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization. *Ann. Acad. Brasil. Sci.* 38, 553-566.
- 16 - Gennis, L.S. and Cantor, C.R. 1976. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. I. Purification of two new protease inhibitors and the endogeneous protease by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 251, 734-740.
- 17 - Royer, A., Miège, M.N., Grange, A., Miège, J. et Mascherpa, J.M. 1974. Inhibiteurs anti-trypsine et activités protéolytiques des albumines de graine de *Vigna unguiculata*. *Planta* 119, 1-16.

- 18 - Royer, A. 1975. Activites proteolytiques et anti-trypsine des graines de *Vigna unguiculata*: repartition et interaction. *Phytochemistry*, 14, 915-919.
- 19 - Dechary, J.M. 1970. Seed proteases and protease inhibitors. *Econ. Bot.* 24, 113-122.
- 20 - Goa, J. 1953. A microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5, 218-222.
- 21 - Domont, G.B., citado em 27.
- 22 - Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- 23 - Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 24 - Laskowski, M. 1955. Chymotrypsinogens and chymotrypsins in *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick and N.O. Kaplan) Vol. II, pp. 8-26, Academic Press, New York.
- 25 - Xavier-Filho, J. 1974. Trypsin inhibitors in sorghum grain. *J. Food Sci.*, 39, 422-423.
- 26 - Clarke, J.T. 1964. Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 428-436.
- 27 - Xavier Filho, J. 1969. Ação do calor sobre o inibidor trípico de soja no estado sólido. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 28 - Weber, K. and Osborn, M. 1964. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- 29 - Sephadex-gel filtration in theory and practice. 1968. Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden.

- 30 - Determann, H. and Michel, W. 1966. The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. *J. Chromatog.* 25, 303-313.
- 31 - Habeed, A.F.S.A. 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, 14, 328-336.
- 32 - Haynes, R., Osuga, D.T. and Feeney, R.E. 1967. Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Biochemistry*, 6, 541-547.
- 33 - Liu, W.H., Feinstein, G., Osuga, D.T., Haynes, R. and Feeney, R.E. 1968. Modification of arginines in trypsin inhibitors by 1,2 cyclohexanedione. *Biochemistry*, 7, 2886-2892.
- 34 - Laskowski, Jr., M. and Sealock, R.W. 1971. Protein proteinase inhibitors-molecular aspects in *The enzymes* (P.D. Boyer eds.), 3rd ed., Vol. 3, pp. 375-473, Academic Press, New York.
- 35 - Ozawa, K. and Laskowski Jr., M. 1966. The reactive site of trypsin inhibitors. *J. Biol. Chem.* 241, 3955-3961.
- 36 - Gennis, L.S. and Cantor, C.R. 1976. Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. II. Structural studies by optical absorption and circular dichroism. *J. Biol. Chem.* 251, 741-746.
- 37 - Huber, R. 1972. Interaction between chymotrypsin (trypsin) and the pancreatic trypsin inhibitor (Kallikrein inactivator) in *Protein-protein Interactions* (R. Jaenicke and E. Helmreich, eds.) pp. 111-128, New York.
- 38 - Huber, R. Kukla, D., Ruhlmann, A., Steigemann, W. 1971. The atomic structure of the basic trypsin inhibitor of bovine organs (Kallikrein inactivator) in *Proceedings of the International Research Conference on proteinase*

inhibitors, (H. Fritz and H. Tschesche, eds.) pp. 56-67, Walter de Gruyter, Berlin.

- 39 - Krahn, J., Stevens, F.C. 1972. Antitrypsin site of Lima bean protease inhibitor, *Biochemistry*, 11, 1804-1808.